



Aclimatación *in vitro* de especies forestales nativas del Sur de Manabí en peligro de extinción

In vitro acclimatization of native forest species from Manabí southern in danger of extinction

Indacochea-Ganchozo Blanca^{1*}, PARRALES-VILLACRESES JOHANN¹, CASTRO-PIGUAVE CARLOS¹, VERA-TUMBACO MÁXIMO¹, GABRIEL-ORTEGA JULIO²

Datos del Artículo

¹Facultad de Ciencias Naturales y de la Agricultura, Ingeniería Agropecuaria, Universidad Estatal del Sur de Manabí (UNESUM), km 11/2 vía Noboa s/n Campus los Ángeles, Jipijapa, Ecuador.

²ATENEO/PROMETEO-SENECYT, Facultad de Ciencias Naturales y de la Agricultura, Ingeniería Agropecuaria, Universidad Estatal del Sur de Manabí (UNESUM), km 11/2 vía Noboa s/n Campus los Ángeles, Jipijapa, Ecuador.

***Dirección de contacto:**

Facultad de Ciencias Naturales y de la Agricultura, Universidad Estatal del Sur de Manabí 10 (UNESUM), km 11/2 vía Noboa s/n Campus los Ángeles, Jipijapa, Ecuador. Telf. 05-11 2600229. 12.

Blanca Indacochea Ganchozo

E-mail address :
blancaindacochea@hotmail.com

Palabras clave:

Micropropagación,
sustrato,
M. balsamum,
T. crhyssantha,
T. billbergii.

J. Selva Andina Res. Soc.
2017; 8(2):124-134.

Historial del artículo.

Recibido noviembre, 2016.
Devuelto mayo 2017
Aceptado junio, 2017.
Disponible en línea, agosto, 2017.

Editado por:
Selva Andina
Research Society

Key words:

Micropropagation,
substrate,
M. balsamum,
T. crhyssantha,
T. billbergii.

Resumen

Las especies forestales *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhyssantha* y *Tabebuia billbergii*, son especies maderables que están en proceso de erosión genética en la zona sur de Manabí (Ecuador), por la constante depredación de su medioambiente. La presente investigación tuvo como objetivo, determinar la adaptación de las plantas producidas *in vitro* (vitroplantas) a las condiciones de ambiente natural. Para esto, plantas obtenidas mediante micropropagación de *M. balsamum*, *T. crhyssantha* y *T. billbergii*, fueron transplantados a sustrato compuesto de 40% de arena de río, 40% de humus y 20% de aserrín de madera descompuesta. El sustrato fue desinfectado con vapor de agua a 121 °C durante tres h. El riego se aplicó dos veces al día con un aspersor durante 20 días, reduciendo el riego paulatinamente los siguientes 40 días, regándolas a partir de este momento una vez al día durante otros 20 días. Para la evaluación de la aclimatación se estimó la supervivencia, altura de planta y número de hojas (vigor) de las plantas. Los resultados mostraron que *M. balsamum*, *T. crhyssantha* y *T. billbergii*, tuvieron un 65, 80 y 70% respectivamente de supervivencia. Los tamaños de las vitroplantas estuvieron entre 17.07 y 19.53 cm en el periodo de pre-aclimatación, con un vigor entre 7 y 14 hojas respectivamente. La altura de las plantas fue de 20.8 a 30.8 cm y fueron consideradas preparadas para la plantación.

© 2017. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. Todos los derechos reservados.

Abstract

Due to the constant depredation of their environment, the forest species *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhyssantha* and *Tabebuia billbergii*, are timber species, which are in the process of genetic erosion in the southern area of Manabí (Ecuador). The objective of the present research was to determine the adaptation of plants produced *in vitro* (vitroplants) to the natural environment conditions. For this, plants obtained by micropropagation of *M. balsamum*, *T. crhyssantha* and *T. billbergii* were transplanted to a substrate composed of 40% river sand, 40% humus and 20% decomposed wood sawdust. The substrate was disinfested with steam at 121 °C for 3 hours. The irrigation was applied twice a day with a sprinkler for 20 days, reducing the irrigation gradually during the following 40 days, watering them from this moment once a day for another 20 days. or the evaluation of the acclimatization, the survival, plant height and leaf number (vigor) of the plants were estimated. The results showed that *M. balsamum*, *T. crhyssantha* and *T. billbergii*, had 65, 80 and 70% respectively survival. The vitroplants sizes were between 17.07 and 19.53 cm in the pre-acclimatization period with strength between 7 and 14 leaves, respectively. The heights of the plants were from 20.8 to 30.8 cm and were considered ready for planting.

