

BP-71

METODOLOGIA PARA LA PROPAGACIÓN DE LAUREL (*Cordia alliodora*) EN LA MICROREGION SUR DE MANABI, ECUADOR COMO CONTRIBUCIÓN A UN PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO.

Ing. Blanca Indacochea Ganchozo¹, Ms.Ca. Dr.C. Maurilio García², Dr.C. Rogelio Sotolongo³

¹ Ingeniero Forestal, Docente principal Titular, Universidad Estatal del Sur de Manabí, Ecuador, blancaindacochea@hotmail.com

² Dr., Docente principal Titular, Universidad Pinar del Rio-Cuba
garcia@af.upr.edu.cu

³ Dr., Docente principal Titular, Universidad Pinar del Rio-Cuba
E-m soto@af.upr.edu.cu

RESUMEN

El árbol de Laurel *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Okén, pertenece a la familia Boragináceae, es una especie con un doble propósito, la explotación comercial y la posibilidad de mejorar el medio ambiente debido a su aporte de nutrientes y a su vinculación con sistemas silvopastoriles; es además una especie utilizada para recuperar zonas degradadas y utilizadas en la reforestación de bosques que han sido afectados por la tala indiscriminada. La aplicación de técnicas de micropropagación en especies forestales ha constituido una alternativa útil para aumentar el establecimiento de plantaciones. No obstante, la desinfección de explantes en este tipo de especies ha sido una de las limitantes para el establecimiento *in vitro*, debido a la presencia de contaminantes que afectan el desempeño de estos bajo estas condiciones; haciendo indispensable el uso de protocolos de desinfección que permitan la disminución en la aparición de agentes contaminantes. El objetivo de la presente investigación consistió en establecer los métodos de desinfección adecuados que permitan iniciar el cultivo "*in vitro*" partiendo de yemas apicales y axilares de Laurel (*Cordia alliodora*), se usaron plantas de invernadero sometidas a un tratamiento fitosanitario previo. Se valoraron varios procedimientos en las etapas de desinfección, establecimiento y multiplicación.

La investigación se desarrolló durante el año 2011, en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Estatal del sur de Manabí, ubicado en la Provincia de Manabí, Cantón Jipijapa, Parroquia Jipijapa, a una altitud de Altitud: 300 msnm.

El trabajo comprendió dos partes. En la primera se determinó el Protocolo de desinfección para segmentos de yemas axilares.

- Jabón líquido en una solución de 50ml/litro, durante 30 minutos.
- Se colocaron los segmentos de yemas axilares en ácido ascórbico 3%, se enjuago 3 veces con agua estéril.
- Con detergente se enjuago en un tiempo de agitación 10 minutos y luego se enjuago 5 veces con agua estéril.
- Fungicida Cobre Nordox 0,5% 1g/l con un tiempo de agitación 15 minutos y se enjuago 1 vez con agua estéril.
- Se aplicó tejo 1% + agua estéril con tiempo en agitación 15 minutos y se enjuago 1 vez con agua estéril.
- En etanol 70% durante 30 segundo tiempo 5 minutos NAOCl 20% + 5 gotas de tween durante un tiempo de 2 minutos, se enjuago. 3 veces con agua estéril.
- Se sumergieron los segmentos de yemas apicales en Cobre Nordox 0,5% a una concentración de 1 g/litro, durante 15 minutos.
- Los segmentos de tallo fueron lavados tres veces, por dos minutos, con agua estéril.

En la segunda parte, se probaron seis tratamientos en dosis combinadas de la auxina ácido Indoacético (AIA) y la citoquinina 6-bencilaminopurina (BAP) en diferentes concentraciones incluyendo el testigo sin fitohormonas. Se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA) para evaluar las variables: longitud de la yema y porcentaje de sobrevivencia y el Diseño Bloques Completos al Azar (DBCA) para la variable número de tubos contaminados. Se realizaron diez repeticiones y cuatro tubos de ensayo por unidad experimental. Cuando se encontraron diferencias significativas se utilizó la prueba de Tukey al 5%.

Los segmentos de yemas preparados dentro de la cámara de flujo laminar, se insertaron en medio de cultivo; los tubos de ensayo se sellaron con papel de aluminio y se trasladaron al cuarto de crecimiento con una humedad relativa del 50% y una temperatura de 23°C, con un fotoperiodo de 13 horas luz y 11 horas de oscuridad.

