

UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y AMBIENTALES
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA FORESTAL



INFLUENCIA DE LOS PROCESOS DE DESINFECCIÓN, MEDIO DE GERMINACIÓN Y REGULADORES DE CRECIMIENTO EN EL DESARROLLO MORFOGÉNICO *IN VITRO* DE *Guazuma crinita* Mart.

**Tesis para optar el título profesional de
INGENIERO FORESTAL**

ANTONY CRISTHIAN GONZALES ALVARADO

Pucallpa - Perú

2023



UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y AMBIENTALES
CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA FORESTAL
COMISIÓN DE GRADOS Y TÍTULOS



ACTA DE APROBACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
N° 433/2022-CGyT-FCFyA-UNU

En la ciudad de Pucallpa a las 11:00 a.m. del día jueves 5 de mayo de 2022, de acuerdo con el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Ucayali, se reunieron los miembros del Jurado Evaluador en forma virtual, mediante la plataforma unificada de comunicación y colaboración Microsoft Teams, los mismos que se designaron con Memo Múltiple N° 047-2022-UNU-FCFyA-CGT, conformado por los siguientes docentes:

Dr. Fernando Velásquez de la Cruz	Presidente
Dr. Víctor Augusto Araujo Abanto	Miembro
Dra. Zenayda Emilia Estrada Tuesta	Miembro

Se procedió a evaluar a la sustentación de la tesis denominado: **“INFLUENCIA DE LOS PROCESOS DE DESINFECCIÓN, MEDIO DE GERMINACIÓN Y REGULADORES DE CRECIMIENTO EN EL DESARROLLO MORFOGÉNICO *IN VITRO* DE *GUAZUMA CRINITA* MART.”**, presentado por el Bachiller **ANTONY CRISTHIAN GONZALES ALVARADO**; asesorado por el Dr. Jorge Arturo Mori Vásquez. Habiendo finalizado la sustentación, se procedió a la formulación de preguntas por parte del Jurado Evaluador, las que fueron absueltas por el sustentante, en consecuencia, la tesis fue **APROBADO POR UNANIMIDAD Y RECOMENDACIÓN DE PUBLICACIÓN**, quedando expedito para el otorgamiento del **TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO FORESTAL**. A las 12.30 pm. del mismo día se da por finalizado el acto académico, firmando los miembros en señal de conformidad.

Dr. Fernando Velásquez De La Cruz
Presidente

Dr. Víctor Augusto Araujo Abanto
Miembro

Dra. Zenayda Emilia Estrada Tuesta
Miembro

ACTA DE APROBACIÓN

Esta tesis fue aprobada por el Jurado Evaluador de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad Nacional de Ucayali, como requisito parcial para optar el Título Profesional de Ingeniero Forestal.

Dr. Fernando Velásquez De La Cruz



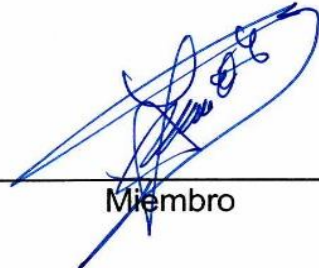
Presidente

Dr. Víctor Augusto Araujo Abanto



Secretario

Dra. Zenayda Emilia Estrada Tuesta



Miembro

Dr. Jorge Arturo Mori Vásquez



Asesor

Bach. Antony Cristhian Gonzales Alvarado



Tesista



CONSTANCIA

ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE INVESTIGACION

SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND

N° V/0173-2022

La Dirección de Producción Intelectual, hace constar por la presente, que el Informe final de Tesis, titulado:

"INFLUENCIA DE LOS PROCESOS DE DESINFECCIÓN, MEDIO DE GERMINACIÓN Y FITORREGULADORES EN EL DESARROLLO MORFOGÉNICO IN VITRO DE GUAZUMA CRINITA MART"

Cuyo(s) autor (es) : GONZALES ALVARADO, ANTONY CRISTHIAN

Facultad : CIENCIAS FORESTALES Y AMBIENTALES

Escuela Profesional : INGENIERIA. FORESTAL.

Asesor(a) : Dr. MORI VASQUEZ, JORGE ARTURO

Después de realizado el análisis correspondiente en el Sistema Antiplagio URKUND, dicho documento presenta un porcentaje de similitud de 10%.

En tal sentido, de acuerdo a los criterios de porcentaje establecidos en el artículo 9 de la DIRECTIVA DE USO DEL SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND, el cual indica que no se debe superar el 10%. Se declara, que el trabajo de investigación: Si Contiene un porcentaje aceptable de similitud, por lo que Si se aprueba su originalidad.

En señal de conformidad y verificación se FIRMA Y CODIFICA la presente constancia

FECHA 01/04/2022



Dr. ABRAHAM ERMITANIO HUAMAN ALMIRON
Dirección de Producción Intelectual



AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE TESIS
REPOSITORIO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI

Yo, Antony Brithian Gonzales Alvarado.

Autor(a) de la TESIS de pregrado titulada:

“Influencia de los procesos de desinfección, medio de germinación y reguladores de crecimiento en el desarrollo morfológico in vitro de Guazuma crinita Mart”.

Sustentada el año: 2022.

Con la asesoría de: Dr. Jorge Arturo Mori Vasquez.

En la Facultad de: ciencias Forestales y Ambientales.

Escuela Profesional de: Ingeniería Forestal.

Autorizo la publicación:

PARCIAL Significa que se publicará en el repositorio institucional solo La caratula, la dedicatoria y el resumen de la tesis. Esta opción solo es válida marcar **si su tesis o documento presenta material patentable**, para ello deberá presentar el trámite de CATI y/o INDECOPI cuando se lo solicite la DGPI UNU.

TOTAL Significa que todo el contenido de la tesis y/o documento será publicada en el repositorio institucional.

De mi trabajo de investigación en el Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de Ucayali (www.repositorio.unu.edu.pe), bajo los siguientes términos:

Primero: Otorgo a la Universidad Nacional de Ucayali **licencia no exclusiva** para reproducir, distribuir, comunicar, transformar (únicamente mediante su traducción a otros idiomas) y poner a disposición del público en general mi tesis (incluido el resumen) a través del Repositorio Institucional de la UNU, en formato digital sin modificar su contenido, en el Perú y en el extranjero; por el tiempo y las veces que considere necesario y libre de remuneraciones.

Segundo: Declaro que la **tesis es una creación de mi autoría** y exclusiva titularidad, por tanto me encuentro facultado a conceder la presente autorización, garantizando que la tesis no infringe derechos de autor de terceras personas, caso contrario, me hago único(a) responsable de investigaciones y observaciones futuras, de acuerdo a lo establecido en el estatuto de la Universidad Nacional de Ucayali, la Superintendencia Nacional de Educación Superior Universitaria y el Ministerio de Educación.

En señal de conformidad firmo la presente autorización.

Fecha: 05 / 05 / 2022.

Email: gonza.ozles@gmail.com
Teléfono: 978199329.

Firma: [Firma manuscrita]
DNI: 73510068.

www.repositorio.unu.edu.pe
✉ repositorio@unu.edu.pe

DEDICATORIA

A Dios, por brindarme vida, salud y sabiduría y por permite estar presente en estos momentos en este mundo terrenal.

A mis padres: Martha Alvarado Inuma y Fredy Fernando Ojanama Gonzales, por sus apoyos incondicionales y estar conmigo en los momentos buenos y malos impulsándome a seguir adelante cuando sentía que no podía, ustedes son el motivo para mi exitosa culminación.

A mis queridos hermanos Jhon Jeremy Ojanama Alvarado y Freddy Gael Yenco Ojanama Alvarado, que también me apoyaron en este largo camino.

A mi estimado asesor Dr. Jorge Arturo Mori Vásquez, docente, investigador y un gran amigo que es mi Mentor y Forjador hacia su línea de investigación científica.

A los docentes de la Universidad Nacional de Ucayali: Dr. Víctor Araujo Abanto, M.Sc. David Lluncor Mendoza en memoria, M.Sc. Jorge Manuel Revilla Chávez y Dra. Zenayda Estrada Tuesta, por brindarme sus sabios y grandes consejos que aún perduran en mi mente; y a toda la plana docente de la Facultad de Ingeniería Forestal y Ambiental por sus grandes aportes y brindarme sus grandes conocimientos que han adquirido en el campo laboral.

AGRADECIMIENTO

A mi asesor Dr. Jorge Arturo Morí Vázquez, por brindarme su apoyo y compartiendo sus grandes conocimientos ya que fue un gran pilar en esta presente investigación.

A mi co-asesor Dr. Jorge Manuel Revilla Chavez, por sus grandes aportes y apoyo hacia mi persona para poder realizar la presente investigación.

A la Universidad Nacional de Ucayali, por brindarme el apoyo económico a través del fondo FOCAM.

A los miembros del jurado de tesis: Dr. Fernando Velásquez De La Cruz, Dr. Víctor Araujo Abanto y Dra. Zenayda Emilia Estrada Tuesta

A mi familia, mis padres, hermanos, y compañeros, por ayudarme en todo el proceso académico y en la parte final de la evaluación de mi proyecto, a mis amigos, ya que ustedes me brindaron su amistad incondicional sin recibir nada a cambio de mi persona, gracias por estar siempre ahí conmigo a pesar de que yo no tuviera nada que ofrecerles, gracias a todos ustedes, por estar presente en los momentos únicos y por apoyarme en la trayectoria académica de mi carrera de Ingeniería Forestal.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE DEL CONTENIDO	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
RESUMEN	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	xvii
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.1. Formulación del Problema.....	1
1.2. Objetivos.....	1
1.3. Justificación	2
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes del Estudio.....	4
2.2.1. Características generales de la especie en estudio.....	6
2.2.1.1. Taxonomía	6
2.2.1.2. Características Botánicas.....	6
2.2.1.3. Fenología	7
2.2.1.4. Distribución y Hábitat	7
2.2.1.5. Observaciones para el reconocimiento de la especie	8
2.2.1.6. La semilla	8
2.2.1.7. Manejo	9
2.2.1.8. Silvicultura.....	9

2.2.1.9. En reforestación	10
2.2.1.10. Tecnología de la madera.....	10
2.2.1.11. Usos.....	11
2.2. Planteamiento Teórico	11
2.2.1. Morfogénesis	11
2.2.2. Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV).....	11
2.2.3. Micropropagación	12
2.2.4. Medio de cultivo.....	18
2.2.5. Reguladores de crecimiento	22
2.2.6. Factores que influyen en el cultivo <i>in vitro</i>	26
2.3. Definición de Términos Básicos	27
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.....	30
3.1. Método de Investigación.....	30
3.2. Poblacion y Muestra.....	30
3.2.1. Población	30
3.2.2. Muestra.....	30
3.3. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos.....	31
3.3.1. Técnicas	31
3.3.2. Instrumentos	31
3.4. Procedimientos de Recolección de Datos.....	35
3.5. Tratamientos de Datos.....	41
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1. Resultados	42
4.1.1. Desinfección de semillas <i>de G. crinita Mart.</i>	42
4.1.2. Etapa de germinación de <i>G. crinita Mart.</i>	45

4.1.3. Desarrollo morfogénico de <i>G. crinita</i> Mart	47
4.1.3.1. Callogénesis.....	47
4.1.3.2. Primordio radicular	50
4.1.3.3. Inducción brotes	53
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	56
5.1. Conclusiones	56
5.2. Recomendaciones.....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXO.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Compuestos nutricionales de medios de cultivos.....	19
Tabla 2. Formato de evaluación de desinfección y germinación.....	32
Tabla 3. Formato de evaluación del comportamiento morfogénico.....	33
Tabla 4. Tratamiento de desinfección.....	37
Tabla 5. Tratamiento de medios de germinación.....	39
Tabla 6. Tratamientos para la fase de morfogénesis.....	40
Tabla 7. Análisis de la Varianza del efecto de diferentes tiempos de exposición al NaClO en el porcentaje de sobrevivencia y contaminación de las semillas de <i>G. crinita</i> in vitro.....	43
Tabla 8. Resultados de la prueba de Tukey para el efecto de diferentes tiempos de exposición al NaClO en el porcentaje de sobrevivencia y contaminación de las semillas de <i>G. crinita</i> in vitro.....	44
Tabla 9. Análisis de la Varianza del efecto del medio de cultivo en el porcentaje de Germinación in vitro de <i>G. crinita</i>	46
Tabla 10. Resultados de la prueba de Tukey para efecto del medio de cultivo en porcentaje de Germinación in vitro de <i>G. crinita</i>	47
Tabla 11. Análisis de la Varianza del efecto de los reguladores de crecimiento en porcentaje de Callo en explantes de <i>G. crinita</i> in vitro.....	49
Tabla 12. Resultados de la prueba de comparación de medias LSD para el efecto de los reguladores de crecimiento en porcentaje de Callo en explantes de <i>G. crinita</i> in vitro.....	50

Tabla 13.	Análisis de la Varianza del efecto de los reguladores de crecimiento en el número de primordios radicular en explantes de <i>G. crinita</i> in vitro.....	52
Tabla 14.	Resultados de la prueba de comparación de medias del efecto de los reguladores de crecimiento en el número de primordios radicular en explantes de <i>G. crinita</i> in vitro.....	53
Tabla 15.	Análisis de la Varianza del efecto de los reguladores de crecimiento en la formación de brotes en explantes de <i>G. crinita</i> in vitro.....	54
Tabla 16.	Resultados de la prueba de comparación de medias LSD para el efecto de los reguladores de crecimiento en la formación de brotes en explantes de <i>G. crinita</i> in vitro.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Efecto de diferentes tiempos de exposición al NaClO en el porcentaje de sobrevivencia y contaminación de las semillas de G. crinita in vitro.....	43
Figura 2. Efecto del medio de cultivo en Porcentaje de Germinación in vitro de G. crinita.....	45
Figura 3. Efecto de los reguladores de crecimiento en porcentaje de Callo en explantes de G. crinita in vitro.....	48
Figura 4. Efecto de los reguladores de crecimiento en el número de primordios radicular en explantes de G. crinita in vitro.....	51
Figura 5. Efecto de los reguladores de crecimiento en la formación de brotes en explantes de G. crinita in vitro.....	53
Figura 6. Semillas de G. crinita Mart.....	64
Figura 7. Vertimiento de medio de cultivo (MS).....	64
Figura 8. Desinfección de las semillas con fungicida Benlate®.....	64
Figura 9. Preparación de medio de cultivo (MS).....	65
Figura 10. Preparación de materiales para la inoculación.....	65
Figura 11. Panorama del experimento fase desinfección.....	65
Figura 12. Separación de la semilla de G. crinita Mart del fruto.....	66
Figura 13. Proceso de germinación de las semillas de G. crinita Mart.....	66
Figura 14. Plántulas in vitro de G. crinita Mart.....	67
Figura 15. Proceso de obtención de explantes.....	67
Figura 16. Proceso de callogenesis.....	67
Figura 17. Proceso de primordios radiculares.....	67

Figura 18. Callogenesi.....	68
Figura 19. Primordios radiculares a partir de callos.....	68
Figura 20. Panorama de los tratamientos con diferentes reguladores (T2, T3, T4 y T5).....	68
Figura 21. Inducción de brotes.....	69
Figura 22. Inicio de la inoculación.....	69
Figura 23. Diferenciación entre el tratamiento 4 y tratamiento 1 de la fase medio de cultivo en la germinación durante 4 meses de consumo de nutrientes.....	69

RESUMEN

La presente investigación se ejecutó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos y Meristemas, ubicado en las instalaciones de la Universidad Nacional de Ucayali, km 6.200 de la Carretera Federico Basadre, con el objetivo principal de determinar la influencia de procesos de desinfección, medio de germinación y reguladores de crecimiento en el desarrollo morfogénico *in vitro* de micro estacas obtenidas a partir de semilla biológica de la especie *Guazuma crinita* Mart (Bolaina). La primera fase de desinfección consistió en someter a las semillas a diferentes tiempos de exposición al hipoclorito de sodio al 2%. En la segunda fase se utilizó diferentes medios de cultivo para obtener el mejor porcentaje de germinación. Y en la fase morfogénica se utilizó diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas. Se determinó que con la exposición al hipoclorito de sodio al 2% por 20 minutos se obtiene un 95% de sobrevivencia, en la germinación *in vitro* de *G. crinita*, el tratamiento uno (T1) presentó un alto porcentaje de germinación. En la fase morfogénica se determinó que el mejor tratamiento para inducir la formación de callos es el tratamiento compuesto de Kinetina (Kin) (12 ppm)+ AIB (12 ppm), para primordios radiculares el mejor tratamiento es Kin (4 ppm)+ AIB (12 ppm), mientras que en la fase de inducción de brotes todos los tratamientos no tuvieron diferencia estadística significativa.