© 2017. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. All rights reserved.

Introducción

El cantón Jipijapa y la zona sur de Manabí, Ecuador tiene una gran variedad de especies maderables, se cuenta aún con bosques primarios, zonas de reserva y a pesar de eso el hombre no ha respetado la naturaleza, deforestando en forma indiscriminada los bosques para hacer uso de este recurso en la elaboración de artesanías, muebles y en gran escala la mayor parte de esta madera es llevada a Guayaquil y Manta para la exportación.

La especie *Tabebuia chrysantha* (Jacq.) Nicholson, es un árbol originario de la zona intertropical de América. Es común en toda la geografía ecuatoriana en el rango altitudinal de 200 a 1200 msnm, es decir, crece preferiblemente en regiones cálidas. Loja, en su cantón Zapotillo, parroquias Mangahurco, Bolaspamba y Cazaderos, se encuentra el bosque de Guayacán más vistoso debido a que alberga 40000 ha, de la especie. La floración en el cantón Zapotillo ocurre entre los meses de diciembre y enero, en esta etapa es común observar una alfombra de flores amarillas cubriendo el suelo del bosque (Ministerio de Turismo 2014).

La especie *Tabebuia billbergii* (Bureau & K. Scum.) Standl., es un árbol caducifolio, de tamaño mediano que alcanza hasta 14 m de altura. Se distribuye en los valles secos de 0 a 500 msnm. Su madera dura y pesada es cotizada en Ecuador para artesanía y carpintería, por el contraste en el color entre la albura clara y el duramen muy oscuro. En el Perú su madera es usada para fabricación de parquet y en construcciones rurales. Sus hojas se utilizan como forraje (INRENA 2002). *T. billbergii* es una especie representativa del bosque estacionalmente seco (BES), un ecosistema muy frágil que se extiende desde la península de Santa Elena, en el sur del Ecuador, hasta el noroeste del Perú, comprendiendo

la costa de las regiones Tumbes, Piura, Lambayeque y el norte de La Libertad así como el piso inferior del valle del Marañón, estas dos áreas se comunican a través del Paso de Porculla, una depresión de 2100 msnm de elevación, considerada la más baja de los Andes peruanos (Brack & Mendiola 2004).

La especie *Myroxylon balsamum* (L.) Harms (1908) es un árbol originario de América tropical, se encuentra distribuido en forma natural en América del sur, su presencia se ha registrado en Bolivia, Brasil, Ecuador, Paraguay, Perú, Venezuela, Guyana y el noroeste de Argentina, en el Ecuador se encuentra en las provincias de: Esmeraldas, sector de San Mateo a 45 msnm, Manabí, sector La Isla de Jama, La Unión de San Vicente a 226 msnm, Jardín Botánico de la Universidad Técnica de Manabí (UTM) en Portoviejo a 42 msnm, El Chontal de Pedro Pablo Gómez desde 484 hasta 588 msnm, Cantagallo de Puerto Cayo a 45 msnm, comuna Agua Blanca de Machalilla en Puerto López, Mirador San Antonio de Jipijapa a 279 msnm, Choconcha de Jipijapa y Las Coronas de Charapotó desde 244 a 339 msnm, Guayas, sector Las Minas 57 msnm, El Aguacate Petrillo a 103 msnm y Casas Viejas Chungón desde 317 a 360 msnm, Santa Elena, cantones Santa Elena y La Libertad a 60 msnm, Los Ríos, Finca La Represa de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ) a 90 msnm, Loja, sectores Cofrana Cotacocha entre 1621 a 1631 msnm y Colanga entre 1487 a 1617 msnm, Napo, comunidad de Campococha desde 380 a 557 msnm. El Jardín Botánico de Missouri reporta la presencia del género en las provincias de Sucumbíos y El Oro. (Limongi 2012). En Ecuador es una de las especies maderables nativas amenazadas ante la acelerada deforestación que se

registra en la ecorregión del bosque seco del Litoral ecuatoriano.

