

UNIVERSIDAD NACIONAL

“PEDRO RUIZ GALLO”

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

TESIS

“Efecto en las características de crecimiento, descarte y supervivencia de la propagación clonal *in vitro*, morfogénesis, conservación de germoplasma y aclimatación de “Cerecillo” *Muntingia calabura* L. y “Guayacán negro” *Tabebuia billbergii* (Bureau & K. Schum.) Standl. Lambayeque - Perú. 2015”

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Br. Yohonatan Alain Duque Aurazo

LAMBAYEQUE – PERU

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL

“PEDRO RUIZ GALLO”

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

TESIS

“Efecto en las características de crecimiento, descarte y supervivencia de la propagación clonal *in vitro*, morfogénesis, conservación de germoplasma y aclimatación de “Cerecillo” *Muntingia calabura* L. y “Guayacán negro” *Tabebuia billbergii* (Bureau & K. Schum.) Standl. Lambayeque - Perú. 2015”

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Br. Yohonatan Alain Duque Aurazo

APROBADO POR:

Dr. César Estela Campos
PRESIDENTE

M.Sc. Consuelo Rojas Idrogo
SECRETARIA

Dra. Marlene Elizabeth Cardozo Quinteros
VOCAL

Dr. Guillermo Delgado Paredes
PATROCINADOR

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN.....	12
II.	MARCO TEÓRICO	
2.1	Antecedentes.....	16
2.2	Bases Teóricas	20
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1	Material	
3.1.1	Material vegetal.....	23
3.1.2	Medios de cultivo	
A.	Preparación del medio de cultivo basal para propagación....	23
B.	Medio de cultivo utilizado en la germinación de semillas.....	24
C.	Medio de cultivo utilizado para el efecto de las citocininas en el brotamiento <i>in vitro</i>	25
D.	Medio de cultivo utilizado para el efecto de las auxinas en la callogénesis <i>in vitro</i>	26
E.	Medio de cultivo utilizado para el enraizamiento <i>in vitro</i>	27
F.	Medio de cultivo utilizado para el efecto de la interacción auxina-citocininas en la regeneración <i>in vitro</i>	28
G.	Medio de cultivo utilizado en la conservación de germoplasma <i>in vitro</i>	29
H.	Preparación del sustrato para aclimatación.....	30

3.2 Metodología

3.2.1 Procedimiento seguido en el cultivo <i>in vitro</i>	31
a. Preparación de la cámara de flujo laminar horizontal de aire esterilizado.....	31
b. Preparación de la sesión de cultivo.....	31
c. Desinfestación y cultivo del material vegetal.....	32
d. Incubación de los cultivos <i>in vitro</i>	32
A. Germinación de semillas <i>in vitro</i>	33
B. Efecto de las citocininas en el brotamiento <i>in vitro</i>	33
C. Efecto de las auxinas en la callogénesis <i>in vitro</i>	34
D. Enraizamiento <i>in vitro</i>	35
E. Efecto de la interacción auxina-citocininas en la organogénesis <i>in vitro</i>	36
F. Conservación de germoplasma <i>in vitro</i>	36
G. Aclimatación del material vegetal.....	37

IV. RESULTADOS

4.1 Identificación taxonómica de las especies vegetales en estudio	
a. <i>Muntingia calabura</i>	38
b. <i>Tabebuia billbergii</i>	39
4.2 Germinación <i>in vitro</i>	40
4.3 Efecto de las citocininas en el brotamiento <i>in vitro</i>	48
4.4 Efecto de las auxinas en la callogénesis <i>in vitro</i>	52
4.5 Enraizamiento <i>in vitro</i>	56

4.6	Efecto de la interacción auxina-citocininas en la organogénesis <i>in vitro</i>	61
4.7	Conservación de germoplasma	63
4.8	Aclimatación.....	68
V.	DISCUSIÓN.....	70
VI.	CONCLUSIONES.....	78
VII.	RECOMENDACIONES.....	79
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	80
IX.	ANEXOS	88

Lista de cuadros

- Cuadro 1. Composición química del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) utilizado en el cultivo *in vitro* de *M. calabura* y *T. billbergii*.....24
- Cuadro 2. Tratamientos en estudio del efecto de las citocininas BAP, KIN, 2iP y TDZ en el brotamiento de *M. calabura* y *T. billbergii*..... 25
- Cuadro 3. Tratamientos en estudio del efecto de las auxinas 2,4-D y ANA en la callogénesis de *M. calabura* y *T. billbergii*..... 26
- Cuadro 4. Tratamientos en estudio del efecto del AIB y 17N en el enraizamiento *in vitro* de *M. calabura* y *T. billbergii*..... 27
- Cuadro 5. Tratamientos en estudio del efecto de la interacción ANA-BAP y 2,4-D-BAP en la regeneración *in vitro* de *M. calabura* y *T. billbergii*..... 28
- Cuadro 6. Tratamientos en estudio del efecto de la interacción ABA-manitol en la conservación *in vitro* de germoplasma de *M. calabura* y *T. billbergii*.....29
- Cuadro 7. Tratamientos en estudio para la aclimatación de plantas *in vitro* de *M. calabura* y *T. billbergii*..... 30
- Cuadro 8. Germinación de semillas *in vitro* de *M. calabura*..... 41
- Cuadro 9. Germinación de semillas *in vitro* de *T. billbergii*..... 42
- Cuadro 10. Elongación y el número de nudos de las plántulas de *M. calabura* germinadas *in vitro*.....45
- Cuadro 11. Elongación, número de nudos y hojas de plántulas de *T. billbergii* germinadas *in vitro*46
- Cuadro 12. Tamaño y número de brotes *in vitro* de *M. calabura*.....48
- Cuadro 13. Porcentaje de brotamiento *in vitro* de *T. billbergii*..... 51
- Cuadro 14. Efecto de las auxinas ANA y 2.4D en la callogénesis de *M. calabura*.....53

- Cuadro 15. Efecto de las auxinas ANA y 2.4D en la callogénesis de *T. billbergii*.....55
- Cuadro 16. Efecto del AIB en el enraizamiento de ápices de *M. calabura* 56
- Cuadro 17. Efecto del AG3 0,01 + ANA 0,01 mg/L (T3) en el enraizamiento de ápices de *T. billbergii*.....59
- Cuadro 18. Efecto de la interacción auxinas – citocininas en la organogénesis en *M. calabura* 61
- Cuadro 19. Efecto de la interacción auxinas – citocininas en la organogénesis en *T. billbergii*.....62
- Cuadro 20. Conservación de germoplasma *in vitro* de *M. calabura*..63
- Cuadro 21. Conservación de germoplasma *in vitro* de *T. billbergii*...65
- Cuadro 22. Sobrevivencia a la aclimatación de plantas *in vitro* de *M. calabura* y *T. billbergii*..... 69

Lista de Figuras

- **Figura 1.** Escala empírica para la evaluación de la formación de callos..... 35
- **Figura 2.** Tamaño de la semilla de *M. calabura*..... 40
- **Figura 3.** Tamaño de la semilla de *T. billbergii*..... 43
- **Figura 4.** Comportamiento de lotes de semilla de las especies *M. calabura* y *T. billbergii* en germinación..... 44
- **Figura 5.** Plántulas germinadas *in vitro*. A *M. calabura* B. *Tabebuia billbergii*.....47
- **Figura 6.** Efecto de las citocininas en el brotamiento: Tamaño y número de brotes de *M. calabura* 49
- **Figura 7.** Efecto de las citocininas en el brotamiento de *M. calabura in vitro*.50
- **Figura 8.** Desarrollo de callos en cotiledones de *T. billbergii*..... 52
- **Figura 9.** A: *M. calabura* sometida al efecto de ANA 1,0mg/L donde se observa un alto desarrollo de los brotes. B: *T. billbergii*, callo rizogénico en ANA 0,1mg/L.....54
- **Figura 10.** Enraizamiento de *M. calabura* en AIB 0.1 mg/L..... 57
- **Figura 11.** Evaluación comparativa de los tratamientos de enraizamiento en *T. billbergii*. (T3) y *M. calabura* (T0, T1, T2)....58
- **Figura 12.** Enraizamiento de *T. billbergii* en MS suplementado con AG3 0.01 mg/L + ANA 0.01 mg/L.....60
- **Figura 13.** Efecto de la interacción auxina – citocinina (ANA 2,0 + BAP 0,1 mg/L) *M. calabura*..... 62
- **Figura 14.** *M. calabura* sometida al tratamiento para la conservación de germoplasma. 64
- **Figura 15.** Conservación de germoplasma *in vitro* de *T. billbergii*.....66
- **Figura 16.** *T. billbergii* sometida a los tratamientos de conservación de germoplasma 67

Abreviaturas

2,4-D: Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

2iP: 2-isopenteniladenina

ABA: Ácido abscísico

AIA: Ácido indol-3-acético

AIB: Ácido Indol-3-butírico

ANA: Ácido 1-Naftaleneacético

BAP: 6-benzilaminopurina

KIN: Kinetina

TDZ: Tiazurón

.

.

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluaron las diferentes técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* tales como: Germinación de semillas, brotamiento, callogénesis y conservación de germoplasma en dos especies del Bosque estacionalmente seco (BES): *Muntingia calabura* y *Tabebuia billbergii*. En todos estos experimentos se tuvo como base el medio de cultivo conformado con las sales minerales Murashige y Skoog (MS) suplementado con tiamina.HCl 0,4 mg L⁻¹, m-inositol 100 mg L⁻¹., sacarosa 2%, reguladores hormonales y agar agar 0.6% como agente gelificante. El pH se ajustó en 5,8 ± 0,1. Se obtuvo un porcentaje de germinación mayor al 96% para *M. calabura* y 76,5% para *T. billbergii* al cabo de 30 días. La propagación de *M. calabura* presentó los mejores resultados en los tratamientos KIN 0,5 mg L⁻¹ 2iP 0,5 mg L⁻¹ y 2iP 1,0 mg L⁻¹ para tamaño de brotes y en los tratamientos KIN 0,5 mg L⁻¹ y TDZ 1,0 mg L⁻¹ para número de brotes. En *T. billbergii* se tienen como mejores resultados para el tamaño de los brotes los tratamientos con KIN 1,0 mg L⁻¹, 2iP 1,0 mg L⁻¹ y TDZ 1,0 mg L⁻¹ y para el número de brotes los tratamientos suplementados con BAP 0,5 y 1,0 mg L⁻¹. La callogénesis en ambas especies fue exitoso, sólo los tratamientos suplementados con 2,4D 1,0 mg L⁻¹ y 2,0 mg L⁻¹ fueron tóxicos, causando necrosis en los explantes. En la conservación de germoplasma la adición de manitol y ABA en el medio fue exitosa para la conservación de *T. billbergii* esta suplementación no es recomendada para *M. calabura*.