Palabras claves: Fase morfogénica, callogenesis, primordio radicular e inducción de brote.

ABSTRACT

The present investigation was carried out in the Laboratory of Tissue Culture and Meristems, located in the facilities of the National University of Ucayali, km 6,200 of the Federico Basadre Highway, with the main objective of determining the influence of disinfection processes, germination medium and phytohormones in the *in vitro* morphogenic development of micro cuttings obtained from biological seed of the species *G. crinita* Mart (Bolaina). In the disinfection phase experiment, the seeds were exposed to different exposure time treatments of 2% sodium hypochlorite. In the germination medium phase, different treatments were used in relation to the type of culture medium to obtain the best germination percentage. And in the morphogenic phase, different concentration treatments of auxins and cytokinins homogenized between them were used. Finally, it was determined that the application of 2% sodium hypochlorite, with an exposure time of 20 minutes, has a 95% survival rate, in the *in vitro* germination of *G. crinita*, treatment one (T1) presented a high percentage of germination. In the morphogenic phase, 3 morphogenic responses were obtained: Callogenesis; it was determined that the best treatment to induce calluses is the treatment that was composed of Kinitina (kin) (12 ppm) + AIB (12 ppm), for root primordia the best treatments Kin (4 ppm) + AIB (12 ppm) respectively, while in In the shoot induction phase, all treatments had no differentiation.

Keywords: Morphogenic phase, callogenesis, root primordium and induction of bud.

INTRODUCCIÓN

Las especies forestales cumplen un rol muy importante en el planeta, conocer sus usos y aplicaciones incentiva a los humanos a mejorar el manejo sostenible y aprovechamiento de los ecosistemas boscosos, pero esto a su vez incentiva el uso insostenible de este recurso causando su agotamiento y en muchos casos la deforestación de extensas áreas de la Selva Amazónica.

Frente a esta realidad, una de las alternativas para mitigar los impactos de la deforestación es el establecimiento de plantaciones con especies forestales nativas de rápido crecimiento, actividad para lo cual se necesita disponer de material reproductivo en suficiente cantidad y en tiempo oportuno para que los plántones lleguen al campo definitivo con las dimensiones y calidad adecuada que garanticen rendimientos económicos comparables con los de especies exóticas como el eucalipto.

Pero esta posibilidad de desarrollo del sector forestal se encuentra limitado porque las especies de rápido crecimiento, y dentro de ellas una de las más prometedoras, la Bolaina, se caracteriza por producir semillas biológicas solo una vez al año y la temporada que dispersa sus frutos y semillas no permite producir plantas que puedan ir al campo con las dimensiones y calidad que garanticen el éxito comercial de la plantación.

Frente a esta situación existe la posibilidad que utilizando la técnica del cultivo *IN VITRO* a partir de semilla biológica de *G. crinita*. (Bolaina), se produzcan plántones durante todos los meses del año, determinando de esta manera el mejor mes para el inicio del proceso productivo de plántones, de tal manera que se tenga un número de meses en crecimiento que permita obtener plantas con las características de calidad que se necesita para obtener plantaciones comerciales competitivas.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Formulación del Problema

El presente trabajo de investigación resolvió la interrogante: ¿Cuál es el proceso de desinfección, medio de germinación y regulador de crecimiento que permiten el desarrollo morfogénico, *in vitro* de microestacas obtenidas a partir de semillas biológicas de la especie forestal *G. crinita* Mart (Bolaina)?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Determinar la influencia de procesos de desinfección, medio de germinación y reguladores de crecimiento en el desarrollo morfogénico *in vitro* de micro estacas obtenidas a partir de semilla biológica de la especie *Guazuma crinita* Mart (Bolaina).

1.2.2. Objetivos Específicos

- Establecer un protocolo de desinfección de las semillas de *G. crinita* Mart (Bolaina) para su germinación *in vitro*.
- Evaluar el efecto de la concentración y los componentes del medio Murashige y Skoog (MS) sobre la germinación de semillas *in vitro* de *G. crinita* Mart (Bolaina).

- Determinar el efecto de reguladores de crecimiento de Ácido Indol Butírico (AIB) y Kinetina (KIN) en el desarrollo morfogénico de microestacas de *G. crinita* Mart (Bolaina).

1.3. Justificación

La biotecnología vegetal experimenta hoy una evolución rápida que ha suscitado gran interés en la mayor parte de las naciones del mundo. El impacto de la biotecnología afectará a todas las especies cultivadas, y su mayor potencial, en términos de desarrollo tecnológico, se concentrará en los trópicos (Roca y Mroginski, 1991).

La aplicación de la biotecnología vegetal en la parte de cultivo *in vitro*, permite obtener plantas asépticas y con un mayor trabajo, mejoradas genéticamente. En consiguiente, la técnica de cultivo in – vitro permite mantener gran cantidad de material para la propagación en espacios pequeños, así como estimular su reproducción en forma masiva en cualquier temporada del año.

Todas estas características de esta técnica, si se logra determinar un protocolo para la desinfección, el medio de cultivo y la combinación adecuada de reguladores de crecimiento, permitirán la producción durante todo el año, o en los meses que sea más conveniente, de plantines y luego plantones de la especie que se estudiará.

Esto a su vez ayudará a viabilizar futuros programas y proyectos de reforestación con esta especie, ya que no nos encontraremos con limitaciones en la disponibilidad de material vegetal para establecer las plantaciones. Por otra parte, la viabilización de los proyectos de reforestación permitirán atraer nuevas inversiones orientadas al establecimiento de plantaciones generándose de este

modo nuevos puestos de trabajo que permitirá que las familias mejoren su acceso a la salud educación, recreación y por lo tanto se contribuiría con el desarrollo social y económico de la zona donde se establezcan las plantaciones. Se debe de agregar que al establecerse las plantaciones se logrará disminuir la presión de tala sobre los bosques nativos, contribuyendo de este modo a su conservación o aprovechamiento sostenible.

Por lo expuesto, la presente investigación buscó obtener un protocolo de micropropagación *in vitro* con la utilización de micro estacas con la aplicación de reguladores de crecimiento para obtener clones de plantines.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del Estudio

En la micro propagación *in vitro* de *Guazuma crinita* (Maruyama et al, 1997) utilizaron como metodología de desinfección alcohol etílico al 70° durante 3 minutos, luego con una solución de peróxido de hidrógeno al 5% por 10 minuto, las semillas se lavaron tres veces en agua destilada estéril obteniendo una desinfección al 100%

Por su parte Villegas (2008) investigó el efecto de la desinfección de semillas de *G. crinita* en diferentes tiempos a la exposición de hipoclorito de sodio al 2%, los tiempos que utilizo fue de 10, 20 y 40 minutos. Donde determino que para todos los tiempos de exposición obtuvo cero porcentajes de contaminación de semillas.

Para la fase de desinfección de la semilla Aponte (2009) utilizó alcohol de 96° por 60 segundos, y después hipoclorito de sodio al 2% durante 40 min con dos gotas de Tween 80.

Así mismo, Ruíz (2010) en su trabajo de investigación denominado determinación de la mejor concentración en la micropropagación de *G. crinita* Mart, en la fase de desinfección superficial de la semilla utilizó alcohol de 70° por 60 segundos y después utilizó hipoclorito de sodio (NaClO) al 2%, durante 40 minutos, obteniendo un 95% de semillas libres de contaminación. Como medio de cultivo utilizó Murashige & Skoog (MS) suplementado con el regulador de

crecimiento Acido Indol Acético (AIA) y Acido Naftaleno Acético (ANA), concluyendo que no existe diferencia significativa entre ellas.

Con el fin de micro propagar la especie *G. crinita* Mart Maruyama et al., (1996) realizaron una investigación utilizando plantas germinadas, como medio de cultivo utilizo Woody Plant Medium (WPM) suplementado con trans-zeatina [trans-6- (4-Hydroxy- 3- metilbut-2-enilamino) purina] (ZEA), logrando después de cuarenta y cinco (45) días obtener plántulas con mayor número de brotes con la dosis de 10 μ M. Para la fase multiplicación de brotes y enraizamiento utilizó como medio de cultivo WPM suplementado con el regulador de crecimiento kinetina [6-furfurilaminopurina] (KIN) con una dosificación de 1 μ M, logrando a sesenta (60) días crecimiento de brotes y altos porcentajes de enraizamiento. Para la fase de aclimatación las plántulas o clones fueron transferidos a macetas para su respectivo crecimiento ex vitro.

En la fase de multiplicación de brotes y producción raíz Aponte (2009) utilizó como regulador de crecimiento ácido- α -naftalenacético (ANA), o ácido indol-3-acético (AIA), donde el porcentaje de supervivencia de estas fueron al 100%. El efecto de las concentraciones aplicadas con ácido- α -naftalenacético no tuvo diferencias significativas con relación al testigo. Por otro lado, las concentraciones aplicadas con el ácido indol-3-acético (AIA) si obtuvieron diferencia significativa en comparación del testigo.

Por otra parte, Maruyama et al., (1997) realizaron una propagación *in vitro* a partir de la técnica de embriogénesis somática, para ello emplearon como explante de propagación las raíces y peciolas, donde estas generaron estructuras bulbosas de color verde. Al cabo de cuarenta y cinco 45 días se visualizó brotes adventicios. Como medio de cultivo se empleó (WPM)

suplementado con trans-6- (4-hidroxi-3-metilbut-2- enil) amino purina (zeatina) y con 6- benciladenina (BA) con zeatina 10 μ M.

2.1.1. Características generales de la especie en estudio

2.1.1.1. Taxonomía

Según Reynel et al., (2003) y Lorenzi (2009) describieron la siguiente clasificación taxonómica de *G. crinita* Mart.:

Clase: Dicotyledoneae

Orden: Malvales

Familia: Malvaceae.

Género: Guazuma Mart.

Especie: Crinita.

Nombre científico: ***Guazuma crinita*** Mart.

Nombre común: Bolaina blanca

2.1.1.2. Características Botánicas

En lo largo y ancho camino de su vida de investigación Flores (2007), publico un libro de la especie *G. crinita* Mart (Bolaina blanca), y en ello da a conocer que es un árbol forestal que llega hasta 35m de altura y 60cm de diámetro. Reynel et al., (2003) la medida del diámetro es de 25-80 cm, el tronco es cilíndrico, su corteza es lisa agrietada, color marrón claro a grisáceo, corteza interna es fibrosa conformado por tejido reticulado color amarillo.

Las características de sus hojas son simples alternas dispuestas en un solo plano, sus flores son rosadas en las axilas de las hojas o al final de las ramitas (SERFOR, 2020). George y Marteus (1961) tiene frutos pequeños, globosos, cubiertos de pelos largos marrones largos para facilitar la dispersión por el viento.

2.1.1.3. Fenología

Es sus avistamientos y observaciones de la especie *G. crinita* Flores (2018) comenta que la floración y fructificación ocurre anualmente. La floración dura aproximadamente 2 meses entre los meses de mayo y junio, en la copa del árbol se observa un color rosado suave. Posteriormente las flores caen y el árbol permanece solo con hojas por 3 a 4 semanas hasta que empiezan a aparecer los frutos, cubiertos por largos pelos marrones.

Así mismo, Flores (2007), comenta que la maduración de los frutos dura 2-3 meses y la diseminación de sus semillas alcanza su máxima intensidad en los meses de setiembre y octubre. Durante la fase de fructificación y la diseminación puede presentarse defoliación parcial de la copa.

2.1.1.4. Distribución y Hábitat

Reynel et al., (2003), en su libro de árboles útiles de la Amazonía peruana, comenta que la distribución de la especie forestal *G. crinita* es muy amplia en el neotrópico desde el centro de América a la región amazónica hasta el sur de Brasil y Bolivia, se encuentra normalmente a 1 500 msnm, pero en su mayoría esta especie es más abundante en la Amazonía Peruana.

Reynel et al., (2003), observó que esta especie se encuentra en zonas con una estación seca marcada, así como también en zonas con gran pluviosidad elevada y constante. Se suele presenciar a esta especie en suelos limosos a arenosos, muchas veces de escasa fertilidad, a veces pedregosas; no tolera el anegamiento, sobre todo cuando es una plántula.

Generalmente se encuentra en bosques secundarios y a orillas de los ríos, a veces formando bosques naturales homogéneos. En el Perú se encuentran en los departamentos de Loreto, Ucayali, Huánuco, Junín y Cerro de Pasco (Flores, 2007).

2.1.1.5. Observaciones para el reconocimiento de la especie

La especie *G. crinia*, se puede reconocer por el porte ya que su fuste es cilíndrico y esbelto y la ramificación en el último tercio, la corteza interna fibrosa que oxida rápidamente luego de cortada, las hojas aserradas y palminervadas, inequiláteras y los frutos cubiertos con largas cerdas. Los frutos de *G. crinita* y de *G. ulmifolia*, ambas conocidas con el nombre local “Bolaina”, son bastante diferentes, como se aprecia contrastando las ilustraciones de estas especies (Reynel et al., 2003).

2.1.1.6. La semilla

La semilla presenta un embrión bien desarrollado, en ello hay presencia de endospermo carnosos formado por lípidos y proteínas. Las Semillas son pequeñas de dimensiones de 1mm de diámetro. El número de semillas en unos frutos es de 10 a 20 semillas.

