



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA



Germinación de semillas, propagación clonal, morfogénesis y conservación de
germoplasma *in vitro* de “choloque” *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae)

TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA

AUTOR

Bardales Suárez, Jordan

ASESOR

Dr. Delgado Paredes, Guillermo Eduardo

LAMBAYEQUE - PERÚ

2023



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA



Germinación de semillas, propagación clonal, morfogénesis y conservación de germoplasma *in vitro* de “choloque” *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae)

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA**

MIEMBROS DE JURADO

APROBADO POR:

Dra. Consuelo Rojas Idrogo

PRESIDENTE

M.Sc. Josefa Ecurra Puicón

SECRETARIA

Lic. Wilmer Leoncio Calderón Mundaca

VOCAL

Dr. Guillermo Eduardo Delgado Paredes

PATROCINADOR

LAMBAYEQUE-PERÚ-2023

Agradecimientos

Agradezco a toda mi familia por el apoyo en mi formación personal y darme la oportunidad de ser un profesional, así como a y todos aquellos que siempre estuvieron cerca de mí.

*Agradecer al Laboratorio General de Biotecnología del Vicerrectorado de Investigación, de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo en la persona de mi asesor, el Dr. Guillermo Delgado, por acogerme, enseñarme y guiarme en este proceso y a todo el personal que labora en el Instituto de Biotecnología: La señora secretaria Melissa Saldarriaga, los Biólogos Botánicos Cecilia Vásquez y Boris Esquerre y la Bióloga M.Sc. Pilar Bazán.
Muchas gracias por todo su apoyo.*

ÍNDICE

RESUMEN	8
I. INTRODUCCIÓN	10
II. MARCO TEÓRICO	12
2.1. ANTECEDENTES	12
2.2. TAXONOMÍA	13
2.3. BASES TEÓRICAS	14
2.4. JUSTIFICACIÓN	15
2.5. OBJETIVOS	16
2.5.1. OBJETIVO GENERAL	16
2.5.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. MATERIALES	16
3.1.1. Medio de cultivo basal MS	16
3.1.2. Población	18
3.1.3. Muestra	18
3.2. MÉTODOS	18
3.2.1. Selección de semillas.	18
3.2.2. Siembra de semillas <i>in vitro</i>	19
3.2.3. Prueba de germinación	20
3.2.4. Propagación clonal	20
3.2.5. Inducción de callos y procesos morfogénicos	20
3.2.6. Conservación de germoplasma	22
IV. RESULTADOS	23
4.1. Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>S. saponaria</i>	23
4.2. Tasa de contaminación	25
4.3. Propagación clonal	26
4.4. Enraizamiento	29
4.5. Inducción de callos	32
4.6. Embriogénesis	34
4.7. Necrosis apical y tasa de supervivencia.	36
4.8. Conservación <i>in vitro</i> de germoplasma	40
V. DISCUSIÓN	41
VI. CONCLUSIONES	46
VII. RECOMENDACIONES	47
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
IX. ANEXOS	44

RELACIÓN DE CUADROS

Tabla 1. Componentes de las sales minerales del medio de cultivo basal MS (Murashige y Skoog, 1962), utilizado en la formulación de los tratamientos in vitro de <i>S. saponaria</i> .	17
Tabla 2 Volúmenes de las soluciones madre o stock y otros compuestos utilizados en la preparación de los medios de cultivo para los diversos eventos realizados en cultivo de tejidos de <i>S. saponaria</i> .	17
Tabla 3. Prueba de germinación in vitro de semillas de <i>S. saponaria</i> con tratamiento de escarificación (E) y no escarificación (NE).	20
Tabla 4. Regulador de crecimiento utilizado en la formulación del medio de cultivo de inducción de callos en diversos explantes de <i>S. saponaria</i> .	21
Tabla 5. Reguladores de crecimiento utilizados en la formulación del medio de cultivo de propagación clonal y conservación de germoplasma in vitro de <i>S. saponaria</i> .	22
Tabla 6. Frecuencia de embriones somáticos de <i>S. saponaria</i> formados por estadio de desarrollo	35
Tabla 7. Promedio de elongación y número brotes, nudos y hojas formadas, en la conservación in vitro de germoplasma de <i>S. saponaria</i> , después de 15 meses de evaluación.	40

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Semillas de <i>Sapindus saponaria</i> , conservadas en bolsas de plástico en condiciones medioambientales.	18
Figura 2. Semillas (A) y frutos (B) seleccionados de <i>S. saponaria</i> .	19
Figura 3. A. Esterilización y posterior hidratación de semillas. B. Semillas in vitro de <i>S. saponaria</i> .	19
Figura 4. Obtención de la región media y basal de hoja, fragmentos de entrenudos y explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de <i>S. saponaria</i> .	21
Figura 5. Secuencia de la germinación de semillas in vitro de <i>S. saponaria</i> , colectadas entre los años 2018 a 2022, después de 45 días de establecidas las semillas in vitro.	23
Figura 6. Germinación de semillas no escarificadas de <i>S. saponaria</i> , colectadas entre los años 2018 a 2022, después de 45 días establecidas las semillas in vitro.	24
Figura 7. Germinación de semillas escarificadas de <i>S. saponaria</i> , colectadas entre los años 2018 a 2022, después de 45 días de establecidas las semillas in vitro.	24
Figura 8. Contaminación de semillas escarificadas (E) y no escarificadas (NE) de <i>S. saponaria</i> , colectadas entre los años 2018 a 2022, después de 45 días de establecidas las semillas in vitro.	25
Figura 9. Elongación (cm) de ápices caulinares y segmentos nodales de <i>S. saponaria</i> , después de cinco meses de evaluación.	26
Figura 10. Número de nudos formados en los ápices caulinares y segmentos nodales de <i>S. saponaria</i> , después de cinco meses de evaluación.	27
Figura 11. Número de brotes formados en los ápices caulinares y segmentos nodales de <i>S. saponaria</i> , después de cinco meses de evaluación.	27
Figura 12. Número de hojas formadas en los ápices caulinares y segmentos nodales de <i>S. saponaria</i> , después de cinco meses de evaluación.	28
Figura 13. Enraizamiento de los ápices caulinares y segmentos nodales de <i>S. saponaria</i> . A. 1. Raíces pequeñas. 2. Raíces medianas. B. 3. Raíces grandes.	29
Figura 14. Crecimiento y desarrollo del sistema radicular de <i>S. saponaria</i> en el tratamiento T1 (AIA 0,02 - AG ₃ 0,02 mg/L), después de cinco meses de establecidos los explantes in vitro.	30
Figura 15. Crecimiento y desarrollo del sistema radicular de <i>S. saponaria</i> en el tratamiento T2 (ANA 0,02 - AG ₃ 0,02 mg/L), después de cinco meses de establecidos los explantes in vitro.	30
Figura 16. Crecimiento y desarrollo del sistema radicular de <i>S. saponaria</i> en el tratamiento T3 (AIA 0,2 - AG ₃ 0,02 mg/L), después de cinco meses de establecidos los explantes in vitro.	31
Figura 17. Crecimiento y desarrollo del sistema radicular de <i>S. saponaria</i> en el tratamiento T4 (ANA 0,2 - AG ₃ 0,02 mg/L), después de cinco meses de establecidos los explantes in vitro.	31
Figura 18. Inducción de callos en <i>S. saponaria</i> . A. Inicio de la división celular. B. Formación de callos en el borde del explante C. Callo parcialmente formado. D. Callo totalmente formado.	32

Figura 19. Inducción de callos en hojas de <i>S. saponaria</i> en varios tratamientos de reguladores de crecimiento. (T1 = BAP 1,0 mg/L; T2 = BAP 2,0 mg/L y T3 = BAP 3,0 mg/L).	33
Figura 20. Inducción de callos en tallos de <i>S. saponaria</i> en varios tratamientos de reguladores de crecimiento. (T1 = BAP 1,0 mg/L; T2 = BAP 2,0 mg/L y T3 = BAP 3,0 mg/L).	33
Figura 21. Estadios de desarrollo de embriones somáticos en <i>S. saponaria</i> (A) Globular, (B) Torpedo, (C) Acorazonado y (D y E) Cotiledonar.	34
Figura 22. Embriones somáticos de <i>S. saponaria</i> aislados y subcultivados.	35
Figura 23. Número de embriones somáticos de <i>S. saponaria</i> formados por tratamiento.	36
Figura 24. Necrosis apical en explantes de <i>S. saponaria</i> . A. Necrosis parcial. B. 1. Necrosis apical avanzada. 2. Muerte del explante.	37
Figura 25. Porcentaje de necrosis apical de segmentos nodales y ápices caulinares de <i>S. saponaria</i> en el tratamiento T1 (T1 = AIA 0,02 - AG ₃ 0,02 mg/L).	37
Figura 26. Porcentaje de necrosis apical de segmentos nodales y ápices caulinares de <i>S. saponaria</i> en el tratamiento T2 (T2 = ANA 0,02 - AG ₃ 0,02 mg/L).	38
Figura 27. Porcentaje de necrosis apical de segmentos nodales y ápices caulinares de <i>S. saponaria</i> en el tratamiento T3 (T3 = AIA 0,2 - AG ₃ 0,02 mg/L).	38
Figura 28. Porcentaje de necrosis apical de segmentos nodales y ápices caulinares de <i>S. saponaria</i> en el tratamiento T4 (T4 = ANA 0,2 - AG ₃ 0,02 mg/L).	39
Figura 29. Tasa de supervivencia de los segmentos nodales y ápices caulinares de <i>S. saponaria</i> , después de 150 días de evaluación en los tratamientos (T1 hasta T4).	39
Figura 30. Conservación in vitro de germoplasma, utilizando ápices caulinares y segmentos nodales de <i>S. saponaria</i> , después de 15 meses de evaluación.	40

RESUMEN

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales - Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo – Lambayeque, estudiándose a *Sapindus saponaria* “choloque”, una especie leñosa con amplia distribución en el continente y que ha sido utilizada desde la antigüedad por diferentes comunidades indígenas americanas y comprobadas sus propiedades fitoquímicas en la actualidad. Sin embargo, múltiples factores como el cambio climático, deforestación y otras actividades antropogénicas, han deteriorado los mejores genotipos de la población vegetal y vulnerado hectáreas de bosques en el mundo poniendo en riesgo a numerosas especies como es el caso de *S. saponaria*. Es por esto que la presente investigación de tipo experimental tuvo como objetivo estudiar la germinación de semillas, colectadas durante los años 2018 a 2022, la propagación clonal y la conservación de germoplasma, a partir de segmentos nodales y ápice caulinares, la inducción de callos y diversos procesos morfogénicos, a partir de hojas y tallos. Se evaluó el porcentaje de germinación de las semillas, crecimiento, necrosis apical, tasa de contaminación y supervivencia, así como el número de hojas, brotes, nudos y tamaño de raíces, la formación de callos y el número de embriones somáticos inducidos. La mejor tasa de germinación fue 45% en semillas escarificadas, colectadas en el año 2018, con una tasa de 0% de contaminación. La mayor inducción de brotes (2.4) se alcanzó en el tratamiento T2 (T2 = ANA 0,02 - AG₃ 0,02 mg/L), el mayor porcentaje de nudos (7.8), hojas (8.9) y elongación (6.9 cm) en el tratamiento T4 (T4 = ANA 0,2 - AG₃ 0,02 mg/L). *S. saponaria* presentó en todos los tratamientos necrosis apical parcial donde en el tratamiento T1 (T1 = AIA 0,02 - AG₃ 0,02 mg/L) se obtuvo la mayor tasa de supervivencia (92%) y el mejor promedio de enraizamiento (27.7%) en el tratamiento T4 (T4 = ANA 0,2 - AG₃ 0,02 mg/L). El mayor promedio de inducción callos se observó en el tratamiento T3 (T3 = BAP 3,0 mg/L) con 74% en hojas y en el tratamiento T2 (T2 = BAP 3,0 mg/L) con 89% en tallos. Asimismo, se obtuvo el mayor número embriones somáticos/explante (86) en el tratamiento T2 (T2 = BAP 3,0 mg/L).

Palabras claves:

Germinación de semillas, propagación clonal, conservación de germoplasma, morfogénesis, embriogénesis somática, *Sapindus saponaria*.

ABSTRACT

The present research was conducted at the Laboratory of Plant Tissue Culture - Faculty of Biological Sciences - National University Pedro Ruiz Gallo - Lambayeque, studying *Sapindus saponaria* "choloque", a woody species widely distributed in the continent and that has been used since ancient times by different American indigenous communities and proven its phytochemical properties today. However, multiple factors such as climate change, deforestation and other anthropogenic activities have deteriorated the best genotypes of the plant population and damaged hectares of forests in the world, putting numerous species at risk, as is the case of *S. saponaria*. This is why the present experimental research aimed to study the germination of seeds, collected during the years 2018 to 2022, clonal propagation and germplasm conservation, from nodal segments and cauline apex, callus induction and various morphogenic processes, from leaves and stems. The percentage of seed germination, growth, apical necrosis, contamination rate and survival, as well as the number of leaves, shoots, nodes and root size, callus formation and the number of induced somatic embryos were evaluated. The best germination rate was 45% in scarified seeds, collected in 2018, with 0% contamination rate. The highest shoot induction (2.4) was reached in treatment T2 (T2 = NAA 0.02 - AG3 0.02 mg/L), the highest percentage of nodes (7.8), leaves (8.9) and elongation (6.9 cm) in treatment T4 (T4 = NAA 0.2 - GA₃ 0.02 mg/L). *S. saponaria* presented partial apical necrosis in all treatments, with the highest survival rate (92%) in treatment T1 (T1 = IAA 0.02 - GA₃ 0.02 mg/L) and the best rooting average (27.7%) in treatment T4 (T4 = NAA 0,2 - GA₃ 0,02 mg/L). The highest average callus induction was observed in the T3 treatment (T3 = BAP 3.0 mg/L) with 74% in leaves and in the T2 treatment (T2 = BAP 3.0 mg/L) with 89% in stems. Likewise, the highest number of somatic embryos/explant (86) was obtained in the T2 treatment (T2 = BAP 3.0 mg/L).

Keywords:

Seed germination, clonal propagation, germplasm conservation, morphogenesis, somatic embryogenesis, *Sapindus saponaria*.

I. INTRODUCCIÓN

La familia Sapindaceae se encuentra distribuida en trópicos y subtrópicos del mundo, con 144 géneros y más de 1,900 especies (Cole *et al.*, 2021). En el Perú se encuentran 22 géneros de los cuales 7 son endémicos y presenta alrededor de 190 especies (Lebel, 2010). El género *Sapindus* tiene trece especies entre ellas *Sapindus saponaria* (Cole *et al.*, 2021). *S. saponaria* L. conocida en el Perú como “choloque”, “jaboncillo”, “boliche” (Alarcón, 2016), es una especie arbórea que se desarrolla en bosques secos y húmedos adaptándose a gran variedad de suelos calizos hasta volcánicos (Lebel, 2010). Presenta una distribución altitudinal desde 0 a 1,500 msnm (Tropicos, 2013) y una distribución geográfica nativa desde México, América Central y las Antillas hasta Ecuador, Brasil, Paraguay, Argentina y Perú, donde se distribuye en los departamentos de Ancash, Apurímac, Cajamarca, Cuzco, Huánuco, Lima, San Martín, Tacna, Tumbes (Lebel, 2010; Marcelo *et al.*, 2007) y Lambayeque.

Esta especie, por las saponinas presentes, ha sido utilizada desde la antigüedad como un jabón natural por diferentes comunidades indígenas y comprobada su eficacia en el tratamiento de lesiones e inflamaciones (Albiero *et al.*, 2008; Cogollo *et al.*, 2008), antitumoral (Rashed *et al.*, 2013), tónico digestivo y diurético (DeFilipps *et al.*, 2004), broncolítico y hipocolesterolémico (Orlando y Guirado, 2005), agente antioxidante y antibacterial (Niloufer, 2021), acción fungicida (Damke *et al.*, 2013; Fiorini *et al.*, 2016; Marinho *et al.*, 2018), larvicida (Santos *et al.*, 2008; Rojas *et al.*, 2015), leishmanicida y tripanocida (Correa *et al.*, 2014) y acción de remediación (Marín y Arriojas, 2021). Es así que los metabolitos secundarios de *S. saponaria* han concitado el interés para diversas investigaciones con el objetivo de utilizar su alto potencial industrial (Sánchez y Silva, 2008). Por otro lado, esta especie ofrece una fuente de materia prima como madera, corteza, hojas, frutos, resinas, gomas, látex y, como ya se ha indicado, una gran variedad de metabolitos secundarios que brindarían beneficios sociales y ambientales en la mitigación de los impactos del cambio climático (Mondragón, 2016).

El peligro de depredación por la deforestación y el cambio climático está llevando a muchas especies de alto valor a la vulnerabilidad. A nivel mundial los bosques secos representan un 42% de todos los bosques tropicales y subtropicales (Murphy y Lugo, 1986; Miles *et al.*, 2006). El Bosque Tropical Estacionalmente Seco (BTES) presenta una ecorregión costera desde el Golfo de Guayaquil, la península de Santa Elena y la isla Puna, Esmeraldas, Galápagos, Guayas, Imbabura, Los Ríos, Loja y Manabí en Ecuador, así como Tumbes, Lambayeque, La Libertad, Piura, Cajamarca y Amazonas, además de las Vertientes

Occidentales de los Andes hasta el valle del Marañón (Brack, 1986; Aguirre, 2012). En el Perú los bosques secos representan 4,7% de la superficie (MINAM, 2019).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, desde 1990 hasta el 2020 se han perdido más de 420 millones de hectáreas de bosques a nivel mundial (FAO, 2020). Según la lista de países con mayor pérdida de bosques primarios tropicales del 2021, Brasil se encuentra en primer lugar seguido por República Democrática del Congo, Bolivia e Indonesia siendo Perú el quinto de este ranking (Nicholas, 2022). Desde 2001 hasta 2021, Perú perdió un total 2,34 millones de hectáreas de bosque primario, pérdida generada por la deforestación, agricultura itinerante e incendios forestales (Global Forest Watch, 2021). Los BTES presentan un alto grado de endemismo, donde la tala, la ganadería y otras actividades antropogénicas y el cambio climático son amenazas para la biodiversidad llevando al deterioro de los mejores genotipos de una población vegetal (Marcelo *et al.*, 2007; Delgado y Suárez, 2009).

Asimismo, según la Organización Meteorológica Mundial cada año el cambio climático es más crítico (OMM, 2022), siendo la década 2011-2020, la más cálida registrada y planteándose que alcance unos 3,2 °C para finales de siglo que conllevaría a la erosión de suelos, perturbación de biodiversidad y desastres naturales (Naciones Unidas, 2021). La deforestación a nivel mundial no está en camino a detenerse, a pesar de que hubo un compromiso en la cumbre climática COP26 del 2020 en Glasgow y que 141 países, incluido, el Perú prometieron revertir esta problemática crítica para el 2030 (Consulting Climate, 2022). Ante esto, debido a que *S. saponaria* presenta una cobertura foliar durante todo el año, resulta una especie importante para el control microclimático en el BTES, donde la mayoría de especies son caducifolias, siendo un riesgo su vulnerabilidad frente a la deforestación. En tal sentido, diferentes estrategias de conservación han venido desarrollándose en *S. saponaria*, como métodos de propagación en vivero mediante semillas y estacas.

Como es ampliamente conocido, los métodos tradicionales de silvicultura son importantes en las actividades forestales, pero son limitados por el ciclo biológico largo, mientras que las técnicas de cultivo de tejidos vegetales promueven la regeneración masiva *in vitro* a través de la micropropagación y embriogénesis somática en un corto periodo de tiempo (Martínez *et al.*, 2003). Estos métodos son aplicados en la obtención a gran escala de especies leñosas de importancia como *Eucalyptus* sp. o *Populus* sp. (Gaur *et al.*, 2016), así como permitir conservar especies con alto riesgo de vulnerabilidad (Pérez, 2021) y posibilitar la obtención de metabolitos secundarios de importancia económica (Delgado y Rojas, 2001). Por todo esto, el

objetivo de la presente investigación fue estudiar en condiciones *in vitro* la germinación de semillas, la propagación clonal, varios aspectos morfogénicos y la conservación de germoplasma de “choloque” *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae), una importante especie forestal nativa del bosque tropical del bosque estacionalmente seco de la costa norte del Perú y el sur del Ecuador.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

En el estudio *in vitro* de *Sapindus mukorossi*, sobre la formación de embriones somáticos, mediante la embriogénesis indirecta, se utilizaron las hojas en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con sacarosa 4,0% y diferentes concentraciones de citoquininas, obteniéndose resultados óptimos con la 6-Bencilaminopurina (BAP) 4,44 μ M y alcanzándose un porcentaje de germinación de embriones somáticos de 77,79 % (Singh *et al.*, 2019).

Asimismo, Philomina y Rao (2000), realizaron un estudio sobre la micropropagación de *S. mukorossi*, utilizando las meristemas axilares y apicales de plántulas *in vitro* en medio de cultivo MS, suplementado con sacarosa 2,0% y BAP o Kinetina (KIN), alcanzándose los mejores resultados con BAP 0,8 μ M e induciendo 6 a 8 brotes por meristema. Cuando se suplementó ácido giberélico (AG₃) los mejores resultados se alcanzaron con las concentraciones más bajas de AG₃ (0,4 μ M) y BAP 2,8 μ M, induciéndose la elongación de los brotes 5 - 7 cm en 4 semanas de cultivo.