ABSTRACT

In this research thesis I was evaluated the different plant tissue culture techniques *in vitro* like as: Seed germination, shooting, callogenesis and germplasm conservation in two species of the Dry Forest (BES): *Muntingia calabura* and *Tabebuia billbergii*. In these experiments the culture medium was based form the mineral salts Murashige & Skoog (MS) with thiamine.HCl 0.4 mg /L, m-inositol 100 mg / L, 2% sucrose, hormonal regulators and agar 0.6% as a gelling agent. The pH was adjusted to 5.8 ± 0.1 . A germination percent was obtained greater than 96% for *M. calabura* and 76,5% for *T. billbergii* after 30 days. The propagation of *M. calabura* presented the best results in the treatments KIN 0,5 mg/L, 2iP 0,5 mg/L and 2iP 1,0 mg/L for shoot size and in the treatments KIN 0.5 mg / L and TDZ 1.0 mg / L for number of shoots. In *T. billbergii* have the best results for the shoot size in the treatments with KIN 1,0 mg/L, 2iP 1,0 mg/L and TDZ 1,0 mg/L and for the number of shoots the treatments supplemented with BAP 0.5 and 1.0 mg / L. Callogenesis in both species was successful, only treatments supplemented with 2.4D 1.0 and 2.0 mg / L were toxic, causing explant necrosis. In germplasm conservation the addition of mannitol and ABA in the medium was successful for the conservation of *T. billbergii* this supplementation is not recommended for *M. calabura*.

I. INTRODUCCIÓN

Los efectos en las características de crecimiento, descarte y supervivencia tienen suma importancia en las técnicas de propagación clonal *in vitro*, morfogénesis, conservación de germoplasma y aclimatación en las especies *Muntingia calabura* L. y *Tabebuia billbergii* (Bureau & K. Schum.) Standl, conocidas comúnmente como “Cerecillo” y “Guayacán negro” respectivamente, debido a que estas especies forman parte del Bosque Seco Ecuatorial o Bosque Estacionalmente Seco (BES) (Sánchez et al, 2006) y son plantas útiles en varios aspectos. En el caso de *T. billbergii* su madera es utilizada para ebanistería, mueblería, parquet, estructuras y construcciones rurales (INRENA, 2002). Las hojas y flores secas son forraje para ganado vacuno y caprino. Las flores en infusión se usan como tratamiento de la hepatitis. La corteza en cocción ayuda a aliviar la osteoporosis (Motto, 2005). La especie *M. calabura* sirve como fuente de alimento de muchas especies endémicas incluyendo la pava aliblanca, *Penelope albipennis* (Martos et al, 2009), siendo ambas de suma importancia económica y ecológica para el entorno.

El Bosque Estacionalmente Seco (BES) o Región Tumbesina es una ecorregión que comprende una franja costera de 100 a 150 Km de ancho (0°30' a 5° LS), desde la península de Santa Elena, el Golfo de Guayaquil y la Isla Puna en Ecuador, gran parte de las regiones de Tumbes, Piura, Lambayeque y La Libertad (7°40' LS), penetrando en las Vertientes Occidentales de los Andes hasta el valle del Marañón (9° LS) entre las regiones de Cajamarca y Amazonas (Brack, 1986). Se caracteriza por poseer una temperatura promedio anual de 23 – 24 °C, clima árido y semiárido y presenta una fuerte estacionalidad de lluvias.

Esta ecorregión ha sido estudiada por la alta tasa de endemismo referente a aves (Angulo, 2009), herpetofauna (Venegas, 2005) que está compuesta por 6 especies de anfibios y 33 especies de reptiles, de las cuales 2 especies de anfibios y 13 especies de reptiles son endémicas a

esta ecorregión y especies vegetales (Martos et al, 2009), representada por la presencia de algarrobo (*Prosopis sp*), sapote (*Colicodendron scarbrida*), vichayo (*Capparis ovalifolia*) y otras especies y malezas temporales en el periodo de lluvias. Esta cobertura vegetal constante expresa la capacidad de almacenamiento de sus acuíferos subterráneos constituyéndose así en una protección natural para la fauna, por su efecto regulador de la radiación solar y la velocidad de los vientos (Gushiken, 1994). Leal y Linares (2005) han identificado un mínimo de 34 familias, 58 géneros y 85 especies y morfoespecies para la zona. La familia Fabaceae (Leguminosae) es la más representativa y sus especies se distribuyen en la mayoría de ambientes. 34 % de las especies arbóreas encontradas en las 16 parcelas de su estudio, en el bosque seco de Tumbes-Piura son Fabaceae, seguido por Bombacaceae (9%), Polygonaceae (5%), Bignoniaceae, Boraginaceae, Lauraceae, Capparaceae y Moraceae (4%).

El Bosque Estacionalmente Seco (BES) tiene una gran importancia en la economía de las familias de las áreas rurales de la costa del norte del Perú, las cuales dependen directamente de este ecosistema, aprovechando los productos madereros (madera, leña y carbón) y no madereros (hojas, frutos, extractos). Estos a su vez sostienen actividades relacionadas como ganadería, apicultura, obtención de productos secundarios, entre otros.

Actualmente, constituye una de las áreas más amenazadas ambientalmente por el grado de desertificación, lo que conlleva al desgaste o deterioro de la vegetación natural amenazando las posibilidades de estudiar otras plantas con importancia científica. Las especies contenidas en el BES han venido siendo amenazadas debido a al aumento de la actividad antrópica y perturbaciones ecológicas como el cambio climático.

De acuerdo a la FAO (2016) se espera que, a mediano y largo plazo, el cambio climático afecte América Latina de la siguiente manera: La

vegetación semiárida iría siendo sustituida por vegetación de tierras áridas. Podrían experimentarse pérdidas de diversidad biológica importantes con la extinción de especies en muchas áreas tropicales de la región. Los cambios en las pautas de precipitación y la desaparición de los glaciares afectarían notablemente la disponibilidad de agua.

FAO (2016) menciona que el Perú es un país altamente vulnerable a los efectos adversos del cambio climático, pues presenta siete de las nueve características de vulnerabilidad reconocidas por la CMNUCC (Convención Marco de la Naciones Unidas para el Cambio Climático); asimismo, relacionadas a países cuyas necesidades y preocupaciones deben ser atendidas, lo que posiciona al Perú entre los diez países más vulnerables ante los cambios. La biodiversidad y los ecosistemas serían los más afectados por una combinación de cambio climático, siendo los BES sensibles a cambios de temperatura y los cambios en la precipitación pluvial teniendo como efectos la producción de las especies, presencia de sequías, desecación e incendios.

Las técnicas de cultivo *in vitro*, desarrolladas por la biotecnología vegetal brinda una serie de protocolos que ayudan a la obtención de plántulas a gran escala, a partir de poco material vegetal (planta madre) en menor tiempo. Dentro de estas técnicas la de mayor aplicación en una serie de especies vegetales, que van desde las plantas herbáceas ornamentales, hasta las plantas leñosas arbóreas, ha sido la propagación clonal (Kumar y Reddy, 2011). Actualmente este sistema, sobre todo en especies forestales y leñosas, constituye una alternativa de solución en la obtención masiva de individuos con fines de reforestación o en la industria maderera o de papel. Se tienen ejemplos como *Eucaliptus*, o *Populus* donde además se ha desarrollado un sistema de embriogénesis *in vitro* (Gaur et al, 2016).

El presente trabajo se desarrolló teniendo como objetivos:

Objetivo general:

Evaluar el efecto en las características de crecimiento, descarte y supervivencia de la propagación clonal *in vitro*, morfogénesis, conservación de germoplasma y aclimatación de “Cerecillo” *M. calabura* L. y “Guayacán negro” *T. billbergii* (Bureau & K. Schum.) Standl.

Objetivos específicos:

- Determinar el porcentaje de germinación in vitro en semillas de “Cerecillo” *M. calabura* L. y “Guayacán negro” *T. billbergii* (Bureau & K. Schum.) Standl.
- Medir el efecto hormonal de las citocininas (BAP, KIN, 2Ip y TDZ), auxinas (2,4-D y ANA) en explantes de “Cerecillo” *M. calabura* L. y “Guayacán negro” *T. billbergii* (Bureau & K. Schum.) Standl *in vitro*.
- Optimizar el proceso de aclimatación, en condiciones de invernadero, en “Cerecillo” *M. calabura* L. y “Guayacán negro” *T. billbergii* (Bureau & K. Schum.) Standl.
- Establecer de un banco de germoplasma in vitro para la conservación de “Cerecillo” *M. calabura* L. y “Guayacán negro” *T. billbergii* (Bureau & K. Schum.) Standl.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

En los últimos años la información bibliográfica sobre trabajos de germinación y propagación *in vitro* de especies forestales ha incrementado significativamente; sin embargo, de *M. calabura*, no se conocen muchos trabajos al respecto, se reportan apenas algunos estudios donde se demuestra la capacidad germinativa de *M. calabura* en condiciones *ex vitro* (López et al, 2002).