Una de las estrategias para superar las dificultades de propagación y evitar la extinción de especies valiosas, es el cultivo *in vitro* de tejido vegetal (Delgado *et al.* 2008). Esta técnica permite obtener plantas a partir de un fragmento pequeño de tejido cultivado en condiciones estériles (Murashige & Skoog 1962). La propagación *in vitro* vía organogénesis directa incrementa de forma rápida el número de individuos, etapa importante en la producción de plántulas a nivel industrial y un banco de germoplasma con fines de rescate (Uribe *et al.* 2008). Además, permite obtener plantas libres de enfermedades, en algunas ocasiones reduce el tiempo de propagación (Rebolledo-Camacho *et al.* 2006). Debido a las dificultades de propagación sexual de *Myroxylon balsamum*, (bálsamo) *Tabebuia crhysantha* (guayacán), *Tabebuia billbergii*, (madero negro) y escasa información disponible de propagación *in vitro* (Valverde *et al.* 1998, Collado *et al.* 2004, Pérez *et al.* 2002).

La aclimatación es una etapa fundamental en un sistema de micropropagación porque dependen de ella la eficiencia del proceso y la calidad final de las plantas producidas *in vitro* (Agramonte-Peñaver *et al.* 1998). Estas plantas en comparación con las cultivadas tradicionalmente presentan un comportamiento diferente en condiciones de invernáculo o de campo. Es decir, sufren cambios morfológicos y fisiológicos que ocasionan una pérdida importante de plantas en el momento de trasplante. Por esta razón, es necesaria la aplicación de técnicas de adaptación al pasar de las condiciones *in vitro* a *ex vitro*. La aclimatación permitirá que la planta alcance un crecimiento autotrófico en ambientes de menor humedad relativa, con más luz y sustratos sépticos (Preece & Sutter 1991). Estas son las condicio-

nes reinantes en invernadero y campo donde crecerán las plantas provenientes de cultivo *in vitro*.

El objetivo de la investigación fue determinar la adaptación de las plantas producidas *in vitro* (vitroplantas) a las condiciones de ambiente natural.

Materiales y métodos

Localización y características climáticas. El estudio se realizó en el Invernadero de Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Estatal del Sur de Manabí, Ecuador, ubicada en el Campus “Los Ángeles”, Km 1.5 vía Noboa el mismo que se encuentra ubicada entre las siguientes coordenadas: 17 M 0548196, UTM 9850644.

Material vegetal. Para el experimento se utilizaron plántulas de las especies *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha* y *Tabebuia billbergii*, adquiridas a partir de la micropropagación de yemas procedentes de material del laboratorio de Biotecnología, este material fue seleccionado de árboles superiores de las fincas de los agricultores desde su iniciación considerando las características morfológicas en su desarrollo.

Condiciones del procesos de aclimatación. Para el desarrollo de esta fase, se emplearon plantas con tamaños entre 6 a 7 cm de longitud, las plantas fueron adquiridas del laboratorio de Biotecnología de la Universidad Estatal del Sur de Manabí. Después fueron llevadas al invernadero donde se realizó el trasplante a los vasos de pre-aclimatación, previamente llenados con una mezclas de sustratos tierra (humus) 40% arena de rio 40% y aserrín de madera descompuesta 20% (3:3:1), se desinfectaron por vapor a 121 °C durante tres horas. Los envases conteniendo la planta fueron cubiertos con otro envase del mismo tamaño, los mismos que fueron gradualmente aperturados mediante agujeros en la cobertu-

ra hasta dejar la planta completamente expuesta al ambiente natural del invernadero a una temperatura promedio de 35 °C, y una humedad relativa de 90%, después de cuatro semanas de pre-aclimatación, dos días después fueron transferidas a bolsas de polietileno, manteniendo el mismo sustrato para darles un mayor espacio de desarrollo radicular, para su aclimatación por un periodo de cuatro semanas antes de llevarlas al vivero, las plántulas se ubicaron en un cantero de hormigón, con un área de 3 m², con una densidad de 200 plantas que proporcionaba un 70% de sombra en vivero, la humedad relativa se mantuvo por encima del 90% durante las dos primeras semanas, aplicándose entre 12 y 14 riegos diarios en forma de neblina entre las 8:00 y las 16:00 h, a intervalos de 30 min y durante 5 min, procurando la no incidencia del agua de riego directamente sobre los sustratos, a partir de la tercera semana el intervalo se amplió a un riego cada 60 min en un 50% el número de riego y manteniendo el tiempo de aplicación. El riego se aplicó con un aspersor durante 20 días dos veces al día, reduciendo paulatinamente hasta los 40 días en que se sacaron las plantas del vivero, regándolas a partir de ese momento una vez al día durante otros 20 días. Se utilizó fertilizante de fórmula completa abono (10-20-30) a los 25 días de iniciada la aclimatación, a razón de 4 gL⁻¹. Se realizaron aspersiones con oxiclورو de cobre a 0.3 gL⁻¹, cada 7 días por un mes, esto debido a que en esta etapa existe un alto índice de ataque de hongos a los explantes principalmente. Esta metodología es la utilizada en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la UNESUM es similar a la empleada por González *et al.* (1987) para la aclimatación de *E. saligna*, mediante el empleo de estaquillas.