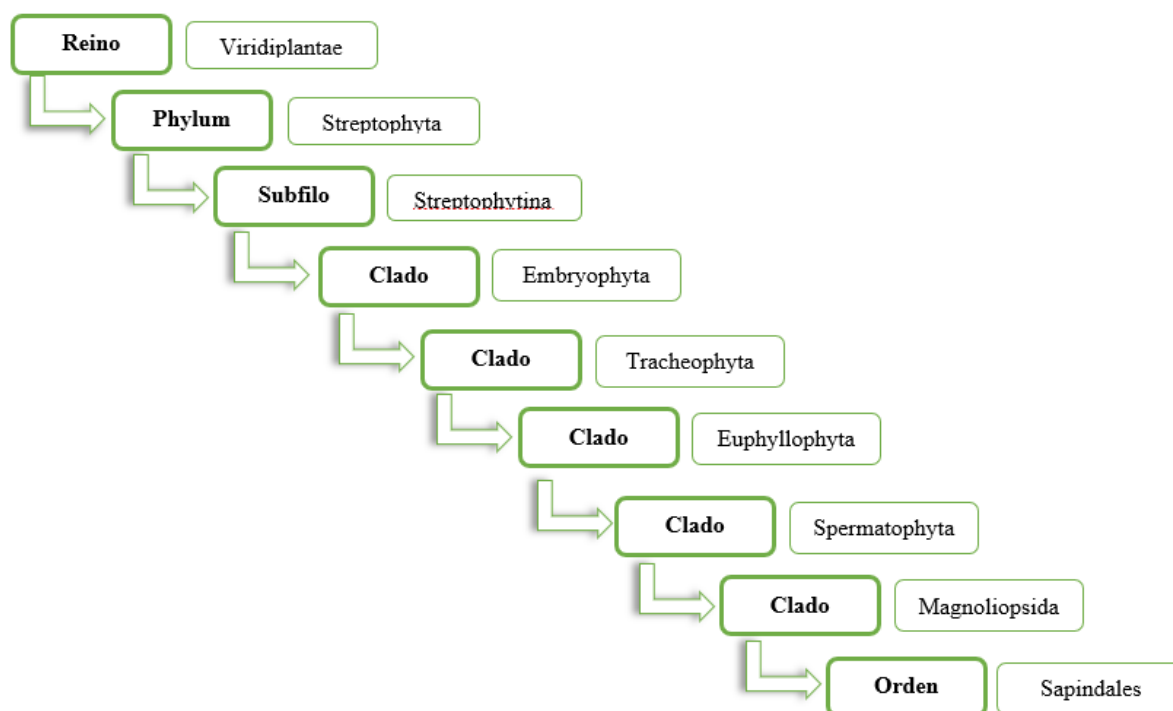
En la micropropagación de *Sapindus trifoliatus* se usaron segmentos nodales de 1,5 a 2,0 cm, en medio de cultivo MS, sacarosa 3,0% y varias concentraciones de BAP y KIN: 0,01; 0,1; 1,0 y 3,0 mg/L, resultando BAP 1,0 mg/L la concentración que indujo 97,22% en número de brotes. En el enraizamiento se suplementó ácido indolbutírico (AIB) 0,0; 0,1; 0,5; 1,0 y 2,0 mg/L, donde con AIB 1,0 mg/L se alcanzó 91,67% de formación de raíces y 90% de supervivencia, durante la aclimatación (Asthana *et al.*, 2011).

En la familia Sapindaceae, se ha reportado la inducción de embriogénesis somática en *Allopylus edulis*, utilizando explantes de hojas y raíces en medio de cultivo MS, sacarosa 3,0% y diferentes concentraciones de BAP 0,25; 0,5; 1,0 y 2,0 mg/L y ácido naftaleneacético (ANA) 0,1 mg/L, observándose los mejores resultados en hojas, para formación de callos, con BAP 0,5 mg/L BAP y ANA 0,1 mg/L, proporcionando mayor peso fresco y seco, siendo los segmentos

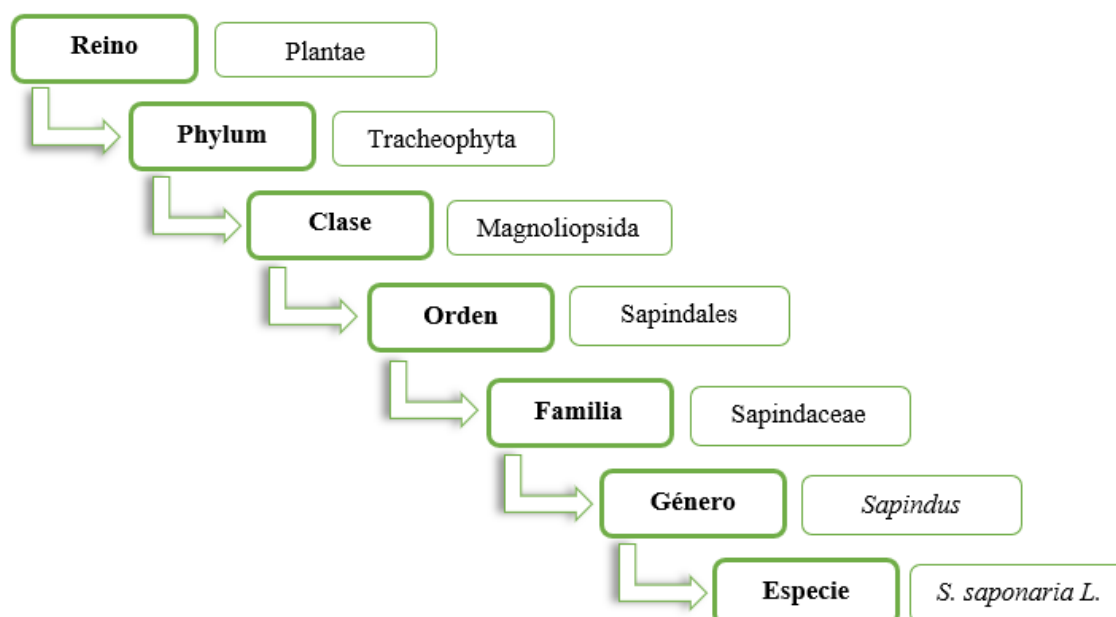
de la raíz los más adecuados para obtener embriones somáticos y con el uso de BAP 2,0 mg/L y ANA 0,1 mg/L, el mayor número de brotes (Messias *et al.*, 2019).

2.2. TAXONOMÍA

La clasificación de *S. saponaria* hasta orden, según The National Center For Biotechnology Information (NCBI, 2023), es la siguiente:



La clasificación, según Global Biodiversity Information Facility (GBIF, 2023), es la siguiente:



2.3. BASES TEÓRICAS

Las diversas técnicas del cultivo de tejidos vegetales permiten obtener células o tejidos totalmente asépticos en medio de cultivo nutritivo donde las condiciones son controladas (Sharry *et al.*, 2015). Dicho medio de cultivo está compuesto por sales minerales, agua y suplementado con compuestos orgánicos como sacarosa, hormonas vegetales y/o reguladores de crecimiento (Martínez *et al.*, 2015). Según el genotipo o especie en estudio la composición del medio de cultivo varía, ya sea en concentración de hormonas, sales minerales, vitaminas, entre otros. (Rivera, 2018; Ponce, 2014). Entre las diferentes técnicas del cultivo de tejidos vegetales destacan organogénesis (Sharry *et al.*, 2015), micropropagación, suspensiones celulares, conservación de germoplasma, cultivo de protoplastos y embriogénesis somática (Suárez, 2020). Los atributos que se destacan en los cultivos embriogénicos son la conservación de todo su potencial de propagación, una gran capacidad de crioconservación (Park *et al.*, 1998) y su alta estabilidad genética (Barrett *et al.*, 1999).

La organogénesis o regeneración de una plántula a partir de un explante es un proceso morfológico mediante el cual las células pasan por un proceso de diferenciación celular con el objetivo de originar nuevas estructuras vegetales (Suárez, 2020). Este proceso se divide en organogénesis directa (OD) e indirecta (OI). La OD es formación de brotes o raíces adventicias que se originan de los explantes como tejidos u órganos vegetales y la organogénesis indirecta presenta una fase intermedia donde hay una proliferación de células que regeneran un callo (George *et al.*, 2008).

La embriogénesis somática es la formación de un embrión sin la fusión de gametos, es decir inducción de células en condiciones *in vitro* (Hernández *et al.*, 2022), este proceso se basa en un principio enunciado por G. Haberlandt en 1902 (Cabasson *et al.*, 1997), postulando el principio de la totipotencia, que quiere decir que cualquier célula de la planta tiene la capacidad de regenerar un nuevo individuo, donde las condiciones *in vitro* del cultivo son manipuladas con la aplicación de reguladores de crecimiento (Freire, 2003).

En la naturaleza las hormonas vegetales influyen en procesos fisiológicos principalmente en el crecimiento, la diferenciación y el desarrollo, siendo un grupo de sustancias orgánicas las cuales se clasifican en auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (Delgado y Rojas, 2001). Hoy en día la biotecnología nos brinda reguladores de crecimiento sintéticos y entre las auxinas tenemos, ácido 2,4-diclorofeoxiacético (2,4-D), ácido naftaleneacético (ANA), PICLORAM, DICAMBA, entre otras. Se utilizan para el crecimiento

celular, inducción de embriogénesis somática, la producción callos, el enraizamiento, y para la inducción de brotes apicales. Las citoquinas más comunes son la BAP, KIN, 2iP, zeatina, topolinas, tidiázurón (TDZ), entre otras. Su función es la formación de raíces, la estimulación de división celular y la proliferación de brotes axilares. Las giberelinas comprenden más de un centenar de compuestos, pero la más utilizada es AG₃ que inducen la elongación del tallo y el crecimiento de los callos. El ácido abscísico (ABA) inhibe o estimula el crecimiento de los callos y el desarrollo de embriones (Saad y Elshahed, 2012).

2.4. JUSTIFICACIÓN

Las especies forestales en su mayoría suelen ser difíciles de propagar debido a que tienen una lenta regeneración y presentan un largo ciclo de desarrollo (Martínez *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2012), lo cual limita las diferentes estrategias de manejo y conservación de programas convencionales de mejoramiento vegetal. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una de las pocas estrategias que pueden superar las dificultades de propagación convencional (Indacochea *et al.*, 2018). Estas técnicas son una alternativa para propagar especies arbóreas (Salazar *et al.*, 2016) mediante procesos morfogénicos y conservación *in vitro* (Martínez *et al.*, 2003); así también, incrementa de manera considerable el número de plantas en un corto periodo de tiempo y permite obtener plantas libres de enfermedades (Indacochea *et al.*, 2018), siendo una estrategia de mejoramiento, conservación y medida de protección para especies importantes.

A la fecha, son limitados los estudios de cultivo de tejidos vegetales en la familia Sapindaceae. Se realizó estudios de micropropagación en *Sapindus mukorossi* y *Sapindus trifoliatus* (Philomina, 2000; Asthana *et al.*, 2011) y la inducción de embriogénesis somática en *Allophylus edulis* y *Sapindus mukorossi* (Asthana *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2019) llegando a la conclusión que estas técnicas permiten obtener plántulas con fines de propagación y conservación.

S. saponaria, especie leñosa del bosque tropical estacionalmente seco (Aguirre *et al.*, 2006; Linares-Palomino *et al.*, 2011), tiene importancia fitoquímica por los diferentes metabolitos secundarios que presenta, entre ellos las saponinas, las cuales tienen propiedades industriales y farmacológicas (Angulo, 2017). *S. saponaria* se ha utilizado para recuperar zonas degradadas (Santos *et al.*, 2012; Teixeira *et al.*, 2022), beneficiando las actividades forestales cuyo sector favorece la mitigación ante el cambio climático (FAO, 2016). *S. saponaria* contribuye a los bosques con su cobertura dando sombra, reduciendo la temperatura del aire y aumentando la humedad relativa, así como de ser el refugio natural para diversas especies.

Por lo expuesto, esta investigación busca esclarecer el proceso de germinación de semillas y proponer metodologías eficientes para la propagación clonal, morfogénesis y conservación de germoplasma de *S. saponaria* en condiciones *in vitro* con el fin de aportar positivamente en futuros programas sustentables de reforestación.

2.5. OBJETIVOS

2.5.1. OBJETIVO GENERAL

Establecer un protocolo eficiente y repetible para la germinación de semillas, propagación clonal, morfogénesis y conservación de germoplasma de *Sapindus saponaria* utilizando diversas técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

2.5.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- a. Promover la germinación de semillas
- b. Formular un medio de cultivo y procedimiento para la propagación clonal, a partir de ápices caulinares y segmentos nodales.
- c. Inducir la formación de callos y diversos procesos morfogénicos
- d. Establecer las condiciones básicas de medio de cultivo y ambientales de incubación para la conservación *in vitro* por limitación de crecimiento a tasas normales.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Medio de cultivo basal MS

El medio cultivo de germinación *in vitro* de semillas de *S. saponaria* fue en base a las sales minerales de Murashige y Skoog – MS (**Tablas 1 y 2**).

Tabla 1.

Componentes de las sales minerales del medio de cultivo basal MS (Murashige y Skoog, 1962), utilizado en la formulación de los tratamientos in vitro de S. saponaria.

Nº	Componente químico	Peso (mg)	Volumen de la solución madre (mL)	Concentración/Litro de medio de cultivo basal (mg/L)	Volumen de la solución madre/Litro de medio de cultivo basal (ml/L)
I	NH ₄ NO ₃	82 500	1000	1 650	20
	KNO ₃	95 000		1 900	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	18 500		370	
	KH ₂ PO ₄	8 500		170	
II	H ₃ Bo ₃	620	100	6,2	1,0
	MnSO ₄ .H ₂ O	2 176		22,3	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	860		8,6	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25		0,25	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	2,5		0,025	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	2,5		0,025	
III	KI	75	100	0,83	1,0
IV	CaCl ₂ .2H ₂ O	1 500	100	440	3,0
V	Na ₂ EDTA	1 492	200	37,3	5,0
	FeSO ₄ .7H ₂ O	1 114		27,8	
VI	Tiamina.HCl	20	200	0,4	2,5
VII	m-Inositol	1 600	200	100	12,5

Nota: Tomado de Delgado y Rojas (2001)

Tabla 2

Volúmenes de las soluciones madre o stock y otros compuestos utilizados en la preparación de los medios de cultivo para los diversos eventos realizados en cultivo de tejidos de S. saponaria.

Soluciones y otros compuestos	Volumen (mL) y peso (g) por litro de medio de cultivo
Solución madre I	20 mL
Solución madre II	1 mL
Solución madre III	1 mL
Solución madre IV	3 mL
Solución madre V	5 mL
m-inositol	12,5 mL
Tiamina.HCl	2,5 mL
Sacarosa 2,0%	20 g
Agar 0,6%	6 g

3.1.2. Población

La población estuvo conformada por semillas de *S. saponaria*, colectadas en la región Lambayeque, en diferentes años: 2018, Jayanca (17 M. 631106 E. 9294520. S); 2019, Ñaupe (17 M 623044 E 9379036 S); 2020, Íllimo (17 M 627049 E. 9283801 S); 2021, Chongoyape (17 M 676546 E. 9266788 S) y 2022, Ñaupe (17 M. 62383568. E. 9378108. S). Las semillas fueron almacenadas en bolsas de plástico, en condiciones medioambientales, en el Laboratorio General de Biotecnología del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo de Lambayeque.

3.1.3. Muestra

La muestra estuvo conformada por semillas colectadas y seleccionadas entre los años 2018, 2019, 2020, 2021 y 2022, las cuales fueron inducidas a germinar en condiciones *in vitro* y obtener plántulas para luego ser utilizadas en los procesos de propagación clonal, morfogénesis y conservación de germoplasma *in vitro* (**Figura 1**).

Figura 1.

Semillas de Sapindus saponaria, conservadas en bolsas de plástico en condiciones medioambientales.



3.2. MÉTODOS

3.2.1. Selección de semillas.

Las semillas seleccionadas fueron las que presentaron las mejores condiciones morfológicas y fitosanitarias, escogiéndose preferentemente las que tenían un tamaño uniforme (1,5 cm) (**Figura 2**).

Figura 2.

Semillas (A) y frutos (B) seleccionados de S. saponaria.

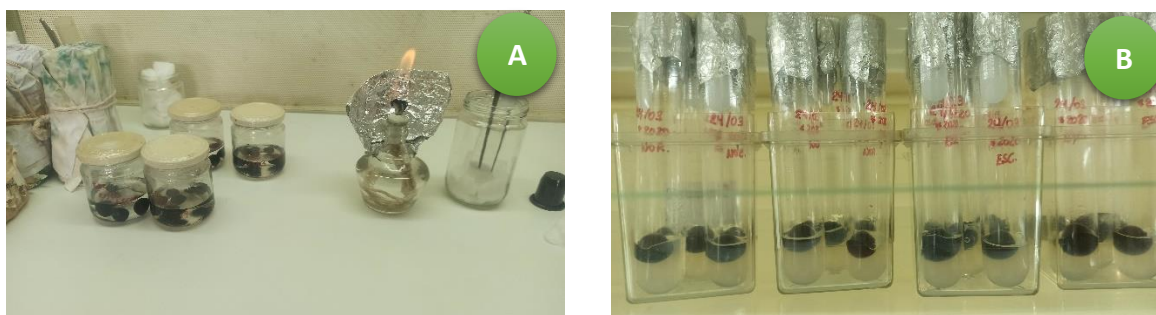


3.2.2. Siembra de semillas *in vitro*

Las semillas seleccionadas fueron lavadas con detergente durante 15 minutos, antes de ingresar a la cámara de flujo laminar horizontal de aire esterilizado donde se realizó la desinfección con alcohol etílico 70% e hipoclorito de sodio (50% lejía marca Sapolio, Cc Cloro 50 g/L - 50% agua destilada), en proporción 1:1 durante 3 y 15 minutos, respectivamente. Estos desinfectantes se removieron con tres enjuagues sucesivos con agua destilada esterilizada. Luego, las semillas desinfectadas fueron mantenidas en frascos con agua destilada esterilizada durante 48 horas hasta que alcancen cierto grado de imbibición. Transcurrido este tiempo fueron cultivadas en tubos de ensayo de 25x150 mm, a razón de una semilla por recipiente, conteniendo el medio de cultivo de germinación de semillas (**Tablas 1 y 2; Figura 3; Anexo 1**). Luego se determinó el porcentaje de germinación y viabilidad.

Figura 3.

*A. Esterilización y posterior hidratación de semillas. B. Semillas *in vitro* de S. saponaria.*



3.2.3. Prueba de germinación

Por cada año en que fueron colectadas las semillas (2018, 2019, 2020, 2021 y 2022), se seleccionaron 20 semillas, de las cuales 10 se sometieron a escarificación mecánica con una lija de acero mientras que las 10 semillas restantes permanecieron intactas (no escarificadas), donde pasaron a un proceso de germinación y evaluación en condiciones *in vitro* (**Tabla 3; Anexo 1**).

Tabla 3.

Prueba de germinación in vitro de semillas de S. saponaria con tratamiento de escarificación (E) y no escarificación (NE).

Año de colecta	Tratamiento	Semillas (Nº)
2018	E	10
	NE	10
2019	E	10
	NE	10
2020	E	10
	NE	10
2021	E	10
	NE	10
2022	E	10
	NE	10

Semillas escarificadas (E) y no escarificadas (NE)

3.2.4. Propagación clonal

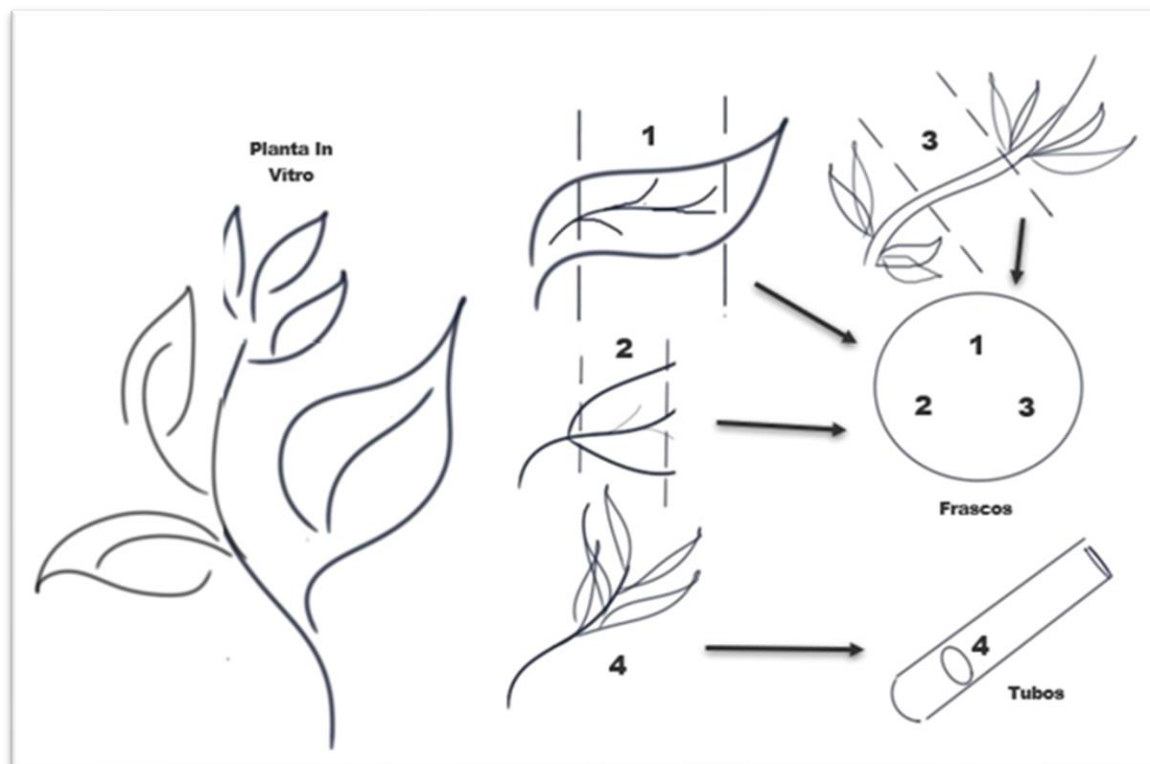
De las plantas germinadas *in vitro* se utilizaron secciones nodales y ápices caulinares con 2,0 a 3,0 cm de altura las que se cultivaron en medio de cultivo MS suplementado con sacarosa 2,0% y diferentes reguladores de crecimiento (**Figura 3; Tabla 5**). Las evaluaciones se realizaron a los 7, 21 y 30 días y después dejando un mes durante 5 meses, registrándose el tamaño de la plántula, número de nudos, hojas y brotes, así como la presencia de raíz en el explante.

3.2.5. Inducción de callos y procesos morfogénicos

Se utilizaron plantas germinadas *in vitro* que alcanzaron 7,0 a 10,0 cm de altura de donde seccionaron de 1,0 a 1,5 cm de tallo sin nudos (entrenudos) y de hojas de 1,0 cm², en sus regiones basal y media, fueron cultivadas para la inducción de callos y procesos morfogénicos diversos. Se evaluaron tres tratamientos con el medio de cultivo suplementado con sacarosa 4,0% y diferentes concentraciones de BAP (**Figura 4; Tabla 4, Anexo 2**).

Figura 4.

Obtención de la región media y basal de hoja, fragmentos de entrenudos y explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de S. saponaria.



Nº: 1 y 2. Sección media y basal de hoja para la inducción de callos y procesos morfogénicos.

Nº: 3. Sección de tallo, sin nudos, para la inducción de callos y procesos morfogénicos.