En cuanto a la germinación de *Tabebuia*, la capacidad de germinación de cualquier semilla depende del grado de tolerancia a la pérdida de agua, al tiempo y las condiciones de almacenamiento de las semillas (Berjak y Pammenter, 2004). La germinación de semillas *in vitro* de *Tabebuia*, de acuerdo con Schuler et al. (2005) logra un 90% en el porcentaje de germinación de semillas de *T. rosea*. Minchala (2014) obtiene un 65% de porcentaje de germinación, y un 30% en la tasa de contaminación. Pavón (2002) menciona que la contaminación provocó una reducción del 43% en el número de las vitroplantas de *T. rosea*; y Espinoza (2001) alcanza una tasa de 37% de semilla contaminada de *T. guayacan*. Además Schuler et al. (2005) menciona, en su estudio sobre *T. rosea*, que las tasas de germinación pueden presentar diferencias, incluso si las semillas pertenecen a la misma especie. Esta variación podría deberse a los factores físicos como la luz y/o temperatura (Vargas et al, 2015). En estudios de germinación *ex vitro*, Vozzo (2010) obtiene un porcentaje de germinación de 47% en semillas de *T. donell-smith* conocido comúnmente como “Guayacán blanco”.

Durante el desarrollo de la plántula *in vitro*, posterior a la germinación, pueden presentarse condiciones poco comunes como albinismo (Cardone et al, 2010) (Rodríguez et al, 2016) (Makowska y Oleszczuk, 2014). Otra condición no común es la

fenolización, la cual se justifica por la antigüedad del material vegetal (Concepción et al, 2005); la influencia de los materiales usados en el proceso de desinfestación (Indacochea et al, 2018). Y la mortalidad causada por la concentración del regulador de crecimiento (Hartmann et al, 2002), incluso estudios demostraron que la mortalidad puede ser crítica en el periodo de aclimatación, llegando a un porcentaje de 10% de supervivencia (Castro et al, 1999)

Los reguladores de crecimiento son fundamentales para el proceso de propagación y morfogénesis *in vitro*, tales como kinetina usada en la regeneración de especies semileñosas (Chen, 2008); KIN, BAP, 2iP y TDZ para la proliferación de brotes (Chamorro et al, 2007). Y especies forestales como el BAP en *Cedrella salvadorensis* (Soto et al, 2010)

En cultivo de tejidos de *M. calabura* se conoce el trabajo realizado por Rout et al, (1996) sobre embriogénesis somática y regeneración de plántulas utilizando la técnica del cultivos de callos a partir de embriones cigóticos inmaduros en medio basal MS semisólido suplementado con diferentes concentraciones de auxinas y citocininas o en combinaciones de KIN 11,6 μM con 2,4-D 4,5 μM , alcanzando el máximo número de embriones somáticos por cultivo. Entre los diferentes carbohidratos utilizados en el medio basal, la sacarosa mostró la mejor respuesta a la inducción de la embriogénesis somática, mientras que el desarrollo de embriones somáticos a plántulas se logró en medio de cultivo MS completo suplementado con sacarosa 2,0% (w/v) sin reguladores de crecimiento.

En *Tabebuia*, se reportan estudios *in vitro* de *T. rosea*, seleccionadas de plantas élites, para el establecimiento de una plantación de origen in vitro, a utilizar en ensayos de propagación

vegetativa y análisis de pruebas clonales y moleculares (Schuler et al, 2005). Se tiene conocimiento, además, de la propagación *in vitro* de *T. billbergii*, a partir de explantes obtenidos de plántulas *in vitro* en donde la adición de KIN 1,0 mg/L más sulfato de adenina 25 mg/L al medio de cultivo MS, posibilitó alcanzar mayores resultados en altura de plántulas y elongación del brote, al cabo de 90 días de evaluación. (Minchala et al, 2014).

El amplio uso de 2,4-D como agente hormonal para la inducción de callos (Dhiya et al, 2013) (Karunaeatne et al, 2014) (Matos 2007). En algunos casos el suplemento hormonal no es esencial para la obtención de callos, para *T. rosea* (Pavón 2002)

En el enraizamiento *in vitro*, la presencia de AIB 1,0 mg/L en el medio de cultivo, fue necesaria para aumentar el número de raíces y la tasa de enraizamiento de los explantes inoculados en el medio de cultivo MS, después de 90 días de evaluación (Minchala et al, 2014); y la aplicación de ANA para *T. rosea* (Suárez et al, 2006) (Schueler et al, 2005).

Es evidente la acción sinérgica entre una auxina y citocinina en la morfogénesis, con esta relación se ha podido modificar el desarrollo células indiferenciadas, con un cuidadoso equilibrio entre ambas podríamos producir raíces y brotes a partir de los explantes iniciales. Indacochea et al. (2016) usó la concentración de BAP 0,2 mg/L + ANA 0,1 mg/L para producir brotes en *Myroxylon balsamum*, *T. crysantha* y *T. billbergii*. Asimismo, esta relación también podría producir la formación de callos como en *Soymida febrífuga* (Chiruvella et al, 2014) y *Arachis burkartii* (Kobelak et al, 2004). En tratamientos combinando BAP y 2,4-D se obtuvieron también callos en *T. rosea* (Pavón, 2002), el 2,4-D es un regulador hormonal que tiene eficacia de promover la formación de callos al combinarlo con alguna citocinina, como BAP y KIN (Matos, 2007)

Una de las ventajas de la conservación de germoplasma *in vitro*, aparte de la seguridad en la sanidad del material biológico, referente a hongos y bacterias, es la facilidad del intercambio de germoplasma a nivel nacional e internacional (Sharma y Sharma, 2013). Por otro lado, tal vez es la única manera de conservar material genético de especies recalcitrantes de las zonas tropicales húmedas, además de las especies cultivadas alimenticias y silvestres (Pathak y Abido, 2014). Para lograr establecer un sistema óptimo de conservación en determinadas especies, sin duda demanda mucho esfuerzo sobre todo si existe mucha variabilidad genotípica.

La presencia de inhibidores de crecimiento, es fundamental para el correcto establecimiento de un banco de conservación de germoplasma, en la que se busca aletargar el proceso de desarrollo del material vegetal. Entre estos inhibidores tenemos el ABA, como Loureiro (2011) que empleó concentraciones de 0,5 y 1,0 mg/L para disminuir el desarrollo de *Piper aduncum*. También se puede reducir la tasa de desarrollo vegetal con la modificación en las concentraciones del medio de cultivo adicionando alguna tipo de carbohidrato como manitol, sorbitol, sacarosa, entre otros (Cruz et al, 2011) (Morante, 2013) (Rayas et al, 2013) (Díaz et al, 2013)

Por otro lado, en *Cedrela montana*, otra especie forestal de importancia económica, se evaluó la conservación de germoplasma en usando dos tipos de explantes (yemas apicales con raíces y yemas apicales sin raíces) con dos concentraciones de manitol (40 y 60 g/L) y combinaciones de ABA (0,1 y 0,5 mg/L), obteniendo una tasa de supervivencia superior a 50% de plántulas en todos los tratamientos ensayados. Los mejores tratamientos en la conservación de germoplasma incorporaron manitol 6% y ABA 0,1 mg/L, aunque el crecimiento de brotes en ambos tratamientos, manitol y ABA, inhibió la conservación

durante 6 meses; sin embargo, la capacidad de brotamiento resultó exitosa cuando los explantes fueron posteriormente transferidos a MS suplementado con ABA 0,5 mg/L y AIB 1,0 mg/L (Díaz et al, 2013).

2.2 BASES TEÓRICAS

Descripción botánica “cercillo” *Muntingia calabura* L.

Muntingia calabura L. (Muntingiaceae/ Elaeocarpaceae), también conocido con los nombres vulgares: “cerezo”, “chitato”, “cercillo”, “memizo”, “guásima cerezo”, “puam”, “capulinas”, es un árbol de hasta 10 m de altura. Corteza externa lisa, levemente fisurada, marrón oscuro; corteza interna fibrosa. Ramas terminales cilíndricas. Hojas simples, alternas, dísticas, de 6.5 -11 cm de largo y 2 - 4 cm de ancho, las láminas lanceoladas o estrechamente ovadas, con ápice acuminado, base asimétrica, borde aserrado o dentado, trinervias a palmatinervias, con haz (superficie adaxial) y envés (superficie abaxial) pubescentes. Flores hermafroditas, axilares o en fascículos, blancas; cáliz con 5 sépalos libres; corola con 5 pétalos blancos, obovados, con el ápice truncado; estambres varios, libres, amarillos, glabros. Fruto una baya globosa de 1-1.5 cm de diámetro, rojiza a purpúrea (Peña et al, 2010). Pulpa de color marrón claro, suave y muy jugosa. El número de semillas por fruto es de 5,139 aproximadamente (Hernández et al, 2011), son fotoblásticas positivas y tardan hasta cuatro semanas en germinar, son consideradas como recalcitrantes, pero no existen suficientes estudios que respalden su clasificación. El porcentaje de germinación en semillas frescas varía de 30 a 60% (Salazar y Soihet, 2001).

Distribución

La planta se encuentra distribuido en la zona tropical de México, además de sembrarse en Centroamérica, Las Antillas, Sudamérica (Bolivia, Colombia y Brasil), el Sureste de Asia y en Estados Unidos, principalmente en Florida (Salazar y Soihert, 2001). *M. calabura* es una especie de rápido crecimiento que se adapta muy bien a todo tipo de suelos (ácidos y alcalinos) (Chízmar, 2009), prefiriendo suelos ligeros con un pH de 5,5-6.5. Habita en climas cálido y semicálido desde el nivel del mar hasta los 1800 msnm, con precipitaciones anuales de 1000 a 2000 mm y temperaturas de 14 a 33 °C (Salazar y Soihet, 2001). Está asociada a la vegetación perturbada derivada de bosques tropicales caducifolios o perennifolios y selva tropical subcaducifolia, formando parte de la vegetación secundaria, cuando el sistema natural es alterado (Maldonado et al, 2004).