El ADEVA detectó diferencias significativas al 1% en la variable Número de tubos contaminados debidas a bloques (días). Al no encontrar diferencias entre tratamientos, se concluyó que los componentes del medio no influyen en la contaminación. En la variable Longitud de yemas se detectaron diferencias significativas atribuidas a tratamientos. C4 (2.5mg/l BAP x 1.mg/l AIA) alcanzó la media más alta con 1,34cm de longitud y la presencia de raíces, obteniéndose de esta forma una vitro-planta completa. En cuanto a la Sobrevivencia de los segmentos yemas axilares, no se detectaron diferencias significativas. C4 obtuvo el 99.99% de sobrevivencia.

Se recomienda utilizar el Protocolo de desinfección desarrollado, para estudios de multiplicación in vitro de *Cordia alliodora*; probar la longitud de los segmentos de yemas

axilares para el proceso de incubación; evaluar el comportamiento de la vitro-planta en las fases de micropropagación y acondicionamiento *ex vitro*; y, asegurar la idoneidad del material a utilizar, mediante la ejecución de un programa de desinfección de plantas madre.

Palabras clave: *Cordia alliodora*, explantes, yemas apicales y axilares, protocolo de desinfección cultivo " *in vitro*".

INTRODUCCIÓN

El Ecuador ha planteado implementar y ejecutar un plan nacional de forestación y reforestación que contempla plantaciones para la protección y conservación de sistemas agroforestales y plantaciones comerciales e industriales con el fin de convertir al Ecuador en una potencia forestal. Una de las especies seleccionadas: *Cordia alliodora*, nativa de la región, tienen un alto uso y valor comercial, es de crecimiento rápido y el objetivo del programa es utilizar material genético de origen certificado, que garantice la calidad de los productos maderables y certificar la propagación con grado de calidad genética comprobado. (Cevallos G, Vítores Pérez M, 2009)

Actualmente la atención está centralizada en aprovechar la ventaja que presenta la metodología de propagación rápida mediante el cultivo de tejidos. La micropropagación *in vitro* es una técnica del cultivo de tejidos vegetales que consiste en la multiplicación de plántulas a partir de ápices meristemáticos en un medio nutritivo artificial. Luego, mediante la adición de reguladores del crecimiento al medio de cultivo, se estimula la multiplicación y obtención de plantas completas debido a la totipotencia de las células vegetales. Una de las principales aplicaciones de esta técnica es la obtención de plántulas uniformes, libres de enfermedades y con una mayor tasa de producción de plantas por unidad de tiempo (Álvarez, 1994).

La propagación vegetativa se ha aplicado en varias especies para incrementar la productividad y resolver problemas con la semilla o de la producción y puede realizarse a través de varias técnicas entre las que se encuentra el cultivo de tejidos. Dentro de esta metodología, la micropropagación ha sido la más difundida y con aplicaciones prácticas comprobadas, la que a pesar de ser una técnica recientemente aplicada a la rama forestal, se ha insertado en los programas de mejoramiento para la propagación de clones a alto valor genético (Zobel, 1993; Kijkar, 1995; Aloisio y Comerio, 1997) Citado por García, 2000.

Cordia alliodora (Ruiz & Pav.) Oken (1833), de la Familia Boraginácea, es una de las especies más cultivadas en plantaciones forestales en el mundo y especialmente en el trópico, es de rápido crecimiento y su madera es altamente cotizada en el mercado, el poder de rebrotar es típico de muchas especies de esta familia, su propagación es asexual y sexual, se encuentra en zonas de litoral húmedo, subhúmedo y secos en su hábitat natural. (Boshier y Lamb 1997).

El cultivo in vitro se perfila como una serie de técnicas alternativas para la reproducción de Laurel *Cordiaalliodora* bajo condiciones asépticas controladas. La propagación masiva in vitro de *Cordiaalliodora*, ya sea por medio de semillas o tejidos, produce altos niveles de multiplicación en períodos de tiempo cortos, además asegura la sanidad del material en multiplicación. Por lo tanto, el cultivo in vitro se perfila como una respuesta alternativa para el problema de las especies en peligro de extinción y en el mantenimiento de híbridos de gran valor.

conociendo esta realidad el presente trabajo tuvo la finalidad de contribuir con un aporte investigativo y científico cuyo propósito fue establecer una Metodología para la Propagación de *Cordiaalliodora* en la Micro región Sur de Manabí, Ecuador como contribución a un programa de mejoramiento genético.

Objetivo General:

Establecer una metodología para la propagación vegetativa de la especies *Cordiaalliodora*, que permita multiplicar genotipos seleccionados mediante un programa de mejora genética en la Micro región Sur de Manabí.

Objetivos Específicos.