Nº: 4. Segmentos nodales y ápice caulinar para la propagación clonal y conservación de germoplasma *in vitro*.

Nota: Figura elaborada por el autor

Tabla 4.

Regulador de crecimiento utilizado en la formulación del medio de cultivo de inducción de callos en diversos explantes de S. saponaria.

Tratamiento	Regulador de crecimiento
	BAP (mg/L)
T1	1,0
T2	2,0
T3	3,0

BAP, 6-Bencilaminopurina. 10 frascos por tratamiento

3.2.6. Conservación de germoplasma

Se utilizaron secciones nodales y ápices caulinares de plántulas germinadas *in vitro* con tamaño de 2,0 a 3,0 cm en medio de cultivo MS suplementado con vitaminas, sacarosa 2,0% y diferentes reguladores de crecimiento (**Figura 4; Tabla 5**). La evaluación fue cada 30 días durante un periodo de 5 meses, registrándose las tasas de crecimiento, necrosis apical y supervivencia.

Tabla 5.

Reguladores de crecimiento utilizados en la formulación del medio de cultivo de propagación clonal y conservación de germoplasma in vitro de S. saponaria.

Tratamientos	Reguladores de crecimiento		
	ANA	AIA (mg/L)	AG ₃
T1	-	0,02	0,02
T2	0,02	-	0,02
T3	-	0,2	0,02
T4	0,2	-	0,02

ANA, ácido 1-naftalenacético; AIA, ácido indol-3-acético; AG₃, ácido giberélico.

15 tubos por tratamiento

3.2.7. Evaluación y análisis estadístico

Se evaluó el porcentaje de germinación de semillas y la tasa de contaminación, el promedio de elongación del tallo y raíces, así como el número de hojas, brotes y nudos. De igual manera, la necrosis apical, la tasa de supervivencia de las plántulas *in vitro*, el promedio de inducción de callos y el número de embriones somáticos formados. En el análisis estadístico se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba paramétrica de Tukey a un nivel de significancia de 95%, para cada uno de los tratamientos. Se utilizó el software estadístico SSPS versión 27 y los programas Microsoft Office Word, Excel versión 2019.

IV. RESULTADOS

4.1. Germinación *in vitro* de semillas de *S. saponaria*

En la germinación *in vitro* de semillas de *S. saponaria* (**Figura 5**), de semillas no escarificadas colectadas entre los años 2018 al 2022, la mayor tasa de germinación se alcanzó a los 33 días (30%), después de establecidas las semillas *in vitro* y correspondió a semillas colectadas en el año 2019, seguida de semillas colectadas en el año 2020 con 20% de germinación (**Figura 6**). En esta clase de semillas, no escarificadas, las colectadas en los años 2021 y 2022 solamente alcanzaron una tasa de 10% de germinación y las colectadas en el año 2018 no germinaron.

Figura 5.

Secuencia de la germinación de semillas in vitro de S. saponaria, colectadas entre los años 2018 a 2022, después de 45 días de establecidas las semillas in vitro.

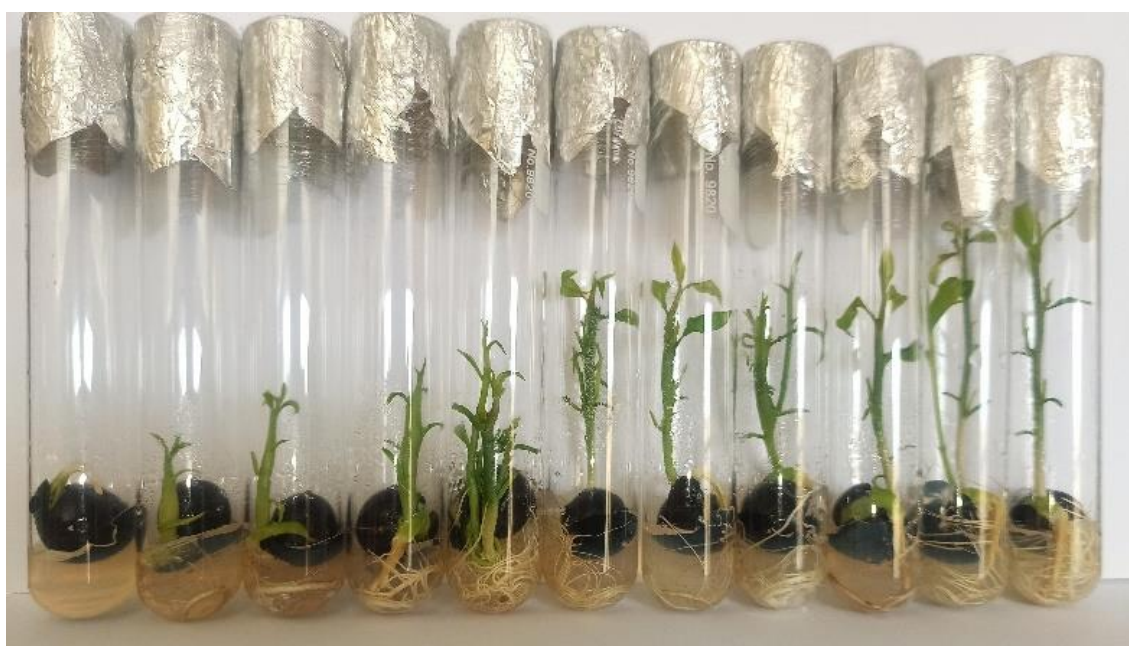
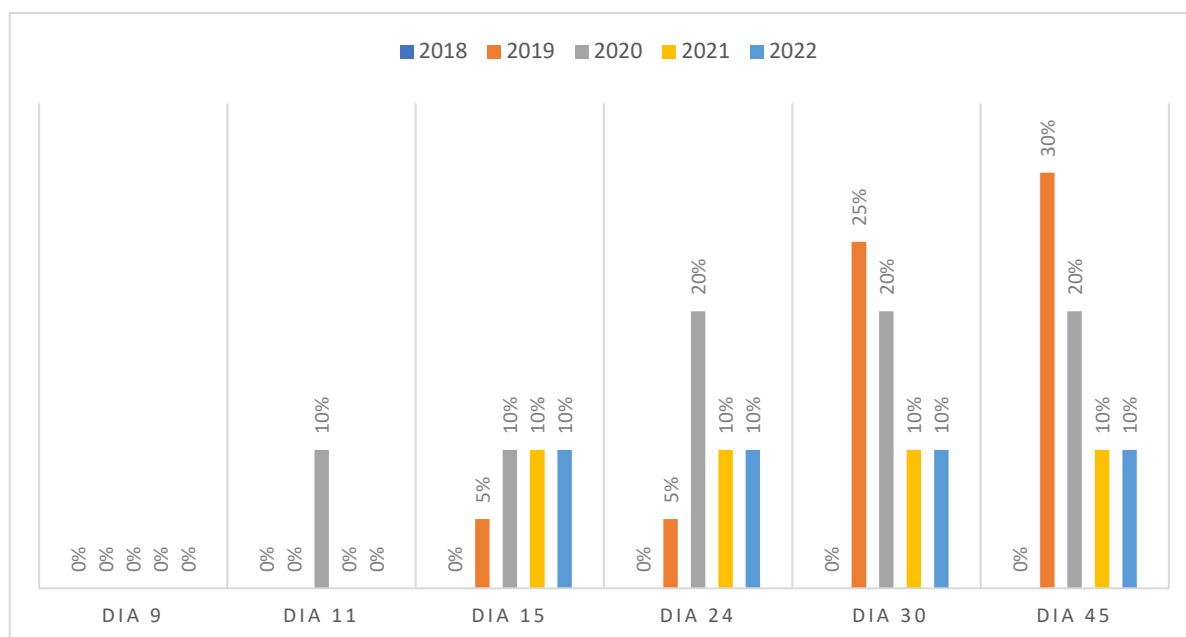
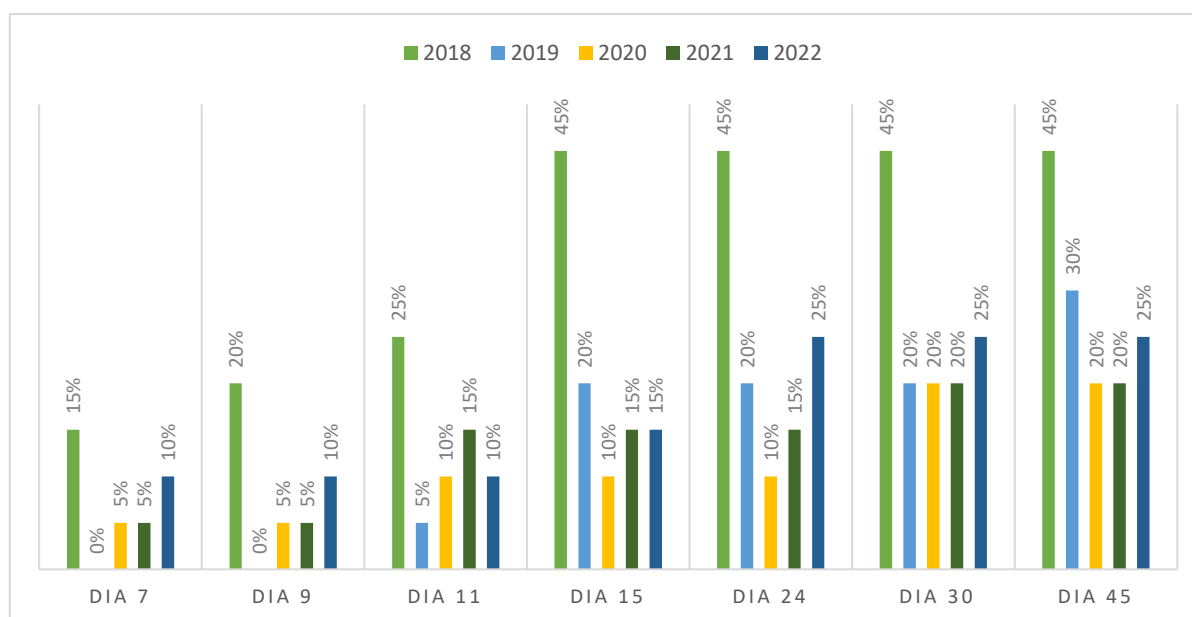


Figura 6.

Germinación de semillas no escarificadas de S. saponaria, colectadas entre los años 2018 a 2022, después de 45 días establecidas las semillas in vitro.

**Figura 7.**

Germinación de semillas escarificadas de S. saponaria, colectadas entre los años 2018 a 2022, después de 45 días de establecidas las semillas in vitro.



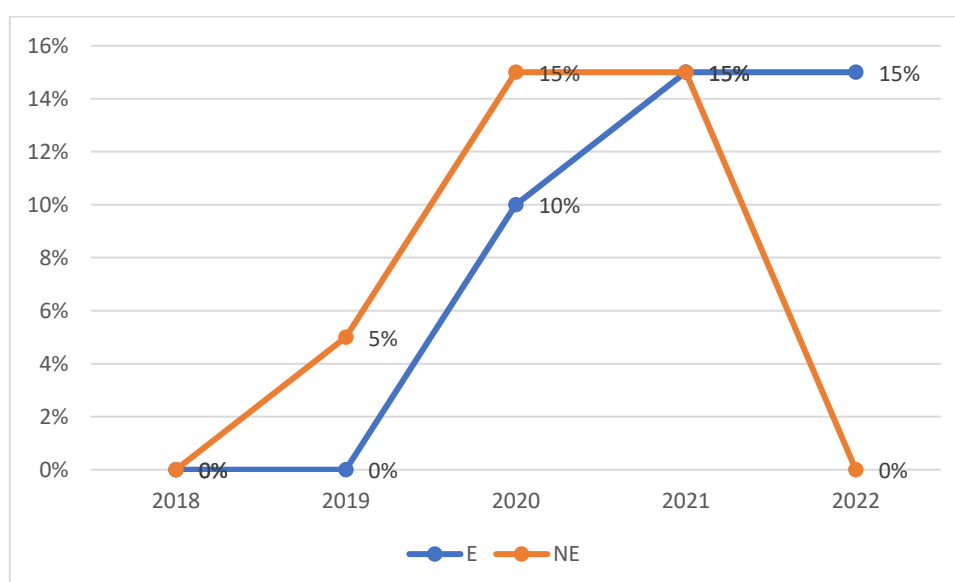
En el caso de semillas escarificadas la mayor tasa de germinación se alcanzó después de 15 días de establecidas las semillas *in vitro* (45%) y correspondió a semillas colectadas en el año 2018 seguido de semillas colectadas en los años 2019 (30%) y 2022 (25%), aunque estos últimos valores obtenidos a los 33 días de evaluación (**Figura 7**). En esta clase de evaluación, a diferencia de los resultados con semillas no escarificadas, donde no se registró germinación de semillas colectadas en el año 2018, en el caso de semillas escarificadas la germinación ocurrió en semillas colectadas en todos los años del ensayo (2018 al 2022).

4.2. Tasa de contaminación

El grupo de semillas que presentó la mayor tasa de contaminación fue la que correspondió a las colectadas en el año 2021, con una tasa de contaminación de 15%, tanto para semillas escarificadas (E) como no escarificadas (NE). En semillas colectadas en los años 2020 (NE) y 2022 (E), también se alcanzó una tasa de contaminación de 15%, en tanto que la tasa más baja de contaminación 0% se alcanzó en semillas colectadas en los años 2018 (NE) y 2019 (E) (**Figura 8**).

Figura 8.

Contaminación de semillas escarificadas (E) y no escarificadas (NE) de S. saponaria, colectadas entre los años 2018 a 2022, después de 45 días de establecidas las semillas in vitro.



4.3. Propagación clonal

Plántulas de 20 días, después de la germinación de semillas, fueron utilizadas en los ensayos de propagación clonal y conservación de germoplasma *in vitro* y en estos ensayos se utilizaron segmentos nodales y ápices caulinares. Después de 5 meses de establecidos los brotes *in vitro* la mayor elongación se alcanzó en el tratamiento T4 (T4 = ANA 0,2 - AG₃ 0,02 mg/L) con 6,9 cm y la menor elongación en el tratamiento T1 (T1 = AIA 0,02 - AG₃ 0,02 mg/L) con 4,7 cm (**Anexo 3 y Figura 9**). La mayor formación de nudos se alcanzó en el tratamiento T4 (7.8) y la menor formación de nudos (5.2) en los tratamientos T1 y T3 (T3 = AIA 0,2 - AG₃ 0,02 mg/L) (**Anexo 4, Figura 10**). La mayor formación de brotes (2.4) se alcanzó en el tratamiento T2 (T2 = ANA 0,02 - AG₃ 0,02 mg/L), en tanto que la menor formación de brotes se alcanzó en el tratamiento T1 (1.1) (**Anexo 5, Figura 11**). Asimismo, la mayor formación de hojas (8.9) se alcanzó en el tratamiento T4, en tanto que el menor número de hojas formadas se alcanzó en el tratamiento T3 (5,7) (**Anexo 6, Figura 12**).

Figura 9.

Elongación (cm) de ápices caulinares y segmentos nodales de S. saponaria, después de cinco meses de evaluación.

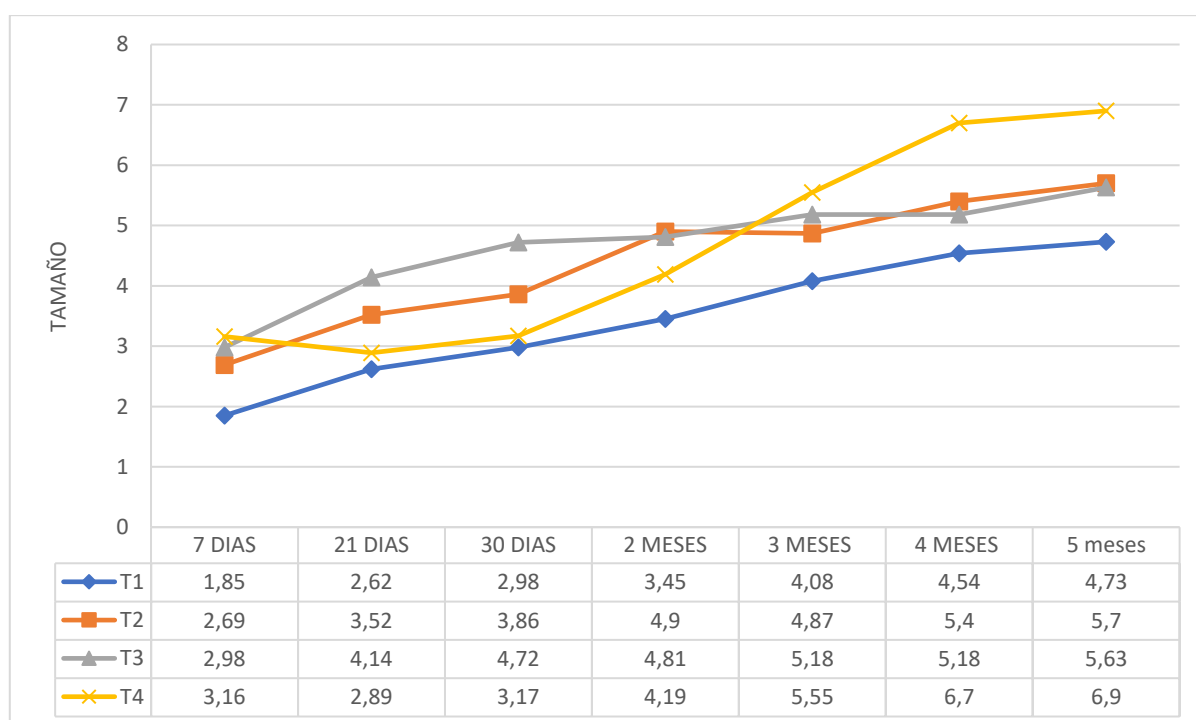
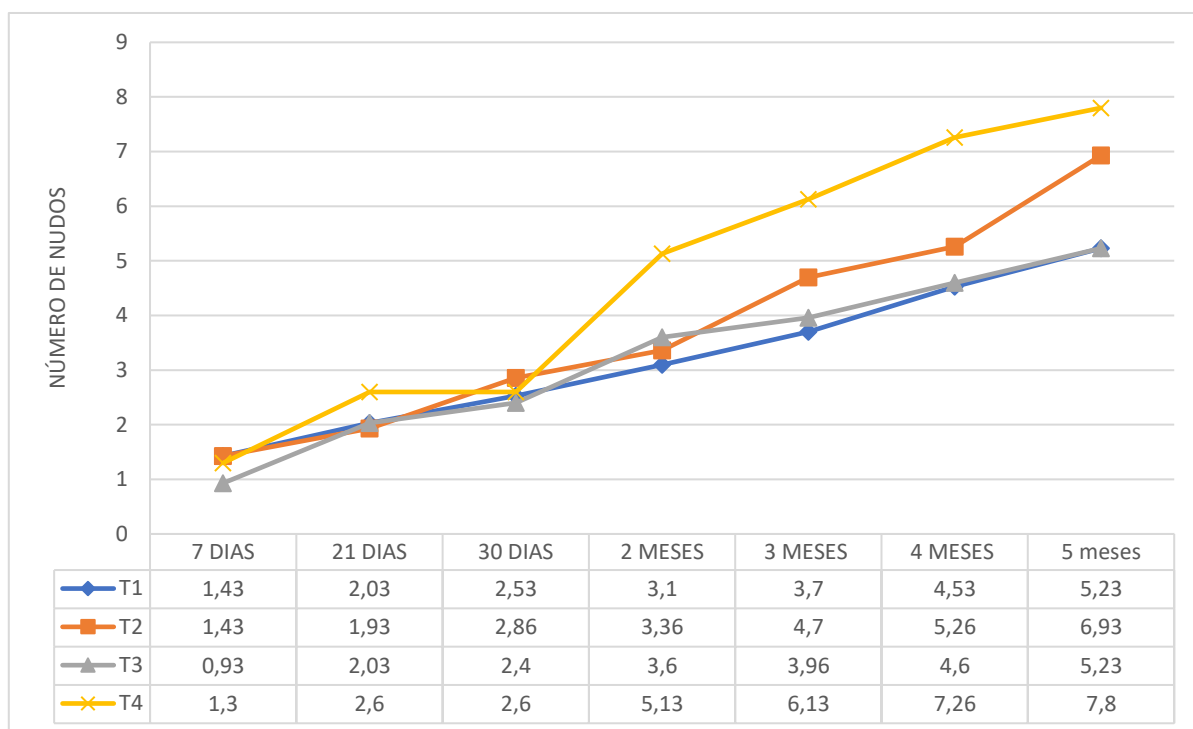


Figura 10.

Número de nudos formados en los ápices caulinares y segmentos nodales de *S. saponaria*, después de cinco meses de evaluación.

**Figura 11.**

Número de brotes formados en los ápices caulinares y segmentos nodales de *S. saponaria*, después de cinco meses de evaluación.