2.1.1.7. Manejo

- **Método de recolección:** Se debe escalar el árbol y cortar las ramas conteniendo los frutos.
- **Tratamiento pre germinativo:** No se requiere ninguno.
- **Germinación:** Se inicia entre 7 y 15 días después del almácigado.
- **Densidad de siembra y momento oportuno de repique:** La densidad de siembra que recomienda Flores (2007), es de 10 g de semilla por metro cuadrado. Las plántulas se repican a los 35-40 días, cuando tengan 7-9 hojitas.
- **Almacenamiento:** La mejor temperatura que recomienda Flores (2007) es de 25 °C, considerándose aceptable hasta los 8 meses, después de este tiempo el porcentaje de germinación disminuye considerablemente.

2.1.1.8. Silvicultura

La *G. crinita* posee abundante regeneración en sucesiones secundarias de origen antrópico y natural, donde forman masas coetáneas (Flores, 2018).

En una investigación realizada por Flores (2007b), en el bosque nacional Alexander Von Humboldt evaluó plantaciones en campo abierto, en fajas de 30m de ancho, los resultados fueron superiores a las 5-10 m de altura total en suelos de tipo gleysol. Y estableció que *G. crinita* tolera diversos tipos de suelo, siendo la luminosidad el factor esencial. Se puede cosechar cada 8-15 años, dependiendo del producto y del sitio.

2.1.1.9. En reforestación

- **Suelos preferidos:** Suelos ricos con buen drenaje, inundables temporalmente.
- **Tolerancia a la competencia:** Baja tolerancia a la competencia.
- **Asociación:** Crece en manchales, asociado con otras especies pioneras como *Schizolobium* sp (quillosia pashaco), *Croton* sp (auca atadijo), *Cecropia* sp (cetico), etc.
- **Plagas importantes:** La principal plaga es el ataque de grillos que disputan la yema principal, la misma que conduce a la bifurcación del tallo.
- **Técnica de plantación:** Siembra directa, en recipientes o a raíz desnuda bajo sistema de campo abierto, especial para combinación con cultivos agrícolas anuales o perennes.
- **Comportamiento inicial:** Rápido crecimiento, formando una pequeña copa de forma globosa a un tercio superior del tronco. Tiene la capacidad de rebrote después de aprovechado el tronco.

2.1.1.10. Tecnología de la madera

- **Color:** la albura y duramen de color blanco, no diferenciándose (condición húmeda). Por exposición a la luz y aire el duramen presenta un color blanco.
- **Olor:** Ausente o no distintivo.
- **Sabor:** Ausente o no distintivo.
- **Grano:** La especie presenta un grano recto.

- **Textura:** Clasificada como mediana y homogénea.
- **Veteado:** En corte radial, la especie presenta reflejos plateados en bandas estratificadas y desordenadas; en cortes tangenciales manifiesta arcos superpuestos poco pronunciados no tan claros.
- **Albura:** Porción promedio en sección transversal de un 18%.

2.1.1.11. Usos

La madera es de buena, se usa en carpintería para la elaboración de utensilios pequeños como paletas de chupetes, mondadientes y palos de fósforos y artesanía; en años reciente se le está usando como tableros contrachapados (Reynel et al., 2003).

2.2. Planteamiento Teórico

2.2.1. Morfogénesis

La morfogénesis es uno de los tres aspectos fundamentales de la biología del desarrollo, junto con el control del crecimiento celular y de la diferenciación celular (Pérez, 2017), Es un proceso muy frecuente en el cultivo *in vitro* de especies vegetales (Prieto *et al.*, 2005).

2.2.2. Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)

Consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para

que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Roca y Mroginski, 1991).

Por otro lado, George (2008) menciona que el cultivo de tejidos vegetales es una ciencia biotecnológica que emplea células, tejidos u órganos aislados de la planta madre, para realizar diferentes técnicas o métodos para propagar plantas. Por otra parte, Levitus (1997) lo define como un conjunto de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (una parte separada de un cuerpo vegetal), donde se les cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuban en condiciones ambientales controladas.

En las últimas décadas, los CTV han adquirido una importancia considerable en la investigación básica y aplicada, su uso se ha expandido rápidamente en la biotecnología. Se ha demostrado su gran utilidad para estudiar, propagar y conservar especies hortícolas, ornamentales y principalmente aquellas que presentan problemas en su conservación como cactáceas y árboles entre muchas más (Sharry et al., 2020).

2.2.3. Micropropagación

La micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. El cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales;

esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados. Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posea y al estímulo que reciban. Dependiendo de las características de la planta que se pretenda propagar y del objetivo perseguido, la micropropagación puede realizarse a través de tres vías de regeneración: brotación de yemas adventicias preexistentes, producción de yemas de novo y embriogénesis somática (Levitus, 1997).

2.2.3.1. Fase de la Micropropagación

Dentro del proceso de micropropagación existen diferentes fases o etapas:

Fase 0: Selección y Preparación de la planta madre.

Fase 1: Desinfección de las yemas de la planta y/o desinfección de semillas.

Fase 2: Introducción del material seleccionado *in vitro*.

Fase 3: Multiplicación de brotes.

Fase 4: Enraizamiento.

Fase 5: Aclimatación.

Las fases abarcan un ciclo completo en la multiplicación de plantas *in vitro* y puede ser aplicada a diferentes especies vegetales (Castillo, 2006).

Fase 0: Preparación de la planta madre

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se debe tener una correcta elección y preparación del explante, ya que esta incide directamente sobre la calidad del mismo y su respuesta frente a los dos principales les

problemas que afectan al establecimiento del cultivo, que son la contaminación con microorganismos y la oxidación del explante.

Los factores que influyen sobre la calidad del explante son: el tipo de órgano que sirve como explante, la edad ontogénica y fisiológica del mismo, la estación en la cual se colecta el material vegetal, el tamaño y el estado sanitario general de la planta donante. La planta donante debe elegirse en base a una selección basal positiva para las características agronómicas deseables. Una vez seleccionados los individuos, es preciso definir el tipo de explante a establecer en condiciones *in vitro*. En general, los órganos jóvenes o bien rejuvenecidos son los que tienen mejor respuesta en el establecimiento que los obtenidos a partir de materiales adultos. El empleo de explantes que se encuentran expuestos a bajos niveles de patógenos puede resolver el problema de la contaminación por hongos y bacterias durante el establecimiento del cultivo *in vitro*. Se recomienda colectar explantes primarios a campo durante la estación primaveral y estival, cuando existe una brotación activa de las yemas, ya que el empleo de yemas en estado de dormición ocasiona serios problemas de contaminación (Castillo, 2006; Levitus, 1997).

Fase 1: Desinfección del material vegetal

El porcentaje de la contaminación en el cultivo *in vitro* es influenciada por diversos factores, siendo la contaminación del explante, un problema serio en el establecimiento de un cultivo primario, convirtiéndose en un problema en la multiplicación (Monfort et al., 2015), unos de los factores en la tasa de contaminación, es la colecta del material propagativo (Singh et al., 2011), es por ello que se sugiere realizar diversas actividades de descontaminación antes de

inocular el explante en un medio de cultivo *in vitro*, como por ejemplo aplicación de fungicidas, bactericidas o insecticidas.

La asepsia del material genético (semillas) es fundamental e importante en la micropropagación, la aplicación de diferentes insumos desinfectantes, evitara contaminación en el medio de cultivo por hongos y bacterias, que ocasionan pérdidas del material genético inducido, por eso es necesario realizar un buen trabajo de desinfección, desde la obtención del material en el campo hasta su utilización en la cámara de flujo laminar (Xavier et al., 2009).

Los explantes pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. Antes de extraer los explantes se realiza una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia (Castillo, 2006).

Para obtener explantes en condiciones de asepsia, se trabaja en cabinas de flujo laminar.

Fase 2: Introducción del material *in vitro*

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro*. También pueden observarse infecciones por bacterias y hongos asociados que sobreviven a los tratamientos de esterilización y por patógenos endógenos latentes dentro del sistema vascular, resultado de una esterilización inefectiva de

los explantes. Estos patógenos latentes podrían manejarse mediante el empleo de bacteriostáticos o antibióticos en el medio de cultivo (Castillo, 2006; Levitus, 1997; Sharry et al., 2020).

Fase 3: Multiplicación de los brotes

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron la FASE 1 y 2 originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben sub cultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas.

El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados. (Castillo, 2006). Cabe mencionar que el principal objetivo de esta fase es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación (Levitus, 1997).

Fase 4: Enraizamiento

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente plantines individuales de un tamaño aproximado de 2 centímetros. Los brotes obtenidos

durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea (Castillo, 2006).

En las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en muchas especies leñosas resulta más complicada por su limitada capacidad rizogénica (Levitus, 1997).

Fase 5: Aclimatación

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrirán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales. En el momento en que se extraen los explantes o plantines enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernáculo, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta (Castillo, 2006).

2.2.4. Medio de Cultivo

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos (Levitus, 1997; Pereira et al., 2008). Por lo general son soluciones sólidas, semisólidas o líquidas, donde se desarrollan microorganismos o células o tejidos vegetales y/o animales (Sharry et al., 2020).

No existe un medio universal para todas las especies que se trabajan *in vitro*, sin embargo, se puede utilizar el medio básico o de Murashige y Skoog (MS). Actualmente se encuentran más de 80 medios comerciales que se venden listos para micropropagación y la literatura menciona alrededor de 2000 formulaciones diferentes (Mroginski et al., 2004).

2.2.4.1. Composición del Medio de Cultivo

La composición de un medio de cultivo está conformado por diferentes sustancias (Paiva y Duarte, 2001), ésta debe garantizar condiciones muy parecidas a las condiciones nutricionales que ofrece el suelo a las plantas en su estado natural; el pH de los medios de cultivo debe ser ajustado con el uso de Ácido Clorhídrico HCL o Hidróxido de Sodio NaOH, para dejar el medio con un pH ajustado entre $5,7 \pm 0,1$ (Lameira, 2000).

Existen diversos medios básicos, por ejemplo, el Murashige y Skoog (MS), Medio de Chu (N6), Medio de Gamborg B5, entre otros. El Murashige y Skoog es un medio con relativamente alto contenido de sal (Murashige y Skoog, 1962), mientras el medio White generalmente se considera como de bajo contenido de sal, muchos explantes crecen mejor si se les suministra nitrógeno reducido, lo

que se puede hacer agregando sales de NH₄ mas suplementos como urea o CH. El valor medio de MS se distribuye en partes a sus altos niveles de NH₄ + K (Krikorian, 2015).

Tabla 1

Compuestos nutricionales de medios de cultivos

Componentes		Medios Bases		
		MS	N6	B5
Macroelementos (mg/L)				
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650	---	---
KNO ₃	Nitrato de potasio	1900	2830	2500
CaCl ₂ 2H ₂ O	Cloruro de calcio di hidratado	440	166	150
MgSO ₄ *7H ₂ O	Sulfato de magnesio	370	185	250
KH ₂ PO ₄	Fosfato mono potásico	170	---	400
(NH ₄) ₂ SO ₄		---	463	134
Microelementos (mg/L)				
H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.2	1.60	3
MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso	22.30	4.40	10
ZnSO ₄ *7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidato	8.6	1.50	2
KI	Yoduro de potássio	0.83	0.80	0.75
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	Molibdato de sodio di hidrato	0.25	---	0.25
CuSO ₄ *5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025	---	0.025
CoCl ₂ *6H ₂ O	Cloruro de cobalto	0.025	---	0.025
FeEDTA (mg/L)				
Na ₂ EDTA	Sal de sodio del ácido etilendiamino tetraacético	37.3	37.25	37.3
FeSO ₄ 7H ₂ O	Sulfato ferroso heptahidrato	27.8	27.85	27.8
Vitaminas e Aminoácidos (mg/L)				
Glicina		2	2	---
Tiamina –HCL		0.1	1	10
Piridoxina –HCL		0.5	0.5	1
Ácido Nicotínico		0.5	0.5	1
Mio-inositol (mg/L)				
Mioinositol		100	---	100
pH				
PH		5.7	5.8	5.5

Los componentes principales del medio son: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azucars, agentes gelificantes y reguladores de crecimiento.

Fuentes de carbono

Por lo general en los cultivos *in vitro* se utiliza glucosa, maltosa, galactosa y sacarosa, esta última es empleada en porcentajes de 2% a 5% (Ertola y Jimenez, 1998; Levitus et al., 2010).

Nutrimientos minerales

La composición mineral está compuesta por macronutrientes y micronutrientes:

- **Macronutrientes:** Son elementos esenciales que las plantas requieren en cantidades mayores, por lo general son seis elementos muy indispensables y son los siguientes: Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Azufre (S), las concentraciones de estas varían según cultivares, especies o explantes (Sharry et al., 2020).
- **Micronutrientes:** Son elementos que las plantas los requieren, pero en menores cantidades, los principales micronutrientes son: Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Zinc (Zn), Boro (B), Cobre (Cu) y Molibdeno (Mo). Algunos medios contienen Cobalto (Co), Yodo (Y) y Cloro (Cl), aunque no son esenciales para el crecimiento vegetal. Estos nutrientes deben estar en una concentración tal que permita el adecuado crecimiento celular. Los requerimientos de nitrógeno son generalmente provistos por una mezcla de nitrato y amonio en concentraciones variables entre 3 y 50 mg. Cuando estas fuentes son suplementadas en forma individual se afectan, generalmente en forma negativa, tanto el crecimiento del cultivo como la

producción de metabolitos (Ertola y Jimenez, 1998).

Vitaminas

Por lo general las plantas, pueden producir vitaminas para sus diversas necesidades. Sin embargo, los cultivos de células vegetales deben complementarse con ciertas vitaminas para su óptimo crecimiento y esta depende del objetivo del experimento y del tipo de tejido que se está cultivando *in vitro*. Las vitaminas más utilizadas son: Tiamina (vitamina B1), Riboflavina (vitamina B2), Acido nicotínico (niacina o vitamina B3), Adenina (vitamina B4), Ácido pantoténico (vitamina B5), Piridoxina (vitamina B6), Niacina (vitamina B12), Ácido Ascórbico (vitamina C), Tocoferol (vitamina E), Biotina (vitamina H), Ácido fólico (vitamina Bc o M), Inositol o myo-inositol (Bhojwani, 1996).

Agente gelificante

Generalmente se usa un agente gelificante para eludir problema del sumergimiento del explante ya que esta puede causar su muerte por falta de oxígeno. La propiedad más deseable de un agente gelificante es que debe resistir la esterilización en autoclave, y el medio debe ser líquido cuando está caliente, pero formar un gel semisólido cuando está frío. Se ha demostrado que estas plantas funcionan mejor cuando se cultivan en un soporte semisólido (Bhojwani, 1996).

Sustancias Reguladoras

Son moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo eficaces a bajas concentraciones internas,

cercanas a 1 mM. En la mayoría de los casos los medios utilizados para el establecimiento de los cultivos contienen auxinas (ANA, 2,4-D, AIA, AIB, NOA, Dicamba, Picloram) y/o citoquininas (BA, KIN, ZEA, 2iP, Thidiazurón). Las giberelinas (especialmente GA3) son requeridas en algunas ocasiones para el cultivo de meristemas o para la elongación de brotes. El ABA, es usado en algunos casos (Levitus, 1997).