- Establecer las condiciones adecuadas para lograr el enraizamiento y desarrollo de esquejes de las especies *Cordiaalliodora*.
- Establecer los métodos de desinfección adecuados que permitan iniciar el cultivo "in vitro" partiendo de explantes vegetativos y semillas tomados de árboles crecidos en el campo.
- Optimizar los medios de cultivos, balances hormonales, uso de bioactivos y condiciones físicas para la multiplicación, desarrollo y enraizamiento "in vitro" de las especies *Cordiaalliodora*.
- Determinar las condiciones adecuadas que permitan aclimatar las vitroplantas de *Cordiaalliodora*.
- Validar la metodología propuesta para propagar genotipos seleccionados de *Cordiaalliodora*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del ensayo

La fase de laboratorio se realizó en las instalaciones del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, de la Universidad Estatal del Sur de Manabí, ubicada en la parroquia Jipijapa, cantón Jipijapa, provincia de Manabí.

Material Vegetal

Se utilizaron como fuente yemas apicales, de Laurel *Cordia alliodora*, provenientes del invernadero el "ANGEL", ubicado en la carretera vía al cantón Santana, tomando en cuenta factores como: condiciones fitosanitarias y fisiológicas

Cultivo in vitro

Yemas apicales y desinfección

Se utilizaron como explantes yemas axilares entre (3cm de longitud) vigorosos y vegetativos con una yema axilar.

El proceso de desinfección del material vegetal fue el siguiente:

- Los segmentos de yemas axilares fueron lavados y sumergidos con agua corriente y jabón líquido en una solución de 50ml/litro, durante 30 minutos.
- Se colocaron los segmentos de yemas axilares en ácido ascórbico 3%, se enjuagó 3 veces con agua estéril.
- Con detergente se enjuagó en un tiempo de agitación 10 minutos y luego se enjuagó 5 veces con agua estéril.
- Fungicida Cobre Nordox 0,5% 1g/l con un tiempo de agitación 15 minutos y se enjuagó 1 vez con agua estéril.
- Se aplicó tecto 1% + agua estéril con tiempo en agitación 15 minutos y se enjuagó 1 vez con agua estéril.
- En etanol 70% durante 30 segundos tiempo 5 minutos NAOCl 20% + 5 gotas de tween durante un tiempo de 2 minutos, se enjuagó 3 veces con agua estéril.
- Se sumergieron los segmentos de yemas apicales en Cobre Nordox 0,5% a una concentración de 1 g/litro, durante 15 minutos.
- Los segmentos de tallo fueron lavados tres veces, por dos minutos, con agua estéril.

a) Desinfección de los segmentos de yemas axilares y obtención de yemas axilares de cordia alliodora.

- Los segmentos de yemas axilares fueron sumergidos por un minuto en cloro 10% 30 minutos se agitó ocasionalmente y se enjuagó tres veces con agua estéril.
- Los segmentos de yemas axilares se colocaron en bicloruro de aluminio 0.05 % durante 5 minutos se agitó ocasionalmente y se enjuagó tres veces con agua estéril durante tres minutos.
- Se realizó un corte transversal utilizando la parte media del segmento de yemas axilares, para obtener un segmento nodal con su respectiva yema en estado latente, en una longitud 2cm a partir del entrenudo a cada lado, para evitar su deterioro.

Diseño Experimental

Los datos se analizaron aplicando Análisis de la Varianza a un criterio de clasificación (diseño completamente al azar), para todas las variables a excepción de la variable número de tubos contaminados. Los tratamientos contenían diferentes dosis de Sacarosa 30 g/l Vitaminas Gamborg Cisteinam25 mg/L 6-bencilaminopurina (BAP) 0.5concentración (mg/L) y AIA ácidoindoacético (AIA) excepto el testigo. Se utilizaron seis tratamientos, diez repeticiones, cuatro tubos por unidad experimental. La prueba de tukey al 5% fue aplicada en el caso de encontrar diferencias significativas y DMS al 5% para la variable número de tubos contaminados. Las variables analizadas fueron: numero de tubos contaminados, longitud de yema Y sobrevivencia.

Preparación de Medios de Cultivo

- Se preparó medio MurashigeSkoog (MS), 200ml para cada tratamiento utilizando los seis stocks, sacarosa y agar.
- Se adicionó las fitohormonas; ácidoindoacético (AIA) y 6-Bencilaminopurina (BAP) en dosis diferentes excepto el testigo. (Cuadro 1).
- Se reguló el pH a 5.5 con ácido sulfúrico (H₂SO₄) en una concentración de 0,0001ppm, e hidróxido de Sodio (NaOH) en la misma concentración.
- El medio de cultivo fue calentado para luego adicionar sacarosa a una concentración de 30gr/
- El medio de cultivo se repartió en 40 tubos de ensayo 5ml/tubo.
- Los tubos de ensayo se sellaron con papel aluminio y se colocaron en la estufa para su esterilización en el autoclave a 15 libras de presión durante quince minutos.
- Los tubos de ensayo fueron llevados a la almacén de medios cultivos durante una hora previo a su utilización.
- Los segmentos nodales de yemas de axilares se colocaron en medio de cultvo.
- Los tubos de ensayo se sellaron con el fin de evitar contaminación y deshidratación de los segmentos nodales.
- Los tubos fueron trasladados al cuarto de crecimiento con una humedad relativa del 50% y una temperatura de 23°C, con un fotoperiodo de 13 horas luz y 11 horas de oscuridad.