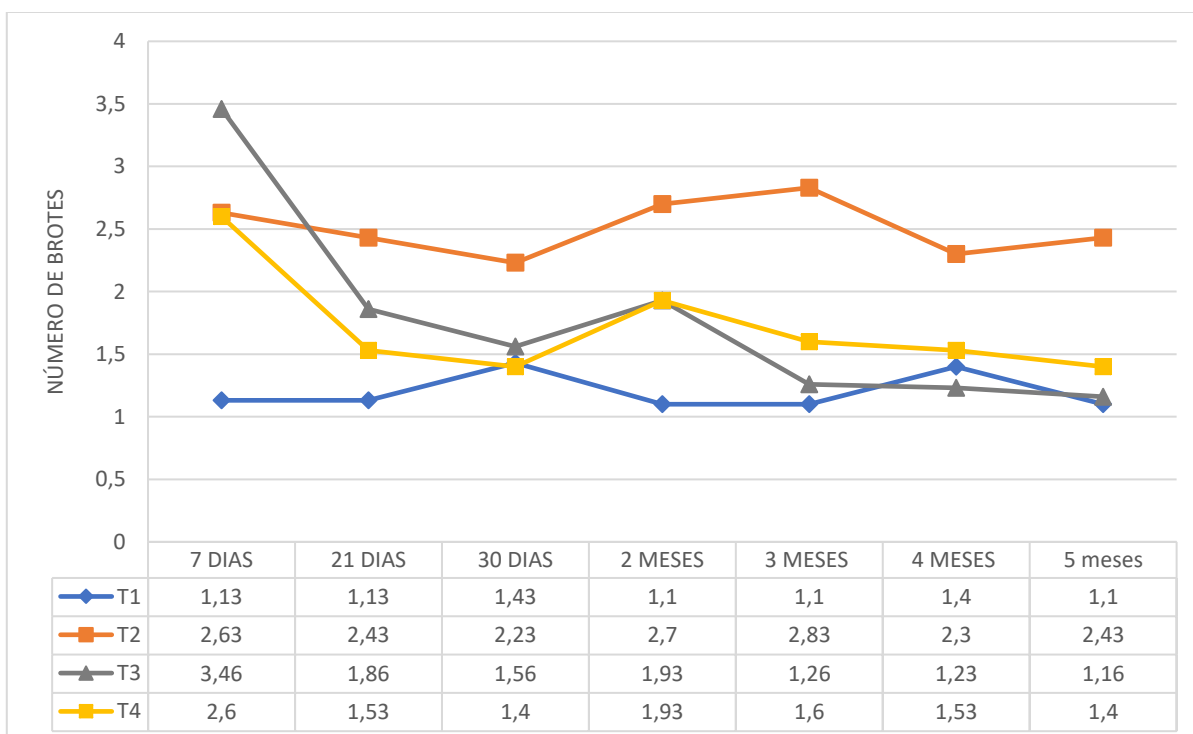
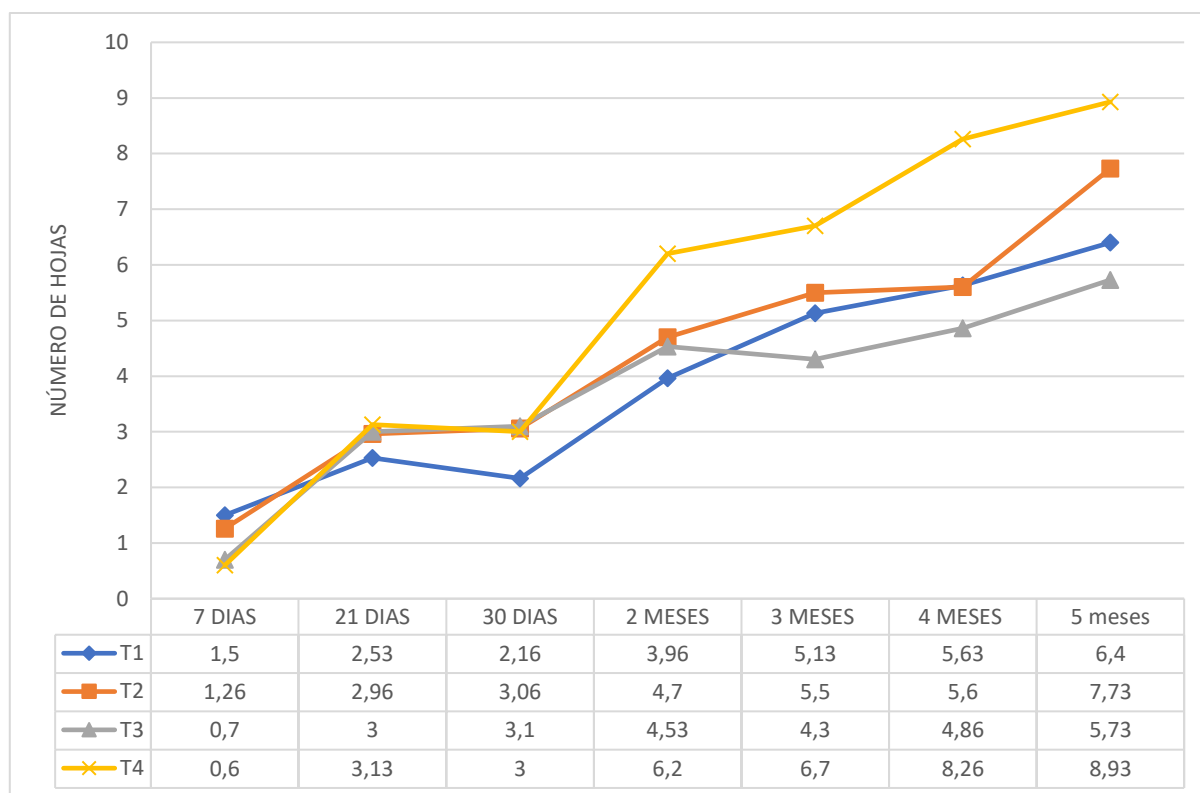


Figura 12.

Número de hojas formadas en los ápices caulinares y segmentos nodales de S. saponaria, después de cinco meses de evaluación.

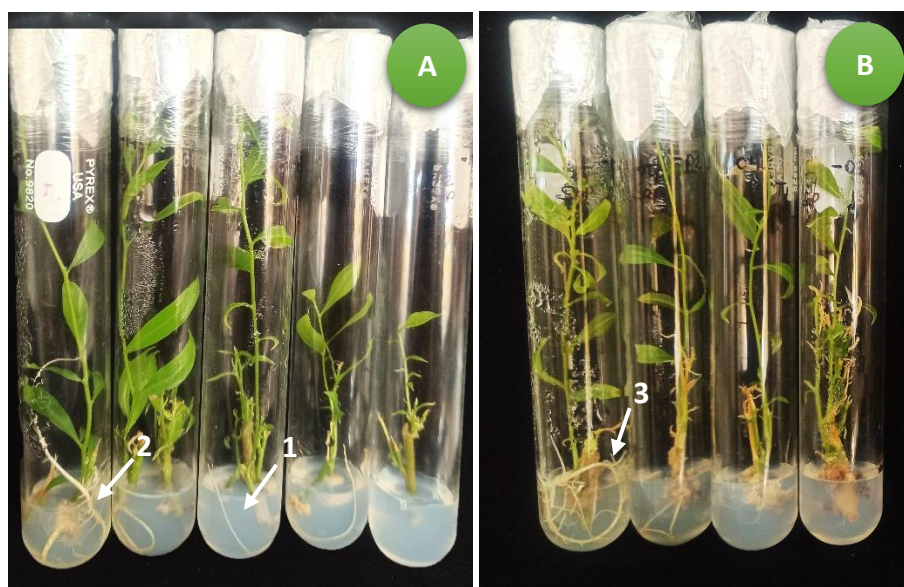


4.4. Enraizamiento

Después de 5 meses de establecidos los explantes *in vitro* el promedio más alto (14.2%) de raíces grandes (> 3 cm) se alcanzó en el tratamiento T3 (T3 = AIA 0,2 - AG₃ 0,02 mg/L) y el menor promedio (11.1%) en el tratamiento T4 (T4 = ANA 0,2 - AG₃ 0,02 mg/L) (**Figuras 16 y 17**). El promedio más alto de raíces medianas (1,1 a 3 cm) se alcanzó en el tratamiento T4 (27.7%), en tanto que el promedio más bajo (0%) en los tratamientos T3 y T2 (T2 = ANA 0,02 - AG₃ 0,02 mg/L) (**Figuras 17; 16 y 15**). Asimismo, el promedio más alto (8%) de raíces pequeñas (< 1 cm) se alcanzó en el tratamiento T2 y el promedio más bajo (0%) en el tratamiento T1 (T1 = AIA 0,02 - AG₃ 0,02 mg/L) (**Figuras 15 y 14**).

Figura 13.

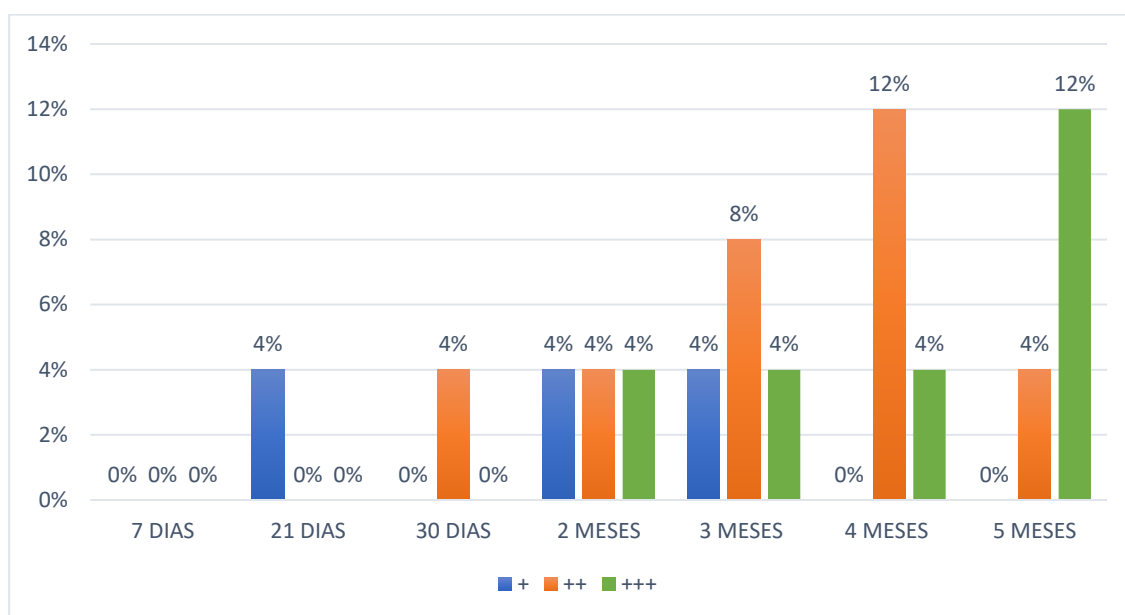
Enraizamiento de los ápices caulinares y segmentos nodales de S. saponaria. A. 1. Raíces pequeñas. 2. Raíces medianas. B. 3. Raíces grandes.



Escala empírica del enraizamiento: -, sin formación de raíces; +, raíces pequeñas (< 1,0 cm); ++, raíces medianas (1,1 a 3,0 cm) y +++, raíces grandes (> 3,0 cm).

Figura 14.

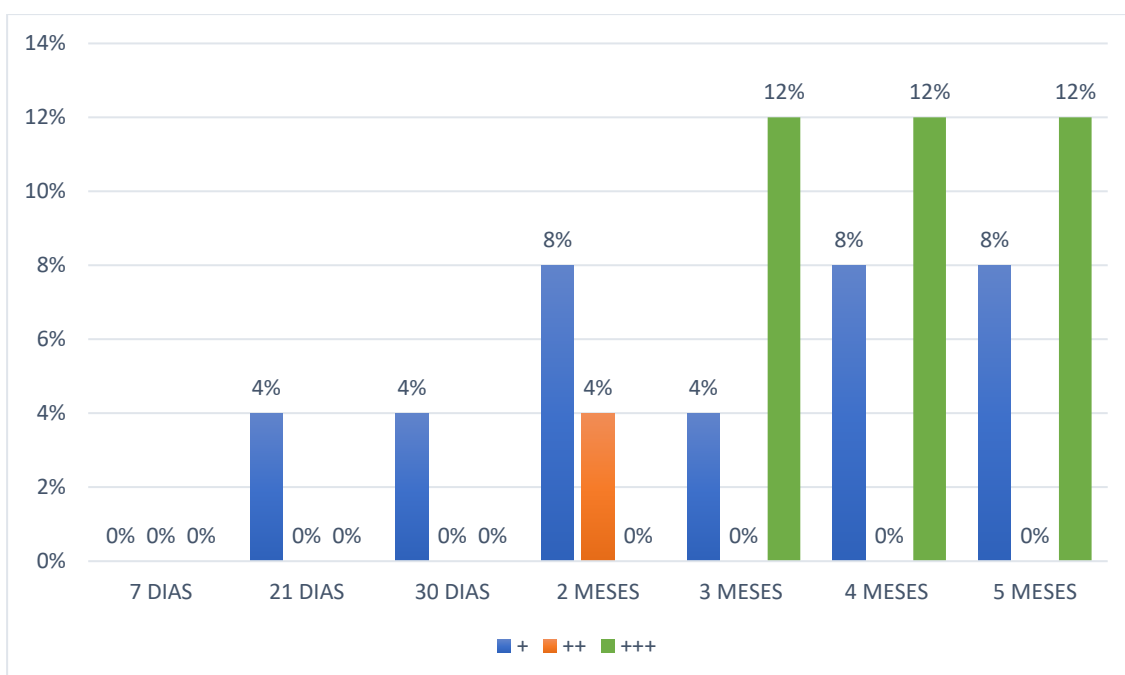
Crecimiento y desarrollo del sistema radicular de S. saponaria en el tratamiento T1 (AIA 0,02 - AG₃ 0,02 mg/L), después de cinco meses de establecidos los explantes in vitro.



Escala empírica del enraizamiento: -, sin formación de raíces; +, raíces pequeñas (< 1,0 cm); ++, raíces medianas (1,1 a 3,0 cm) y +++, raíces grandes (> 3,0 cm).

Figura 15.

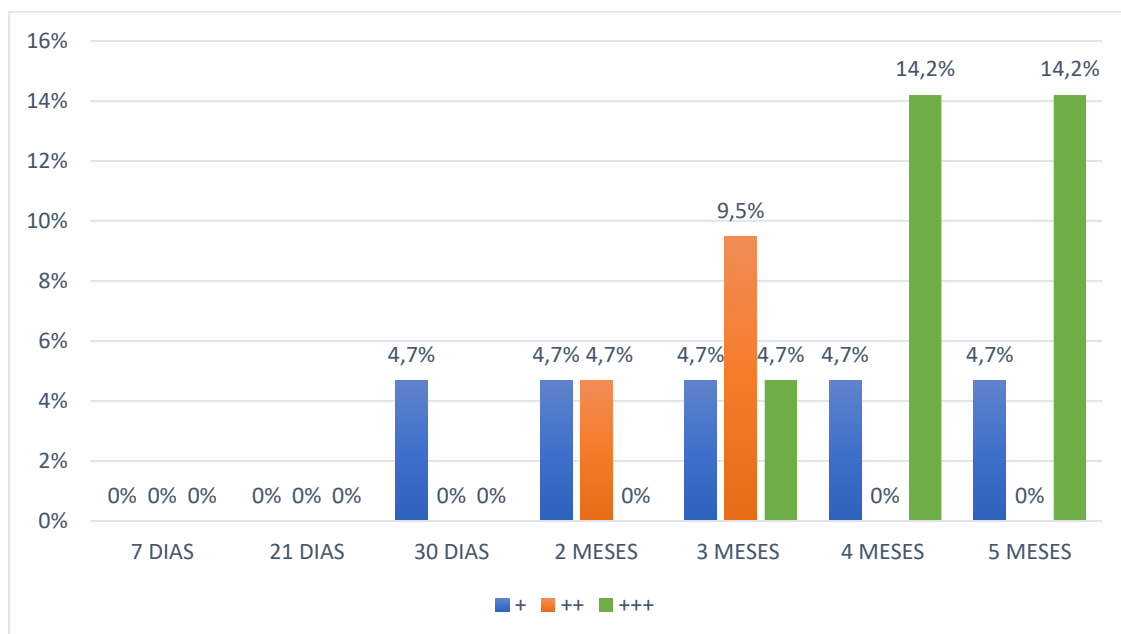
Crecimiento y desarrollo del sistema radicular de S. saponaria en el tratamiento T2 (ANA 0,02 - AG₃ 0,02 mg/L), después de cinco meses de establecidos los explantes in vitro.



Escala empírica del enraizamiento: -, sin formación de raíces; +, raíces pequeñas (< 1,0 cm); ++, raíces medianas (1,1 a 3,0 cm) y +++, raíces grandes (> 3,0 cm).

Figura 16.

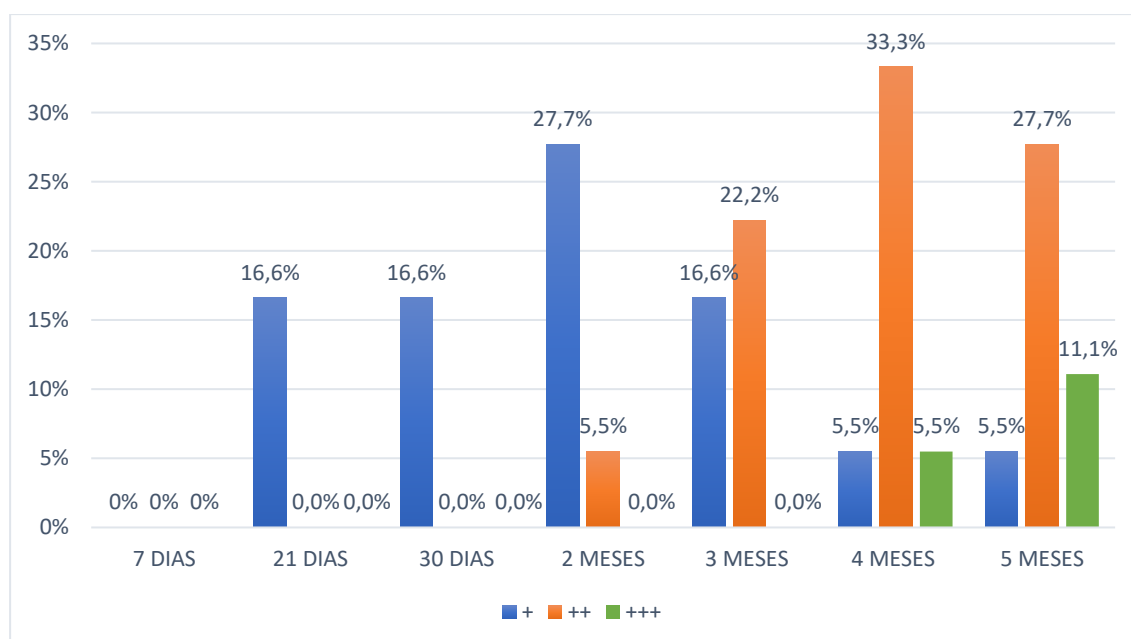
Crecimiento y desarrollo del sistema radicular de S. saponaria en el tratamiento T3 (AIA 0,2 - AG₃ 0,02 mg/L), después de cinco meses de establecidos los explantes in vitro.



Escala empírica del enraizamiento: -, sin formación de raíces; +, raíces pequeñas (< 1,0 cm); ++, raíces medianas (1,1 a 3,0 cm) y +++, raíces grandes (> 3,0 cm).

Figura 17.

Crecimiento y desarrollo del sistema radicular de S. saponaria en el tratamiento T4 (ANA 0,2 - AG₃ 0,02 mg/L), después de cinco meses de establecidos los explantes in vitro.



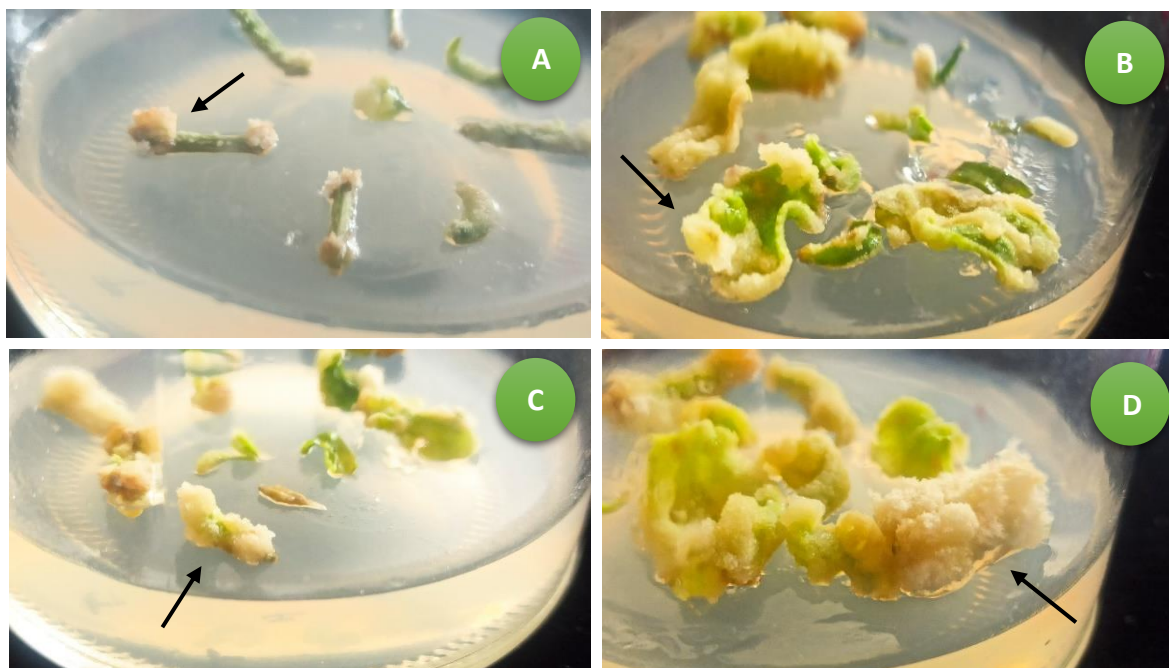
Escala empírica del enraizamiento: -, sin formación de raíces; +, raíces pequeñas (< 1,0 cm); ++, raíces medianas (1,1 a 3,0 cm) y +++, raíces grandes (> 3,0 cm).

4.5. Inducción de callos

Para la inducción de callos se utilizó hojas y tallos en medio de cultivo MS suplementado con diferentes concentraciones de BAP (**Tabla 1 y 4**). Después de 60 días de establecer el cultivo *in vitro* en los respectivos tratamientos se obtuvo el mayor promedio (74%) de callos totalmente formados (cubre todo el explante) (+++++) en hojas en el tratamiento T3 (T3 = BAP 3,0 mg/L) y el menor promedio (55%) en el tratamiento T1 (T1 = BAP 1,0 mg/L) (**Figura 19**). Asimismo, en tallos el mayor promedio (89%) de callos totalmente formados (+++++) en el tratamiento T3 y el promedio más bajo (55%) en el tratamiento T2 (T2 = BAP 3,0 mg/L) (**Figura 20**).

Figura 18.