Evaluaciones. Se evaluó la supervivencia de las vitroplantas realizando mediciones de altura y número de hojas por planta tomándose al azar 20 plan-

tas por tratamiento y especies. Se hicieron cuatro mediciones posteriores a la pre-aclimatación en un periodo de 30 días, época en que las plantas estaban listas para su traslado a condiciones de trasplante a bolsas y crecimiento en vivero.

Variables evaluadas. i) V1: Altura al inicio de la pre-aclimatación, ii) V2: Número de hojas al inicio de la pre aclimatación. iii) V3: Altura de la planta al término de la aclimatación. iv) V4: Número de hojas desarrolladas por la planta al término de la aclimatación. v) V5: Incremento en la altura de la planta en la fase de aclimatación.

Análisis estadístico. Cada especie y el sustrato representaron un tratamiento y las vitroplantas fueron instaladas bajo un diseño completamente aleatorio. El análisis de varianza, se realizó con el paquete estadístico Statistical Package for Social Science (SPSS) (Pardo & Ruiz 2002).

Resultados

Sobrevivencia de vitroplantas. En el caso de las tres especies, la susceptibilidad al cambio de humedad micro ambiental y temperatura entre el espacio cerrado de desarrollo dentro del frasco de vidrio y el espacio de desarrollo en transición al ambiente natural, fue evidente. Ensayos preliminares realizados fuera de su ámbito de desarrollo natural, cuando las plantas fueron enraizadas *in vitro* y posteriormente trasplantadas a condiciones *ex vitro*, no sobrevivieron en la fase de aclimatación en ninguno de los dos sustratos evaluados (turba y arena), sus hojas mostraron una decoloración marcada, enrollamiento y marchitez rápidamente una vez que fueron establecidas *ex vitro*. Contrariamente, los tallos micro propagado y transferido directamente de la fase de multiplicación, sin raíces, mostraron una mayor adaptabilidad a las condiciones *ex vitro*, alcanzando un

87% de supervivencia cuando fueron establecidos en el sustrato turba, y solo un 12% de los mismos sobrevivieron cuando el trasplante se hizo en arena. En los ensayos realizados se determinó una supervivencia de *M. balsamum*, *T. crhysantha* y *T. billbergii* de 65%, 80% y 70% respectivamente (Figura 1).

Tabla 1 Supervivencia promedio de vitroplantas

Especies	Supervivencia (%)
<i>Myroxylon balsamum</i>	65%
<i>Tabebuia crhysantha</i>	80%
<i>Tabebuia billbergii</i>	70%

Estas se trasplantaron a bolsas de polietileno negro de 4 x 9 cm, que contenían una mezclas de sustratos con 40% de arena de río, 40% de humus y 20% de aserrín de madera descompuesta, las plantas micropropagadas tuvieron un aceptable porcentaje de supervivencia y adaptación a las condiciones normales de campo, representado en una buena apariencia morfológica, coloración verde de las hojas y formación de filodios aproximadamente a las 10 semanas después de haber sido trasplantadas a condiciones *ex vitro*. La transferencia directa de explantes micropropagados del estado II (multiplicación)

al estado IV (aclimatización) posibilitó el ahorro de recursos (medio de cultivo, hormonas, manipulaciones, etc.) y tiempo para la producción de material vegetal a partir de la micropropagación.

La aclimatación de vitroplantas de las tres especies se logró en un periodo de diez semanas, correspondiendo las cuatro primeras semanas a un periodo de pre-aclimatización. En esta etapa, se tomó en cuenta la temperatura y la humedad relativa al interior de los envases de cobertura. Estos fueron manejados a través de perforaciones graduales de la cobertura hasta su retiro total y adaptación a las condiciones del ambiente de invernadero.

Las condiciones en las que se llevó a cabo la etapa de pre-aclimatización fueron de 35 °C durante el día y 90% de humedad relativa.

Análisis Descriptivo de la altura inicial. No hubo diferencias notables en la altura de las plantas de las tres especies al inicio de la aclimatización (Tabla 2), sin embargo, en la *T. billbergii* máxima altura promedio fue de 19.53 cm, mientras que la mínima altura promedio fue para *M. balsamum* con 17.93 cm.