Preparación de Medios de Cultivo

MS	Nombre de reactivo	Formulación	Concentración mg/L	Stock Mg/L
----	--------------------	-------------	--------------------	------------

Macros 500 mL Tomar 25 mL	Ammoniumnitrate	NH ₄ NO ₃	1650	33000
	Potassiumnitrate	KNO ₃	1900	38000
	Magnesium sulfate	MgSO ₄	180.7	3614
	Potassiumphosphatemonobasic	MnSO ₄ .H ₂ O	170	3400
Micros 200 mL Tomar 10 mL	Boricacid	H ₃ Bo ₃	6.2	124
	Manganese sulfate • H ₂ O	MnSO ₄ .H ₂ O	16.9	338
	Zinc sulfate • 7H ₂ O	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	172
	Molybdic acid (sodium salt) • 2H ₂ O	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	5
	Cupric sulfate • 5H ₂ O	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.5
	Cobalt chloride • 6H ₂ O	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.5
CaCl₂ - 200 mL / 10 mL	Calcium chloride anhydrous	CaCl ₂	332.2	6644
Fe-EDTA - 200 mL / 10 mL	Na ₂ -EDTA	Na ₂ -EDTA	37.26	745.2
	Ferrous sulfate • 7H ₂ O	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	556
KI - 200 mL / 10 mL	Potassium iodide	KI	0.83	16.6
VitaminasGamborg 200 mL / 10 mL	Inositol		100	2000
	Ácidonicotínico		1	20
	Piridoxina	Hcl	1	20
	Tiamina	Hcl	10	200

Dosis de BAP y AIA

TRATAMIENTOS	BAP versus AIA
C1	0* x 0*
C2	0.5* x 0.3*
C3	1.5* x 0.3*
C4	2.5* x 1.5*
C5	3* x 0*
C6	0.5* x 0.1*

*mg/l

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EFFECTO DE LA CITOQUININA 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) Y LA AUXINA ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA) EN LA FASE DE INTRODUCCIÓN

Número de Tubos contaminados.

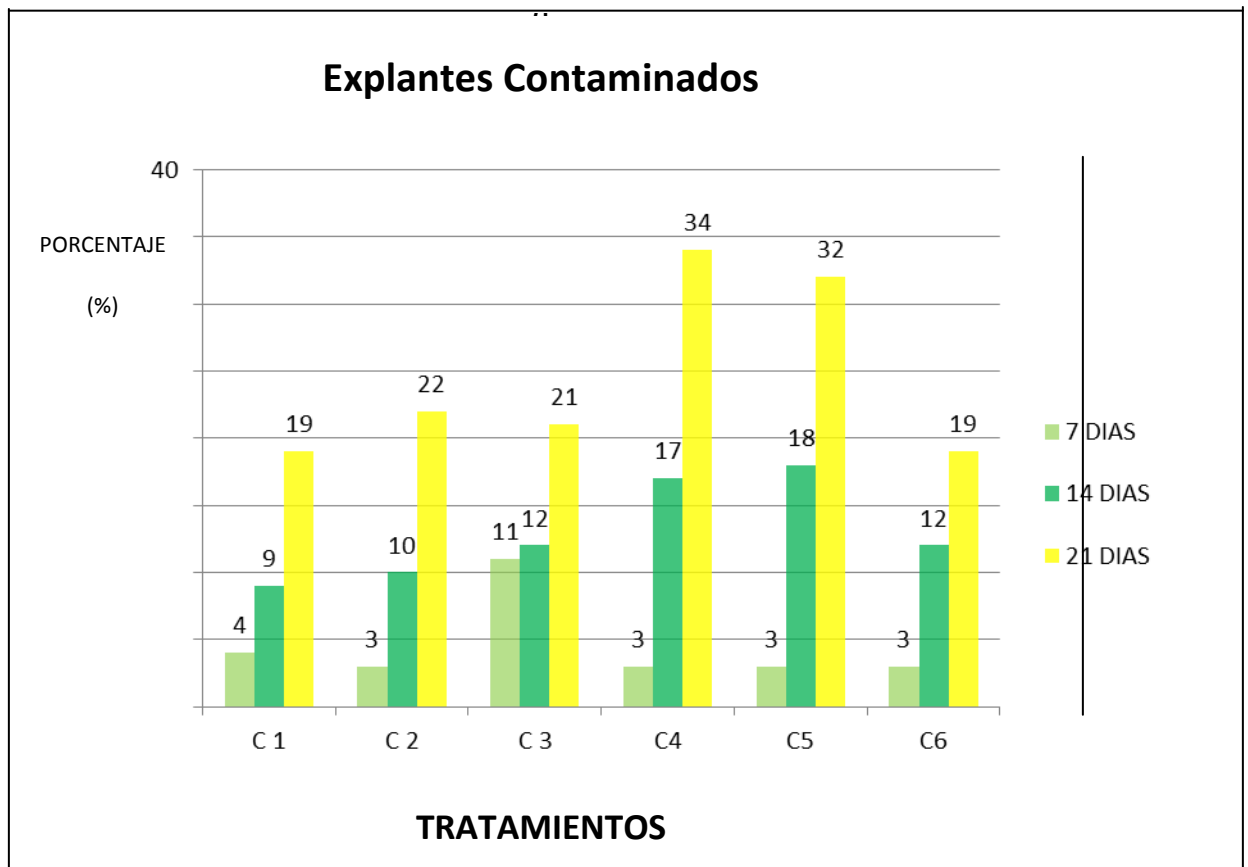
El análisis de varianza, determinó que existe una diferencia significativa al 1% para días. No se detectaron diferencias significativas para tratamientos, por lo que se asume que los componentes de cada formulación no influyeron en la contaminación de los segmentos nodales. El coeficiente de variación fue del 30%.