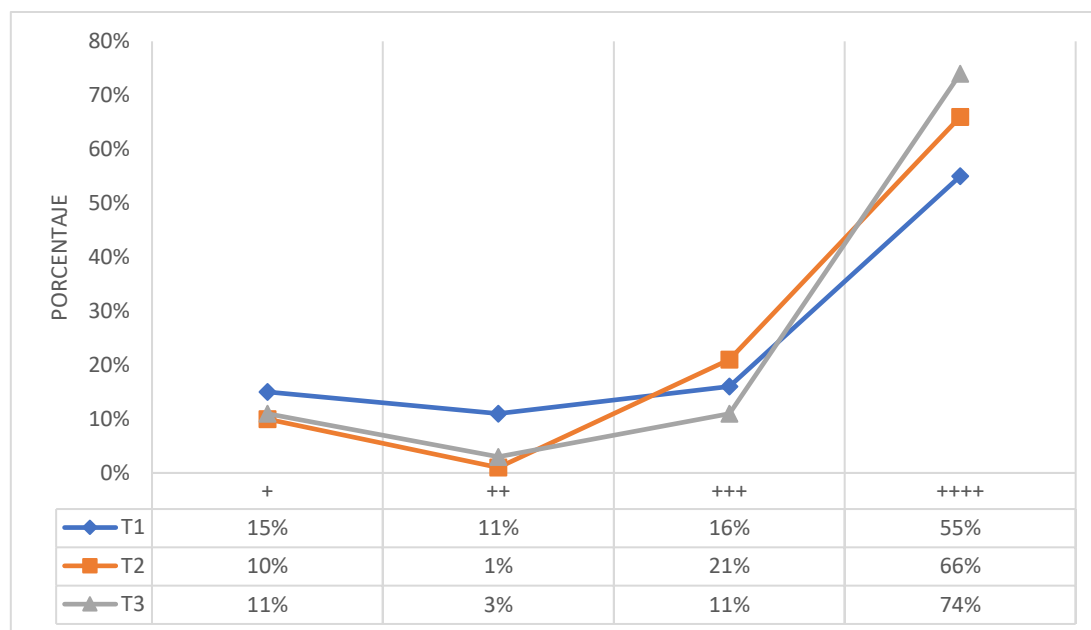
Inducción de callos en S. saponaria. A. Inicio de la división celular. B. Formación de callos en el borde del explante C. Callo parcialmente formado. D. Callo totalmente formado.



Escala empírica: -, sin formación de callos; +, callo cubre menos de la mitad del explante; ++, callo cubre la mitad del explante, +++, callo cubre las $\frac{3}{4}$ partes del explante y +++++, callo cubre totalmente el explante.

Figura 19.

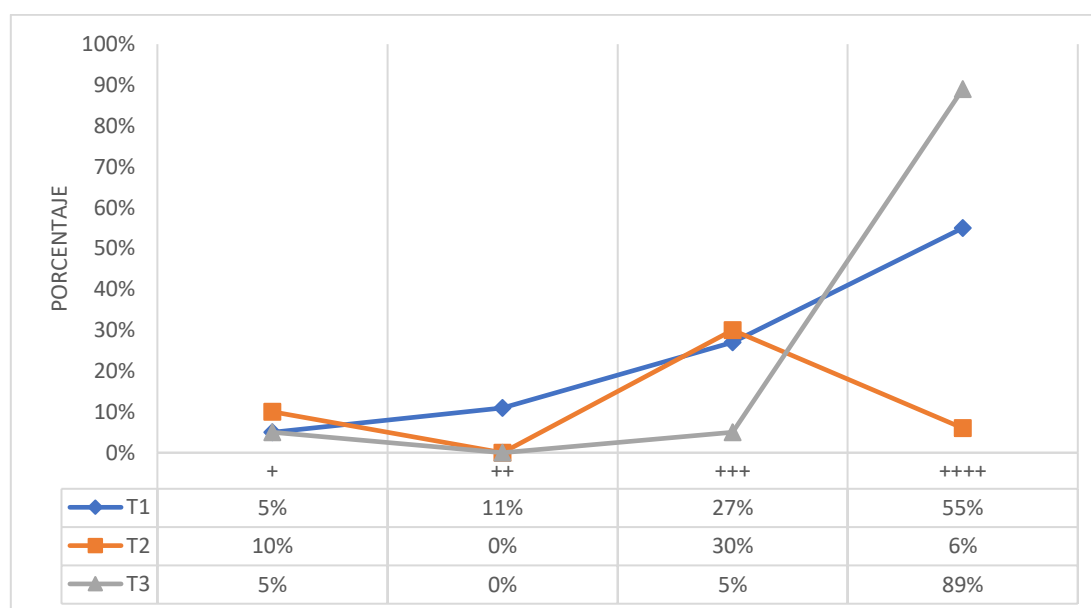
Inducción de callos en hojas de S. saponaria en varios tratamientos de reguladores de crecimiento. (T1 = BAP 1,0 mg/L; T2 = BAP 2,0 mg/L y T3 = BAP 3,0 mg/L).



Escala empírica: -, sin formación de callos; +, callo cubre menos de la mitad del explante; ++, callo cubre la mitad del explante, +++, callo cubre las $\frac{3}{4}$ partes del explante y ++++, callo cubre totalmente el explante.

Figura 20.

Inducción de callos en tallos de S. saponaria en varios tratamientos de reguladores de crecimiento. (T1 = BAP 1,0 mg/L; T2 = BAP 2,0 mg/L y T3 = BAP 3,0 mg/L).



Escala empírica: -, sin formación de callos; +, callo cubre menos de la mitad del explante; ++, callo cubre la mitad del explante, +++, callo cubre las $\frac{3}{4}$ partes del explante y ++++, callo cubre totalmente el explante.

4.6. Embriogénesis

Se observó las primeras formaciones embriogénicas a los 60 días, en diferentes fases de desarrollo (**Figuras 21**). Iniciando el periodo de evaluación, se obtuvo el mayor número embriones somáticos formados (86) con el tratamiento T2 (T2 = BAP 2,0 mg/L) y el número más bajo de embriones somáticos formados (6) en el tratamiento T1 (T1 = BAP 1,0 mg/L), donde los embriones fueron aislados y subcultivados en un medio basal (**Figuras 23 y 22; Tabla 6**).

Figura 21.

Estadios de desarrollo de embriones somáticos en S. saponaria (A) Globular, (B) Torpedo, (C) Acorazonado y (D y E) Cotiledonar.

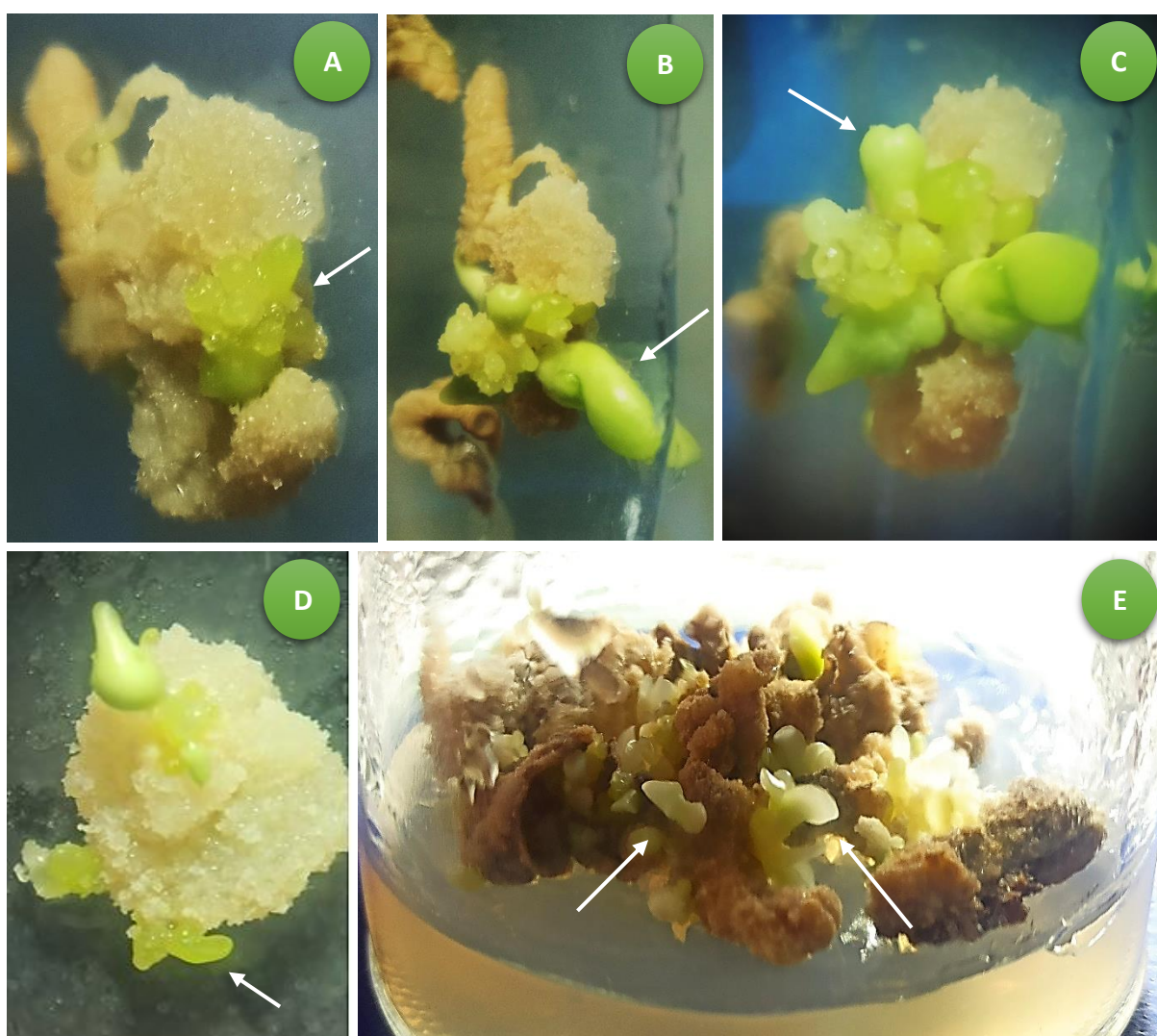
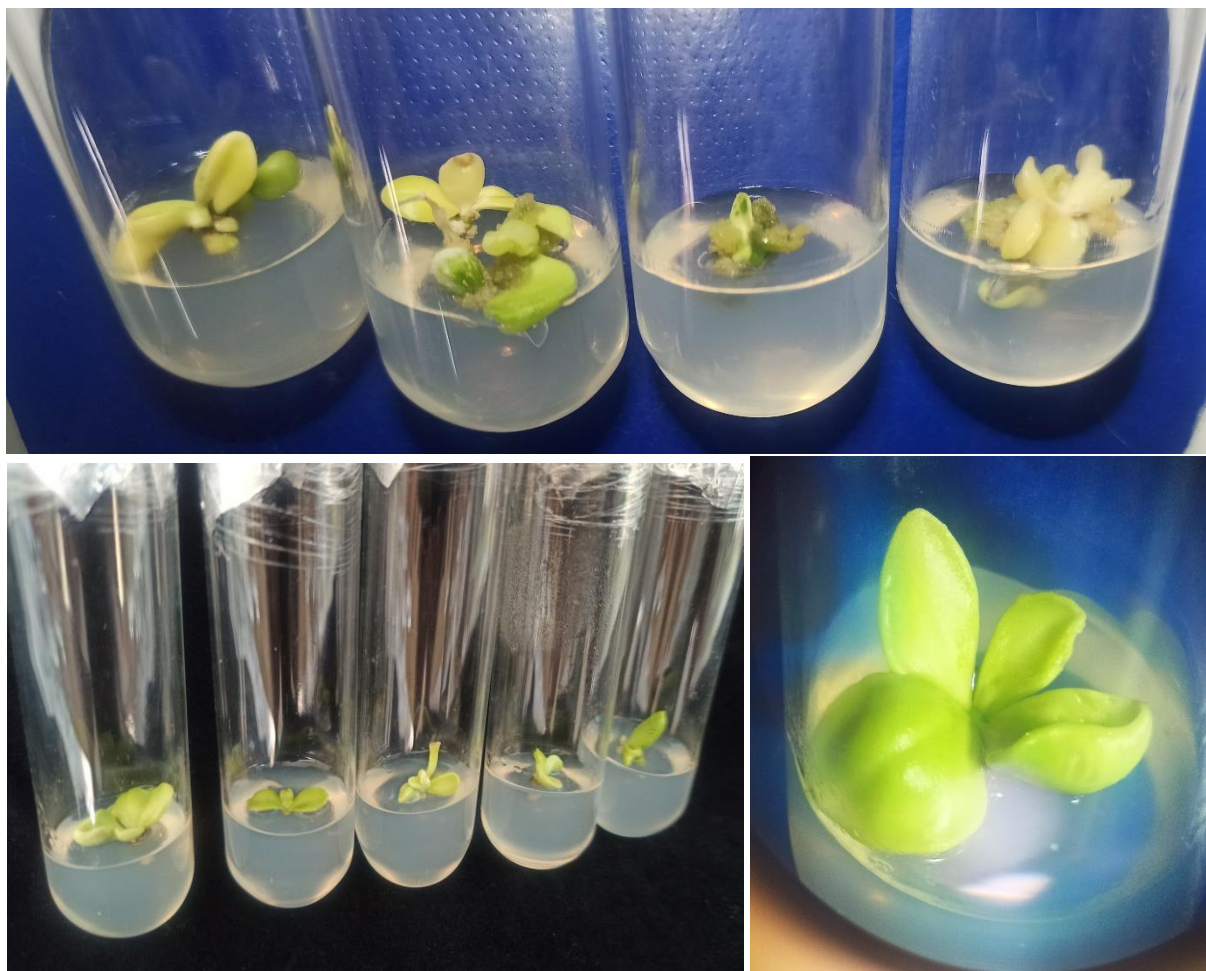


Figura 22.

Embriones somáticos de S. saponaria aislados y subcultivados.

**Tabla 6.**

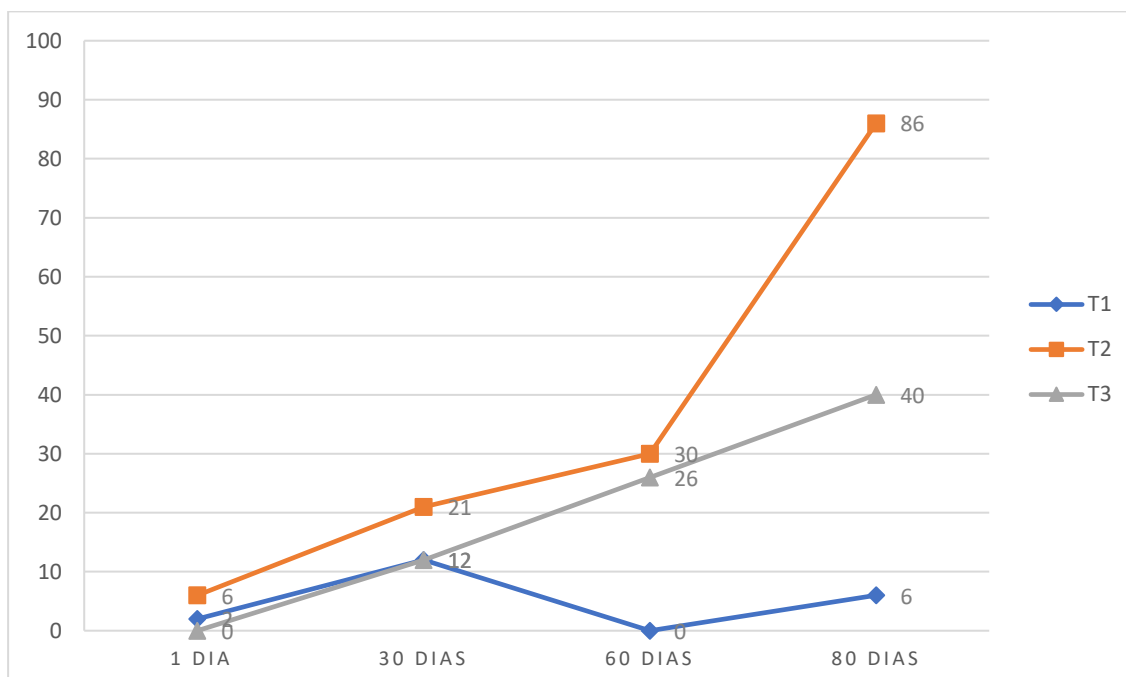
Frecuencia de embriones somáticos de S. saponaria formados por estadio de desarrollo.

Tratamiento	Días	En formación	Globular	Torpedo	Acorazonado	Cotiledonar
T1	60	2	-	-	-	-
	90	-	8	2	1	1
	110	-	-	-	-	-
	140	-	2	2	-	2
T2	60	6	-	-	-	-
	90	-	12	4	-	5
	110	-	19	-	1	10
	140	-	27	12	1	46
T3	60	-	-	-	-	-
	90	-	10	1	-	1
	110	-	25	-	-	1
	140	-	15	3	-	22

Nota: Periodo de evaluación 80 días.

Figura 23.

Número de embriones somáticos de S. saponaria formados por tratamiento.

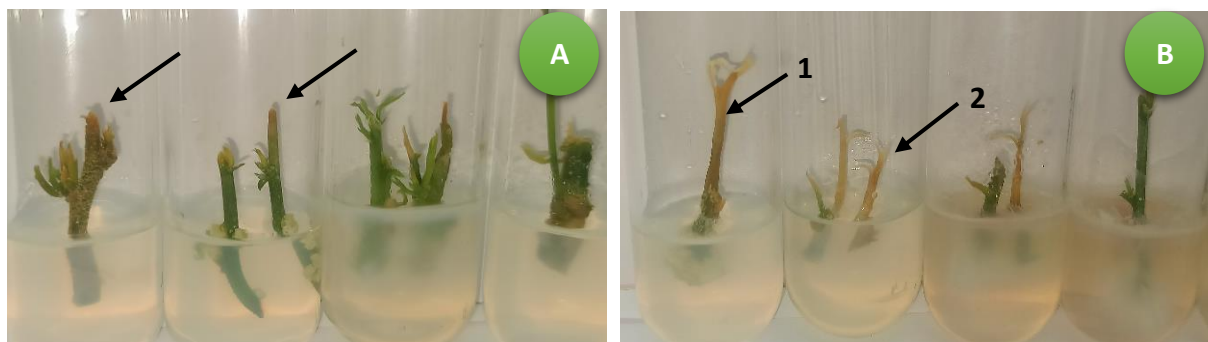


4.7. Necrosis apical y tasa de supervivencia.

Durante el periodo de evaluación de 5 meses se promedió la necrosis apical, la tasa de supervivencia de los segmentos nodales y ápices caulinares presentando el tratamiento T4 (T4 = ANA 0,2 - AG₃ 0,02 mg/L) necrosis apical parcial (+) con el promedio más alto (27,7%) y el más bajo (14,2%) en el tratamiento T3 (T3 = AIA 0,2 - AG₃ 0,02 mg/L) (**Figuras 28 y 27**). El mayor promedio de necrosis apical avanzada (++) se observó en el tratamiento T3 (19%) y el promedio más bajo (0%) en los tratamientos T2 (T2 = ANA 0,02 - AG₃ 0,02 mg/L) y T4 (**Figuras 27; 26 y 28**). La muerte del explante (+++) por necrosis apical alcanzó el promedio más alto (28,5%) en el tratamiento T3 y el promedio más bajo (0%) en el tratamiento T1 (T1 = AIA 0,02 - AG₃ 0,02 mg/L) (**Figuras 27 y 25**). En tanto, el mayor promedio de supervivencia (92%) se alcanzó en el tratamiento T1 y el promedio más bajo (50%) en el tratamiento T4 (**Figura 29**).

Figura 24.

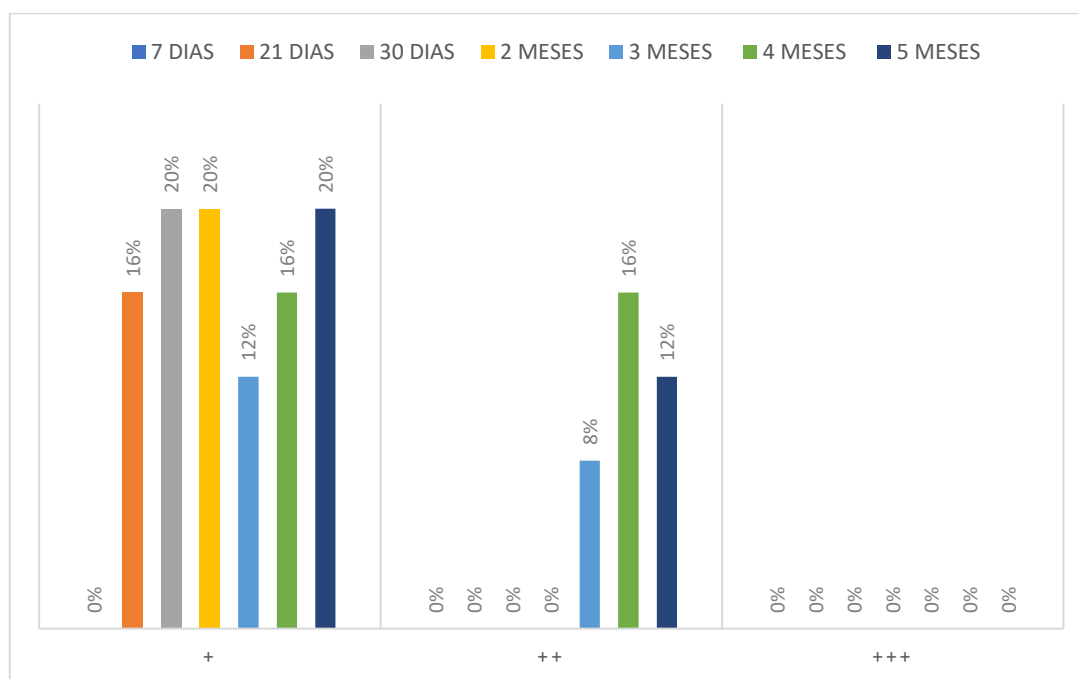
Necrosis apical en explantes de S. saponaria. A. Necrosis parcial. B. 1. Necrosis apical avanzada. 2. Muerte del explante.



Necrosis parcial (+), necrosis apical avanzada (++) y muerte del explante (+++).

Figura 25.