Tabla 2 Altura promedio de vitroplantas al final de la pre-aclimatización

Especies	Números de datos	Mínimo	Máximo	Promedio	Desviación estándar	CV
<i>Myroxylon balsamum</i>	30	13	25.00	17.93	4,394	24.50
<i>Tabebuia crhysantha</i>	30	12	25.00	18.47	4,116	22.29
<i>Tabebuia billbergii</i>	30	12	27.00	19.53	4,272	21.88

Tabla 3 Número promedio de hojas al final de la pre aclimatización

Especies	Números de datos	Mínimo	Máximo	Promedio	Desviación estándar	CV
<i>Myroxylon balsamum</i>	30	6	22.000	10.80	3.377	31.27
<i>Tabebuia crhysantha</i>	30	7.00	28.00	12.53	4.453	35.61
<i>Tabebuia billbergii</i>	30	4.00	16.00	9.50	3.579	37.65

Análisis Descriptivo del número inicial de hojas. Analizando el número promedio de hojas desarrolladas por las vitroplantas al inicio de la aclimatación (Tabla 3), se observa que la especie *T. crhy-santha* tuvo 12 hojas, a diferencia de las vitroplantas de *M. balsamum* que tuvo 10 hojas. En el caso de las vitroplantas *T. billbergii*, mostró nueve hojas, a pesar de que su altura fue superior (19.53 cm).

Análisis Descriptivo de la altura final. En términos promedios, se observó que las vitroplantas de *T. billbergii* mantienen la predominancia en altura final (30.80 cm), después de cuatro semanas de crecimiento (Tabla 4). Esto no sucede de igual forma con las vitroplantas *T. crhy-santha* que logran alcanzar la mínima altura final de 22.76 cm y *M. balsamum* que tuvo un promedio de altura de 20.80 cm.

Logrando el incremento en la altura, en términos de la primera y última evaluación según las especies, se nota en la Tabla 5, que se mantiene la tendencia de crecimiento. Así se observó que en las vitroplantas de la especie *T. billbergii*, se presentó el mayor incremento (5.27 cm.); mientras que el mínimo incremento se dio en *M. balsamum* (2.87 cm).

Análisis Descriptivo del número de hojas. Analizando el número de hojas desarrolladas por la planta al final de la aclimatación, no se distinguen diferencias significativas; sin embargo, en la especie *T. billbergii* hubo 16.37 hojas, respecto de *T. crhy-santha* que mostró un menor número de hojas (13) (Tabla 6).

Tabla 4 Altura de vitroplantas al final del periodo de aclimatación

Especies	Números de datos	Mínimo	Máximo	Promedio	Desviación estándar	CV
<i>Myroxylon balsamum</i>	30	15.00	27.00	20.80	4.428	21.29
<i>Tabebuia crhy-santha</i>	30	15.00	28.00	22.77	4.761	20.91
<i>Tabebuia billbergii</i>	30	16.00	30.00	30.80	4.294	17.31

Tabla 5 Promedio del incremento de la altura

Especies	Números de datos	Mínimo	Máximo	Promedio	Desviación estándar	CV
<i>Myroxylon balsamum</i>	30	1.00	5.00	2.86	0.819	28.58
<i>Tabebuia crhy-santha</i>	30	2.00	7.00	4.30	1.263	29.39
<i>Tabebuia billbergii</i>	30	3.00	9.00	5.27	1.818	34.50

Tabla 6 Número promedio de hojas desarrolladas

Especies	Números de datos	Mínimo	Máximo	Promedio	Desviación estándar	CV
<i>Myroxylon balsamum</i>	30	9.00	27.00	14.17	4.243	29.95
<i>Tabebuia crhy-santha</i>	30	8.00	28.00	13.03	4.937	37.88
<i>Tabebuia billbergii</i>	30	10.00	36.00	16.37	5.275	33.39

Discusión

Se determinó la influencia del sustrato en la supervivencia y vigorosidad de las plantas expresada en altura y número de hojas, así como también se validó los parámetros micro ambiental durante el proceso de aclimatación. La mortandad de vitroplantas en esta etapa es un factor de alto riesgo si no se tiene establecido las condiciones propicias para este proceso de adaptación y el estrés de cambio puede afectar en pocas horas la supervivencia de la planta. Las plantas producidas en estas condiciones pueden resultar de fácil aclimatación, mientras que en otras el déficit morfológico y funcional dificultará el trasplante y posterior aclimatación (Reigosa-Roger & Pedrol-Bonjoch 2003).