Prueba de significación de DMS al 5% para días.

DÍAS	MEDIAS	RANGOS
21	9.7	A
14	5.20	B
7	1.70	C

La prueba DMS al 5% para tratamientos detectó la presencia de tres rangos. En el primer rango se ubicó los 21 días, en el segundo los 14 días y en el tercero los 7 días en que fueron evaluados el número de tubos contaminados.

Esto permite señalar que a medida que transcurre el tiempo, también se incrementa el número de tubos contaminados. Básicamente, hasta el momento se puede afirmar que la contaminación fue causada por hongos y bacterias pues se evidenció la presencia de los dos esta contaminación estaría atribuida a que el material vegetal empieza a necrosarse en la cicatriz de corte, sitio en el cual se observó la contaminación.



Porcentaje de contaminación a los 7, 14 y 21 días en segmentos de yemas axilares de *Cordia alliodora*.

Longitud de yemas

TRATAMIENTOS	MEDIAS
C1	1.16
C2	1.23
C3	1.26
C4	1.34
C5	1.27
C6	1.20

En el análisis de varianza detectó que existen diferencias significativas al 1% entre tratamientos. El coeficiente de variación fue del 8.29%. El promedio de longitud del brote desarrollado a partir de la yema fue de 1.26cm.

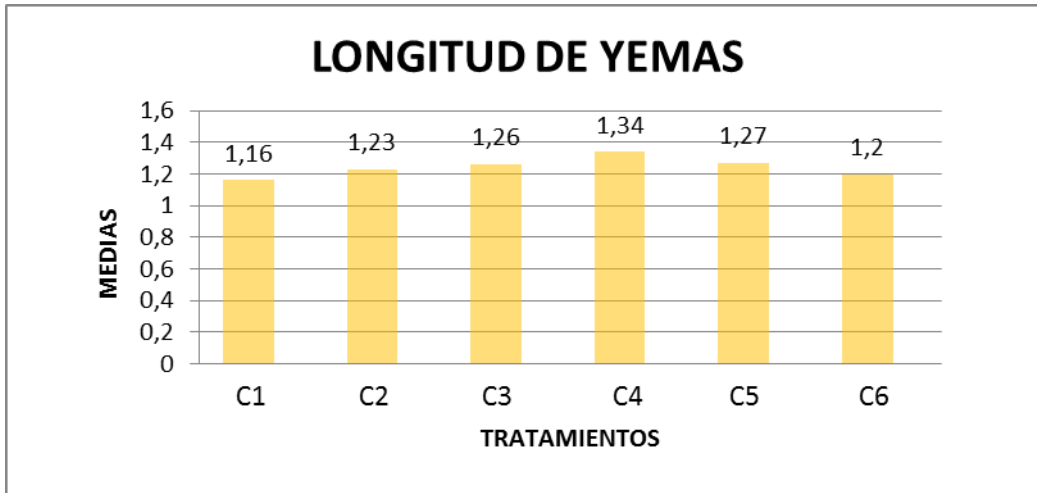
Prueba de Tukey al 5% para longitud de yemas

TRATAMIENTOS	MEDIAS	RANGOS
C4	1.34	A
C5	1.27	AB
C3	1.26	AB
C2	1.23	AB
C6	1.20	AB
C1	1.16	B

prueba de Tukey al 5% para tratamientos detectó la presencia de dos rangos. Siendo los tratamientos que ocupan el primer rango C4, C5, C3, C2 y C6, los que desarrollaron una mayor longitud de yema en relación al C1 que ocupa el segundo rango.