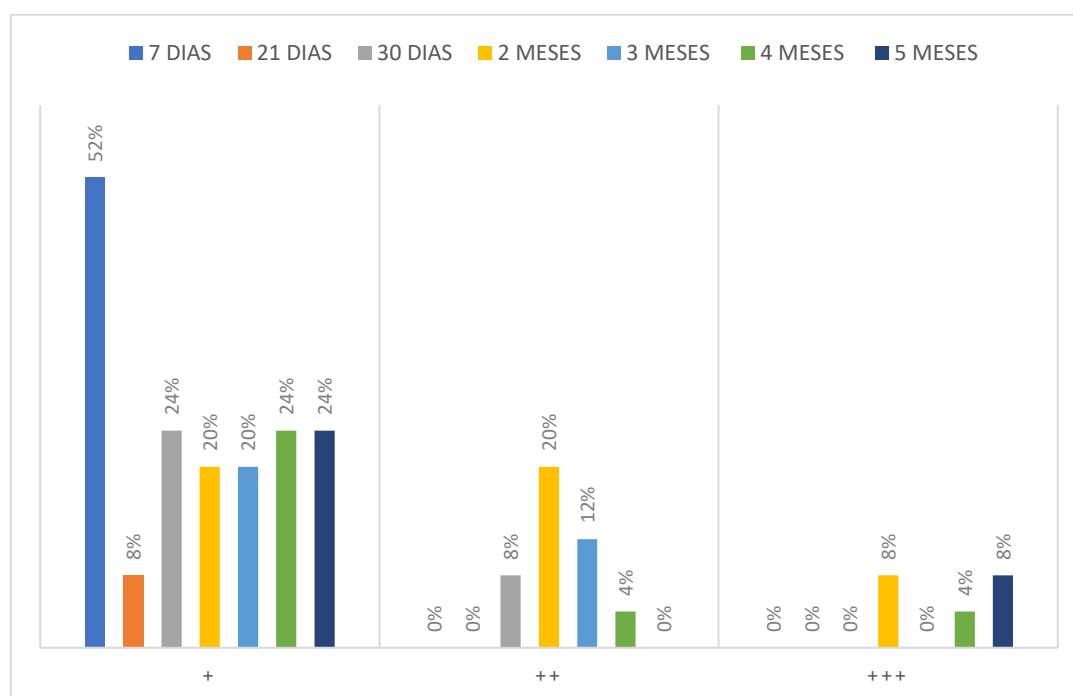
Porcentaje de necrosis apical de segmentos nodales y ápices caulinares de S. saponaria en el tratamiento T1 (T1 = AIA 0,02 - AG₃ 0,02 mg/L).



Necrosis parcial (+), necrosis apical avanzada (++) y muerte del explante (+++).

Figura 26.

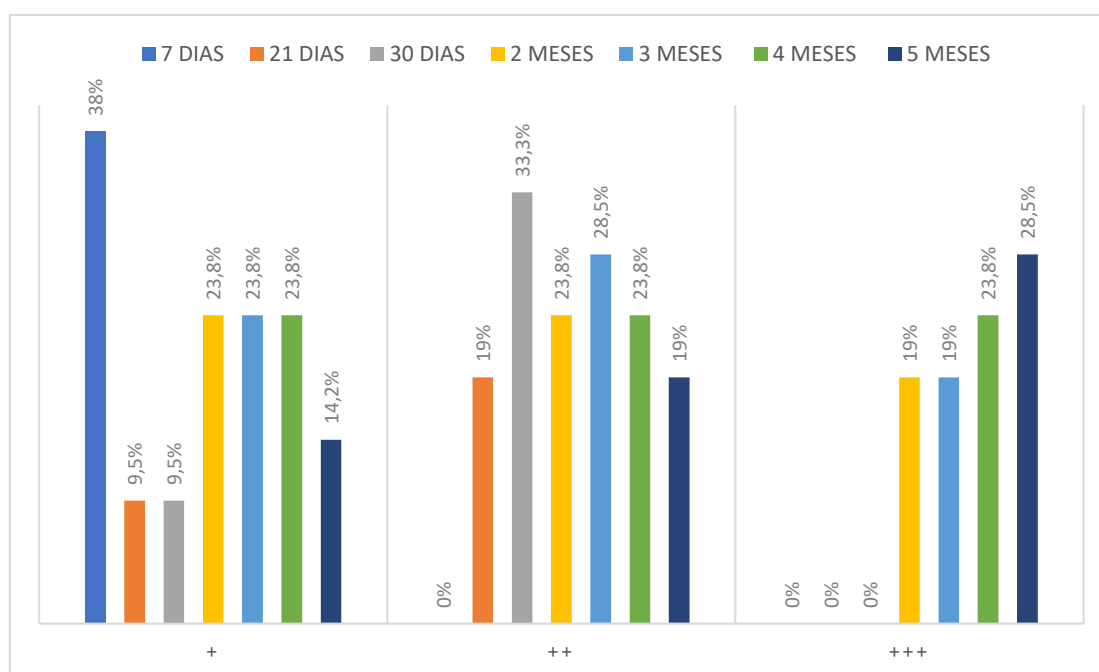
Porcentaje de necrosis apical de segmentos nodales y ápices caulinares de *S. saponaria* en el tratamiento T2 (T2 = ANA 0,02 - AG₃ 0,02 mg/L).



Necrosis parcial (+), necrosis apical avanzada (++) y muerte del explante (+++).

Figura 27.

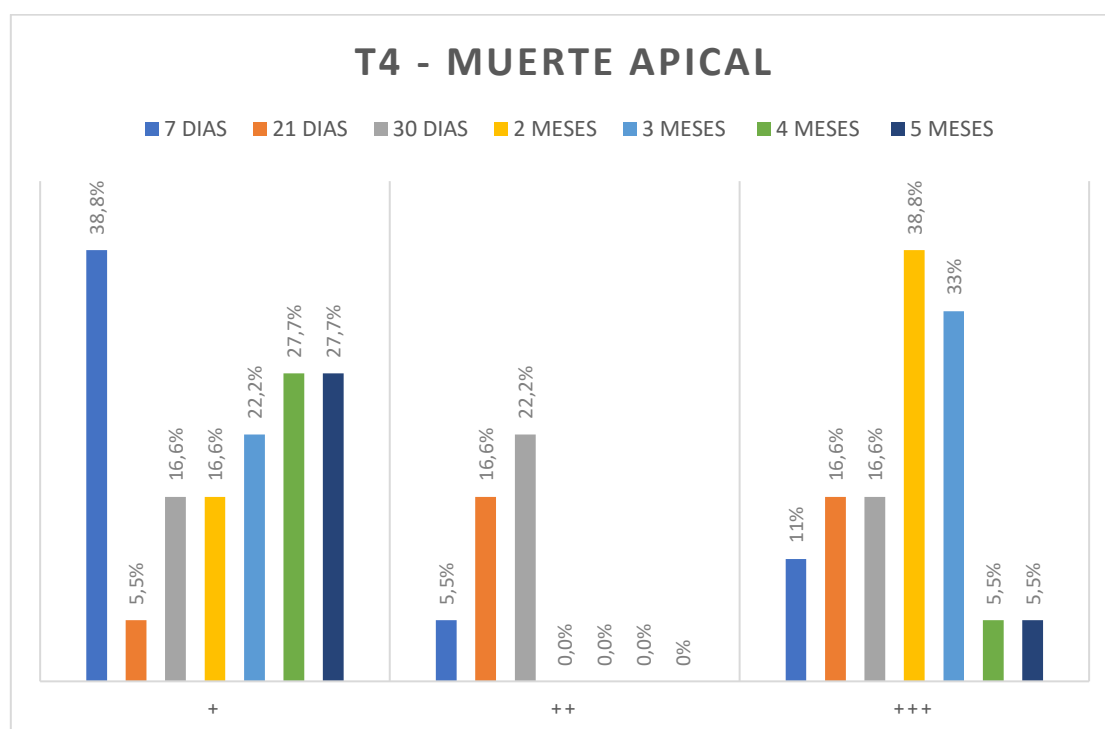
Porcentaje de necrosis apical de segmentos nodales y ápices caulinares de *S. saponaria* en el tratamiento T3 (T3 = AIA 0,2 - AG₃ 0,02 mg/L).



Necrosis parcial (+), necrosis apical avanzada (++) y muerte del explante (+++).

Figura 28.

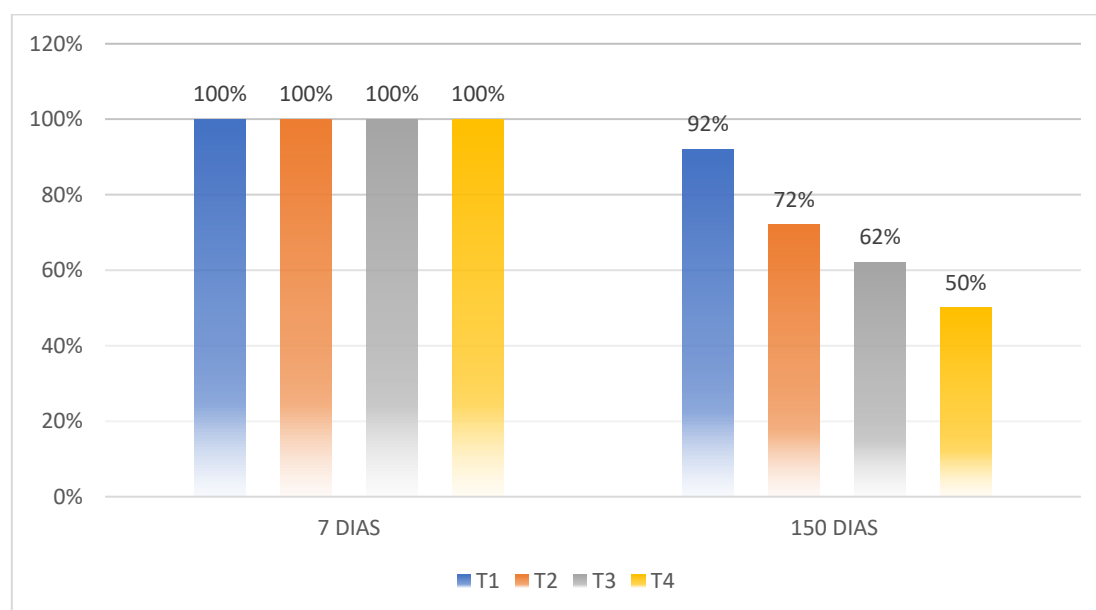
Porcentaje de necrosis apical de segmentos nodales y ápices caulinares de *S. saponaria* en el tratamiento T4 (T4 = ANA 0,2 - AG₃ 0,02 mg/L).



Necrosis parcial (+), necrosis apical avanzada (++) y muerte del explante (+++).

Figura 29.

Tasa de supervivencia de los segmentos nodales y ápices caulinares de *S. saponaria*, después de 150 días de evaluación en los tratamientos (T1 hasta T4).



4.8. Conservación *in vitro* de germoplasma

Después de 15 meses de evaluación, en medio de cultivo MS suplementado con sacarosa 2,0% y los reguladores de crecimiento AIA 0,02 mg/L y AG₃ 0,02 mg/L, se observó plántulas con un promedio de 5,9 cm de altura y la formación de 3,6 brotes, 8,4 hojas y 10,6 nudos, así como un moderado sistema radicular (**Figura 30 y Tabla 7**).

Figura 30.

Conservación in vitro de germoplasma, utilizando ápices caulinares y segmentos nodales de S. saponaria, después de 15 meses de evaluación.



Tabla 7.

Promedio de elongación y número brotes, nudos y hojas formadas, en la conservación in vitro de germoplasma de S. saponaria, después de 15 meses de evaluación.

Plántulas evaluadas (Nº)	Elongación (cm)	Brotes (Nº)	Nudos (Nº)	Hojas (Nº)
1	7,3	2	12	9
2	4,8	6	8,7	7,2
3	5,1	3	13,7	13,3
4	4,8	3	10,7	9
5	7,7	3	12,7	8,3
6	5,8	4	7,8	6
7	7,3	2	12	9
8	4,8	6	8,7	7,2
9	5,8	4	7,8	6
10	5,9	3	12,4	9,9
Total	5,9	3,6	10,7	8,5

V. DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinó el porcentaje de germinación de semillas de *Sapindus saponaria* agrupadas por año de recolección (2018 a 2022), separándose en dos grupos. En el caso de las semillas colectadas en el año 2018, el primer grupo de semillas no escarificadas alcanzó 0% de germinación, en tanto que el segundo grupo, que correspondió a semillas escarificadas, alcanzaron 45% de germinación. En los años subsiguientes (2019 a 2022) la tasa de germinación fue menor, tanto en semillas no escarificadas como escarificadas, aunque en este último grupo fue alrededor de 25%. En el estudio sobre germinación de semillas de *S. saponaria* colectadas en el Valle del Cauca, Colombia y aun cuando no fue reportado el año de colecta y evaluación, sobrentendiéndose que fueron evaluadas en el mismo año de la colecta, a los 21 días de evaluación, las semillas enteras (no escarificadas) solamente alcanzaron 4% de germinación, en tanto que las semillas escarificadas con segueta (sierra metálica) y taladro manual, alcanzaron en ambos casos 95% de germinación (Bonilla *et al.*, 2007).

Por otro lado, en un estudio en condiciones de invernadero con semillas de *S. saponaria* colectadas en el mismo año y en cinco diferentes localidades, sin precisar la escarificación durante un minuto y luego la escarificación química en solución de ácido sulfúrico 50% durante una hora, los porcentajes de germinación variaron desde 21,56% hasta 74,69%, con un promedio de 52,94%, dependiendo del lugar de procedencia de la colecta, sin presentar una hipótesis que explicara los resultados obtenidos (Sánchez y Silva, 2008). Estos mismos autores, en su estudio morfo-anatómico, determinaron que la estructura de protección de la semilla presenta varias capas de tejidos gruesos y duros donde la capa más externa es lignificada y de color negro. Estos resultados, al compararlos con los resultados obtenidos en el presente estudio, indicarían que las semillas de *S. saponaria* presenta tanto “dormancia impuesta”, es decir, impuesta por la dureza de los tegumentos, como “dormancia innata” (Barceló *et al.*, 2000), donde condiciones adversas dentro de la semilla estarían inhibiendo la germinación. Adicionalmente, el método de escarificación utilizado (lija metálica) quizás no hubiese sido el método más indicado de escarificación. Es posible asumir que *S. saponaria* presentaría una condición de semilla intermedia, entre ortodoxa y recalcitrante, categoría propuesta por Barbedo *et al.*, (2013) y que ha sido recibida con entusiasmo por investigadores en biología de semillas.

De los cinco grupos de semillas evaluados todos presentaron tasas de contaminación debajo de 15%, excepto el grupo de semillas del año 2018 con 0% de contaminación; sin embargo, es frecuente la contaminación microbiana asociada al cultivo de semillas. Klaedtke

et al., (2016), estudiando diferentes ensamblajes microbianos asociados a semillas de cinco cultivares de frijol cosechados en dos fincas diferentes, reportaron que las semillas en general han evolucionado desarrollando una amplia gama de ensamblajes microbianos (bacterias y hongos) que pueden influir en el crecimiento y óptimo desarrollo de las plantas, precisando que este ensamblaje microbiano de las semillas estaría asociado a procesos basados en nichos ecológicos y las características del suelo, impulsores claves de estas fuerzas selectivas. Asimismo, en *Opuntia streptacantha* Lem. se determinó que las semillas presentan latencia fisiológica necesitando un periodo de maduración posterior para romper este tipo de latencia. Al comparar la germinación de semillas asépticas de nueve años de colectadas con semillas frescas, sin observar germinación, versus semillas de las mismas épocas de colectas, pero sin esterilizar, se observó 27% y 67% de germinación, respectivamente, observando también la presencia de los hongos *Penicillium chrysogenum* y *Phoma* sp. creciendo en los tegumentos de todas las semillas germinadas. La inoculación de tales microorganismos posibilitó alcanzar tasas de germinación más alta en las semillas inoculadas que en los controles y siempre más alta en las semillas de mayor edad, lo que indicaba que los hongos estaban fuertemente involucrados en la ruptura de la latencia de las semillas y así como en la especificidad hongo-especie vegetal (Delgado-Sánchez *et al.*, 2011). Si bien es cierto, es importante considerar en la germinación de las semillas la presencia de microorganismos (endófitos), tanto endógenos como exógenos, el buen cuidado y almacenamiento de las semillas tiene como finalidad mantener su viabilidad conservándolas en las mejores condiciones fisiológicas y fitosanitarias, controlando factores físicos como la temperatura y la humedad o factores bióticos como insectos, bacterias y hongos ambientales (Doria, 2010), reduciendo las tasas de contaminación *in vitro*, lo que de alguna manera concuerda con la investigación presentada, en especial con la germinación de semilla de *S. saponaria* colectada en el 2018.

Con respecto a la propagación clonal y conservación *in vitro* de germoplasma de *S. saponaria* en el presente estudio se utilizó ápices caulinares y segmentos nodales en medio de cultivo MS suplementado con las auxinas ANA y AIA y la giberelina AG₃, obteniéndose como mejores resultados en promedio 6.9 cm de elongación del explante, 2,4 brotes, 7,8 nudos y 8,9 hojas formadas, en tanto que en el proceso de enraizamiento 27.7%, como promedio más alto. En un estudio pionero sobre micropropagación realizado en *Sapindus mukorossi* Gaertn se indujo brotamiento y brotamiento múltiple en yemas apicales y yemas axilares, obtenidas de plántulas de semillas de un mes de edad, en medio de cultivo MS suplementado con BAP 0,4 µM y 0,8 µM y con BAP 0,4 µM y AG₃ 2,8 µM, en tanto que el enraizamiento fue mejor con

AIB 3,4 μ M o 2,4 μ M (Philomina y Rao, 2000). Sánchez y Silva (2008) reportaron dificultades en la propagación vegetativa mediante estacas de *S. saponaria* en condiciones de invernadero utilizando diferentes concentraciones de AIB, obteniendo 35% de inducción de brotes y 0% de enraizamiento en todos los tratamientos ensayados, lo que sin duda es un buen resultado si la intención es la clonación puesto que los brotes inducidos, jóvenes y con baja tasa de contaminación, pueden ser utilizados en la micropropagación o propagación clonal *in vitro*. Delgado-Paredes *et al.*, (2023) reportaron resultados similares, a los obtenidos en el presente estudio, en la micropropagación en *Cedrela odorata* L., especie del orden Sapindales, una importante especie forestal de la zona intertropical americana, utilizando ápices caulinares y obteniendo plántulas con altura 5,4 cm de altura, 12 nudos y 83% de enraizamiento, en medio cultivo MS suplementado con AIA 0,02 mg/L y AG₃ 0,02 mg/L. Asimismo, en *Litchi sinensis* Sonn. Var. Gola, una especie de Sapindaceae de amplia distribución en la India y Pakistán, una alta frecuencia (51%) de inducción de brotes fue alcanzada en medio de cultivo MS conteniendo AG₃ y BAP (2,0 mg/L) y KIN 2,0 mg/L, así como enraizamiento con AIB 2,0 mg/L (Din *et al.*, 2020). En otras especies que habitan el ambiente ecológico de *S. saponaria*, Indacochea *et al.*, (2018) realizaron un estudio de las especies forestales nativas amenazadas del bosque seco del Ecuador y Perú, con la finalidad de obtener un medio cultivo de micropropagación y conservación para *Myroxylon balsamum* (L.) Harms (bálsamo), *Handroanthus crysanthus* (Jacq.) S.O.Grose (*Tabebuia crhysantha*) (guayacán) y *Tabebuia billbergii* (Bureau & K. Schum.) Standl. (madero negro), utilizando segmentos nodales, obtenidos de estacas brotadas en condiciones de invernadero, en medio de cultivo MS suplementado con BAP 2.0 mg/L y ANA 1.0 mg/L, obteniéndose 80%, 82% y 87% de explantes con brotes con un promedio de 0,16 cm, 0,18 cm y 0,17 cm de longitud, es decir, menos de 2,0 cm; sin embargo, en todos los tratamientos no se observó la formación de raíces, posiblemente porque el balance y las concentraciones de citocinina-auxina utilizados no fueron los más adecuados. A diferencia de estos resultados, los mostrados en el trabajo que se presenta sí se alcanzó un mayor crecimiento y desarrollo de los explantes, tanto en el brotamiento como en el enraizamiento.

Una de las mayores dificultades observadas en la investigación que se presenta fue la necrosis apical, que apareció desde los primeros días del cultivo en todos los tratamientos de micropropagación ensayados, entre los que contamos el tratamiento suplementado con AIA 0,02 y AG₃ 0,02 mg/L, donde la necrosis apical se inició con una frecuencia de 12% y fue aumentando de acuerdo al incremento de las concentraciones de auxinas ensayadas, alcanzando el mayor promedio de muerte del explante (28,5%) en el tratamiento suplementado con AIA

0,2 mg/L y AG₃ 0,02 mg/L. Vergara (2018), reportó resultados similares en la micropropagación de *Cedrela lilloi* C.DC., especie del orden Sapindales, a partir de embriones zigóticos, observándose que el grado de necrosis era mayor conforme se incrementaban las concentraciones de las citoquininas BAP 2,0 mg/L y ZEA, 2,0 mg/L, ensayadas de manera individual, observándose 54.8% y 60.6%, respectivamente, de necrosamiento. En el cultivo *in vitro* de pistacho, *Pistacia vera* L., la utilización del medio de cultivo DKW (Driver y Kuniyuki, 1984), posiblemente porque el calcio se suplementa en una concentración hasta tres veces superior que otros medios de cultivo como MS y WPM (Lloyd y McCown, 1980), redujo significativamente la inducción de necrosis apical, así como otras estrategias utilizadas como el enfriamiento basal, menor número de brotes por frasco, frascos ventilados y de mayor volumen (García *et al.*, 2011).

Asimismo, en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos se observó hasta 35% de muerte de los explantes por necrosis, porcentaje ligeramente superior a la obtenida en el estudio que se presenta (Díaz *et al.*, 2021), donde como han coincidido varios autores, la oxidación de tejidos *in vitro*, puede atribuirse a la oxidación por radicales libres, de diferentes componentes celulares, como a la oxidación de compuestos fenólicos catalizada por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas (Azofeifa *et al.*, 2009). Por otro lado, varios autores han reportado que la necrosis apical, oxidación, ennegrecimiento y muerte de los tejidos, es un fenómeno frecuente en el cultivo *in vitro* de especies leñosas y su ocurrencia, como consecuencia de la alta producción de polifenoles, en la ruta del ácido shikímico, puede deberse a varios factores (García *et al.*, 2011; Teixeira da Silva *et al.*, 2020; Díaz *et al.*, 2021). Un estudio reciente realizado por Teixeira da Silva *et al.* (2020) ha indicado que la necrosis apical es un fenómeno tan complejo que su ocurrencia puede deberse a varios factores como la deficiencia de los siguientes nutrientes: Calcio (Ca²⁺), boro, la forma y cantidad de nitrógeno, la interacción de otros iones; el efecto de los reguladores de crecimiento y otros factores e interacciones como el momento de las evaluaciones y la duración de los subcultivos, respuestas específicas del genotipo, elección del medio de cultivo basal, antioxidantes, humedad, aireación e hiperhidricidad, entre otros factores menores. En el estudio que se presenta como la tasa de necrosis apical y oxidación en general fue relativamente baja no se consideró necesario ampliar la investigación explorando nuevas alternativas más que el subcultivo.