Otros Compuestos

- **Aminoácidos y amidas:** Entre los más beneficiosos, está la de L-arginina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-ácido glutámico y L-tirosina. Otros compuestos utilizados son: adenina, sulfato de adenina, el ácido cítrico y el ascórbico, para evitar la oxidación de los tejidos (Abdelnour y Vicent, 1994).
- **Carbón activado:** El carbón activado presenta cargas residuales, que son capaces de absorber las sustancias que excretan los explantes, normalmente el carbón activo es prelavado antes de ser incorporado al medio de cultivo y las concentraciones varían de 0,1 a 5% (Gonzales et al., 2004) y esta suele ser incorporado al medio, dado que es probable que absorba metabolitos tóxicos para los cultivos.

2.2.5. Reguladores de crecimiento

Es conocida como hormonas vegetales, son sustancias sintetizadas en determinado lugar de la planta y se desplazan a otro, donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, desarrollo y metabolismo del vegetal.

El término “regulador de crecimiento” es más general y abarca las sustancias de origen natural y las sintetizadas en laboratorio, que determinan respuestas en la planta (Perea, 2010).

2.2.5.1. Tipos de reguladores de crecimiento

Auxina

Son sustancias que deben ser utilizadas en concentraciones muy bajas con el fin de no causar efectos inhibitorios ni atrofas en células y tejidos (Carvalho y Vidal, 2003; Perea, 2010).

Los efectos más destacables son:

- Alargamiento celular.
- División celular.
- Diferenciación del floema y de la xilema.
- Participación en respuestas tropical (gravitropismo y fototropismo).
- Promoción la formación de raíces adventicias en pequeñas cantidades.
- Promoción la dominancia apical.
- Regulación la formación floral.

Ejemplo de algunas

- AIA (Ácido 3- Indol acético).
- AIB (Ácido Indol Butirico).
- 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxi).
- ANA (Ácido 2-(1-naftalen acético)).

Citocininas

Derivan de adeninas y promueven la división celular en tejidos no meristematicos, estas son las más usadas (Perea, 2010; Valerio, 2018).

Son producidas a partir de órganos en crecimiento y en el meristemo de la raíz. Se sintetizan a partir del isopentenil adenosina fosfato.

Efectos fisiológicos

- División celular y formación de órganos.
- Retardo de la senescencia (debido a su propiedad de generar alta división celular).
- Desarrollo de yemas laterales o callogenesis.
- Inducen partenocarpia.

Ejemplo de algunas

- Zeatina.
- Kinetina (N6-furfuriladenina).
- BAP (6 bencil amino purina).
- TDZ (thidiazuron).
- 2-iP (2-isopentil adenina).

Giberelinas

Son compuestos que promueven el alargamiento de los entrenudos de la planta mediante la inducción de la división y elongación celular. La síntesis en plantas completas ocurre principalmente en las hojas jóvenes, promueven la

división celular al reducir la interface del ciclo celular e inducir las células en fase G1 a sintetizar ADN (Perea, 2010; Suárez, 2020).

Efectos fisiológicos

- Control del crecimiento y elongación de los tallos.
- Crecimiento y desarrollo de frutos.
- Rompimiento de dormancia en semillas de algunas especies.

Etileno

Es activo en concentraciones muy bajas, del orden de 1 ppm (parte por millón). Las plantas pueden oxidar fácilmente al etileno hasta CO₂; debido a su alta volatilidad, la regulación de su concentración se lleva a cabo en la síntesis, mediante el control de la ACC sintasa (1- aminociclopropano-1-carboxílico) y la ACC oxidasa (Perea, 2010).

Efectos fisiológicos

- Maduración del fruto.
- Senescencia foliar.
- Lesión física.
- Lesión por congelación.
- Estrés hídrico.

2.2.6. Factores que influyen en el cultivo *in vitro*

2.2.6.1. Genotipo

Es un factor determinante en todos los procesos morfogénicos, desde la capacidad del explante para su establecimiento en condiciones *in vitro* a la proliferación de callo, o la diferenciación y crecimiento de nuevos órganos. Por esta causa, no es posible generalizar metodologías o protocolos de trabajo debido a que los medios de cultivo, así como las condiciones de cultivo seleccionados, deben ser específicos para cada situación en particular (Levitus et al., 2010).

2.2.6.2. Condiciones Químicas

Las composiciones químicas son factores esenciales que alteran la morfogénesis entre ellas se puede encontrar:

- **Composición salina del medio de cultivo:** La composición salina más empleada para inducir la formación de callo, la organogénesis directa o indirecta en la mayoría de las especies vegetales, es la de Murashige & Skoog (1962) (MS). Sin embargo, existen otras formulaciones diseñadas para inducir determinados patrones morfogénicos (Levitus, 1997).
- **Reguladores del crecimiento:** Estos compuestos pueden promover la morfogénesis aun cuando la concentración salina no sea la adecuada. En condiciones óptimas de cultivo pueden aumentar significativamente la diferenciación de órganos (Levitus et al., 2010).

- **Carbón activado, antibióticos, Agente gelificante:** Son de gran importancia en el desarrollo del explante.

2.2.6.3. Condiciones Físicas

- **Temperatura:** Es un factor importante ya que la temperatura estable favorece a la regeneración (Levitus et al., 2010).
- **Humedad relativa:** Dependerá del sello o cobertura del envase empleado. Si el sello es hermético, la humedad interior será del 100 %. Si en cambio existe la posibilidad de un intercambio gaseoso la humedad interna puede descender a niveles cercanos al 50 %. El descenso de la HR puede promover una pérdida veloz de agua del medio de cultivo variando la concentración de sus compuestos hasta llegar a niveles tóxicos (Levitus et al., 2010).
- **Luz:** Debe ser suministrada, evaluada en intensidad y periodo, el suministro de luz favorece a la diferenciación de órganos y para la formación de callo, es común que se prefiera la oscuridad (Levitus, 1997).

2.3. Definición de Términos Básicos

- **Agua destilada:** Agua purificada por el proceso de destilación (condensación del vapor de agua obtenido por la ebullición o la evaporación) de agua. Es utilizada en el CTV en la preparación de medios de cultivo y de soluciones stock de reactivos químicos (Carvalho et al., 2011).

- **Autoclave:** Equipo utilizado para esterilizar vidrios, medios de cultivo e instrumentos absorción de agua de una semilla (Carvalho et al., 2011).
- **Germoplasma:** Conjunto de materias hereditarias de una especie (Carvalho et al., 2011).
- **Inoculación:** Introducir parte de la planta (explante) o célula en medio nutritivo, para el establecimiento del cultivo *in vitro* (Carvalho et al., 2011).
- ***In vitro*:** Literalmente en el vidrio. Es un término aplicado para designar el desarrollo de células, tejido u órganos vegetales en frascos conteniendo medio de cultivo (Carvalho et al., 2011).
- **Morfogénesis:** Estudio de la emergencia y de la formación de nuevos órganos y su preparación durante el ciclo de vida que resulta en las características de tamaño, forma y estructura de unos organismos (Carvalho et al., 2011).
- **pH:** Símbolo de cantidad fisicoquímica potencial hidrogenado. Esta cantidad indica la acidez, neutralidad o alcalinidad de una solución acuosa (Carvalho et al., 2011).
- **Propagación *in vitro*:** Técnica para propagar plantas dentro de tubos de ensayo o recipientes de vidrio (Carvalho et al., 2011).
- **Regulador de Crecimiento:** Sustancia reguladora de crecimiento.
- **Totipotencia:** Propiedad inerte de las células vegetales de manifestar, en

momentos diferentes estímulos apropiados, la potencialidad en iniciar un nuevo individuo multicelular (Carvalho et al., 2011).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1. Método de Investigación

En la presente investigación se utilizó el método experimental ya que en una primera fase se evaluó el efecto del tiempo en la desinfección de las semillas de *G. crinita*, en la segunda fase, la influencia de sustratos en la germinación de las semillas y en la tercera fase el efecto de hormonas en la morfogénesis de explantes provenientes de plantines crecidos en medio *in vitro*. Esto se llevó a cabo en condiciones controladas, con el fin de describir los efectos que produjo la variable en los diferentes ensayos de investigación (Fontelles et al., 2009).

3.2. Población y Muestra

3.2.1. Población

La población estuvo constituida por un lote de semillas biológicas obtenidas de los huertos semilleros de Bolaina establecidos por el World Agroforestry (ICRAF) en la cuenca del río Aguaytía, los semilleros que tenían una edad aproximada de 10 años.

3.2.2. Muestra

La muestra estuvo representada por diferente número de semillas por fase de desarrollo del experimento, en la fase de desinfección se utilizaron 388 semillas, en la fase de germinación 192 semillas y en la fase de morfogénesis se utilizaron 55 explantes.

Las semillas fueron colectadas de individuos con características superiores en altura, diámetro y un estado fitosanitario sano.

3.3. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

3.3.1. Técnicas

La técnica utilizada fue la observación directa del efecto que produjo cada una de las variables en estudio sobre el material experimental que en este caso fueron semillas biológicas de *G. crinita* Mart.

3.3.2. Instrumentos

Como instrumento se utilizó diferentes cuestionarios en cada una de las fases del experimento. A continuación, se presenta los diferentes cuestionarios:

Para la recolección de datos para la desinfección y germinación se utilizó el formato presentado en la Tabla 2.

Tabla 2

Formato de Evaluación de Desinfección y Germinación

EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO MORFOGÉNICO DE LA FASE DE GERMINACIÓN DE LA ESPECIE:								
HOJA:			FECHA DE INOCULACIÓN:			DIA:	MES:	ANO:
NÚMERO DE EVALUACIÓN:			FECHA DE EVALUACIÓN:			DIA:	MES:	ANO:
EVALUADOR:								
TRATAMIENTO DE MEDIO DE CULTIVO PARA LA GERMINACIÓN			T0:		T2:		T4:	
			T1:		T3:		T5:	
Nº	CÓDIGO	ESPECIE	GERMINACIÓN MAX 03	DESINFECCIÓN "SI O NO"	GRADO DE INFESTA- CIÓN MAX 03	INFESTACIÓN		OBSERVACIÓN
						HONGO "SI O NO"	BACTERIA "SI O NO"	
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
n								

Para la recopilación de información sobre el comportamiento morfológico se utilizó el formato presentado en la tabla 3:

Tabla 3

Formato de Evaluación del Comportamiento Morfogénico

EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO MORFOGENICO DE LA FASE DE PRODUCCION DE BROTES Y ENRAIZAMIENTO DE LA ESPECIE:														
HOJA:			TEMPERATURA:			FECHA DE INOCULACIÓN:			DIA:		MES:		AÑO:	
NÚMERO DE EVALUACIÓN:			HUMEDAD:			FECHA DE EVALUACIÓN:			DIA:		MES:		AÑO:	
EVALUADOR:														
TRATAMIENTO DE MEDIO DE CULTIVO			T1:			T2:			T3:					
			T4:			T5:			T6:					
			T7:			T8:			T9:					
N°	CÓDIGO	VIVO O MUERTO	CONTAMINACIÓN		OXIDACIÓN		CALLOS		NÚMEROS					OBSERVACIÓN
			HONGO	BACT	SI	NO	SI	NO	PRIM. RADL.	RAÍZ	BROT	HOJA	LONG	
1														
2														
3														
4														
5														
6														
7														
8														
9														
10														
11														
12														
13														
14														
15														
16														
17														
18														
19														
20														
21														
22														
N														

Así mismo se utilizó cámara fotográfica para reportar las características de desarrollo de las semillas biológicas, así como de los explantes. También se utilizó el siguiente material y equipo:

Material vegetal:

- Semillas de *Guazuma crinita* Mart.
- Micro estacas

Materiales de laboratorio:

- Placas Petri
- Agitador
- Pipetas
- Tubo de ensayo
- Matraz Erlenmeyer
- Vasos de precipitación
- Mecheros de alcohol.
- Fosforo
- Micropipetas
- Formato
- Pinza de 20 cm de largo.
- Espátula.
- Papel aluminio
- Papel toalla
- Plumón marcador
- Piseta
- Algodón
- Hoja de bisturí

Equipos:

- Balanza analítica
- pH-metro
- Termohigrómetro
- Autoclave
- Horno de Microondas
- Cámara fotográfica
- Cámara de flujo laminar
- Destilador de agua

Reactivos:

- Auxina (AIB)
- Citoquininas (KIN)
- Alcohol 70°
- Alcohol 96°
- Hipoclorito de sodio
- Twee 20
- Ácido clorhídrico
- Fito gel

- Carbón activado
- Sacarosa
- Murashige skoog
- Hidróxido de sodio

3.4. Procedimientos de Recolección de Datos

Todas las fases de la investigación fueron desarrolladas en el laboratorio de cultivos de tejidos y Meristemas de la Universidad Nacional Ucayali, km 6.200 de la Carretera Federico Basadre.

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), aplicándose las pruebas de ANVA y comparación de medias a los resultados de cada una de las tres fases en la que consistió el desarrollo de la investigación.

Para la primera fase (DESINFECCIÓN) se trabajó con 5 tratamientos (incluido el testigo), con 17 a 20 repeticiones. Las variables que se emplearon fueron: 0: sin contaminación y 1: contaminación total.

Para la segunda fase, de GERMINACIÓN, se trabajó con 4 tratamientos (incluido el testigo), con 17 a 20 repeticiones. Las variables que se emplearon fue: 0: sin germinación 1: una semilla germinada, 2: dos semillas germinadas y 3: tres semillas germinadas.

Para la fase Morfogénica, CALLOGENESIS, DIFERENCIACIÓN RADICULAR e INDUCCIÓN DE BROTES, se trabajó con 5 tratamientos (incluido el testigo), con 17 a 20 repeticiones. Las variables que se emplearon en callo génesis fueron: 0: sin callo y 1: con presencia de callo. Las variables que se empleó en la diferenciación radicular fue: 0: sin presencia de primordio radicular, n veces: número total de primordio radicular. Las variables que se emplearon en la inducción de brotes fue: 0: sin de brotes, n veces: número total de brotes.

Para Las diferentes fases de la que constó el experimento se desarrollaron de la siguiente manera:

Fase de desinfección

En esta fase se utilizó hipoclorito de sodio (NaClO) al 2%, con diferentes tiempos de exposición.

Para la obtención del NaClO al 2%, se diluyó una solución al 6% de este compuesto realizando el siguiente cálculo:

$$\begin{array}{r} 6\% \text{ NaClO} \text{ -----} 100\text{ml} \\ 2\% \text{ NaClO} \text{ -----} X \\ 33.33 \text{ ml}=X \end{array}$$

El NaClO al 6% se obtuvo en el mercado bajo el nombre comercial de Sapolio®. El resultado de X representó la cantidad de NaClO que se añadió a un vaso precipitado, volumen que se completó a 100 ml agregando 66.66 ml de agua destilada. De esta forma se llevó la concentración de NaClO de 6% a 2%.