El desarrollo de las yemas en los segmentos nodales fue evidente a los 14 días de haber sido tratados con reguladores de crecimiento. Se observó un mayor desarrollo de yemas en el C4 en concentraciones de 2.5mg/litro de BAP y 1.5mg/litro de AIA que alcanzó un promedio de 1.34cm de longitud. Esto concuerda con lo encontrado por (Murashige, T. y Skoog, F. A 1962) quienes reportaron un mayor crecimiento de yemas a concentraciones combinadas para el establecimiento y la multiplicación se empleó el medio de Murashige y Skoog semisólido modificado, suplementado con AIA 3 mg.L-1 + 6-BAP 4 mg.L-1 (establecimiento) y con AIA 0.65 mg.L-1 + 6-BAP 4 mg.L-1 (multiplicación). Tobacco, usando segmentos nodales como explantes.

Se hace evidente que existe una interacción de las fitohormonas utilizadas con la capacidad de absorción de los tejidos por difusión, observación que ya fuera señalada por Izquierdo, H. et al, (2002), quien trabajando con segmentos nodales de *Allium sativum* L, expuestos a diferentes concentraciones de BAP y AIA, observó un desarrollo de yemas distinto para cada formulación, siendo capaz de sustituirla con resultados superiores.



Medias para la longitud de yemas cordia alliodora

Sobrevivencia

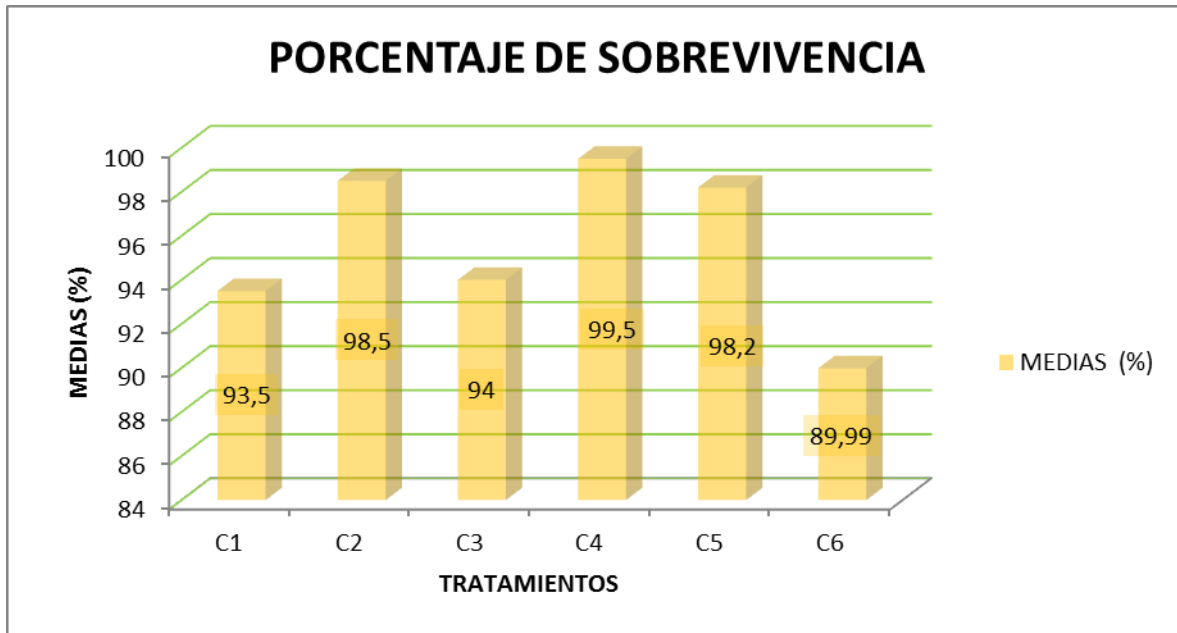
Porcentaje de sobrevivencia en la Fase de Introducción

TRATAMIENTOS	MEDIAS (%)
C1	93.5
C2	98.5
C3	94.0
C4	99.5
C5	98.2
C6	89.99

En el análisis de varianza determina que no existen diferencias significativas entre tratamientos por lo que se considera que no hay influencia de los componentes de los tratamientos en el porcentaje de sobrevivencia. El coeficiente de variación fue del 10.99%.