En esta fase de inducción del callo embriogénico y la formación de embriones somáticos, en el presente estudio, se utilizaron plántulas de 20 días de germinación *in vitro*,

alcanzándose el mayor porcentaje de formación de callos en hojas (74%) y en tallos (89%), en medio de cultivo suplementado con BAP 3,0 mg/L, así como el mayor número de embriones somáticos germinados en medio de cultivo suplementado con BAP 2,0 mg/L. En *Koelreuteria paniculata* Laxm., una Sapindaceae arbórea ornamental originaria del sur de China, la máxima frecuencia de inducción de callos (80,25%), a partir de tallos obtenidos de plántulas germinadas *in vitro*, fue alcanzada en medio de cultivo DKW suplementado con BA 0,5 mg/L, ANA 0,25 mg/L y 1,5 mg/L 2,4-D, destacándose ANA 0,1 mg/L donde se registró la máxima frecuencia (54,75%) en el crecimiento de embriones somáticos (Yang *et al.*, 2018). Singh *et al.* (2019) reportaron resultados similares en *Sapindus mukorossi* Gaertn, alcanzando 100% de formación de callos en hojas en medio de cultivo suplementado con BAP (4,44 a 13,32 μ M) con la mayor producción de embriones somáticos (47,10) con BAP 8.88 μ M; asimismo, la más alta tasa de germinación de embriones somáticos (77.79%) fue observada en medio de cultivo con sacarosa 4,0% y BAP 4,44 μ M. Por su parte, Fernández Da Silva y Montilla (2022) establecieron suspensiones celulares, a partir de callos de hojas y cotiledones de *Azadirachta indica* A. Juss. (Sapindales), diferenciando embriones somáticos en medio de cultivo con BAP 2,0 mg/L, 2,4-D 1,0 mg/L, nitrato (60 mM), acetato de sodio y escualeno 10 mg/L, respectivamente, después de 5 meses de cultivo, con la mayor producción de azadiractina (52,53 mg/L). En todos estos estudios se alcanzaron frecuencias de inducción de callos embriogénicos similares a los reportados en el presente trabajo donde el suplemento de las citocininas BA o BAP resultaron fundamentales.

S. saponaria es una especie nativa del BTES y el presente estudio determinó un medio de cultivo, tanto de micropropagación como de conservación de germoplasma, suplementado AIA 0,02 mg/L y AG₃ 0,02 mg/L, obteniéndose, en la etapa de micropropagación, como promedio más alto 6,9 cm en 5 meses de cultivo y una tasa de supervivencia de 92%, en tanto que en la etapa de conservación la elongación promedio fue 5,9 cm, después de 15 meses de evaluación. Existen muy pocos estudios sobre la conservación *in vitro* de germoplasma de especies de Sapindaceae. Uno de estos estudios es en la conservación *in vitro* de 13 genotipos de “Litchi” *Litchi chinensis* Sonn. utilizando callos embriogénicos obtenidos de embriones inmaduros, observándose crecimiento lento de los explantes hasta por 100 días en medio de cultivo suplementado con manitol 20 g/L en temperatura de 15 °C (Wang y Wang, 2010). Asimismo, en un amplio estudio sobre estrategias *in vitro* utilizadas para la conservación de plantas medicinales trepadoras de la India (Deepa y Thomas, 2020), se incluyó a la Sapindaceae *Cardiospermum halicacabum* L., observándose organogénesis directa e indirecta, en varios

tipos de explantes, con fines de micropropagación y conservación de germoplasma (Thomas y Maseena, 2006; Jahan *et al.*, 2014). *Acer japonicum* Thunb., una especie rara ornamental amenazada de Sapindaceae, fue incluida entre un amplio número de especies de la Federación Rusa, como prioritaria en actividades de micropropagación y conservación de germoplasma (Barkalov y Eremenko, 2003; Chokheli *et al.*, 2020). *Dimocarpus longan* Lour. es otra especie de Sapindaceae frutícola, también amenazada, donde no solamente se indujo callos y organogénesis indirecta sino también micropropagación y conservación de germoplasma mostrando las plántulas fidelidad genética usando la técnica AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*/polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados) (Ahmed, 2022). En general, tal como se ha enfatizado en el presente estudio, todas estas estrategias de conservación *in vitro* tienen como finalidad contribuir a atenuar la vulnerabilidad que sufren los bosques secos tropicales por las actividades agroindustriales, la ganadería y la tala indiscriminada, que sumado al cambio climático está determinando que en la actualidad menos de la cuarta parte original de su extensión, representando el 42% de la superficie de los bosques tropicales, el 2% está intacto y 8% está como zonas protegidas, lo cual los convierte en uno de los biomas más degradados del mundo (Bonilla, 2015; Fuentes *et al.*, 2022; Linares-Palomino *et al.*, 2022).

VI. CONCLUSIONES

1. El mejor mecanismo para la germinación de semillas *in vitro* de *S. saponaria* fue la escarificación, donde respondieron todos los grupos de semillas evaluados, desde los años 2018 al 2022, obteniéndose 45% como la mayor tasa de germinación.
2. El protocolo de desinfestación y almacenamiento de semillas resultó óptimo al alcanzarse bajas tasas de contaminación.
3. El protocolo de propagación clonal *in vitro* de *S. saponaria* fue establecido a partir de ápice caulinares y segmentos nodales, alcanzándose los mejores resultados en el tratamiento T2 (ANA 0,02 + AG₃ 0,02 mg/L), donde se desarrolló el mayor número de brotes, así como la formación de raíces en todos los tratamientos ensayados.
4. El proceso morfogénico que conllevó a la embriogénesis somática indirecta de *S. saponaria* se alcanzó en entrenudos y la región media y basal de hojas de plántulas *in vitro*, obteniéndose los mejores resultados en el tratamiento T3 (BAP 3,0 mg/L), dando se indujo el mayor porcentaje de callos en entrenudos y hojas, en tanto que

en el tratamiento T2 (BAP 2,0 mg/L) se alcanzó el mayor número de embriones somáticos diferenciados.

5. El mejor tratamiento de conservación *in vitro* de germoplasma de *S. saponaria*, después de 15 meses de evaluación, fue el tratamiento T1 (AIA 0,02 - AG₃ 0,02 mg/L), donde se obtuvo un promedio de elongación de 5,9 cm y 10,7 nudos formados.

VII. RECOMENDACIONES

1. Desarrollar nuevos métodos de escarificación para incrementar la tasa de germinación *in vitro*.
2. Complementar los estudios que conlleven a un óptimo desarrollo, germinación, maduración y aclimatización de los embriones somáticos.
3. Realizar ensayos de análisis molecular para determinar la ocurrencia o no de variación somaclonal en los embriones somáticos formados.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, Z. (2012). Especies forestales de los bosques secos del Ecuador. Guía dendrológica para su identificación y caracterización. Finlandia. Quito, Ecuador.: Proyecto manejo forestal sostenible ante el cambio climático, MAE/FAO. Recuperado el 10 de 2022, de: <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/10/Bosques-Secos4.pdf>
- Aguirre, Z., Kvist, L., Sanchez, O., Moraes, R., Øllgaard, B., Borchsenius, F., y Balslev, H. (2006). Bosques secos en Ecuador y su diversidad. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. https://www.researchgate.net/publication/228362343_Bosques_secos_en_Ecuador_y_su_diversidad
- Ahmed, M.E.A.E. (2022). *In vitro* propagation for conservation and genetic fidelity of the near threatened *Dimocarpus longan* plant. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 20(1): 130. Doi: <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00406-4>
- Alarcón, K. L. (2016). Extracción de saponinas del fruto de la *Sapindus saponaria* (choloque), y sus aplicaciones. *Ingeniería: Ciencia, Tecnología e Innovación*, 3(1): 37 – 41. <https://revistas.uss.edu.pe/index.php/ING/article/view/356>
- Albiero, A., Bacchi, E., y Mourão, K. (2008). Caracterização anatômica das folhas, frutos e sementes de *Sapindus saponaria* L. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 23: 549 – 560. <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/2733/2049>
- Angulo, K. (2017). Aprovechamiento como tensioactivo de las saponinas del pericarpio de los frutos *Sapindus saponaria* L. para formular jabones más amigables con la piel. *Universidad de Iberoamérica (UNIBE)*. <https://unibe.ac.cr/revistafarmacia/wp-content/uploads/2018/03/TESIS-1144-KEINER-RASHID-ANGULO-GRIJALBA.pdf>
- Asthana, P., Jaiswal, V. S., y Jaiswal, U. (2011). Micropropagation of *Sapindus trifoliatus* L. and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD analysis. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(5): 1821-1829. Doi: [10.1007/s11738-011-0721-0](https://doi.org/10.1007/s11738-011-0721-0)
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 153-175. Fecha de consulta 26 de agosto de 2023. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43711514016>.
- Barbedo, C. J., Da Cruz Centeno, D., y De Cássia Leone, R. (2013). Do recalcitrant seeds really exist?. *Hoehnea* 40(4): 583-593, 3 fig. <https://doi.org/10.1590/S2236-89062013000400001>
- Barceló, J., Rodrigo, G.N., Sabater, B., y Sánchez, R. (2000). Fisiología Vegetal. Ed. Pirámide. Madrid, España. 568 p. I.S.B.N.: 978-84-368-1525-2
- Barkalov, V., y Eremenko, N.A. (2003). Flora of the Kurilsky nature reserve and the small kurils nature reserve (Sakhalin Region); Dalnauka: Vladivostok, Russia. 285 p. (In Russian).

- Barrett, C., Roche, T., Dean, C., Williams, G., y Doyle, O. (1999). Impact and awareness of biotechnology in academic and commercial sectors. *Horticulture and Landscape*: 9-19.
- Bonilla C., Carmen R., Arce, Kadaffi L, Sánchez O, Manuel S, y Escobar, Roosvelt. (2007). Morfoanatomía y respuesta fisiológica de las semillas de chambimbe a condiciones de criopreservación. *Acta Agronómica*, 56 (3), 135-140. Recuperado el 09 de abril de 2023, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122007000300005
- Bonilla Morales, M. M. (2015). Conservación *in vitro*: una perspectiva para el manejo de los recursos fitogenéticos. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 6(1), 67-82. DOI: <https://doi.org/10.22490/21456453.1264>
- Brack, A. (1986). Las ecorregiones del Perú . *Boletín de Lima*, 8 (44): 57-70.
- Cabasson , C., Alvard , D., Dambier , D., Ollitrault , P., y Teisson, C. (1997). Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 50: 33-37. <https://doi.org/10.1023/A:1005896725780>
- Chokheli, V.A., Dmitriev, P.A., Rajput, V.D., Bakulin, S.D., Azarov, A.S., Varduni, T.V., Stepanenko, V.V., Tarigholizadeh, S., Singh, R.K., Verma, K.K. y Minkina, T.M. (2020). Recent development in micropropagation techniques for rare plant species. *Plants (Basel)*. 9(12): 1733. Doi: [10.3390/plants9121733](https://doi.org/10.3390/plants9121733).
- Cogollo A, K. A., Barraza P, V. F., y Gary, C. M. (2008). Bondades del fruto del jaboncillo (*Sapindus saponaria*) como un detergente biodegradable. Recuperado el 09 de 2022, de *Ciencia y Biología*: <https://cienciaybiologia.com/wp-content/uploads/2014/03/bondades-fruto-jaboncillo.pdf>
- Cole, T., Ferrucci, M., y Gonzalez, A. (10 de Octubre de 2021). *Filogenia de las Sapindaceae*. <https://www.researchgate.net/publication/325989031>
- Consulting Climate. (2022). Recuperado el 31-08-2022, de <https://climate.selectra.com/es/ques/deforestacion>
- Correa, , E., Quiñones , W., Robledo, S., Carrillo, L., Archbold, R., Torres, F., Escobar, G., Herrera, N., y Echeverri, F. (2014). Leishmanicidal and trypanocidal activity of *Sapindus saponaria*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 13 (4): 311 - 323. <https://www.redalyc.org/pdf/856/85631435001.pdf>
- Damke, E., Tsuzuki, J., Chossot, F., Cortez, D., Ferreira, I., Mesquita, C., Da-Silva, V., Svidzinski, T., y Consolaro, M. (2013). Spermicidal and anti-Trichomonas vaginalis activity of Brazilian *Sapindus saponaria*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13, 196. Doi: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-196>
- Deepa, A.V., y Thomas, T.D. (2020). *In vitro* strategies for the conservation of Indian medicinal climbers. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 56, 784-802. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10084-x>

- DeFilipps, R., Maina, S., y Crepin, J. (2004). Medicinal Plants of the Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana). 254, 256 - 490. <https://naturalhistory.si.edu/sites/default/files/media/file/medicinalplantsmaster1.pdf>
- Delgado, G., y Rojas, C. (2001). *Cultivo de Tejidos Vegetales I: Fundamentos y Aplicaciones*. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú. 5-11
- Delgado-Paredes, G. E., Vásquez-Díaz, C., Esquerre-Ibañez, B., Zuñe-da Silva, F., Bazán-Sernaqué, P., y Rojas-Idrogo, C. (2023). Germinación de semillas, micropropagación y conservación de germoplasma *in vitro* de *Cedrela odorata* (Meliaceae) en el norte del Perú. *BOSQUE*, 44(1), 97–109. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002023000100097>
- Delgado-Sánchez, P., Ortega-Amaro, M. A., Jiménez-Bremont, J. F., y Flores, J. (2011). Are fungi important for breaking seed dormancy in desert species? Experimental evidence in *Opuntia streptacantha* (Cactaceae). *Plant Biology*, 13(1), 154–159. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00333.x>
- Delgado, T., y Suárez, D. (2009). Efectos del cambio climático en la diversidad vegetal del corredor de conservación comunitaria reserva ecológica el ángel- bosque protector golondrinas en el norte del ecuador. *Ecología Aplicada*. 8(1-2): 27-36. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162009000100004&lng=es&tlng=es.
- Díaz Lezcano, M., Rodas Ramírez, J., González Segnana, L., y Vera de Ortiz, M. (2021). Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Handroanthus heptaphyllus* de flores blancas. *Biotecnología Vegetal*, 20(3), 203-210. Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/672>
- Din, S.u., Shafqat, W., Qureshi, M.A., Saleem, A.R., Sharif, N., Raza, M.K., Ikram, S. y Iqbal, M. (2020). *In vitro* regeneration of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) through shoot bud culture. *J. Glob. Innov. Agric. Soc. Sci.*, 8 (3): 141-146. Doi: <https://doi.org/10.22194/JGIASS/8-913>
- Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 00. Recuperado en 09 de abril de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000100011
- Driver, J.A., y Kuniyuki, A.H. (1984). *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, 19: 507-509. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.19.4.507>
- FAO. (2016). The agriculture sectors in the intended nationally determined contributions: analysis. Recuperado el 10 de 2022, de: <https://www.fao.org/3/i5687e/i5687e.pdf>
- FAO. (2020). Recuperado el 10 de 2022, de: <https://www.fao.org/forest-resources-assessment/2020/es>
- Fernández-Da Silva, R. y Montilla, V. (2022). Establecimiento del sistema de embriogénesis somática en *Azadirachta indica* A. Juss. a partir de suspensiones celulares, acoplado a la producción de azadiractina *in vitro*. *Revista Ingeniería UC*. 29(2): 156-167. <https://doi.org/10.54139/revinguc.v29i2.169>

- Fiorini, A., Rosado, F., Bettega, E., Melo, K., Kukulj, C., Bonfim-Mendonça, P., Shinobu-Mesquita, C., Ghiraldi, L., Campanerut, P., Capoci, I., Godoy, J., Ferreira, I., y Svidzinski, T. (2016). Changes in response to the butanolic extract of *Sapindus saponaria* L. *Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 58, 1-8. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658025>
- Freire, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología vegetal*, 3(4): 195-209. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/263>
- Fuentes, M. E. M., Enríquez, C. A. D., y Duarte, C. (2022). Destrucción del bosque seco tropical en el valle geográfico del río cauca. *Historia ambiental latinoamericana y caribeña (HALAC) Revista de la Solcha*, 12(3), 287–324. <https://doi.org/10.32991/2237-2717.2022v12i3.p287-324>
- García, E., Lorente, P., Marín, J. A., y Arbeloa, A. (2011). Factores que afectan a la necrosis apical de brotes de *Pistacia vera* L. cultivados *in vitro*. *ITEA*, 107(4), 315-323. Recuperado el 09 de abril de 2023, de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3842849>
- Gaur, A., kumar, P., Kumar, A., y Kumar, D. (2016). *In vitro* plant regeneration studies and their potential applications in *Populus* spp. *Israel Journal of Plant Sciences*, 63 (2): 77-84.
- GBIF (2023). Recuperado el 7 de febrero. *Global Biodiversity Information Facility*. Obtenido de: <https://www.gbif.org/species/8017915>
- George, E., Hall, M., y Klerk, GJ. (2008). *Micropropagation: Uses and Methods*. Plant propagation by tissue culture. 3(1):29-64 https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_2
- Global Forest Watch. (2021). Recuperado el 30/08/2022, de “Tree cover in Peru” :<https://www.globalforestwatch.org/map/country/PER/?mainMap=eyJzaG93QW5hbHlzaXMiOnRydWV9&map=eyJjZW50ZXIiOnsibGF0IjotOS4zMTQzODA4NDc0MDg0LCJsbmciOi03NC45OTE3NDg4MTAwMDQ4Nn0sInpvb20iOiJQuMjc3NDI0NzA4NzQ2NDQ0LCJjYW5Cb3VuZCI6ZmFsc2UsImRhdGFzZXRzIjpbeyJkYXRhc2V>
- Hernández-Meneses, E. López-Peralta, M., Estrada-Lun, A., y Valdovinos-Ponce, G. (2022). Embriogénesis somática en *Heliconia collinsiana*. *Fitotecnia Mexicana*. 45(3), 333-333. <https://doi.org/10.35196/rfm.2022.3.333>
- Indacochea, B., Parrales, J., Hernández, A., Castro, C., Vera, M., Zhindón, A., y Gabriell, J. (2018). Evaluación de medios de cultivo *in vitro* para especies forestales nativas en peligro de extinción en Ecuador. *Agronomía Costarricense* 42(1): 63-89. <http://dx.doi.org/10.15517/rac.v42i1.32203>
- Jahan, A.A., Anis, M. y Aref, I.M. 2014. Relative examination of antioxidative enzymatic activities in plantlets of *Cardiospermum halicacabum* L. differentiated from hypocotyls *in vivo* and *ex vitro* environment. *Biotechnol. Rep.* 4:66-72.
- Klaedtke, S., Jacques, M., Raggi, L., Préveaux, A., Bonneau, S., Negri, V., Chable, V., y Barret, M. (2016). Terroir is a key driver of seed-associated microbial assemblages. *Environmental Microbiology*, 18(6), 1792–1804. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12977>

- Lebel, C. (2010). Caracterización dendrológica de las especies leñosas del distrito de Pacarán, cañete, Lima. Tesis para optar el título de ingeniero forestal. *Universidad Nacional Agraria La Molina*. 108-159. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/1653/F70.L44-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Linares-Palomino, R., Oliveira-Filho, A., y Pennington, R. (2011). Neotropical seasonally dry forests: diversity, endemism, and biogeography of woody plants. *Seasonally Dry Tropical Forests*, 3-21. Doi: 10.5822/978-1-61091-021-7_1
- Linares-Palomino, R. Huamantupa-Chuquimaco, I. Marcelo-Peña, J.L. Padrón, E. La Torre-Cuadros, M.A. Roncal-Rabanal, M. Choquecota, N. Collazos, L. Elejalde, R. y Vergara, N. (2022). Los bosques estacionalmente secos del Perú: un re-análisis de sus patrones de diversidad y relaciones florísticas. *Rv Peruana de Biología* 29(4): e21613 001 - 020. doi: <https://doi.org/10.15381/rpb.v29i4.21613>
- Lloyd, G., y McCown, B. (1980). Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. *HortScience*, 15: 416.
- Marcelo, J., Reynel, C., Zevallos, P., Bulnes, F., y Pérez, A. (2007). Diversidad, composición florística y endemismos en los bosques estacionalmente secos alterados del distrito de Jaén, Perú. *Ecología Aplicada*, 6(1-2): 9-22. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-22162007000100002&script=sci_abstract
- Marín, T. D., y Arriojas, D. (2021). Efecto remediador de extractos de *Sapindus saponaria* sobre un suelo contaminado con gasoil a nivel de laboratorio. *Ciencia & Desarrollo*, 20 (1): 13-26.
- Marinho, G., Klein, D., y Junior, S. (2018). Evaluation of soapberry (*Sapindus saponaria* L.) leaf extract against papaya anthracnose. *Summa Phytopathol.*, 44. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/175605>
- Martínez, Y., Rodríguez, M., Colinas, M., Villegas, O., Castillo, A., y Alia, I. (2015). Efectos de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuíta (*Euphorbia leucocephala* L.). *Fitotecnia Mexicana*, 38(4), 369-374.
- Martínez, R., Rodríguez, J., Cetina, V., Gutiérrez, M., y Azpiroz, H. (2003). Aplicación de la biotecnología en los recursos genéticos forestales. *Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 9 (1): 17-34. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62990103>
- Messias, T., Rezende, R. k., Silva, F., Jesus, M., y Nunes, G. (2019). Somatic embryogenesis induction in leaf and root explants of *Allophylus edulis*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. Doi: 10.15835/nbha47411504
- Miles, L., Newton, A., DeFries, R., Ravilious, C., May, L., Blyth, S., Kapos, V., y Gordon, J. (2006). A global overview of the conservation status of tropical dry forests. *Journal of Biogeography*, 33: 491-505. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2005.01424.x>
- MINAM. (2019). ABC de los bosques peruanos. Recuperado el 10 de 2022, de <http://www.bosques.gob.pe/peru-pais-de-bosques>