El siguiente paso fue lavar las semillas con agua destilada durante 30 minutos y luego fueron sumergidas en una solución de agua destilada con fungicida Benlate® a una concentración de 03 g para 100ml de agua destilada durante un periodo de 30 minutos. Después se enjuagaron las semillas con agua destilada para posteriormente sumergirles en Alcohol 96° durante 1 minuto (este proceso fue dentro de la cámara de flujo laminar), inmediatamente después se extrajo las semillas de la solución para ser sembradas en sus respectivos frascos que contenían los medios de cultivo de acuerdo a los 5 tratamientos, donde en el tratamiento testigo las semillas fueron sumergidas sólo en agua estéril y

destilada. Los demás tratamientos variaron en el tiempo de: 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos y 20 minutos de permanencia en el hipoclorito de sodio.

Para finalizar las semillas expuestas a la acción del NaClO fueron lavadas 5 veces con agua destilada esterilizada. Cabe mencionar que en todo el proceso se trabajó con materiales esterilizados. Los tratamientos aplicados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4

Tratamiento de desinfección

Tratamientos	Tiempo de NaClO	Nº repeticiones
T1	00 min	17
T2	05 min	20
T3	10 min	20
T4	15 min	20
T5	20 min	20

La variable analizada fue porcentaje de semillas desinfectadas y porcentaje de semillas contaminadas. Para obtener dichos datos se evaluó durante 15 días el experimento para que se exprese a plenitud la posible contaminación. En este primer experimento se utilizó sólo Fita gel, como medio de cultivo.

Fase de medio de germinación

En esta fase se desinfectó las semillas utilizando el tratamiento cinco de la fase de desinfección, para obtener semillas con una alta tasa de probabilidad de asepsia, luego estas fueron sembradas en diferentes medios de cultivo para la fase de germinación de semillas de *G. crinita*.

Para la preparación del medio de germinación se identificó una proporción entre la cantidad de frescos que se utilizó, con la cantidad de medio preparado (40 frascos para 1L de medio, 25ml de medio de cultivo para una unidad de frasco).

Se utilizó diferentes materiales para la preparación de los medios de cultivos, los materiales utilizados fueron lavados con agua destilada. Después se colocó en una mesa 4 matraz Erlenmeyer de 500 ml con 400 ml de agua destilada, luego se agregó diferentes compuestos orgánicos para cada tratamiento como se indica en la tabla 3.

Para el primer tratamiento (T1), se pesó 7 gr de Fito gel para una cantidad de 500 ml de agua destilada, después se colocó en una cocina con agitador magnético hasta que se homogenizó el medio. Después de preparado el medio de cultivo, fue vertido en 20 frascos con la ayuda de una jarra. Los frascos fueron inmediatamente cubiertos o tapados con papel aluminio y etiquetado para ser identificado en la evaluación correspondiente.

Para el segundo tratamiento (T2), FITO GEL + SACAROSA, se pesó 7 (gr. L⁻¹) de Fito gel y 15 (gr. L⁻¹) de sacarosa para una cantidad de 500 ml de agua destilada. Y luego se siguió los mismos pasos que en el caso anterior.

Para el tercer tratamiento (T3), FITO GEL + SACAROSA + MURASHIGE y SKOOG, Se pesó 7 (gr.L⁻¹) de Fito gel, 30 (gr.L⁻¹) de sacarosa y 2.215 (gr.L⁻¹) Murashige and Skoog (MS) para una cantidad de 500 ml de agua destilada, preparándose el medio de cultivo siguiendo los mismos pasos que en el caso anterior.

Para el cuarto tratamiento (T4), FITO GEL + SACAROSA + ½ MURASHIGE y SKOOG, Se pesó 7 (gr.L⁻¹) de Fito gel, 30 (gr.L⁻¹) de sacarosa y

1.107 (gr.L⁻¹) Murashige and Skoog (MS) para una cantidad de 500 ml de agua destilada, procediéndose luego de la misma manera que en los casos anteriores.

Después se procedió a autoclavar los frascos con 15 libras de presión y 131°grados Celsius por 20 minutos. Luego de la esterilización se extrajo los frascos para después enfriarse e inocular las semillas para su respectiva germinación. Los tratamientos aplicados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5

Tratamiento de medios de germinación

Tratamientos	Medio de germinación	N° repeticiones
T1	Fitogel + Sacarosa	17
T2	Fitogel + Sacarosa	20
T3	Fitogel + Sacarosa + Murashige and Skoog (MS)	20
T4	Fitogel + Sacarosa + ½ MS	20

La variable analizada fue porcentaje de germinación, para obtener dichos datos se evaluó durante 30 días, para obtener la germinación en su totalidad, como medio base su utilizo solo Fitogel.

Fase Morfogénica

En esta fase al tratamiento cuatro de la fase de medio de germinación se agregó hormonas que estimulan el crecimiento de raíces o de la parte aérea de los explantes. Se utilizó este medio de cultivo porque se observó que durante el periodo de germinación se obtuvo una mayor sobrevivencia después de 3 meses.

El pH del medio de cultivo fue ajustado entre 5,5 - 5,9; posteriormente se añadió 1 (gr. L⁻¹) de carbón activado, para evitar la oxidación de los explantes extraídas del experimento de la fase de germinación (Tratamiento 4).

En esta fase se utilizó cinco tratamientos con diferentes dosis de Kinetina (Kin) y Acido Indol Butirico (AIB) como se indica en la tabla 6.

Tabla 6

Tratamientos para la fase de morfogénesis

Tratamientos	Concentración de hormonas	Nº repeticiones
T1	Kin (0 ppm) + AIB (0 ppm)	11
T2	Kin (4 ppm) + AIB (4 ppm)	11
T3	Kin (12 ppm) + AIB (4 ppm)	11
T4	Kin (12 ppm) + AIB (12 ppm)	11
T5	Kin (4 ppm) + AIB (12 ppm)	11

La variable analizada fue porcentaje de callo, número de primordio radicular, número de brotes, para obtener dichos datos se evaluó durante 120 días calendario.

El experimento se desarrolló en tres fases, fase de desinfección, fase de germinación de semillas ante diferentes medios de cultivo y fase morfogénica.

En la fase de desinfección, las evaluaciones se realizaron cada 4 días, hasta hacer un total de 15 días de evaluación.

Así mismo, en la fase de germinación, la recopilación de los datos se realizó cada tres días, durante 30 días calendarios.

Fase morfogénica, lo datos colectados fueron obtenidas cada 15 días, en un periodo de 120 días calendario.

3.5. Tratamientos de Datos

Los datos obtenidos en cada una de las fases de la que consistió el experimento fueron introducidos al programa Excel, donde fueron ordenados con la finalidad de generar tablas y figuras que permitan lograr los objetivos trazados. Posteriormente se utilizó el programa Libre Office Calc para ordenar todos los datos y convertir en un formato adaptable para el análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa computacional “Sistema para Análisis de Varianza” (SISVAR 5,6) (Ferreira, 2011). Los datos fueron sometidos a una prueba de análisis de la varianza (ANOVA), de acuerdo a lo que indica el diseño completamente al azar. Y para el análisis y comparación de las medias se utilizó la prueba TUKEY y LSD al 5% de significancia ($\alpha = 0.05$). Todas estas pruebas fueron aplicadas a cada una de las fases por separado.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Desinfección de semillas de *G. crinita* Mart.

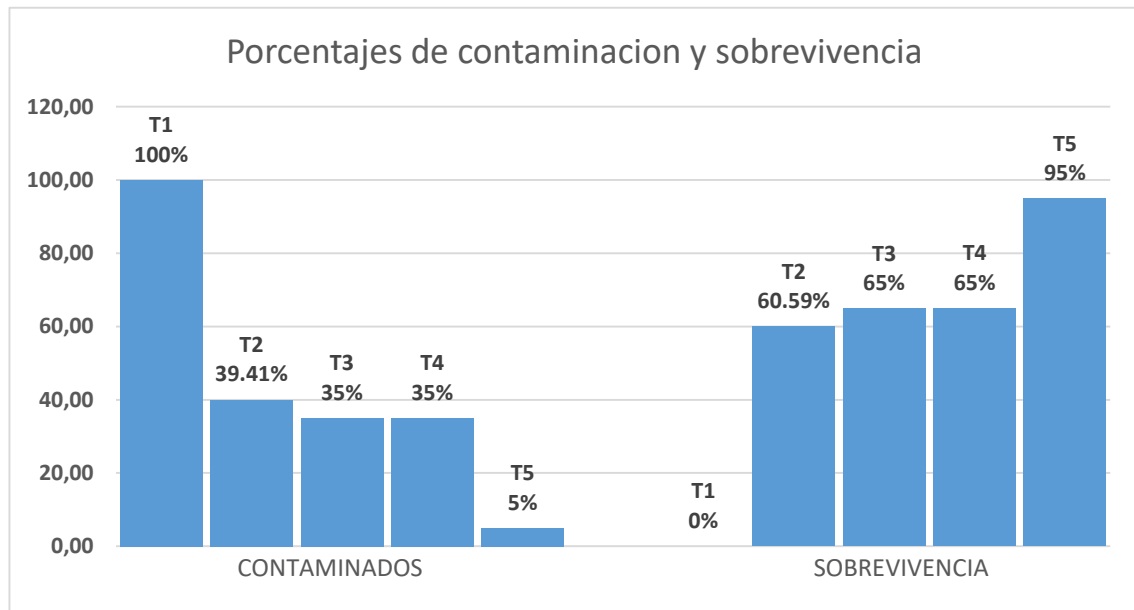
El tratamiento T5, fue el más eficiente en el proceso de descontaminación, obteniendo un porcentaje de 95% de desinfección y 5% de contaminación (Figura 1).

Por el contrario, el tratamiento 1, donde las semillas biológicas no recibieron la asepsia, presentó alta contaminación (100%) y una sobrevivencia del 00%. Según Villegas (2008) los tratamientos de exposición al hipoclorito de sodio al 2%, logran un porcentaje de contaminación de cero, lo cual en este experimento no se obtuvo, ya que en diferentes tiempo de exposición al producto desinfectante, los porcentaje de contaminación varían. De la misma manera Chudzikiewicz (2019) menciona que la exposición de los explantes a un tiempo mayor y un conjunto de fungicidas, resulta en un porcentaje menor de contaminación.

Por otra parte Ruíz (2010), en su trabajo de investigación con *G. crinita* Mart, en la fase de desinfección superficial de la semilla utilizó alcohol de 70° por 60 segundos y después utilizó hipoclorito de sodio (NaClO) al 2%, durante 40 minutos, obteniendo un 95% de semillas libres de contaminación, resultados similares a este estudio.

Figura 1

Efecto de diferentes tiempos de exposición al NaClO en el porcentaje de sobrevivencia y contaminación de las semillas de *G. crinita* in vitro



Mediante el programa SISVAR se realizó el ANVA, cuyos resultados se presenta en la Tabla 7, cuyos datos indica que existe diferencia significativa entre los tratamientos aplicados.

Tabla 7

Análisis de la Varianza del efecto de diferentes tiempos de exposición al NaClO en el porcentaje de sobrevivencia y contaminación de las semillas de *G. crinita* in vitro

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENTO	4	9.660000	2.415000	15.449	0.0000
Error	95	14.850000	0.156316		
Total corregido	99	24.510000			
CV (%) =	91.95				
Media general:	0.4300000	Número de observaciones:	100		

En la tabla 8, se observa los resultados del análisis de comparación de medias, para ello se aplicó la prueba de TUKEY al 5% de significancia ($\alpha=0.05$). De la presentación de los resultados se puede inferir que existen tres grupos de resultados similares estadísticamente, el tratamiento T5, T4 y T3 forman un grupo con los cuales se puede tener un mismo nivel de desinfección de las semillas, otro grupo está formado los tratamientos T4, T3 y T2 y por último se tiene un solo tratamiento, el T1, con el cual se tiene la infección de todas las muestras, tratamiento que carece de exposición al hipoclorito de sodio al 2%. En la figura 1, podemos observar que existe una relación directa entre tiempo de exposición al hipoclorito de sodio y el grado de desinfección obtenida en las semillas, y es que el mayor grado de exposición de las semillas al desinfectante permite una mayor acción que mata a los agentes patógenos que albergan en la semilla.

Tabla 8

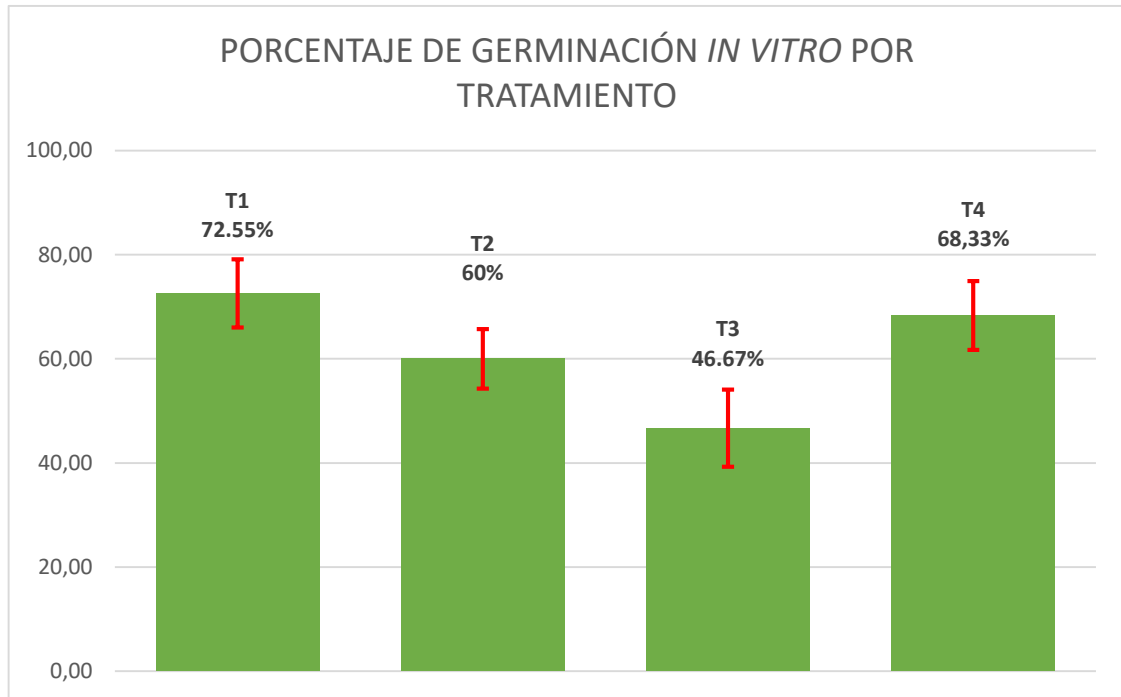
Resultados de la prueba de Tukey para el efecto de diferentes tiempos de exposición al NaClO en el porcentaje de sobrevivencia y contaminación de las semillas de G. crinita in vitro

Tratamientos	Tiempo de NaClO	Media	Tukey
T5	20 min	0.050000	a
T4	15 min	0.350000	ab
T3	10 min	0.350000	ab
T2	05 min	0.400000	b
T1	00 min	1.000000	c

4.1.2. Etapa de germinación de *G. crinita* Mart.

Figura 2

Efecto del medio de cultivo en Porcentaje de Germinación in vitro de G. crinita



En esta etapa, se registró 72,55% para el tratamiento T1, 60% para el tratamiento T2, 43,67% para el tratamiento T3 y 68,33% para el tratamiento T4, con un error estándar entre 6,54 y 7,41. T1 y T4 presentan los porcentajes más alto en relación al efecto de los medios de cultivo, Figura 2. Se puede inferir que el tratamiento T1, se puede utilizar en fases de germinación, pero al pasar del tiempo el embrión zigótico consume en poco tiempo las reservas nutricionales hasta autoconsumirse, obteniendo como resultado un color peculiar en las plántulas (amarillento en las hojas), también afecta al crecimiento, ya que inicia un proceso de inhibición y posteriormente inicia el proceso de mortandad fisiológica ya que no puede efectuar funciones vitales para su desarrollo por la falta de nutrientes en el medio.