Fitoquímica

El análisis fitoquímico cualitativo del extracto etanólico de las hojas frescas de *M. calabura* mostró la presencia de alcaloides, compuestos fenólicos, terpenos y flavonoides y de la corteza fresca flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, terpenos y saponinas (Márquez et al, 2007) (Bao et al, 2003). Recientemente, se realizaron análisis fitoquímicos cualitativo y cuantitativo de hojas y frutos. Entre los fitoquímicos evaluados se observó la presencia de hidratos de carbono, glucósidos, taninos, compuestos fenólicos, proteínas y aminoácidos. El rendimiento total obtenido a partir 15 g de polvo fue 09,95% para hoja y 16.01% para frutos. Se determinó que el contenido de carbohidratos fue mayor en la hoja ($204,0 \pm 3,46$ mg/g) en comparación con el fruto ($75,33 \pm 4.61$ mg/g), pero el contenido de proteína fue mayor con extracto de fruta ($6,44 \pm 0,15$ mg/g) en comparación con el extracto de hoja ($2,04 \pm 0,15$ mg/g);

asimismo, se detectaron alcaloides, flavonoides y antraquinonas (Krishnaveni y Dhanalakshmi, 2014).

Neto (2013) propone que *M. calabura* tiene potencial como futuro bioinsecticida, al observar que la efectividad tóxica de los extractos en larvas de *Plutella xylostella* (Lepidoptera, Plutellidae)

Descripción botánica “Guayacán negro” *Tabebuia billbergii*

En cuanto a *Tabebuia billbergii* (Bureau & K. Schum.) Standl. (Bignoniaceae), es un árbol caducifolio, mediano hasta 14 m de altura, la corteza es fisurada de color pardo oscuro, fuste cilíndrico, hojas decusadas, digitadas con 2 a 5 foliolos, ovados angostos, borde entero, ápice agudo a acuminado, la base redondeada, el tamaño de los foliolos alcanza 10 cm de largo y 5 cm de ancho, el foliolo terminal es más grande, los laterales más pequeños, consistencia membranácea a cartácea, generalmente glabros o simplemente puberulentos a lo largo de la vena media. Inflorescencia de 2 a 8 flores en racimo terminales. Flores con cáliz campanulado, pubescente, con tricomas estrellados denso en la base. La corola amarilla con estrías rojizas en la garganta, tubiliforme, 6 a 8 cm de largo. El fruto cápsula oblonga 17 a 29 cm largo, 8 a 10 mm ancho, semillas delgadas bialadas (INRENA, 2002).

Distribución

T. billbergii es una especie representativa del bosque estacionalmente seco (BES), un ecosistema muy frágil que se extiende desde la península de Santa Elena, en el sur del Ecuador, hasta el noroeste del Perú, comprendiendo la costa de las regiones Tumbes, Piura, Lambayeque y el norte de La Libertad así como el piso inferior del valle del Marañón; estas dos áreas se comunican a través del Paso de Porculla, una depresión de 2100 m de elevación, considerada la más baja de los Andes peruanos (Brack y Mendiola, 2004).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Material vegetal

El material vegetal estuvo constituido por semillas de las especies *M. calabura* y *T. billbergii* obtenidos de frutos maduros colectados en el caserío de Pilasca del distrito de Salas (Lambayeque, Perú) y El Bosque Zapotillo (Loja, Ecuador). Luego de germinadas las plántulas *in vitro* constituyeron el material de experimentación para las fases posteriores de la investigación.

3.1.2 Medios de cultivo

A. Preparación del medio de cultivo basal para propagación

El medio de cultivo basal estuvo constituido por las sales inorgánicas MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementadas con las vitaminas tiamina.HCl 0,4 mg/L y m-inositol 100 mg/L (Cuadro 1), sacarosa 2.0 %, como fuente de carbohidratos. El pH del medio de cultivo fue ajustado en $5,8 \pm 0,1$ con NaOH y HCl 0,1N, para luego suplementarlo con agar-agar 0,6%, como agente gelificante.

Los reguladores de crecimiento variaron dependiendo del experimento, utilizando entre estos: 2,4-D, ANA, AIB, BAP, KIN, 2iP, TDZ y ABA. Posteriormente, se envasaron en sus respectivos recipientes de vidrio (frascos tipo compota o tubos de ensayo de 18x150 y 25x 150 mm). Se esterilizaron en autoclave por 25 minutos a 121 °C de temperatura y 15 lbs/pulg² de presión.

Cuadro 1. Composición química del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) utilizado en el cultivo *in vitro* de *M. calabura* y *T. billbergii*.

Solución Madre Nº	Constituyentes químicos	Concentración (mg/L)	Volumen de la Solución Madre/Litro Medio Basal* (ml)
1	NH ₄ NO ₃	1650	20,0
	KNO ₃	1900	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	
	KH ₂ PO ₄	170	
	H ₃ BO ₃	6,2	
2	MnSO ₄ .H ₂ O	22,3	1,0
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	
3	KI	0,83	1,0
4	CaCl ₂ .2H ₂ O	440,0	3,0
5	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	5,0
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	
6	Tiamina.HCl	0,4	1,0
7	Mio-Inositol	100	12,5

Fuente: Guía de estudio para el cultivo de meristemas de yuca (Roca, 1980) del Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. Cali - Colombia.

B. Medio de cultivo utilizado en la germinación de semillas de *M. calabura* y *T. billbergii*.

El medio de cultivo estuvo constituido por las sales minerales MS suplementado con vitaminas (Cuadro 1), sacarosa 2,0% y agar 0,6% como agente gelificante. El pH fue ajustado en $5,8 \pm 0,1$.

C. Medio de cultivo utilizado para el efecto de las citocininas en el brotamiento *in vitro* de *M. calabura* y *T. billbergii*.

El medio de cultivo estuvo constituido por las sales minerales MS y vitaminas (Cuadro 1), suplementado con sacarosa 2,0% y agar 0,6% como agente gelificante y dos concentraciones de las citocininas: BAP, KIN, 2iP y TDZ (Cuadro 2). Se tuvo en cuenta un tratamiento testigo T0.

Cuadro 2. Tratamientos en estudio del efecto de las citocininas BAP, KIN, 2iP y TDZ en el brotamiento de *M. calabura* y *T. billbergii*.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mg/L)			
	BAP	KIN	2iP	TDZ
T0	-	-	-	-
T1	0,5	-	-	-
T2	1,0	-	-	-
T3	-	0,5	-	-
T4	-	1,0	-	-
T5	-	-	0,5	-
T6	-	-	1,0	-
T7	-	-	-	0,5
T8	-	-	-	1,0

Fuente: Elaborado por el autor

D. Medio de cultivo utilizado para el efecto de las auxinas en la callogénesis *in vitro* de *M. calabura* y *T. billbergii*.

El medio de cultivo estuvo constituido por las sales minerales MS y vitaminas (Cuadro 1), suplementado con sacarosa 2,0% y agar 0,6% como agente gelificante y diversas concentraciones de 2,4-D y ANA (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos en estudio del efecto de las auxinas 2,4-D y ANA en la callogénesis de *M. calabura* y *T. billbergii*.

Reguladores de crecimiento (mg/L)		
Tratamiento	2,4-D	ANA
T0	-	-
T1	0,1	-
T2	0,5	-
T3	1,0	-
T4	2,0	-
T5	-	0,1
T6	-	0,5
T7	-	1,0
T8	-	2,0

Fuente: Elaborado por el autor

E. Medio de cultivo utilizado para el enraizamiento *in vitro* de *M. calabura* y *T. billbergii*.

El medio de cultivo estuvo constituido por las sales minerales MS y vitaminas (Cuadro 1), suplementado con sacarosa 2,0%, agar 0,6%, como agente gelificante y diversas concentraciones de AIB; asimismo, del medio de cultivo de enraizamiento denominado convencionalmente 17 N constituido por las sales MS suplemento con ANA y AG₃ 0,01 mg /L (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tratamientos en estudio del efecto del AIB y 17N en el enraizamiento *in vitro* de *M. calabura* y *T. billbergii*.

Reguladores de crecimiento (mg/L)			
Tratamiento	AIB	AG ₃	ANA
T0	-	-	-
T1	0,1	-	-
T2	0,5	-	-
T3 / 17N	-	0,01	0,01

Fuente: Elaborado por el autor

F. Medio de cultivo utilizado en el efecto de la interacción auxina - citocinina en la regeneración *in vitro* de *M. calabura* y *T. billbergii*.

El medio de cultivo estuvo constituido por las sales minerales MS y vitaminas (Cuadro 1), suplementado con sacarosa 2,0% y agar 0,6% como agente gelificante y diversas combinaciones de 2,4-D, ANA y BAP (Cuadro 5).

Cuadro 5. Tratamientos en estudio del efecto de la interacción ANA-BAP y 2,4-D-BAP en la regeneración *in vitro* de *M. calabura* y *T. billbergii*.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mg/L)		
	ANA	2,4-D	BAP
T0	-	-	-
T1	2,0	-	0,1
T2	2,0	-	0,5
T3	-	0,1	0,1
T4	-	0,1	0,5

Fuente: Elaborado por el autor

G. Medio de cultivo utilizado en la conservación de germoplasma *in vitro* de *M. calabura* y *T. billbergii*.

El medio de cultivo estuvo constituido por las sales minerales MS y vitaminas (Cuadro 1), suplementado con sacarosa 2,0%, agar 0,6% como agente gelificante y diversas combinaciones de manitol y ABA (Cuadro 6).

Cuadro 6. Tratamientos en estudio del efecto de la interacción ABA-manitol en la conservación *in vitro* de germoplasma de *M. calabura* y *T. billbergii*.