Las técnicas aplicadas durante la fase de supervivencia, son las que van encaminadas a lograr gradualmente menos humedad relativa, más luz, crecimiento autotrófico y un medio aséptico (Agramonte-Peñaaver 1998). En ese sentido la técnica de control individual de las vitroplantas de las tres especies nativas en los primeros días de transferencia a sustrato sólido desinfectado, dio un resultado satisfactorio. En estas condiciones se mantuvieron con una alta humedad relativa evitando el exceso de transpiración de las plantas hasta que logren un adecuado desarrollo de estomas y cutícula (Ziv 1991).

Según Hartmann *et al.* (2002), el bajo porcentaje de supervivencia se debe a que las plantas deben adaptarse de una nutrición heterótrofa a una autótrofa. Aunque las plantas en el experimento habían desarrollado raíces, debieron también desarrollar brotes funcionales e incrementar la resistencia a la pérdida de agua y el ataque de patógenos. El drástico cambio de estado heterotrófico a autotrófico, como modo de nutrición, es una de las etapas más críticas de la micropropagación, ya que podría causar en las

plantas serios daños fisiológicos. Es por esto, que en muchos casos la tasa de crecimiento y supervivencia de las plantas es muy baja (Desjardins *et al.* (1987). Otra causa, las plantas *in vitro* poseen una alta tasa de transpiración, que provoca una gran pérdida de agua, debido a que poseen una delgada capa de cera epicuticular y un anormal funcionamiento de los estomas. Este estrés hídrico es la principal causa del problema del trasplante (Sutter & Langhans 1979, Brainerd *et al.* 1981, Vega 2009).

Las raíces formadas *in vitro* son poco funcionales, presentando epidermis no suberizadas y pocos pelos radicales, los que generalmente mueren post-trasplante y deben ser regenerados (Vega 2009).

Se reportó que las raíces desarrolladas *in vitro* son extremadamente frágiles y que, al ser colocadas en el sustrato, mueren (Vega 2009). Este aspecto fue mencionado por Pospisilova *et al.* (1999), quienes señalan que muchas plántulas mueren durante el período de aclimatación y que necesitan una disminución gradual de la humedad del aire.

Según Torres *et al.* (2013), algunas de las particularidades del cultivo *in vitro* radica en que las condiciones ambientales dentro del recipiente garantizan un ambiente con alta humedad relativa (100%) y una nutrición heterótrofa por el suministro de fuentes energéticas (sacarosa) en el medio de cultivo.

Estas condiciones propician una baja funcionalidad en la raíces producidas en condiciones *in vitro*, las cuales son por lo tanto poco eficientes en la toma de agua y nutrientes, tornándose, en algunos casos en vías para la pérdida de agua interna, una vez la planta es trasplantada a condiciones *ex vitro*. Mc Crown (2000), plantea que esta es una de las etapas más difícil de un sistema de propagación *in vitro* pues las plantas regeneradas deben regresar a condiciones naturales que son fisiológicamente estresantes para

plantas con finas cutículas y con una reducción en metabolismo dado por las condiciones *in vitro*.

Las alteraciones morfológicas, anatómicas y fisiológicas, ocurridas en las vitroplantas como resultado del ambiente *in vitro*, hacen que las plántulas durante las primeras semanas de la aclimatación presenten incapacidad para controlar la pérdida de agua, lo que les provoca un incremento brusco de la transpiración y que puedan alcanzar tasas reducidas en la actividad fotosintética (Rogalski *et al.* 2003).

Los valores alcanzados en las tres especies, son similares a otras especies como *Eucalyptus grandis* y *E. urophylla* con 75 y 85% de sobrevivencia (Orellana 1997), *Psidium salutare* con 75% (Sotolongo-Sospedra 2000) y *Eucalyptus globulus* con 90% (Abdelnour & Muñoz 2005) pero muy superiores al comportamiento de especies recalcitrantes como caoba y cedro que tuvieron un 27% de sobrevivencia (Azofeifa *et al.* 2009, Pérez *et al.* 2002). Salazar *et al.* (2009), plantea que el porcentaje de plantas de cocuy y que fueron adaptadas en esta fase fue de 60%, y las pérdidas de los explantes principalmente se debieron a daños en el sistema radical, el cual se desprendía con facilidad.