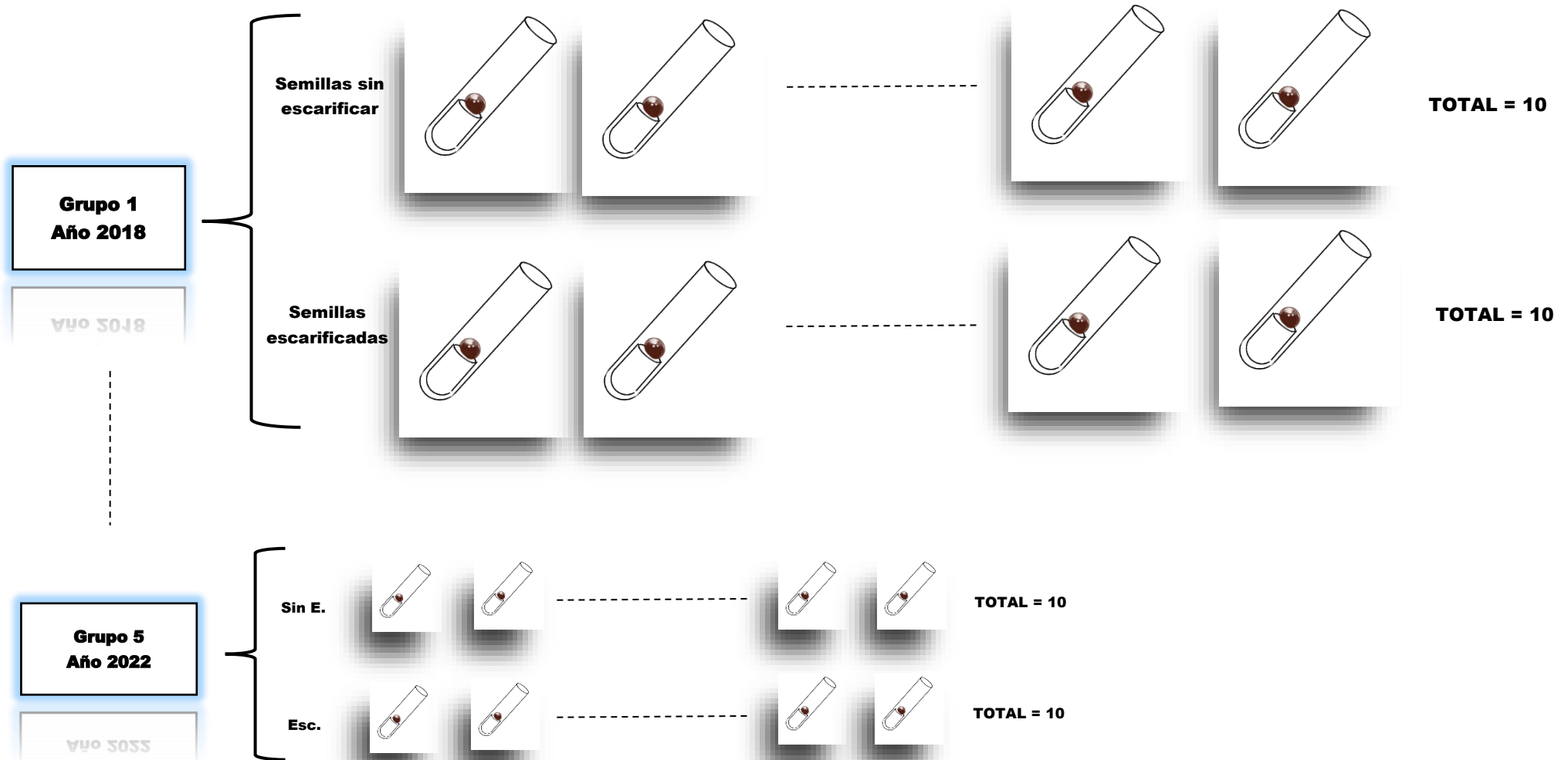
- Mondragón, G. (2016). Evaluación del crecimiento de plántulas de *caesalpinia spinosa*, *sapindus saponaria* y *tecoma stans* en diferentes sustratos durante su propagación en vivero durante su propagación en vivero. Tesis para optar el título de ingeniero forestal. *Universidad Nacional La Molina De Lima*. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/2641>
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15: 473 - 497.
- Murphy, P., y Lugo, A. (1986). Ecology of Tropical Dry Forest Ann. *Ecol. Sist*, 17: 67-88.
- Naciones Unidas. (Revisado 11 del 2021). <https://www.un.org/es/climatechange/what-is-climate-change>
- NCBI (2023). Recuperado el 7 de febrero. *The National Center For Biotechnonology Information*. Obtenido de: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=171222&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=f&log_op=lineage_toggle
- Nicholas , H. (29 de Abril de 2022). *Mongabay Latam*. <https://es.mongabay.com/2022/04/deforestacion-durante-2021-el-mundo-perdio-un-area-de-bosque-tropical-del-tamano-de-cuba/#:~:text=El%20pa%C3%ADs%20perdi%C3%B3%201%2C5,su%20respuesta%20en%20los%20incendios>.
- Niloufer, S. (2021). *In vitro* Analysis of phytochemical, anti-oxidant capacity of seed ethanolic extracts of *Sapindus saponaria* vahl and anti-bacterial activity on common dental pathogens. *J. Pharm. and Tech*. Doi: 10.5958/0974-360X.2021.00064.0
- OMM. (9 de Mayo del 2022). *La Organización Meteorológica Mundial*. Obtenido de: <https://public.wmo.int/es/media/comunicados-de-prensa/la-organizaci%C3%B3n-meteorol%C3%B3gica-mundial-cifra-en-un-50-la-probabilidad-de>
- Orlando, A., y Guirado, A. (2005). Potencial medicinal del género *Sapindus* L. (Sapindaceae) y de la especie *Sapindus saponaria* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 10(3-4).
- Park, Y., Barret, J., y Bonga, J. (1998). Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control and stability of cryopreserved clones. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 34, 231-239.
- Pérez, J. C. (2021). Biotecnología vegetal: mejoramiento de cultivos ante el cambio climático. *TEC - Tecnológico de costarica*. https://revistas.tec.ac.cr/index.php/investiga_tec/article/view/5985/5716
- Philomina, N., y Rao, J. (2000). Micropropagation of *Sapindus mukorossi* Gaertn . *Indian Journal of Experimental Biology*. 38: 621-624 .
- Ponce, F. (2014). Evaluación del efecto de bencilaminopurina y ácido indolbutírico en la propagación *in vitro* de segmentos nodales de *Manikara bidentata* (Quinilla Colorada). Tesis pregrado. *Universidad Nacional de Ucayali.*, 55. <http://repositorio.unu.edu.pe/handle/UNU/3202>

- Rashed, k., Ćirić, A., Glamočlija, J., Calhelha, R., y Ferreira, I. (2013). Antimicrobial activity, growth inhibition of human tumour cell lines, and phytochemical characterization of the hydromethanolic extract obtained from *Sapindus saponaria* L. *BioMed Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2013/659183>
- Rivera, J. (2018). Micropropagación de *Prosopis pallida* (Humb. & Bompl. Ex Wild.) Kunth a partir de yemas apicales. Tesis pregrado. Universidad Nacional Agraria La Molina., 131. <https://hdl.handle.net/20.500.12996/3515>
- Rojas, L. E., Araujo, K. C., y Montero, E. (2015). Evaluación del uso de *Sapindus saponaria* como biocida de *Aedes aegypti* en condiciones *in vitro*. *Producción + Limpia*, 10 (2): 11 - 17.
- Saad, A., y Elshahed, A. (2012). *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. In Leva, A. & Rinaldi, R. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/50569>
- Salazar, A., Jiménez, G., Lozano, S., y Monroy, M. (2016). Preliminary study for in vitro propagation of *Cedrus atlantica* through axillary buds. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(8), 2071-2078. Recuperado el 10 de 2022, https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342016000802071
- Sánchez Bultrago, J., y Silva Herrera, L. (2008). Estudio silvicultural de la especie *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo) como base para su aprovechamiento silvoindustrial. *Revista Colombia Forestal*, 11(1):71 – 82. <https://doi.org/10.14483/udistrital.jour.colomb.for.2008.1.a05>
- Santos, P., Ferreira, R., Aragão, A., Amaral, L., y Oliveira, A. (2012). Estabelecimento de espécies florestais nativas por meio de sementeira direta para recuperação de áreas degradadas. *Revista Árvore*, 36(2): 237-245. Doi:10.1590/S0100-67622012000200005
- Santos, W., Freire, M., Bogorni, P., Vendramim, J., y Macedo, M. (2008). Effect of the aqueous extracts of the seeds of *Talisia*. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 51. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000200018>
- Sharry S., Adema M., y Abedini W. (2015). Plantas en probeta, manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/46738>
- Singh, R., Kumari, N., y Singh, M. (2019). Overcome the seasonal constraint for somatic embryogenesis using in vitro leaf explants and genetic fidelity testing of *Sapindus mukorossi*. *Proc Indian Natn Sci Acad* 86, 1259-1266.
- Suárez, I. (2020). *Cultivo de tejidos vegetales*. Fondo Editorial Universidad de Córdoba. <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/2553>
- Teixeira, D., Leite, G., Sampaio, R., Tavares, W., Filho, T., Serrão, J., Zanetti, R., Camargo, R., y Zanuncio, J. (2022). Ecological indexes of arthropods on *Sapindus saponaria* plants with dehydrated sewage sludge as fertilizer. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1875712/v1>

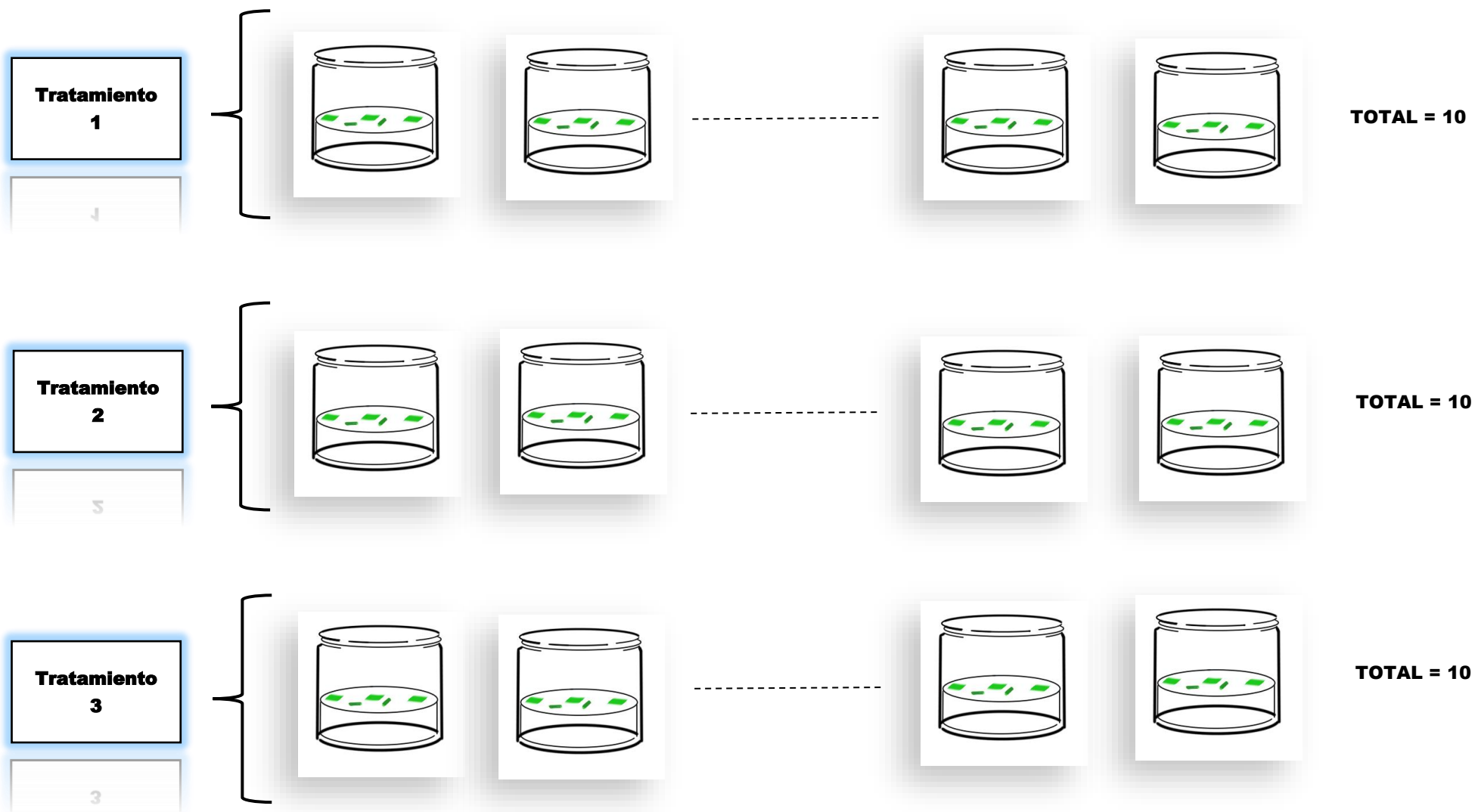
- Teixeira da Silva, J.A., Nezami-Alanagh, E., Barreal, M.E., Kher, M.M., Wicaksono, A., Gulyás, A., Hidvégi, N., Magyar-Tábori, K., Mandler-Drienyovszki, N., Márton, L., Landín M., Gallego, P.P., Driver, J.A. y Dobránski, J. (2020). Shoot tip necrosis of *in vitro* plant cultures: a reappraisal of possible causes and solutions. *Planta* **252**, 47. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03449-4>
- Thomas, T.D., y Maseena, E.A. (2006). Callus induction and plant regeneration in *Cardiospermum halicacabum* Linn. an important medicinal plant. *Sci. Hortic.* 108:332-336.
- Tropicos. (2013). Revisado el 10 de 2022, de <http://legacy.tropicos.org/specimen/100786008>
- Vergara Arellano, R. C. (2018). Micropropagación de *Cedrela lilloi* C. DC. (Cedro de altura) a partir de yemas apicales provenientes de embriones cigóticos germinados *in vitro*. Tesis para optar el título de ingeniero forestal. *Universidad Nacional Agraria La Molina*, Lima, Perú. 55-65 p. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/3528>
- Wang, J.F. y Wang, Z.Q. (2010). Studies on *in vitro* germplasm conservation of *litchi*. *Acta Horticulturae* (863): 111-116 . [_Doi: 10.17660/ActaHortic.2010.863.12](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.863.12)
- Yang, X., Yang, X., Guo, T., Gao, K., Zhao, T., Chen, Z. y An, X. (2018). High-efficiency somatic embryogenesis from seedlings of *Koelreuteria paniculata* Laxm. *Forests* 9, 769. <https://doi.org/10.3390/f9120769>

IX. ANEXOS

Anexo 1. Prueba de germinación *in vitro* en semillas de *S. saponaria* colectadas durante los años 2018 a 2022.



Anexo 2. Evaluación de varias concentraciones de BAP (T1 = 1,0 mg/L, T2 = 2,0 mg/L y T3 = 3,0 mg/L) en la inducción de callos y procesos morfogénicos de *S. saponaria*.



Anexo 3. Resultados estadísticos del crecimiento (cm) *in vitro* de los segmentos nodales y ápices caulinares de *S. saponaria*, después de 5 meses de evaluación.

3.1. Resultados estadísticos ANOVA.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	17,204 ^a	27	0,637	1,176	0,251
Intersección	1998,642	1	1998,642	3688,580	0,000
tratamiento	2,913	3	0,971	1,792	0,148
tiempo	11,261	6	1,877	3,464	0,002
tratamiento * tiempo	3,029	18	0,168	0,311	0,997
Error	212,404	392	0,542		
Total	2228,250	420			
Total corregido	229,608	419			

a. R al cuadrado = 0,075 (R al cuadrado ajustada = 0,011)

3.2. Resultados estadísticos Tukey y Duncan

		Subconjunto	
Tratamientos		1	
HSD Tukey^{a,b}	Tratamiento 1	105	2,043357171914879(a)
	Tratamiento 4	105	2,188156752112791(a)
	Tratamiento 2	105	2,245364956057889(a)
	Tratamiento 3	105	2,248873697143276(a)
	Sig.		0,181
Duncan^{a,b}	Tratamiento 1	105	2,043357171914879(a)
	Tratamiento 4	105	2,188156752112791(a)
	Tratamiento 2	105	2,245364956057889(a)
	Tratamiento 3	105	2,248873697143276(a)
	Sig.		0,064

Anexo 4. Resultados estadísticos del número de nudos de los segmentos nodales y ápices caulinares de *S. saponaria*, después de 5 meses de evaluación en cuatro tratamientos.

4.1. Resultados estadísticos ANOVA

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	9,873 ^a	3	3,291	0,910	0,451
Intersección	390,681	1	390,681	108,073	0,000
Tratamientos	9,873	3	3,291	0,910	0,451
Error	86,760	24	3,615		
Total	487,314	28			
Total corregido	96,633	27			

a. R al cuadrado = 0,102 (R al cuadrado ajustada = -0,010)

4.2 Resultados estadísticos Tukey

			Subconjunto
Tratamientos		N	1
HSD Tukey ^{a,b}	T1	7	3,2214
	T3	7	3,2500
	T2	7	3,7814
	T4	7	4,6886
	Sig.		0,486

Anexo 5. Resultados estadísticos del número de brotes de los segmentos nodales y ápices caulinares, después de 5 meses de evaluación en cuatro tratamientos.

5.1. Resultados estadísticos ANOVA

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	9,513 ^a	3	3,171	2,780	0,063
Intersección	112,922	1	112,922	98,985	0,000
Tratamientos	9,513	3	3,171	2,780	0,063
Error	27,379	24	1,141		
Total	149,814	28			
Total corregido	36,892	27			

a. R al cuadrado = 0,258 (R al cuadrado ajustada = 0,165)

5.2. Resultados estadísticos Tukey.

HSD Tukey^{a,b}	Tratamientos	N	Subconjunto 1
	T1	7	1,1986
	T4	7	1,7129
	T2	7	2,5071
	T3	7	2,6143
	Sig.		0,089

Anexo 6. Resultados estadísticos del número de hojas de los segmentos nodales y ápices caulinares, después de 5 meses de evaluación en cuatro tratamientos.

6.1. Resultados estadísticos ANOVA

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	9,873 ^a	3	3,291	0,910	0,451
Intersección	390,681	1	390,681	108,073	0,000
Tratamientos	9,873	3	3,291	0,910	0,451
Error	86,760	24	3,615		
Total	487,314	28			
Total corregido	96,633	27			

a. R al cuadrado = 0,102 (R al cuadrado ajustada = -0,010)

6.2. Resultados estadísticos Tukey

HSD Tukey^{a,b}	Tratamientos	N	Subconjunto 1
	T1	7	3,2214
	T3	7	3,2500
	T2	7	3,7814
	T4	7	4,6886
	Sig.		0,486




Recibo digital


Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Jordan Bardales Suárez
Título del ejercicio: Quick Submit
Título de la entrega: Germinación de semillas, propagación clonal, morfogénesis ...
Nombre del archivo: TESIS-Jordan_FINAL_II.docx
Tamaño del archivo: 14.74M
Total páginas: 60
Total de palabras: 13,301
Total de caracteres: 74,815
Fecha de entrega: 01-dic.-2023 09:01a. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega... 2244205846



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA



Germinación de semillas, propagación clonal, morfogénesis y conservación de
germoplasma *in vitro* de "choloque" *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae)

TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA

AUTOR
Bardales Suárez, Jordan

ASESOR
Dr. Delgado Paredes, Guillermo Eduardo

LAMBAYEQUE - PERÚ

2023



Dr. Guillermo Eduardo Delgado Paredes

Germinación de semillas, propagación clonal, morfogénesis y conservación de germoplasma in vitro de "choloque"

Sapindus saponaria L. (Sapindaceae)

INFORME DE ORIGINALIDAD

11%

INDICE DE SIMILITUD

10%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1 revista.ibp.co.cu 1%
Fuente de Internet

2 www.researchgate.net 1%
Fuente de Internet

3 doaj.org 1%
Fuente de Internet

4 worldwidescience.org 1%
Fuente de Internet

5 www.ellespro.com 1%
Fuente de Internet

6 revistas.unprg.edu.pe <1%
Fuente de Internet

7 Tang, H.. "Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars", Scientia Horticulturae, 20020419 <1%
Publicación

www.scribd.com



Dr. Guillermo Eduardo Delgado Paredes


CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD DE TESIS

Yo, Guillermo E. Delgado PareDes, asesor de tesis del Bachiller Jordan Bardales Suárez, autor de la tesis titulada: Germinación de semillas, propagación clonal, morfogénesis y conservación de germoplasma *in vitro* de “choloque” *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae)”, después de la revisión exhaustiva del documento en mención, dejo constancia que el mismo tiene un índice de similitud de 11 % verificable en el reporte de similitud del programa Turnitin.

El suscrito analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias no constituye plagio. A mi leal saber y entender la tesis cumple con las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Lambayeque, 11 de enero de 2024


Guillermo Eduardo Delgado Paredes
DNI N° 16452609
Asesor


Jordan Bardales Suarez
DNI N° 71458542
Autor



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN



ACTA DE SUSTENTACIÓN

ACTA DE SUSTENTACION N° 023-2023-FCCBB-UI

Siendo las 8:30 horas del día 29 de diciembre de 2023, se reunieron los Miembros del Jurado evaluador de la tesis titulada "Germinación de semillas, propagación clonal, morfogénesis y conservación de germoplasma *in vitro* de "choloque" *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae)", designados por Resolución N° 017-2023-VIRTUAL-FCCBB/D de fecha 26 de enero de 2023, con la finalidad de evaluar y calificar la sustentación de la tesis antes mencionada, conformada por los siguientes docentes:

Dra. Consuelo Rojas Idrogo
MSc. Josefa Ecurra Puicón
Lic. Wilmer Leoncio Calderón Mundaca
Dr. Guillermo Eduardo Delgado Paredes

Presidenta
Secretaria
Vocal
Asesor

Acto de sustentación fue autorizado por Resolución N° 332-2023-VIRTUAL-FCCBB/D, de fecha 27 de diciembre de 2023.

La Tesis presentada y sustentada por el Bachiller **JORDAN BARDALES SUÁREZ**, tuvo una duración de 3.0 minutos. Después de la sustentación y absueltas las preguntas y observaciones de los miembros del jurados; se procedió a la calificación respectiva, otorgándole el calificativo de (Muy Buena) (19.4) en la escala vigesimal.

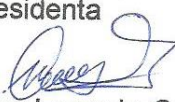
Por lo que el Bachiller **JORDAN BARDALES SUÁREZ** queda **APTO** para obtener el título profesional de Licenciado en Biología de acuerdo con la Ley Universitaria 30220 y la normatividad vigente de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

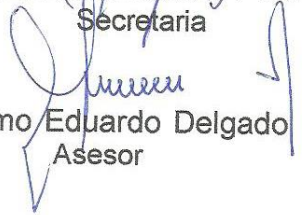
Siendo las 10:15 se dio por concluido el presente acto académico, dándose conformidad al presente acto, con la firma de los miembros del jurado.

Firman:


Dra. Consuelo Rojas Idrogo
Presidenta


MSc. Josefa Ecurra Puicón
Secretaria


Lic. Wilmer Leoncio Calderón Mundaca
Vocal


Dr. Guillermo Eduardo Delgado Paredes
Asesor