Tratamiento	Sin raíz		Con raíz	
	ABA (mg/L)	Manitol (%)	ABA (mg/L)	Manitol (%)
T0	-	-	-	-
T1	0,5	-	0,5	-
T2	1,0	-	1,0	-
T3	-	4,0	-	4,0
T4	-	2,0	-	2,0
T5	0,5	2,0	0,5	2,0
T6	1,0	2,0	1,0	2,0
T7	0,5	4,0	0,5	4,0
T8	1,0	4,0	1,0	4,0

Fuente: Elaborado por el autor

H. Preparación del sustrato para aclimatación.

El material que se utilizó como sustrato en la transferencia de plantas de *M. calabura* y *T. billbergii*, de una condición *in vitro* a suelo, estuvo constituido por tierra vegetal, arena de río y vermiculita, los que fueron combinados y esterilizados en horno a 50 °C de temperatura durante 60 minutos. Posteriormente, se distribuyeron en vasos de plástico y humedecidos con agua destilada. Se plantearon los siguientes tratamientos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Tratamientos en estudio para la aclimatación de plantas *in vitro* de *M. calabura* y *T. billbergii*.

Tratamientos	Sustratos	Combinación
T1	Tierra vegetal	1
T2	Arena + Tierra vegetal	1:1
T3	Vermiculita + Tierra vegetal	1:1

Fuente: Elaborado por el autor

3.2 Metodología

3.2.1 Procedimiento seguido en el cultivo *in vitro*

a. Preparación de la cámara de flujo laminar horizontal de aire esterilizado.

Se utilizó la cámara de flujo laminar horizontal de aire esterilizado, cuyo principio consiste en un sistema de filtros que sirven para purificar el aire del ambiente impelido por un ventilador accionado a motor, la misma que fue activada 15 minutos antes de iniciar cada sesión de trabajo correspondiente en las diferentes etapas de la investigación. Las paredes laterales y mesa fueron limpiadas con alcohol etílico embebido en algodón, para garantizar la asepsia.

b. Preparación para la sesión de cultivo

El operador se lavó las extremidades superiores hasta la altura del codo en un flujo constante de agua y jabón antibacterial, se proveyó de una chaqueta limpia y cubre boca o barbijo antes de iniciar el proceso de cultivo *in vitro*.

El material de disección para el cultivo *in vitro* estuvo constituido por pinzas y bisturíes sumergidos en tubos de ensayo con alcohol etílico 96%, este material fue esterilizado mediante flameado en el mechero de alcohol antes de iniciar la sesión de cultivo *in vitro*. También se contó con alcohol etílico 70% para desinfectar constantemente las manos y superficie de trabajo. Se utilizaron también placas de Petri esterilizadas, film plástico adhesivo para el sellado de tubos y marcador indeleble.

c. Desinfestación y cultivo del material vegetal

En el establecimiento del cultivo aséptico, el material vegetal fue sometido a diferentes tratamientos. En el caso de semillas, estas se sometieron a un proceso de desinfestación con alcohol etílico 70% durante un minuto y luego con una solución (1:1) de hipoclorito de sodio comercial (5,25% de cloro activo) durante 5-7 minutos, ambos desinfestantes fueron removidos con tres enjuagues con agua destilada esterilizada. Posteriormente se procedió a depositar el material vegetal en los tubos y frascos conteniendo los medios de cultivo, flameando los bordes en la llama del mechero antes de tapar y sellar con plástico adhesivo. Cada frasco y tubo fue rotulado de manera conveniente

En el caso de los explantes establecidos previamente *in vitro*, no fue necesario la desinfestación, únicamente la disección y cultivo en los tratamientos correspondientes, por considerarse la asepsia *per se*.

d. Incubación de los cultivos *in vitro*

Los cultivos fueron instalados en el cuarto de incubación en las siguientes condiciones físicas:

Temperatura: 24 – 28 °C

Iluminación: oscuridad total para germinación

Humedad relativa: 85-90%

Fotoperiodo: 16/8 h (luz/oscuridad), dependiendo de la fase del experimento.

Irradiancia: lámparas fluorescentes de luz fría de una intensidad de 50 – 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

A. Germinación de semillas *in vitro*

Las semillas utilizadas para propagación, fueron aquellas que presentaron las mejores condiciones morfológicas, fisiológicas y fitosanitarias, con la finalidad de obtener plantas vigorosas y mínima contaminación de los medios de cultivo, no siendo necesarias la adición de hormonas para inducir germinación, por tratarse de semillas frescas, tampoco fue necesario ningún proceso de escarificación.

El proceso de desinfestación para el caso de *T. billbergii* fue el mismo indicado anteriormente. En el caso de semillas de *M. calabura*, debido a su tamaño pequeño, se procedió a desinfestar el fruto completo.

En *T. billbergii*, las semillas se colocaron sobre la superficie del medio de cultivo con la parte convexa hacia la parte superior del tubo de ensayo y la parte cóncava en contacto con el medio de cultivo, a razón de una semilla por tubo de ensayo, mientras que en *M. calabura*, las semillas se colocaron de dos maneras: solo semillas y semillas con parte del pericarpio del fruto; no fue posible tener en cuenta el número exacto de semillas por tubo de ensayo para esta especie debido a su pequeño tamaño.

B. Efecto de las citocininas en el brotamiento *in vitro*

El tipo de explante para este experimento estuvo constituido por segmentos nodales con uno a tres nudos y cotiledones de plantas germinadas *in vitro*, de aproximadamente 30 días de edad. Estas plántulas fueron colocadas en placas de Petri esterilizadas para mantener la asepsia, y con ayuda de pinzas y escalpelos se realizó la disección de las estructuras indicadas,

colocándolos en el medio de cultivo haciéndolo entrar en contacto con el medio de cultivo (Cuadro 2).

C. Efecto de las auxinas en la callogénesis *in vitro*

El tipo de explante para este experimento estuvo constituido por fragmentos de las plántulas germinadas *in vitro*, como cotiledones, hipocótilos y raíces, de aproximadamente 0,5 a 1,0 cm de longitud los cuales se disectaron con ayuda de pinzas y escalpelos.

Luego los explantes fueron colocados en los frascos conteniendo el medio de cultivo según los tratamientos experimentales (Cuadro 3), a razón de cuatro explantes por frasco.

En la Figura 1 se muestra de manera esquemática las respuestas en la formación de callos en los tejidos utilizados, para ello se elaboró una escala empírica que permitió una valoración en la evaluación de la formación de callos y se dieron valores para las pruebas estadísticas:

(-) no existió desarrollo de callo tomando el valor 0
(+) el callo abarcó 25% del explante inicial tomando el valor 1
(++) el callo abarcó 50% del explante inicial tomando el valor 2
(+++) el callo abarcó 75% del explante inicial tomando el valor 3
y (++++) el callo abarcó 100% del explante inicial tomando el valor 4. En el valor 0, sólo se observó necrosis en el explante inicial.

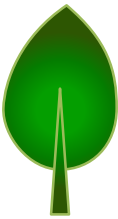
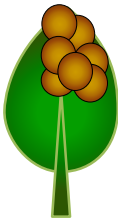
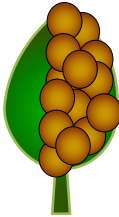
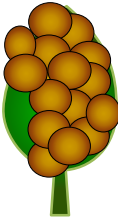
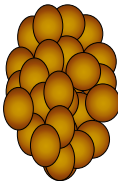
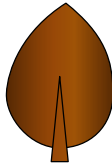
Inicial	+	++
		
+++	++++	-
		

Figura 1. Escala empírica para la evaluación de la formación de callos.

D. Enraizamiento *in vitro*

Los explantes estuvieron constituidos por ápices caulinares de plántulas obtenidas mediante germinación de semillas *in vitro* con una edad mayor a 60 días y con más de 1,5 cm de altura. En el caso de *T. bilbergii* en las placas de Petri se cortó aproximadamente 0,5 cm por debajo del nudo cotiledonar, se separaron hojas y cotiledones. Luego, los explantes fueron cultivados en el medio de cultivo conteniendo el tratamiento experimental correspondiente (Cuadro 4), a razón de un explante por tubo de ensayo.

E. Efecto de la interacción auxina – citocinina en la organogénesis *in vitro*.

Los explantes para este experimento estuvieron constituidos por fragmentos de callos (verdosos y friables) formados en presencia de auxinas. Los explantes fueron colocados en los frascos conteniendo el medio de cultivo de los correspondientes tratamientos experimentales (Cuadro 5), a razón de dos explantes por frasco.

F. Conservación de germoplasma

Los explantes para este experimento estuvieron constituidos por ápices caulinares de plántulas obtenidas mediante germinación de semillas *in vitro* con más de 3 cm de altura, aproximadamente. En esta fase experimental fueron abordadas dos alternativas, en el primer caso, en placa de Petri fue separada la raíz de la plántula, para el tratamiento “sin raíz” y en el segundo caso, para el tratamiento “con raíz”, se dejó 5 mm de raíz aproximadamente (medido desde el cuello anatómico de la plántula hacia la raíz). Luego, los explantes fueron cultivados en tubos de ensayo conteniendo el medio de cultivo de los tratamientos experimentales para tal fin (Cuadro 6), a razón de un explante/tubo de ensayo.

G. Aclimatación del material vegetal

Las plántulas que ingresaron al proceso de aclimatación cumplieron con las siguientes características morfológicas; altura: 2 - 4 centímetros, buena constitución morfológica, más de 3 hojas verdes y expandidas y un buen sistema radicular.

El proceso de aclimatación se inició destapando los recipientes de vidrio, conteniendo las plántulas, 48 horas antes de su extracción. Las plántulas luego fueron extraídas con ayuda de una pinza recta, eliminando los restos de agar adheridos a las raíces con lavados de agua destilada, permaneciendo por 24 horas en agua destilada a temperatura ambiente y cubriéndolas con una bolsa de polietileno transparente humedecido en el interior. Luego se sembraron en los sustratos respectivos (Cuadro 7), cubriéndolas siempre con bolsas de polietileno transparente también humedecidas en su interior para crear el ambiente de alta humedad semejante al de los cultivos *in vitro*.

En cada una de las fases del trabajo, fueron establecidos los siguientes aspectos a evaluar:

- Porcentaje de germinación en semillas
- Porcentaje de contaminación
- Tamaño del epicótilo
- Tamaño de hipocótilo
- Tamaño total de la plántula
- Número de nudos por plántula
- Problemas fisiológicos (necrosis apical, vitrificación, fenolización, entre otras).
- Contaminación
- Respuestas morfogénicas (inducción de callos, brotes o raíces)
- Sobrevivencia de plántulas.