Por lo que es preciso que en la fase de aclimatación (durante las primeras dos semanas después del trasplante), es necesario controlar adecuadamente los factores ambientales y se requiere simular las condiciones del ambiente *in vitro* hasta que las plantas se adapten a las nuevas condiciones, para evitar el exceso de transpiración de las jóvenes plantas, hasta que éstas logren un adecuado desarrollo de sus estomas y cutícula, tal como lo mencionan Ziv (1991), Haggman *et al.* (1999).

Las vitroplantas presentan cambios sustanciales sobre todo en características epidérmicas, hojas delgadas y delicadas, con menor capacidad fotosintética y estructuras cerosas superficiales escasas,

estomas deficientes. Todo esto resulta en transpiración excesiva y marchitamiento de las plantas si no se someten a cuidados especiales para corregir estas anomalías, incrementar la sobrevivencia y acelerar la aclimatación o endurecimiento (Ganopadhyay *et al.* 2002, Pospóšilová *et al.* 1999). También otros investigadores como De Fossard (1976), Tisserat & Murashige (1977), afirman que esta fase todavía presenta problemas, que pueden implicar grandes pérdidas (marchitamiento, desecación, podredumbre de raíces) y en definitiva una disminución de la supervivencia. La estabilidad fenotípica es esencial y la forma en que ésta puede medirse es a través de una evaluación del comportamiento en el campo de las plantas regeneradas (Martínez-Pulido 1990).

Las diferencias observadas no fueron significativas, se consideraron normales en vitroplantas y son debidas a los distintos factores de estrés que tienen que soportar durante las fases de la micropropagación. Reigosa-Roger & Pedrol-Bonjoch (2003), mencionan al respecto que todas las plantas producidas en recipientes con escaso intercambio gaseoso, pueden manifestar alteraciones o déficit en cuanto a su estructura anatómica, morfológica fisiológica dependiendo de la especie e incluso de la variedad.

Conflictos de intereses

Los autores declaran que esta investigación fue realizada en la Universidad Estatal del Sur de Manabí (Cantón Jipijapa) y no presenta conflictos de interés.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a la Universidad Estatal del Sur de Manabí y la Dirección

de investigación, por el financiamiento de la investigación. Asimismo, se agradece a los Ingenieros Otto Quimis Garcés, Cristhían Chilán G, Mirella Guerra C, Azucena Zhindón G. y Anita Choéz, del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la UNESUM.

Literatura citada

- Abdelnour A, Muñoz A. Micropropagación de teca (*Tectona grandis* L.f). Kurú: Revista Forestal 2005;2(5):1-11.
- Agramonte-Peñalver D, Jiménez-Terry F, Dita-Rodríguez MA. Aclimatación. En: Pérez JN, Editorial. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara: Cuba; 1998. p. 193-206.
- Azofeifa-Bernal J, Rojas A, Hine A. Optimización del proceso de enraizamiento y aclimatación de vitroplantas de *Swietenia macrophylla* King (Orden Meliaceae). Tecnol Marcha 2009; 22 (3):34-41.
- Brack AY, Mendiola C. Ecología del Perú. PNUD. Asociación Editorial Bruño. Lima: Perú; 2004. p. 495.
- Brainerd KE, Fuchigami LK, Kwiatkowski S, Clark CS. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured "Pixy" plume grown under different environments. HortScience 1981; 16:173-5.
- Collado R, Barbón R, Agramonte D, Jiménez F, Pérez M, Gutiérrez O, et al. Establecimiento *in vitro* de ápices y segmento nodales de *Swietenia macrophylla* King. Biotecn Veg 2004;4 (3):143-6.
- De Fossard RA. Tissue culture for plant propagators. University New England; 1976. p. 409.
- Delgado MF, Cuba M, Hechenleitner P, Thiers O. Propagación vegetativa de taique (*Desfontainia spinosá*) y tepa (*Laureliopsis philippiana*) con fines ornamentales. Bosque 2008; 29(2):120-6.
- Desjardins Y, Gosselin A, Yelle S. Acclimatization of *ex vitro* strawberry plantlets in CO₂-enriched environments and supplementary lighting. J Amer Soc Hort Sci 1987;112(5): 846-51.
- Gangopadhyay G, Das S, Mitra SK, Poddar R, Modak BK, Mukherjee KK. Enhanced rate of multiplication and rooting through the use of coir in aseptic liquid culture media. Plant Cell Tissue Organ Cult 2002;68(3):301-10.
- González A, Vera N, Pérez M, Rodríguez E. Obtención de posturas de *Eucalyptus saligna* Topes de Collantes mediante el empleo de estaquilla Ctro Agr 1987;14(1):77-84.
- Häggman H, Jokela A, Krajnakowa J, Kauppi A, Niemi K, Aronen T. Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction. J Exp Bot 1999;50:1769-78.
- Hartmann H, Kester DE, Davies FT, Geneve RL. Plant propagation. Principles and practices. Prentice Hall. New Jersey, U.S.A; 2002. p. 880.
- INRENA. Manual divulgativo de las especies forestales de la Reserva de Biosfera del Noroeste. Tumbes - Perú. 2002.
- Limongi R. Catálogo del banco de germoplasma de bálsamo. Programa Nacional de Forestería. Estación Experimental Litoral Sur. INIAP; 2012. p. 8.
- Martinez-Pulido C. Cultivo de tejidos vegetales: Multiplicación vegetativa *in vitro* del pino canario. Universidad la Laguna; 1990. p. 122.