En el caso del tratamiento T4, el porcentaje de germinación fue 68.33%, sin embargo, este tratamiento obtuvo un mejor desarrollo fisiológico en un periodo de 90 días calendarios, pudiéndose explicar este resultado al hecho de que una vez agota las reservas alimenticias de las semillas, la plántula comenzó a utilizar los nutrientes que estaban en el medio de cultivo.

El ANVA obtenida mediante el programa SISVAR, determinó que existe diferencia significativa entre los tratamientos analizados (Tabla 9).

Tabla 9

Análisis de la Varianza del efecto del medio de cultivo en el porcentaje de Germinación in vitro de G. crinita

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENTO	3	6.709282	2.236427	2.946	0.0384
Error	73	55.420588	0.759186		
Total corregido	76	62.129870			
CV (%) =	47.25				
Media general:	1.8441558	Número de observaciones: 77			

En la tabla 10, se observa el análisis de comparación de medias, para ello se aplicó la prueba TUKEY al 5% de significancia ($\alpha= 0.05$), donde la variable de comparación fue el porcentaje de germinación, también se observa que algunas medias difieren con letras minúsculas entre sí.

Se infiere que se formaron dos grupos de tratamientos con resultados semejantes estadísticamente, el primer grupo formado por los tratamientos T1, T4 y T2 presenta semejanzas estadísticas, así como los tratamientos T4, T2 y T3.

Cada grupo de tratamientos puede resultar de gran beneficio de acuerdo al objetivo para el cual fue diseñado el experimento, por ejemplo, si se aplicaría el tratamiento T1, esta se utilizaría en fases de germinación ya que la media de semillas que germinan por unidad experimental es alta (2,76) y el porcentaje de germinación también (72.55%), pero no resulta eficiente para la fase de crecimiento después de la germinación, por la inexistencia de nutrientes en el medio de cultivo. Pero con la aplicación del tratamiento T4, se facilitaría el desarrollo de la plántula por un mayor tiempo, permitiendo de este modo que se pueda obtener un mayor número de explantes por plántula germinada en medio *in vitro*.

Tabla 10

Resultados de la prueba de Tukey para efecto del medio de cultivo en porcentaje de Germinación in vitro de G. crinita

Tratamientos	Medio de cultivo	Media	TUKEY
T1	Fito gel	2.176471	a
T4	Fito gel + sacarosa + ½MS	2.050000	ab
T2	Fito gel + sacarosa	1.800000	ab
T3	Fito gel + sacarosa + MS	1.400000	b

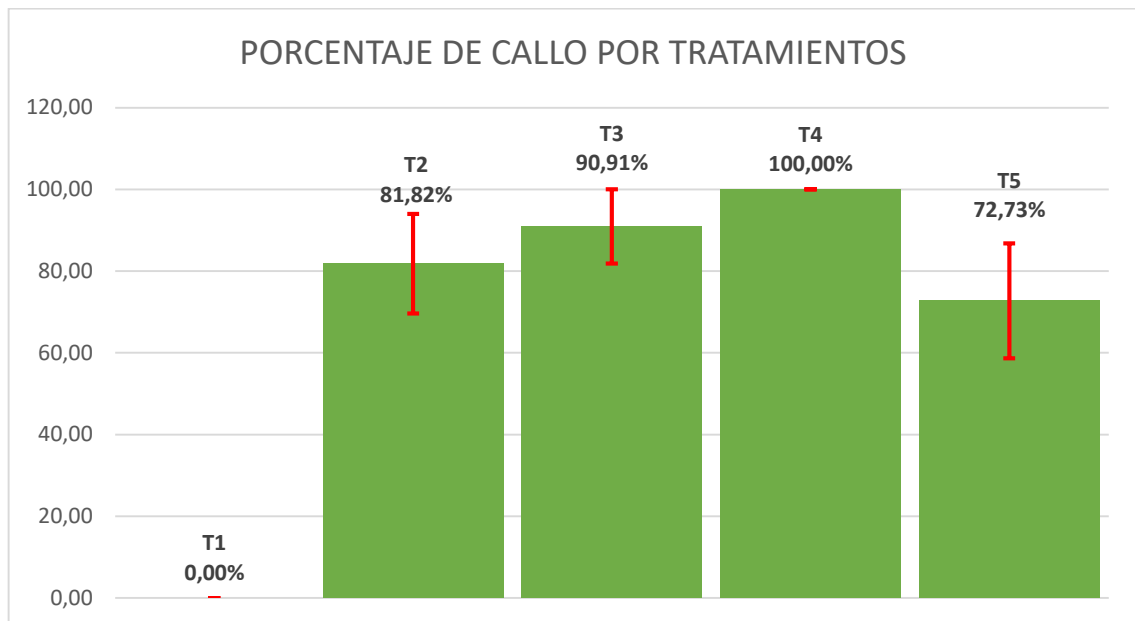
4.1.3. Desarrollo morfológico de *G. crinita* Mart.

4.1.3.1. Callogénesis

Los resultados del porcentaje de Callogénesis obtenida por el efecto de los reguladores de crecimiento sobre los explantes de *G. crinita*, se presenta en la figura 3.

Figura 3

Efecto de los reguladores de crecimiento en porcentaje de Callo en explantes de G. crinita in vitro



En el desarrollo morfogénico *in vitro* de segmentos nodales, se registró un 100% de Callogénesis con la combinación de dos reguladores de crecimiento una citoquinina que es la Kinetina (Kin) y una auxina que es el ácido Indol butírico (AIB) en una proporción de 12 ppm para cada uno de ellos, por el contrario, con el tratamiento T1 que obtuvo un 0% de callo, este tratamiento no presenta ninguna concentración de reguladores de crecimiento como la citoquinina y la auxina.

La fase de obtención de callos es una etapa morfogénica donde las células diferenciadas se desdiferencian y estas alteran su ritmo metabólico obteniendo una masa de célula que se dividen infinitamente. Se puede inducir la diferenciación de estas células resultantes de la Callogénesis, encontrando proporciones de auxinas adecuadas para este fin.

El ANVA obtenida mediante el programa SISVAR, nos indica que existe diferencia significativa entre los tratamientos aplicados (Tabla 11).

Tabla 11***Análisis de la Varianza del efecto de los reguladores de crecimiento en porcentaje de Callo en explantes de G. crinita in vitro***

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENTO	4	7.018182	1.754545	18.558	0.0000
Error	50	4.727273	0.094545		
Total corregido	54	11.745455			
CV (%) =	44.50				
Media general:	0.6909091	Número de observaciones:		55	

En el análisis de comparación de las medias se aplicó la prueba LSD al 5% de significancia ($\alpha= 0.05$), donde la variable fue porcentaje de callos (Tabla 12). En la tabla indicada se observa la formación de tres grupos con respuestas estadísticamente iguales a la formación de callos, tenemos al primer grupo formado por los tratamientos T2, T3 y T4, el otro grupo está formado por los tratamientos T2, T3 y T5, y existe un tercer grupo formado solo por el tratamiento T1 en el cual no se agregó ningún regulador de crecimiento.

De los resultados, podemos deducir que para la formación de callos en los explantes de G. crinita necesitaríamos entre 4 y 12 ppm de kinetina e igual concentración para AIB, pudiéndose concluir, que utilizando estos compuestos en ese rango se obtendrían iguales resultados.

Debemos de destacar que la fase de callogénesis puede causar mutaciones genéticas, que pueden beneficiar a un gen en específico o perjudicarla, también es beneficioso por puede ser la fuente de diversos metabolitos secundarios, por ejemplo, metabolizar algún compuesto químico que tiene un rol farmacéutico o algún compuesto de lípidos.

Los callos pueden ser inadecuados para algún proceso de obtención de plantas ya que estas estructuras aparecen cuando se aplica un exceso de los reguladores de crecimiento.

Por otro lado, Gordon, Chickarmane, Ohno y Meyerowitz (2009); mencionan que diferentes combinaciones y concentración de reguladores de crecimiento afectan directamente a las células y esta solo continua indiferenciada, formando masas de tejido llamadas callos.

Las auxinas como el AIB, son utilizados para promover la división celular y proliferación de raíces (George, Hall y De Klerk, 2008), en conjunto con las citoquininas como la kinetina, son capaces de inducir el crecimiento del callo (Bhojwani y Razdan, 1996), información que es corroborada en esta fase de la investigación.

Tabla 12

Resultados de la prueba de comparación de medias LSD para el efecto de los reguladores de crecimiento en porcentaje de Callo en explantes de G. crinita in vitro

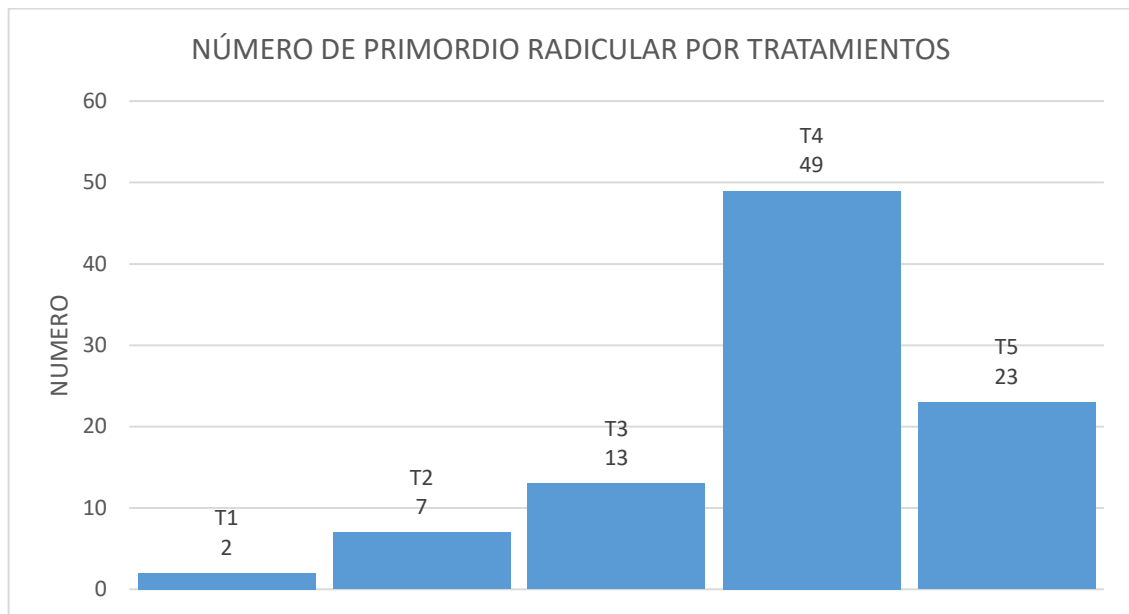
Tratamientos	Reguladores de crecimiento	Media	LSD
T4	Kin (12 ppm) + AIB (12 ppm)	1.000000	A
T3	Kin (12 ppm) + AIB (4 ppm)	0.909091	Ab
T2	Kin (4 ppm) + AIB (4 ppm)	0.818182	Ab
T5	Kin (4 ppm) + AIB (12 ppm)	0.727273	B
T1	Kin (0 ppm) + AIB (0 ppm)	0.000000	C

4.1.3.2. Primordio radicular

El número de primordios radiculares obtenida por tratamiento, por efecto de los reguladores de crecimiento sobre los explantes (segmentos nodales) de *G. crinita*, se presenta en la figura 4.

Figura 4

Efecto de los reguladores de crecimiento en el número de primordios radicular en explantes de G. crinita in vitro



En la evaluación del número de primordios radiculares por tratamientos (Figura 4), se observa que el mayor número (49) de primordios radiculares se obtiene en el tratamiento T4 y el menor número en el tratamiento T1 (2). Según Haissing (1973) las auxinas son los únicos reguladores de crecimiento que propician la formación primordios radiculares. En referencia a una óptima concentración de auxina, para generar primordios radiculares, se deben realizar diversos ensayos o experimentos, las cuales deben de estar en constante evaluación para optimizar este proceso, la utilización de alguna auxina por lo general puede ser suficiente o al mismo tiempo puede ser insuficiente o también perjudicial, esta puede afectar la cualidad de las raíces y el desarrollo de obtención de estas, la formación de los primordios radiculares depende de la concentración de la auxina (Cresswell y Nitsch, 1975).

En la fase de desarrollo o formación de primordios radiculares, las células des diferenciadas, inician un proceso de diferenciación, estas pueden variar

referente a la concentración de los reguladores de crecimiento, si tiene mayor cantidad de auxina, se obtiene primordios radiculares, pero si hay mayor concentración de citoquininas la des diferenciación se encamina hacia la inducción y proliferación de brotes o en la obtención de yemas apicales.

En el ANVA obtenida mediante el programa SISVAR, se observa que existe diferencia significativa entre los tratamientos aplicados (Tabla 13).

Tabla 13

Análisis de la Varianza del efecto de los reguladores de crecimiento en el número de primordios radicular en explantes de G. crinita in vitro

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENTO	4	125.890909	31.472727	4.477	0.0036
Error	50	351.454545	7.029091		
Total corregido	54	477.345455			
CV (%) =	155.13				
Media general:	1.7090909	Número de observaciones:		55	

En el análisis de comparación de las medias se aplicó la prueba de TUKEY al 5% de significancia ($\alpha= 0.05$), donde la variable fue número de primordio radicular por tratamientos (tabla 14),

Según la prueba de comparación de medias de Tukey existen dos grupos de tratamientos con los cuales se obtiene similares resultados desde el punto de vista estadístico, un grupo está formado por los tratamientos T4 y T5 y el otro grupo está formado por los tratamientos T5, T3, T2 y T1, pudiéndose concluir que las concentraciones que permiten una mayor formación de primordios radiculares son 12 ppm de kinetina y AIB (tabla 14). Los demás tratamientos.