IV. RESULTADOS

4.1. Identificación taxonómica de las especies vegetales en estudio

a. *Muntingia calabura*.

El material vegetal colectado en el Caserío Pilasca a 4.32 km al Norte del Distrito de Salas, Región Lambayeque – Perú. Ubicación 6°14'14.6"S 79°35'34.4"W, fue identificado como *Muntingia calabura* L. (1753). Publicado en: Species Plantarum 1: 509. 1753. Se tomó en cuenta las “Claves para el reconocimiento de los grupos vegetales. Lambayeque – Perú” de Llatas (2009).

M. calabura está incluido en la siguiente clasificación taxonómica, de acuerdo a la APG IV.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malvales

Familia: Muntingiaceae

Género: Muntingia

Especie: *Muntingia calabura* L.

Género monoespecífico que se distribuye desde México hasta Bolivia.

Fruto, una baya globosa de 1-1,5 cm de diámetro, rojiza. Pulpa de color marrón claro, suave y muy jugosa, consumida por las aves silvestres y niños de las comunidades. La mayor parte del año se puede encontrar frutos. Semillas de tamaños inferiores a 1 mm, el número de semillas por fruto contado es 1 900 aproximadamente, son fotoblásticas; en condiciones naturales la germinación es escasa; sin embargo, en condiciones *in vitro* la germinación es superior al 90% (Cuadro 8). La viabilidad puede mantenerse hasta 6 meses a partir del día de colectados los frutos.

b. *Tabebuia billbergii*

El material vegetal colectado en el Bosque Zapotillo, Zapotillo a 240 km. de la ciudad de Loja, Ecuador). Ubicación: 4°22'46.5"S 80°14'56.9"W, fue identificado como *Tabebuia billbergii* (Bureau & K. Schum.) Standl. por el Dr. Guillermo E. Delgado Paredes.

T. billbergii está incluido en la siguiente clasificación taxonómica, de acuerdo a la APG IV.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Bignoniaceae

Género: *Tabebuia*

Especie: *Tabebuia billbergii* (Bureau & K. Schum.) Standl.

Las semillas fueron colectadas de frutos maduros próximos a la dehiscencia, y transportadas del lugar de colección hasta el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Recursos Genéticos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; almacenadas durante un mes desde colectadas hasta el día que comenzaron los experimentos de germinación *in vitro*. El fruto cápsula oblonga 20 cm largo, 8 mm ancho, semillas delgadas bialadas de 1,5 – 2 cm aproximadamente, de coloración pardo a marrón. Pasado un periodo de 6 meses las semillas perdieron viabilidad (Cuadro 9).

4.2. Germinación *in vitro*

Luego de instalado el material vegetal en cada uno de los tratamientos ensayados, se realizaron evaluaciones después de 30 días. En el Cuadro 8 se observan los resultados de germinación de *M. calabura*. Debido a que posee semilla pequeña ($< 0,1$ cm), las plántulas germinadas también resultaron ser pequeñas (1,3 cm aprox.); asimismo, también fue difícil el conteo de las mismas. (Figura 2). Para ello se tomó en cuenta el número de tubos de ensayo donde se sembró un promedio de 10 a 20 semillas. Esta siembra se realizó en tres sesiones, haciendo un total de tres lotes de 40, 50 y 50 tubos de ensayo conteniendo entre 10 y 20 semillas cada uno. Estos lotes tenían como única diferencia la variable tiempo, en que la semilla estuvo en condiciones de almacenamiento hasta por cuatro meses. Los resultados mostraron más de 90% de germinación, asegurando que las semillas no perdían su viabilidad por lo menos durante el tiempo de almacenamiento.

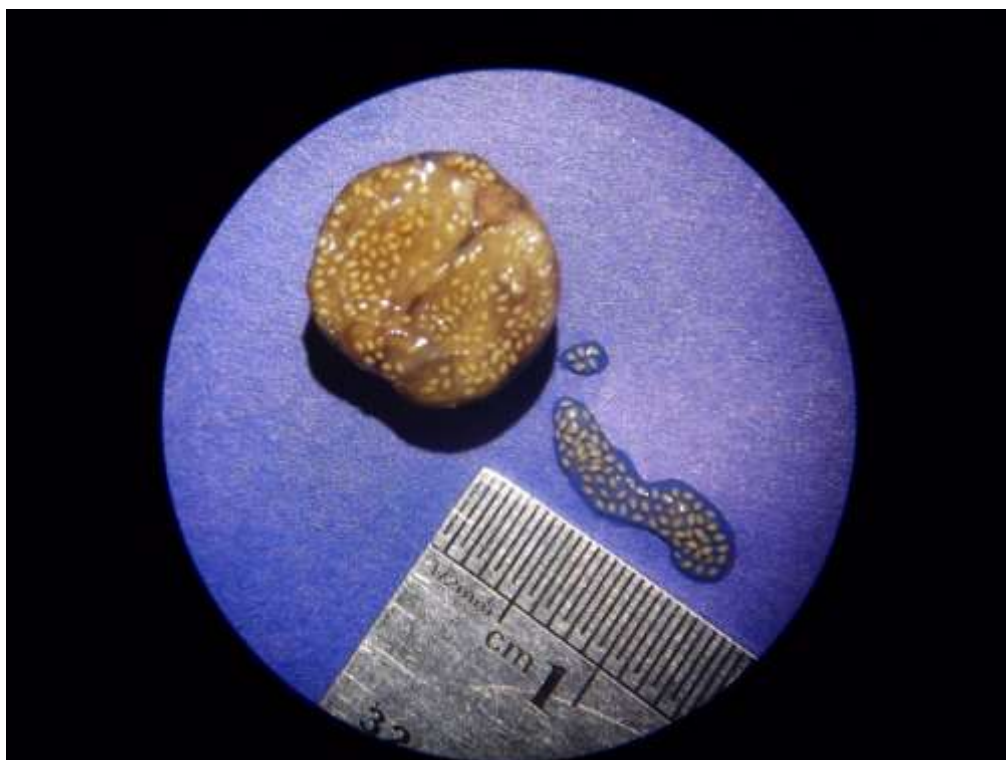


Figura 2. Tamaño de la semilla de *M. calabura*

Cuadro 8. Germinación de semillas *in vitro* de *M. calabura*

	Número	Porcentaje (%)
1º LOTE (0 meses)		
Semilla germinada	40	100
Semilla no germinada	0	0
Contaminados	0	0
TOTAL	40	100
2º LOTE (02 meses)		
Semilla germinada	48	96
Semilla no germinada	0	0
Contaminados	2	4
TOTAL	50	100
3º LOTE (04 meses)		
Semilla germinada	50	100
Semilla no germinada	0	0
Contaminados	0	0
TOTAL	50	100

Fuente: Elaborado por el autor

En el Cuadro 9, se observan los resultados de la germinación de *T. billbergii*. Esta especie presenta semillas fácil de observar y cuantificar (> 1,0 cm) teniendo en cuenta resultados directos de la cantidad de semillas cultivadas y germinadas (Figura 3). Se observaron plántulas albinas y la presencia de un contaminante de coloración marrón. Las semillas germinadas llegaron a 88,6% y 76% en el primer y segundo lote, respectivamente; en tanto que en el tercer lote el porcentaje de germinación fue 0%, lo que indicaría una pérdida de la viabilidad durante el periodo de almacenamiento.

Cuadro 9. Germinación de semillas *in vitro* de *T. billbergii*

	Número	Porcentaje (%)
1º LOTE (0 meses)		
Semillas germinada	116	88,6
Semilla no germinada	2	1,5
Planta albina	7	5,3
Contaminados	6	4,6
TOTAL	131	100
2º LOTE (02 meses)		
Semilla germinada	39	76,5
Semilla no germinada	11	21,6
Planta albina	0	0
Contaminados	1	1,9
TOTAL	51	100
3º LOTE (04 meses)		
Semilla germinada	0	0
Semilla no germinada	39	97,5
Planta albina	0	0
Contaminados	1	2,5
TOTAL	40	100

Fuente: Elaborado por el autor



Figura 3. Tamaño de la semilla de *T. billbergii*

La germinación fue exitosa en ambas especies ($> 75\%$), solo que en *T. billbergii*, al cabo de cuatro meses, pierde viabilidad (Cuadro 9 y Figura 4).

El bajo grado de contaminación que presentan, demuestra por un lado la limpieza de las semillas colectadas y por otro lado, que el proceso de desinfestación fue efectivo, descontando que el hecho de extraer las semillas contenidas dentro del fruto desinfestado garantizan la asepsia completa.

Las plántulas germinadas *in vitro* no sufrieron necrosis, durante el tiempo de evaluación.