- McCrown BH. Recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: dealing with genetic predeterminedism. *In Vitro Cell Develop Biol Plant* 2000;36(3):149-54.
- Ministerio de Turismo. [Página en internet] El Guayacán, el árbol que despierta a la vida 2014. (Revisado: Abril 15, 2017). Disponible en <http://www.turismo.gob.ec/el-guayacan-el-arbol-que-despierta-a-la-vida/>
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plant* 1962;15:473-97.
- Orellana M. Desarrollo de un sistema de cultivo *In vitro* para los explantes nodales de Caoba (*Swietenia macrophylla*. King). [Tesis Maestría]. Turrialba, Costa Rica. CATIE; 1997. p. 85.
- Pardo A, Ruiz MA. SPSS 11.0. Guía para el análisis de datos. Madrid: McGraw-Hill; 2002.
- Pérez J, Mesén F, Hilje L, Aguilar ME. Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L optimización de la fase de multiplicación. *Rev For Centroam* 2002;38:67-71.
- Pospisilova J, Ticha I, Kadlec P, Haisel D, Plzakova S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biol Plant* 1999; 42(4):481-97.
- Preece JE, Sutter EG. Acclimation of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh PC, Zimmerman RH, ed. *Micropropagation technology and application*. Dordrecht (NL): Kluwer Acad. Publ; 1991; p. 71-93.
- Rebolledo-Camacho V, Aparicio-Rentería A, Cruz-Jiménez H. Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de dos especies de pinos. *Foresta veracruzana* 2006;8(2):27-32.
- Reigosa-Roger MJ, Pedrol-Bonjoch N. La ecofisiología vegetal. *Una Ciencia de Síntesis*; 2003. p. 1-58.
- Rogalski M, Guerra MP, da Silva AL. Multiplicação *in vitro* da Ameixeira “Santa Rosa”: Efeito da citocinina BAP. *Rev Bras Frutic* 2003;25(2):365 -7.
- Salazar E, González P, Hernández C. Multiplicación *in vitro* de *agave cocui* trelease a través de yemas axilares. *Agron Trop* 2009;59(2):7-8.
- Sotolongo-Sospedra R. Micropropagación de *Psidium salutare* (HBK) Berg. [Tesis Doctoral]. Universidad del Pinar del Rio. Cuba; 2000.
- Sutter E, Langhans RW. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. *J Am Soc Hortic Sci* 1979;104: 493-6.
- Tisserat B, Murashige T. Probable indentity of substances in citrus that repress asexual embryogenesis. *In Vitro* 1977;13(11):785-9.
- Torres LA, Suarez IE, Gatti K. Propagación *in vitro* de *Acacia mangium* Willd. *Biotechnol* 2013; 11(1):81-7.
- Uribe ME, Delaveau C, Garcés M, Escobar R. Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. *Bosque* 2008;29 (1):58-64.
- Valverde L, Dufour M, Villalobos V. *In vitro* organogénesis in *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata* and *Swietenia macrophylla* (Fabácea, meliácea). *Rev Trop* 1998;46(2):225-8.
- Vega A. Efecto de la preaclimatación *in vitro* sobre la supervivencia en invernadero de tres plantas micropropagadas. [Tesis Licenciatura]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacan, México; 2009. p. 67.

Ziv M. Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plant In: Debergh PC & Zimmerman RH. Micropropagation: Technology and application. Editorial Dordrecht, Kluwer Academic; 1991. p. 45-69.