Tabla 14

Resultados de la prueba de comparación de medias del efecto de los reguladores de crecimiento en el número de primordios radicular en explantes de *G. crinita* in vitro

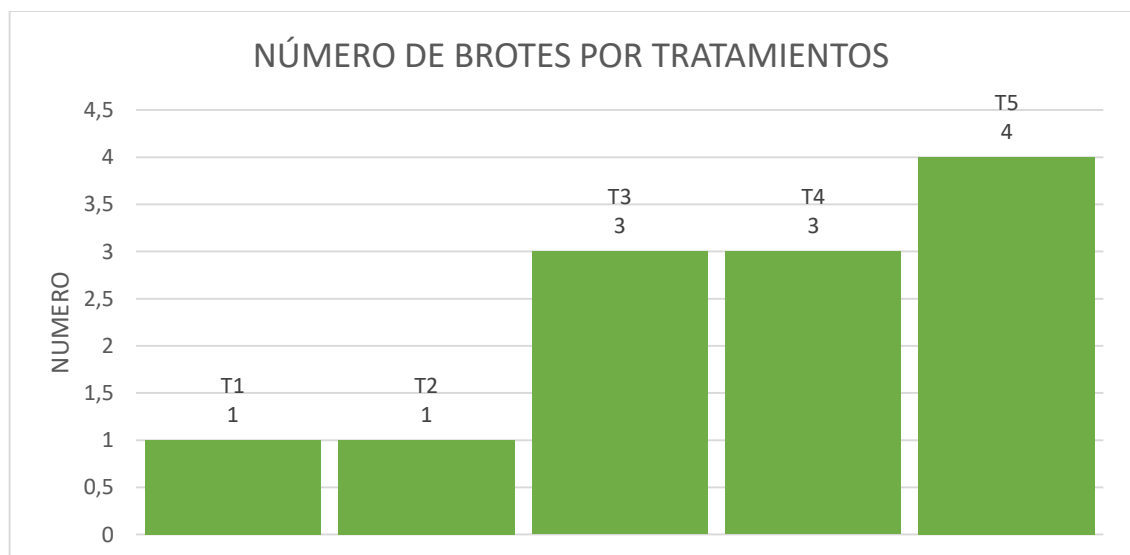
Tratamientos	Reguladores de crecimiento.	Media	TUKEY
T4	Kin (12 ppm) + AIB (12 ppm)	4.454545	A
T5	Kin (4 ppm) + AIB (12 ppm)	2.090909	Ab
T3	Kin (12 ppm) + AIB (4 ppm)	1.181818	B
T2	Kin (4 ppm) + AIB (4 ppm)	0.636364	B
T1	Kin (0 ppm) + AIB (0 ppm)	0.181818	B

4.1.3.3. Inducción brotes

Los resultados de número de brotes por efecto de los reguladores de crecimiento sobre los explantes de *G. crinita*, se presenta en la figura 5. En la figura se observa que el mayor número (4) de brotes corresponde al tratamiento T5 y el menos al tratamiento T1 con cero brotes (0).

Figura 5

Efecto de los reguladores de crecimiento en la formación de brotes en explantes de *G. crinita* in vitro



Según Grattapaglia y Machado (1998) la utilización de citoquininas con determinadas auxinas, son óptimas inductoras de brotes en los explantes, estos autores determinaron que la mejor relación de Ácido Indol Butirico (AIB) y citoquininas (KIN) en la propagación de yemas axilares de sauce fueron 1.0 AIB y 1.0 KIN mg/L en el medio Murashige Skoog (1962), sin embargo, al utilizar este método con una concentración mayor no se obtuvieron buenos desarrollos, esto puede ser por motivos de que la aplicación de la citoquinina es muy alta, al ser alta lo que ocasiona es el aumento de callo. Por otra parte, Chudzikiewicz (2019); De Souza (2019); Lima et al., (2018); Silva (2006) en la obtención de mayor número de brotes, utilizaron la citoquininas Bencilamina purina (BAP) con diferentes concentraciones no mayor a 5ppm, demostraron mejor desarrollo morfogénico.

El ANVA obtenida mediante el programa SISVAR, nos indica que existe diferencia significativa entre los tratamientos aplicados (Tabla 15).

Tabla 15
Análisis de la Varianza del efecto de los reguladores de crecimiento en la formación de brotes en explantes de G. crinita in vitro

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMIENTO	4	0.654545	0.163636	0.643	0.6345
Error	50	12.727273	0.254545		
Total corregido	54	13.381818			
CV (%) =	231.24				
Media general:	0.2181818	Número de observaciones:		55	

En el análisis de comparación de las medias se aplicó la prueba TLSD 5% de significancia ($\alpha= 0.05$), la variable evaluada fue número de brotes por tratamientos. Se determinó que todos los tratamientos permiten obtener iguales resultados desde el punto de vista estadístico.

Tabla 16

Resultados de la prueba de comparación de medias LSD para el efecto de los reguladores de crecimiento en la formación de brotes en explantes de G. crinita in vitro

Tratamientos	Reguladores de crecimiento	Media	LSD
T5	Kin (4 ppm) + AIB (12 ppm)	0.363636	a
T3	Kin (12 ppm) + AIB (4 ppm)	0.272727	a
T4	Kin (12 ppm) + AIB (12 ppm)	0.272727	a
T2	Kin (4 ppm) + AIB (4 ppm)	0.090909	a
T1	Kin (0 ppm) + AIB (0 ppm)	0.090909	a

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se determinó que el mejor porcentaje de desinfección de las semillas de *G. crinita* (95%), corresponde a la exposición de hipoclorito de sodio al 2% por 20 minutos.
- El medio de cultivo en el que se logra los mayores porcentajes de germinación y mayor crecimiento de las plántulas fue con el T1. Si bien es cierto el tratamiento T1 presentó un alto porcentaje de germinación la ausencia de nutrientes en el medio de cultivo limita el posterior desarrollo de las plántulas germinadas, tornándose amarillentas y poco desarrollo.
- Las concentraciones de 12 ppm de kinetina y 12 ppm de Ácido Indol Butirico (AIB), obtuvo una mayor respuesta en la formación de callos.
- Las concentraciones de 12 ppm de kinetina y 12 ppm de Ácido Indol Butirico (AIB), permite la formación de un mayor número de primordios radiculares.
- Las concentraciones aplicadas de 0, 4 y 12 ppm de kinetina (KIN) y 0, 4 y 12 ppm Ácido Indol Butirico (AIB), promueven una baja cantidad de inducción de número de brotes.

5.2. Recomendaciones

- En relación al proceso de desinfección, no extraer las semillas del fruto antes de desinfectarlas, ya que éstas se podrían contaminar con agentes patogénicos.
- Tener mucho cuidado de la posición de la inoculación del explante, debido a que si se coloca en una posición inversa formará callo, pero no formará brotes.
- Evaluar las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas que están fuertemente influidas sobre el crecimiento.
- Realizar pruebas adicionando diferentes dosis de reguladores de crecimiento para mejorar la tasa de brotes.
- Realizar más estudios en relación a los medios de cultivo para la fase morfológica modificando los mg de otros tipos de media base.
- Realizar ensayos en diferentes momentos del año podría dar resultados sobre el comportamiento fisiológico de la planta madre y su efecto en el explante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelnour, & Vicent. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CIRIEC - España. Revista de Economía Pública, Social y Cooperativa.*
- Aponte, F. (2009). *Efecto de ácido indol acético y ácido naftalen acético en la propagación por microestacas de Guazuma crinita Mart. (BOLAINA BLANCA).* Universidad Nacional de Ucayali.
- Aponte, F. P. (2009). *Efecto de 2 auxinas, ácido indol acético (AIA), y ácido naftalen acético (ANA), en la propagación por microestacas de Guazuma crinita, Mart (BOLAINA BLANCA).*
- Bhojwani. (1996). *Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a Revised Edition.* Elsevier Amsterdam - Lausanne - New York - Oxford - Shannon - Tokio.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00002-9>
- Bhojwani, S. & Razdan, M. (1996). Plant Tissue Culture. *ELSERVER*, 48.
- Carvalho, A. C. P. P., Torres, A. C., Braga, E. J. B., Lemos, E. E. P., Souza, F. V. D., Peters, J. A., Câmara, T. R. (2011). *Glossário de cultura de tecidos de plantas. Plant Cell Culture and Micropropagation*, 7(1), 30–60.
- Carvalho, J. M. F. C., & Vidal, M. S. (2003). *Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais. Embrapa Algodão*, (1), 1–42.
- Castillo. (2006). *Propagación de plantas por cultivo in vitro una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo.* Lima: Instituto Nacional Innovación Agraria (Inia).
- Chudzikiewicz. (2019). *Estabelecimento In Vitro De Bambusa Oldhamii Munro E Multiplicacao In Vitro De Guadua chacoensis.* Universidade Federal de Santa Catarina.
- Cresswell, R., & Nitsch, C. (1975). *Organ culture of Eucalyptus grandis L. Planta*, 125, 87–90.

- De Sousa, A. (2019). *Análise de Germinação e Estabelecimento In Vitro de Aroeira-Do-Sertão (Myracrodruon urundeuva Allemão) AUGUSTO. Nuevos sistemas de comunicación e información.* Universidade Federal de Sergipe.
- Ertola, H., & Jimenez, D. (1998). *Cultivo de células y tejidos vegetales in vitro. Plant Physiology and Biochemistry, 4(3), 28–42.*
- Ferreira, D. (2011). *A computer statistic analysis system.* Ciência e Agrotecnologia, 35(6), 1039–1042.
- Flores, Y. (2007a). *Bolaina blanca.* Pucallpa: Instituto Nacional Innovación Agraria.
- Flores. (2018). *Árboles nativos de la región Ucayali.* (Y. Flores Bendezu, Ed.) (Estacion E). Pucallpa.
- Flores, Y. (2007b). Bolaina Blanca Guazuma crinita Mart. In Bolaina Blanca Guazuma Crinita Mart. (Carlos E., p. 8). Pucallpa, Perú.
- Fontelles, M. J., Simões, M. G., Farias, S. H., & Fontelles, R. G. S. (2009). *Metodologia da Pesquisa Científica: Diretrizes para a Elaboração de um Protocolo de Pesquisa.* Australian Journal of Physiotherapy, 52(8), 237–239.
- George, E. (2008). *Plant Propagation By Tissuw Culture 3rd Edition.* Netherlands: P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.J. (2008). *Plant propagation by Tissue Culture.* Spreinger Science & Business Media. Bhojwani, 1(3), 175.
- George, & Marteus. (1961). *A Revision Of The Genus Guazuma.* CEIBA, 1(4), 225.
- Gonzales, S. R., Lozano, J. G., & Rojas, H. J. (2004). *Propagación assexual de plantas: Conceptos Básicos y Experiências con Espécies Amazônicas.* Pronatta: Colombia, 55.
- Gordon, P., Chickarmane, S., Ohno, C., & Meyerowitz, M. (2009). *Multiple Feedback Loops Through Cytokinin Signaling Control Stem Cell Number Within*

- Arabidopsis Shoot Meristem. Natl Acad Sci USA*, 106(16529), 34.
- Grattapaglia, D., & Machado, M. (1998). *Micropropagação*. Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq. Brasília., 1, 183–260.
- Haissing, B. E. (1973). *Influences of auxin synergists on adventitious root primordium initiation and development*. *Journal of Forestry Science*, 4(3), 311–323.
- Krikorian. (2015). *Medios de Cultivo: Generalidades Composición y Preparación*. Nueva York, E. U.
- Lameira, Lemos, Menezes, & Pinto. (2000). *Cultura de tecidos (Manual)*. *Embrapa Amazonia Oriental*, 66.
- Levitus. (1997). *Biología y Mejoramiento Vegetal II*. (G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, & L. Mroginski, Eds.), *ArgenBio*. Buenos Aires-Argentina.
- Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski. (2010). *Biología y Mejoramiento Vegetal II*. *Biología y Mejoramiento Vegetal II*, 26–33.
- Lima, Moreno, Eras, Minchala, Gonzalez, Yaguana, & Valarezo. (2018). *Propagación In Vitro de Cinchona officinalis L a partir de semillas In Vitro Propagation Of Cinchona officinalis L From Seeds*. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 20(2), 169–178.
- Lorenzi, H. (2009). *Árvores Brasileiras*. In *Árvores Brasileiras Manual De Identificação E Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas Do Brasil* (1º, p. 354). Sao Paulo-Brasil: Instituto Plantarum De Estudos Da Flora Ltda.
- Maruyama, E., Ishii, K., Kinoshita, I., Ohba, K., & Saito, A. (1996). *Micropropagation of Bolaina Blanca (Guazuma crinita Mart.), a Fast-Growing Tree in the Amazon Region*. *Journal of Forest Research*, 1(4), 211–217.
- Maruyama, E., Ishii, K., Kinoshita, I., Ohba, K., & Saito, A. (1997). *Micropropagation*

- Of Guazuma crinita Mart. By Root And Petiole Culture. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 33(2), 131–135. <https://doi.org/10.1007/s11627-997-0011-0>
- Monfort, L., Pinto, J., Bertolucci, S., Rossi, Z., Silva, A., & Silva, G. (2015). *Micropropagação e germinação de sementes in vitro de atroveran. Rev. Ceres, Viçosa*, 62(2), 215–223.
- Mroginski, L., Sansberro, & Flaschland. (2004). *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal II. Biotechnología*, 1(1), 352.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). *A Revised Medium For Rapid Growth And Bio Assays With Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
- Paiva, & Duarte. (2001). *Cultura de Tecidos Vegetais. Cultura de Tecidos*. Lavras.
- Perea, M. (2010). *Cultivo de Tejidos Vegetales in vitro. Universidad Nacional de Colombia (Vol. 9)*.
- Pereira J, N., Bon, E. P. Da Silva., & Ferrara, M. A. (2008). *Series Em Biotechnologia: Tecnologia De Bioprocessos. Séries Em Biotechnologia (Vol. I)*.
- Pérez, F. (2017). *Fisiología Vegetal. In Fisiología Vegetal IV (pp. 0–73)*. Pucallpa, Perú.
- Prieto, H., Jordan, M., Barrueto, L., R, M., & Durzan, D. (2005). *Biotechnología Vegetal. (I. de I. Agropecuarias, Ed.)*. Santiago, Chile.
- Reynel, C., Pennington, R., Pennington, T., Flores, C., & Daza, A. (2003). *Árboles útiles de la Amazonía Peruana. In Árboles útiles de la Amazonía Peruana (p. 50)*. Lima.
- Roca, W. M., Mroginski, L. A. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. (W. M. Roca & L. A. Mroginski, Eds.)*. CALI, COLOMBIA: CIAT N°. 151.

- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). *Principios Básicos, Metodológicas y Técnicas de Tejidos Vegetales*. In *Cultivo de Tejidos en la Agricultura* (pp. 2–17). Cali-Colombia: CIAT N°. 151.
- Ruíz, J. (2010). *Determinación de la mejor concentración de ácido indolacético y ácido naftalenacético en la micropropagación de Guazuma crinita, Mart (bolaina blanca)*. Universidad Nacional de Ucayali.
- SERFOR. (2020). *Manual para identificación botánica de especies forestales de la Amazonía Peruana* (Tundra Tal). Lima: Impreso Grafica S.A.
- Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2020). *Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. (U. D. La Plata, Ed.), Editorial de la Universidad de La Plata. PLATA.
- Silva, L. (2006). *Propagação vegetativa in vitro de Aniba rosaeodora Ducke (Lauraceae)*. UEA\INPA.
- Singh, S., Dalal, S., Singh, R., Dhawan, A., & Kalia, R. (2011). *Micropropagation of Dendrocalamus asper (Schultes f.) Backer ex Heyne: an exotic. Of Plant Biochemistry and Biotechnology, 22(2), 220–228.*
- Suárez, I. (2020). *Cultivo de Tejidos Vegetales. Fondo editorial, Universidad de Cordoba.*
- Valerio, P. (2018). *Fatores Bióticos E Abióticos Que Afetam A Micropropagação In Vitro. Advanced Optical Materials, 10(1), 56.*
- Villegas, P. (2008). *Efecto del tiempo de exposición del hipoclorito de sodio sobre la germinación de semillas de Bolaina (Guazuma Crinita) en condiciones de in vitro. Investigación Universitaria, 4(1), 22–25.*
- Xavier, A., Wendling, I., & Silva, R. (2009). *Silvicultura clonal: princípios e técnicas. Viçosa, (57), 272.*

ANEXO

Figura 6
Semillas de *G. crinita* Mart



Figura 7
Vertimiento de medio de cultivo (MS)



Figura 8
Desinfección de las semillas con fungicida Benlate®

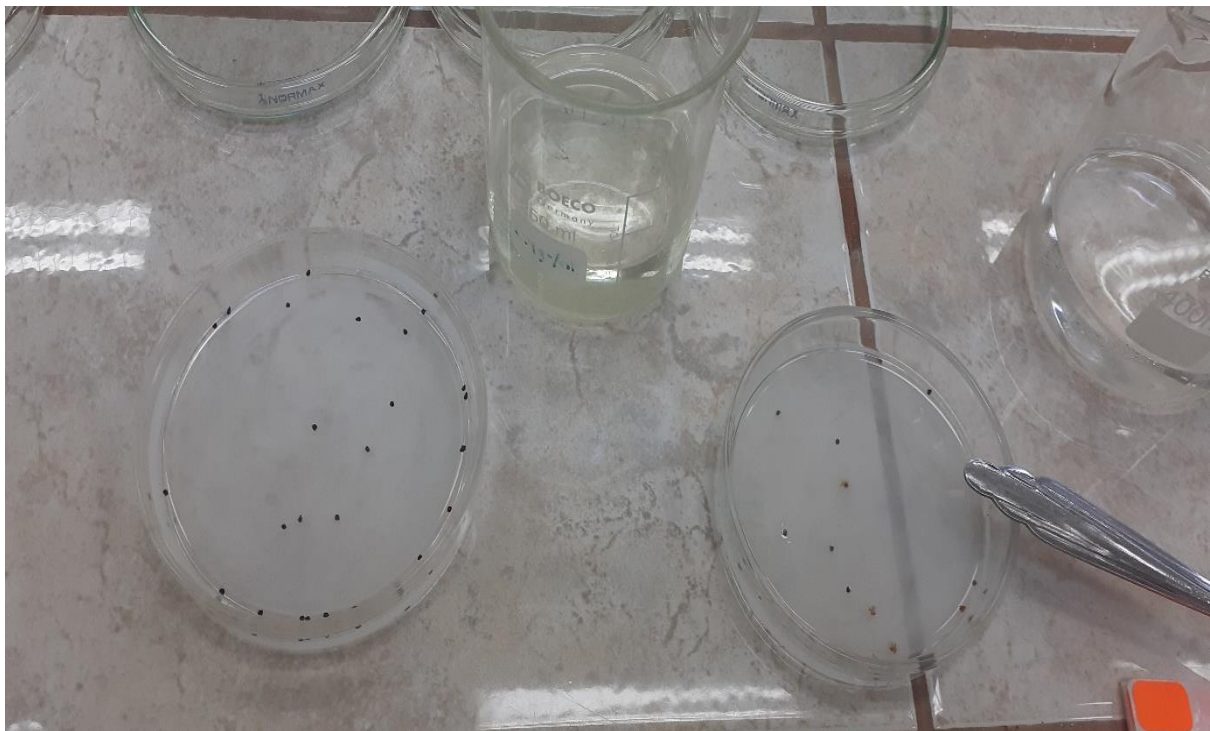


Figura 9
Preparación de medio de cultivo (MS)



Figura 10
Preparación de materiales para la inoculación

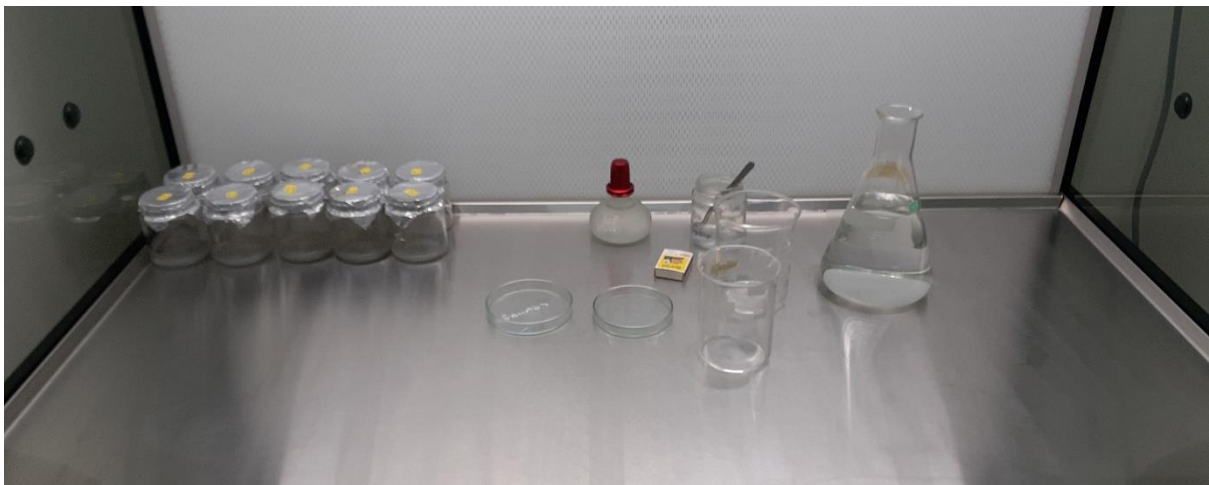


Figura 11
Panorama del experimento fase desinfección

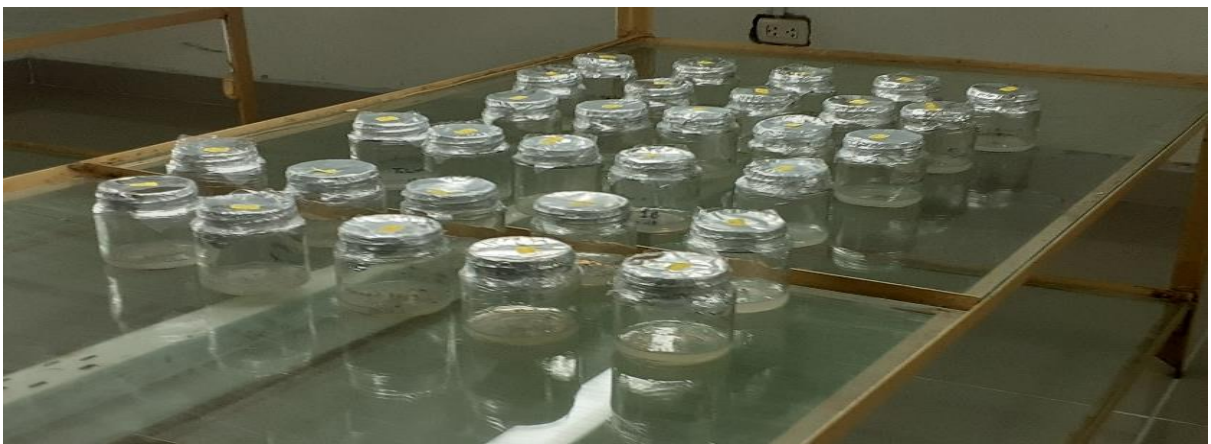


Figura 12
Separación de la semilla de *G. crinita* Mart del fruto



Figura 13
Proceso de germinación de las semillas de *G. crinita* Mart

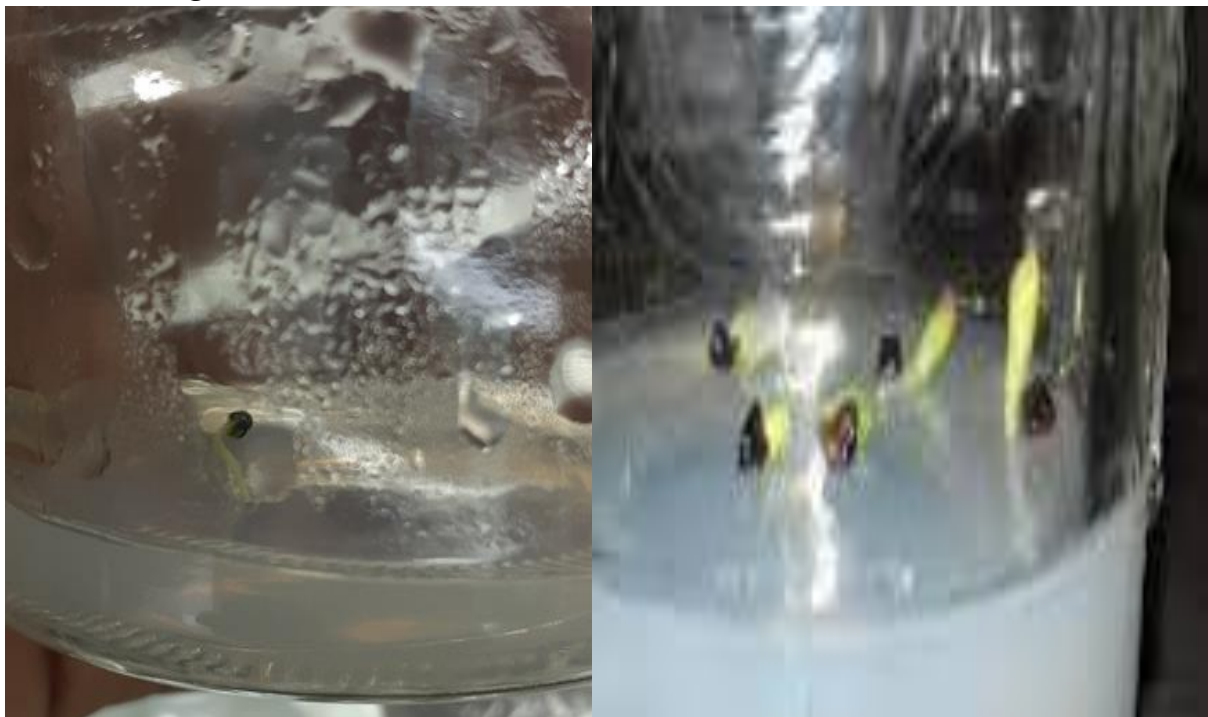


Figura 14
Plántulas in vitro de G. crinita Mart



Figura 15
Proceso de obtención de explantes



Figura 16
Proceso de callogenesis



Figura 17
Proceso de primordios radiculares



Figura 18
Callogenesis



Figura 19
Primordios radiculares a partir de callos



Figura 20
Panorama de los tratamientos con diferentes reguladores (T2, T3, T4 y T5)

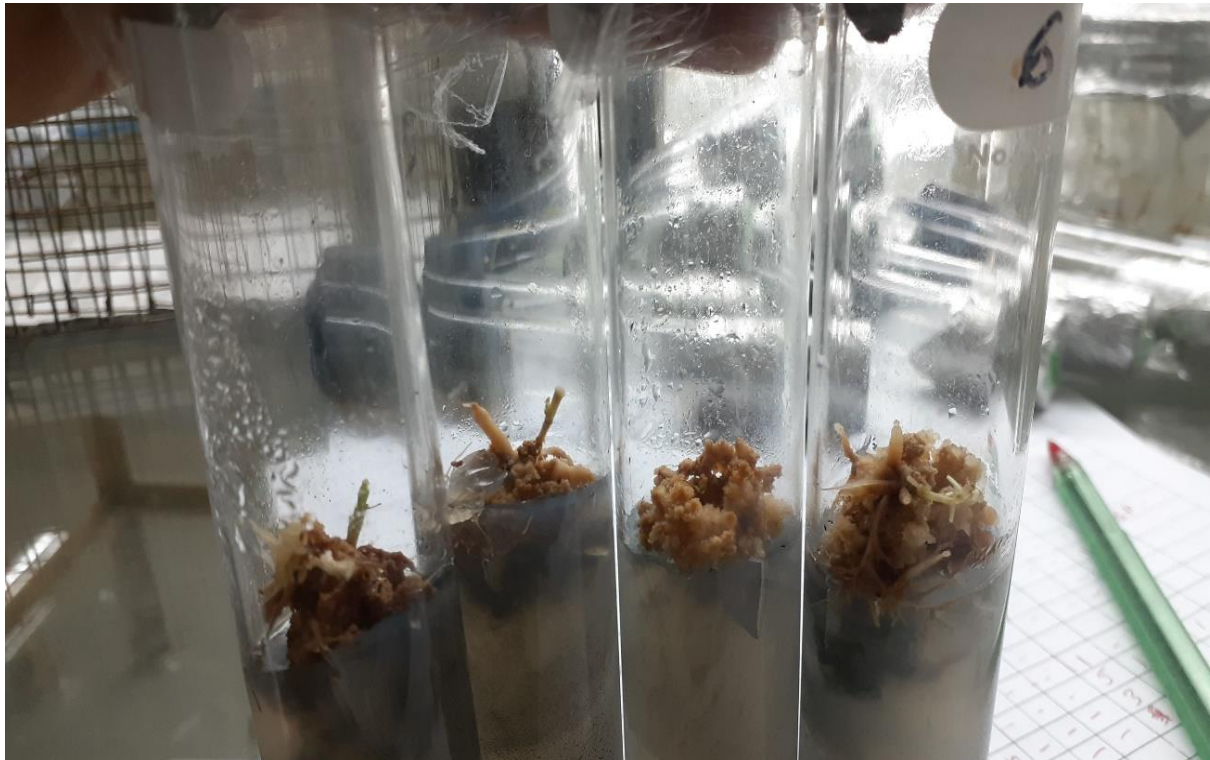


Figura 21
Inducción de brotes



Figura 22
Inicio de la inoculación



Figura 23
Diferenciación entre el tratamiento 4 y tratamiento 1 de la fase medio de cultivo en la germinación durante 4 meses de consumo de nutrientes