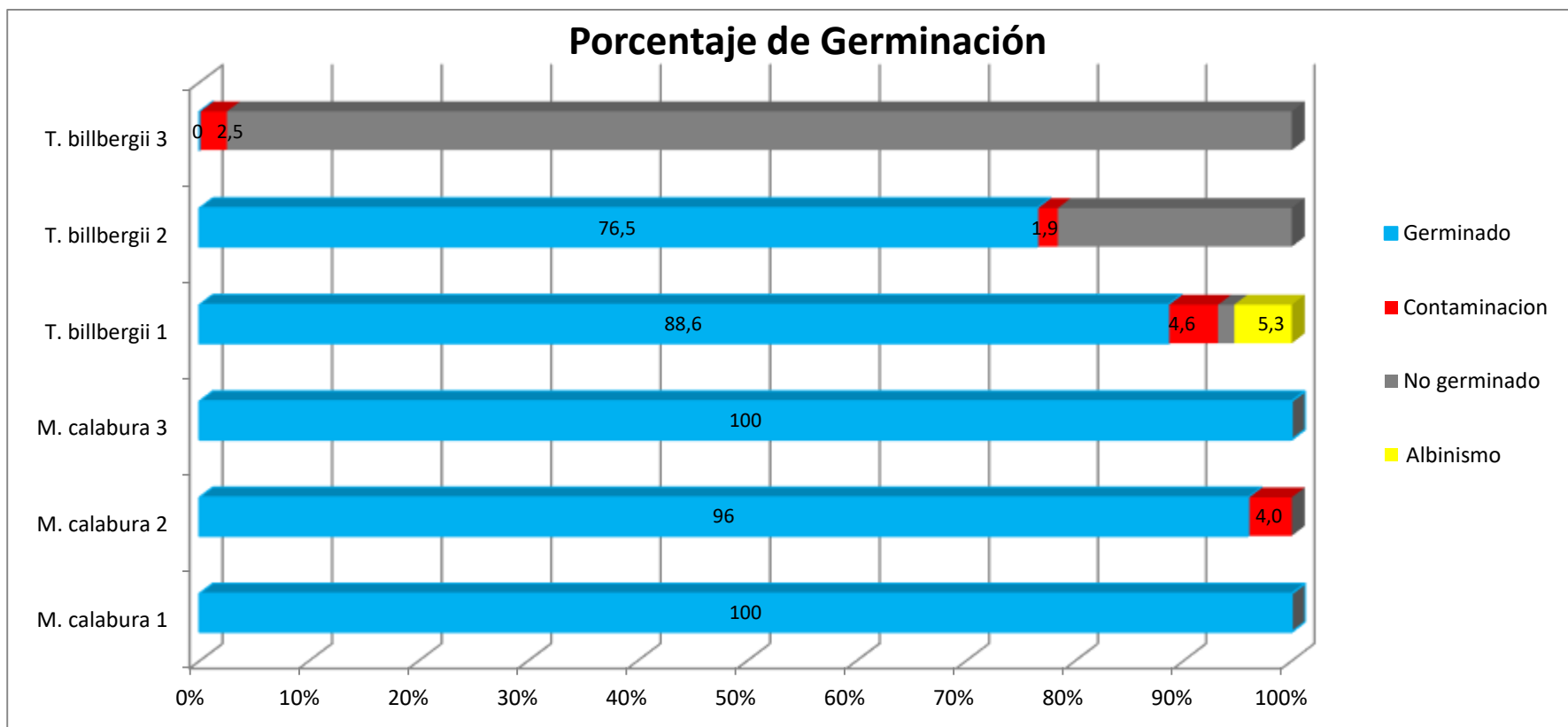


Figura 4. Comportamiento de lotes de semilla de las especies *M. calabura* y *T. billbergii* en germinación.

En el Cuadro 10, se observa la elongación de las plántulas germinadas *in vitro* de *M. calabura* luego de 30, 60 y 90 días en cultivo y el número de nudos después de 90 días. Para los días posteriores, no fue posible realizar mediciones debido al conglomerado de plántulas en los tubos de ensayo (Figura 4).

Cuadro 10. Elongación y el número de nudos de las plántulas de *M. calabura* germinadas *in vitro*

Nº de planta	(cm)			Nº de nudos (90 días)
	30 días	60 días	90 días	
1	1,8	2,6	3,8	4
2	1,6	2,8	2,6	2
3	1,1	2,0	3,1	3
4	1,0	1,9	2,5	3
5	1,2	2,0	2,7	5
6	1,2	1,8	2,9	4
7	1,4	2,4	3,4	5
8	1,1	2,2	3,0	5
9	1,6	2,5	3,4	4
10	1,3	1,9	2,8	3
	1,3	2,21	3,02	3.8

Fuente: Elaborado por el autor

En el Cuadro 11 se observa el promedio de elongación de las plántulas germinadas *in vitro* de *T. billbergii* en 30 – 180 días, número de hojas y número de nudos donde fue posible su determinación (Figura 5). No se tomó en consideración el lote 3 donde no se observó germinación de la semilla.

Cuadro 11. Elongación, número de nudos y hojas de plántulas de *T. billbergii* germinadas *in vitro.**

LOTE 1					
	Hipocótilo (cm)	Epicótilo (cm)	Total** (cm)	Número de nudos	Número de hojas
1 MES	2,4 ± 0,5	1,2 ± 0,6	3,6 ± 0,5	1,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0
2 MES	3,5 ± 1,1	2,1 ± 0,9	5,6 ± 1,6	1,7 ± 0,5	3,3 ± 1,0
3 MES	3,6 ± 1,1	2,5 ± 0,9	6,1 ± 1,5	3,2 ± 0,4	5,3 ± 1,2
4 MES	3,5 ± 0,9	2,7 ± 1,1	6,2 ± 1,4	3,4 ± 0,7	5,8 ± 1,9
5 MES	3,6 ± 1,1	3,0 ± 1,1	6,5 ± 1,3	3,9 ± 0,8	7,4 ± 2,3
6 MES	3,6 ± 1,1	3,0 ± 1,2	6,6 ± 1,4	4,2 ± 1,4	8,3 ± 2,4

LOTE 2					
1 MES	2,4 ± 0,5	1,5 ± 0,6	3,9 ± 0,7	1,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0
2 MES	2,6 ± 0,7	3,0 ± 0,9	5,6 ± 0,9	1,2 ± 0,4	2,5 ± 1,0
3 MES	2,8 ± 0,6	3,5 ± 0,9	6,3 ± 0,9	3,0 ± 1,6	2,5 ± 0,8
4 MES	2,8 ± 0,7	3,6 ± 1,0	6,5 ± 1,0	2,6 ± 0,8	3,5 ± 1,6
5 MES	2,8 ± 0,7	3,6 ± 1,2	6,4 ± 1,3	3,2 ± 1,2	5,2 ± 2,9
6 MES	2,9 ± 0,7	3,8 ± 1,2	6,7 ± 1,2	4,4 ± 1,7	6,5 ± 2,9

*Mediciones con desviación estándar.

**Tamaño total de la plántula (parte aérea).

Fuente: Elaborado por el autor

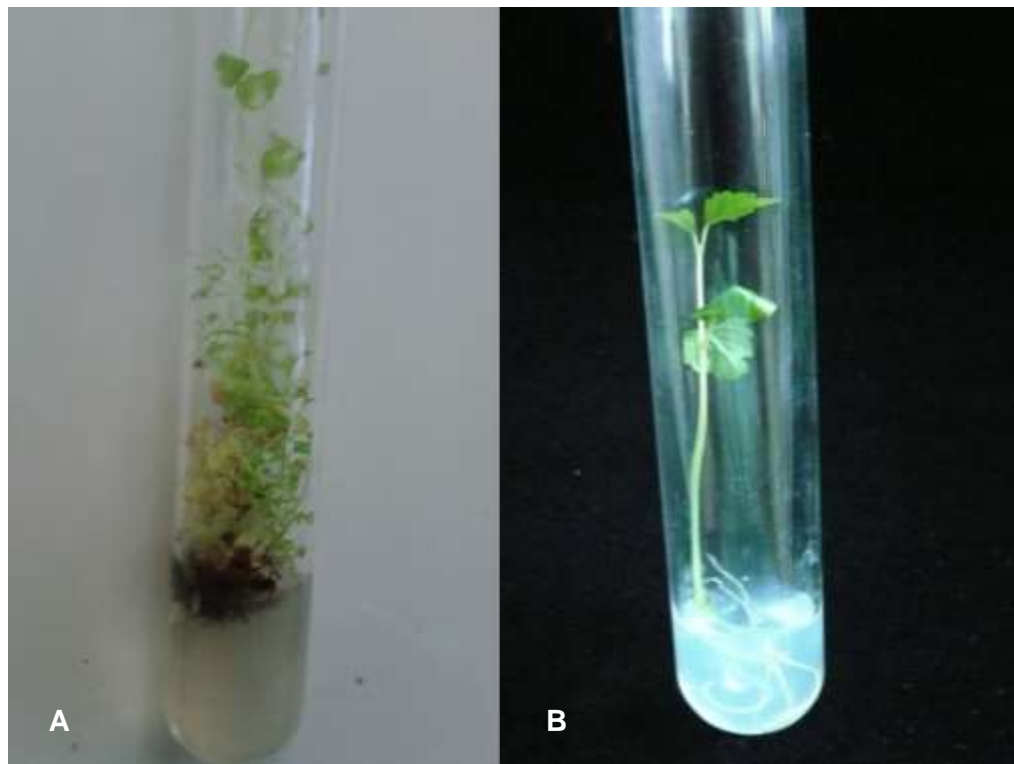


Figura 5. Plántulas germinadas *in vitro*. **A** *M. calabura* **B.** *T. billbergii*.

4.3. Efecto de las citocininas en el brotamiento *in vitro*

Luego de instalado el material vegetal en cada uno de los tratamientos ensayados, se realizaron evaluaciones después de 30 días. En el Cuadro 12 se observa los resultados de los tratamientos para la inducción de múltiples brotes teniendo en cuenta el tamaño y número de brotes de *M. calabura*. (Figuras 6 y 7).

Se aprecia diferencias significativas entre los tratamientos, teniendo así que el tratamiento con mayores resultados para el número de brotes fue el que incluyó KIN 0,5 mg/L (T3) y TDZ 1,0 mg/L (T8) para *M. calabura*. En cuanto al tamaño de los brotes inducidos *in vitro* en *M. calabura*, se observa diferencias significativas entre tratamientos, teniendo así que el tratamiento con mayores resultados para el tamaño de brotes fue el que incluyó KIN 0,5 mg/L (T3), 2iP 1,0 mg/L (T5) y 2iP 0,5 mg/L (T6).