A pesar de que T4 fue el tratamiento con mayor porcentaje de contaminación, alcanzó el 99.99% de sobrevivencia. Se puede afirmar que la contaminación, al estar presente en tejido necrosado de la cicatriz de corte ubicada fuera del medio no afectó a la yema en crecimiento ubicada en la parte central del segmento nodal, que se desarrolló

normalmente, mientras que, en los trabajos realizados por Recalde C, (2000), la alta tasa de contaminación se puede atribuir a tres aspectos importantes: mal manejo de la planta donante o planta madre, probabilidad de que existan agentes endógenos que no son fácilmente eliminados con una desinfección superficial y a la posición rastrera que tiene la planta.



Porcentajes de supervivencia de los segmentos nodales a los 30 días de duración de la Fase de Introducción

CONCLUSIONES

El tratamiento fitosanitario aplicado a las plántulas de *cordia alliodora* previa su introducción es determinante para reducir la contaminación en condiciones *in vitro*; la aplicación de 10 gramo/l de óxido cuproso con aplicaciones cada tres días.

Las dos fitohormonas utilizadas en la fase de introducción de *Cordia alliodora*., bajo condiciones *in vitro* promovieron el crecimiento de las yemas en estado latente consiguiendo consigo la formación de una vitro-planta completa con la formación de raíces.

En cuanto al número de tubos contaminados el C6 obtuvo el menor porcentaje de contaminación en relación de los demás tratamientos, debido a que no existió necrosamiento en la cicatriz de corte, sitio donde se presentó la contaminación por hongos y bacterias en los demás tratamientos.

Se logró la mayor longitud de yemas con 2.5mg/l de 6- Benzilaminopurina (BAP) y 1.0mg/l de Ácido Indolacético (AIA), correspondientes a C4 a pesar que fue el tratamiento que presentó mayor contaminación con esto se concluye que la contaminación de los segmentos nodales no influye en su desarrollo, cuando esta no sea proveniente del medio o por una mala desinfección de los segmentos nodales, además se alcanzó un desarrollo de raíces consiguiendo la formación de una vitroplanta completa.

La mejor dosis de 6 – bencil amino purina (BAP) utilizada en la etapa de inducción fue la de 2.5 mg/L y 1.0mg/l de Ácido Indolacético (AIA), que fue la adecuada para regenerar brotes en los explantes de cordiaalliodora.

En lo que respecta a la variable porcentaje de sobrevivencia, no se detectaron diferencias significativas, pero cabe recalcar que el tratamiento C4 alcanzó el 99.99% de sobrevivencia al final de la Fase de Introducción.

RECOMENDACIONES

Para futuras investigaciones acerca de cultivo in vitro de Cordia alliodora se recomienda lo siguiente:

- En el establecimiento aséptico de las yemas de cordia alliodora la mejor respuestas se obtuvo en el tratamientos de yemas axilares lavados y sumergidos con agua corriente y jabón líquido en una solución de 50ml/litro, durante 30 minutos, Se colocaron los segmentos de yemas axilares en ácido ascórbico 3%, se enjuago 3 veces con agua estéril, con detergente se enjuago en un tiempo de agitación 10 minutos y luego se enjuago 5 veces con agua estéril. Se aplico Fungicida Cobre Nordox 0,5% 1g/l con un tiempo de agitación 15 minutos y se enjuago 1 vez con agua estéril, luego se aplicó tegró 1% + agua estéril con tiempo en agitación 15 minutos y se enjuago 1 vez con agua estéril se aplico etanol 70% tiempo 5 minutos, NAOCl 20% + 5 gotas de tween tiempo de 2 minutos, luego se enjuago 3 veces con agua estéril y se sumergieron los segmentos de yemas axilares en Cobre Nordox 0,5% a una concentración de 1 g/litro, durante 15 minutos, es el tratamiento óptimo para la desinfección de los explantes de cordia alliodora en la fase de establecimiento del cultivo porque es el tratamiento con el cual se obtuvieron el mayor número de explantes sanos, vivos y libres de contaminantes exógenos.
- Se recomienda prolongar el tratamiento fitosanitario previo a la introducción *in vitro* de las yemas axilares de cordiaalliodora, usando concentraciones altas de fungicida y además el uso de un fungicida sistémico.
- Transferir los segmentos nodales antes de los treinta días para evitar la contaminación en la cicatriz de corte.

- Realizar la preparación de las plantas madre por lo menos tres meses dentro de un ambiente adecuado, para que no existan problemas al momento de introducir el material vegetal al cultivo in-vitro, para lo cual se necesita un invernadero con acceso restringido y con riego localizado para cada planta y realizar la aplicación de fungicidas sistémicos para aumentar las probabilidades de éxito en la Fase de Introducción.
- Probar con dosis intermedias de las Fitohormonas 6-Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Indolacético (AIA) y comparar con los resultados ya obtenidos.
- Para obtener el mayor índice de propagación en la fase de multiplicación de cordia alliodora es necesario cultivar los brotes en un medio de cultivo que contenga como base en su composición las sales minerales de Murashige y Skoog (MS, 1962), suplementados con 30 g/L sacarosa, 0.1 ppm AIA y 2.5 ppm BAP, que corresponde al tratamiento C 4 en esta investigación.
- Se recomienda hacer un seguimiento de la preparación de la planta madre o planta donante en el invernadero, evaluando el programa de fumigación y fertilización que se aplica.
- Los explantes, que se sembraron en el medio de cultivo y que presentaron crecimiento de hongos y bacterias, si es posible se recomienda desinfectarlos nuevamente y volverlos a sembrar en un medio de cultivo limpio para evitar una excesiva pérdida de los explantes en la fase de establecimiento del cultivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Álvarez, 1994. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y Aplicaciones.
2. Boshier, D.H., Lamb, A.T. 1997. *Cordia alliodora*: genética y mejoramiento de árboles. Tropical Forestry Papers no. 36. Oxford Forestry Institute, Oxford, UK. 100 pp.
3. CBD 2000. Cartagena Protocol on Biosafety. Convention on Biological Diversity. Available on the Internet at. <http://www.biodiv.org/biosafe/Protocol/Protocol.html>.
4. Censo Agropecuario. 2000. "Resumen del Plan de Desarrollo de la Provincia de Manabí"- Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo. Manabí –Ecuador.
5. Cevallos G, Víctores Pérez M, 2000. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y Aplicaciones.
6. Corporación Forestal de Manejo Sustentable. (CEMAFORS) - PANAROMA Forestal Ecuatoriano. 2008.
7. Diagnóstico de la Subsecretaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería-Portoviejo 2004.
8. Farina, G. H. 2003. Desarrollo de Técnicas Biotecnológicas de Producción Vegetal. Empresa Bioext S.A. Proyecto FONTAR, Quilmes, Prov. de Buenos Aires. Disponible en: www.bioext.com. [Consulta: 25 de marzo del 2009].
9. García López, M. 2000. "Propagación clonal" in vitro de *Eucalyptus salignum*. Pinar del Río. 120 h. Tesis (en opción al grado científico de doctor en Ciencias Forestales). Ministerio de Educación Superior.
10. ITTO 2001. International Tropical Timber Organization. Plan Action 1998.
11. Izquierdo, H.; Quiñones, Y.; Disotuar, R.; Pedroso, D.; Núñez, M. y Rodríguez, E. Efecto del Biobras-6 sobre algunos indicadores del crecimiento in vitro en el ajo (*Allium sativum* L.). En: Taller de Productos Bioactivos, Congreso Científico del INCA. Memorias (CD-ROM), Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, ISBN 959-7023-22-9. (2:13:2002: La Habana), 2002.
12. Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962, vol. 15, p. 473-497.

13. Plan de Fortalecimiento Institucional de la Microregión Sur de Manabí, Plan de Desarrollo Local 2003.
14. Pozo, E. 2008. Corporación Forestal de Manejo Sustentable. (CEMAFORS). Revista Panorama Forestal Ecuatoriano.
15. Prado Rodríguez, L. y Samaniego Rojas, C. 2008.II. Seminario Internacional de Plantaciones forestales. ECUAPACIF- Esmeraldas, Ecuador.
16. Recalde Bastidas Cristina Alexandra. Establecimiento del cultivo IN VITRO y aclimatación en invernadero de nepetahederaceas variegadas, Tabacundo – Pedro Moncayo, 2006.
17. Rizzo, P. P. 2004. Guayaquil, 2 de septiembre del. http://es.wikipedia.org/wiki/Madera_de_balsa # Searchinput.
18. Roca, W.M., Mrogrinski, L. A. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Cali. Colombia.
19. SDS, 2005. “Línea base de Manabí (Diagnóstico” (Informe N° 1); “Zonificación Forestal y Agroforestal de Manabí” (Informe N° 3); “Mecanismos de financiamiento para la reactivación de la reforestación en Manabí” (Informe N° 4).
20. SIG AGRO, 2006. Sistema de Información Geográfica Agropecuario. Ministerio de Agricultura y Ganadería- Ecuador.
21. Sotolongo Sospedra, R. 2000. Micropropagación de *Psidium salutare* (HBK) Berg. Pinar del Río. 120 h. Tesis (En opción al grado científico de Doctor en Ciencias Forestales). Ministerio de Educación Superior.
22. Yanchuk Alvin Recursos Genéticos Forestales n° 30 Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Roma, 2003.