Cuadro 12. Tamaño y número de brotes *in vitro* de *M. calabura*

Tratamiento	Tamaño de brotes (cm)	Número de brotes	Callos	color
T0	0,38 ± 0,1 c	1,50 ± 0,6 e	No	-
T1	2,09 ± 0,5 b	10,67 ± 2,1 b	Si	Crema
T2	2,04 ± 0,5 b	2,67 ± 1,2 de	Si	Crema
T3	2,27 ± 0,5 ab	18,00 ± 2,2 a	No	-
T4	1,83 ± 0,6 b	7,25 ± 2,9 bc	No	-
T5	3,11 ± 0,5 a	6,50 ± 0,6 cd	No	-
T6	2,76 ± 0,5 ab	7,50 ± 1,7 bc	No	-
T7	0,75 ± 0,2 c	11,01 ± 0,8 b	Si	Verde/marrón
T8	0,13 ± 0,2 c	16,50 ± 0,6 a	Si	Verde/marrón

Diferencia significativa entre tratamientos a nivel de significancia 0,05 (Prueba de Tukey $p < 0,05$)

Fuente: Elaborado por el autor

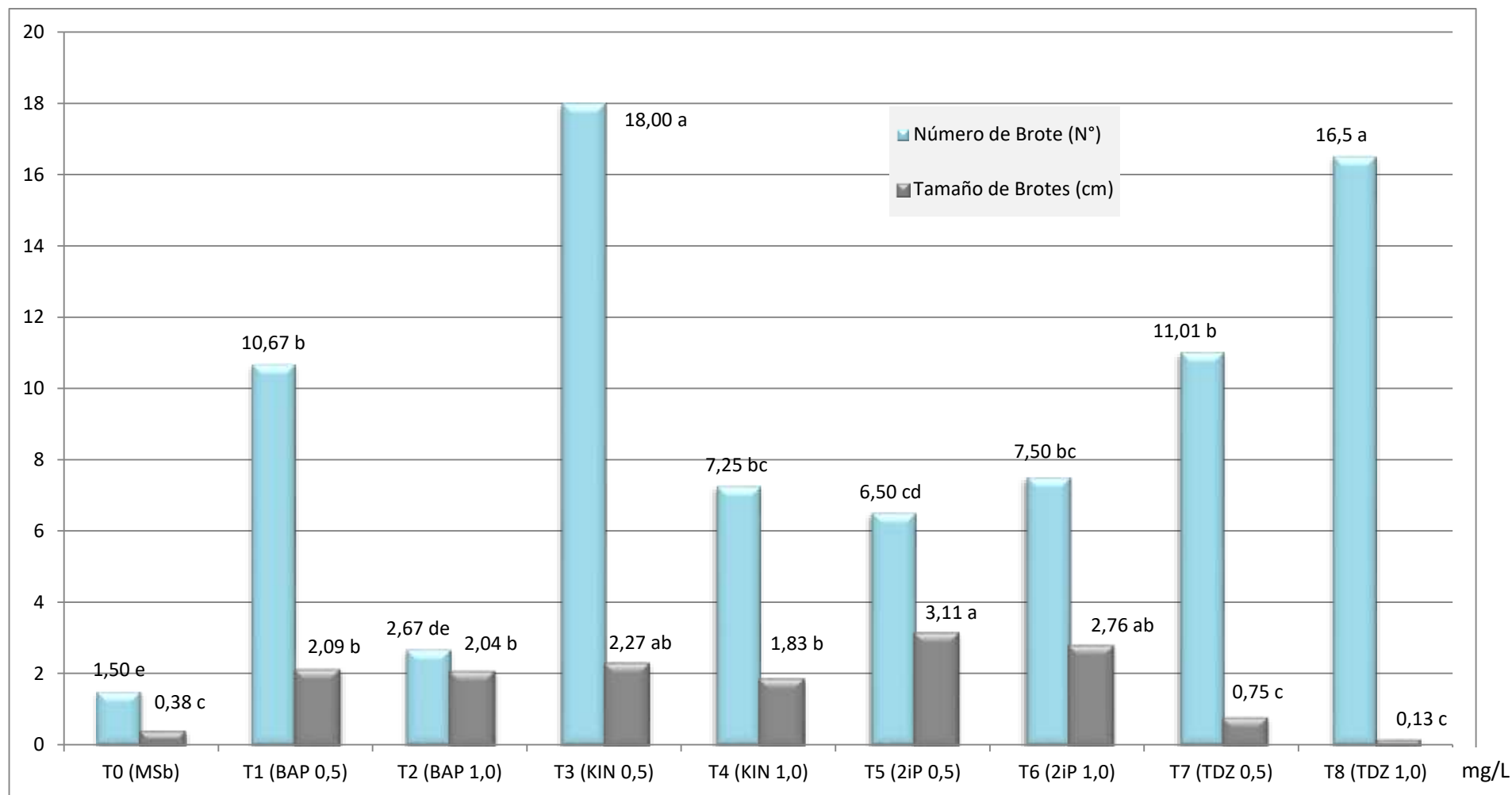


Figura 6. Efecto de las citocininas en el brotamiento: Tamaño y número de brotes de *M. calabura*

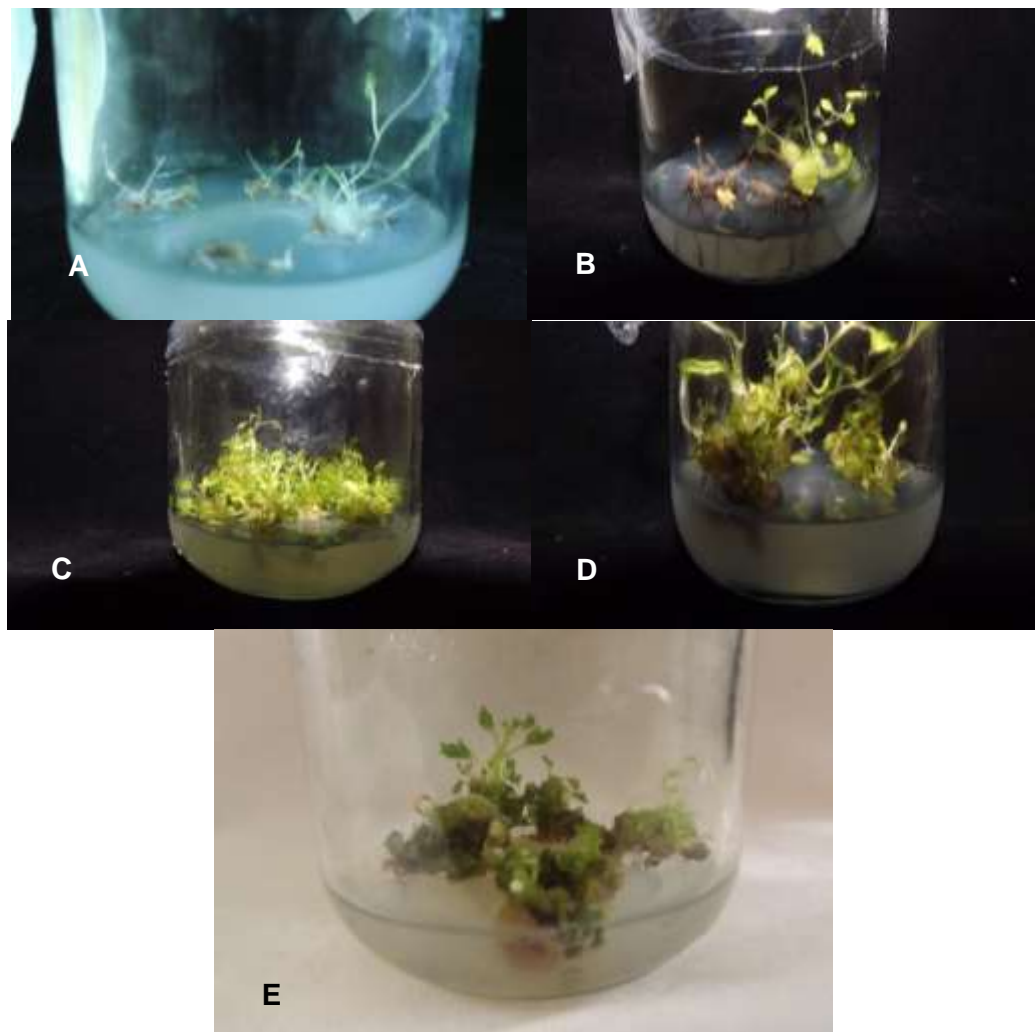


Figura 7. Efecto de las citocininas en el brotamiento de *M. calabura in vitro*. **A:** Tratamiento testigo, sin reguladores de crecimiento, **B:** BAP 1,0 mg/L, **C:** KIN 1,0 mg/L, **D:** 2iP 1,0 mg/L, **E:** TDZ 1,0 mg/L

Igualmente, fueron evaluados los tratamientos del efecto de las citocininas en *T. billbergii*, donde el material vegetal se valoró en porcentaje de sobrevivencia, tamaño (cm), número de brotes, número de hojas, entre otras respuestas organogénicas (Cuadro 13).

Cuadro 13. Tamaño y número de brotes *in vitro* de *T. billbergii*.

Tratamiento	Segmento nodal				Cotiledones			
	% sobreviv.	Tamaño (cm)	N° Brotes	N° Hojas	Callo	Color de callo	Raíz	Necrosis
T0	60	1,1± 0,2 f	1,3 ± 0,5 b	2,8 ± 1,0 b	No	-	-	No
T1	100	1,7 ± 0,2 de	2,4 ± 0,5 a	6,0 ± 2,0 a	No	-	-	No
T2	100	1,6 ± 0,2 e	2,5 ± 0,5 a	6,1 ± 2,0a	Si	marrón	No	No
T3	100	1,9 ± 0,2 bcd	1,1 ± 0,3 b	2,3 ± 0,6 b	No	-	-	Si
T4	90	2,1 ± 0,2 ab	1,1 ± 0,3 b	2,6 ± 1,2 b	No	-	-	No
T5	100	1,9 ± 0,3 bcd	1,1 ± 0,4 b	2,3 ± 0,7 b	Si	verde	Si	No
T6	100	2,2 ± 0,2 a	1,2 ± 0,4 b	2,5 ± 0,8 b	Si	verde	Si	No
T7	100	1,8 ± 0,2 cde	1,2 ± 0,4 b	2,4 ± 0,8 b	Si	crema	Si	No
T8	100	2,0 ± 0,3 abc	1,0 ± 0,0 b	2,1 ± 0,3 b	Si	crema	Si	No

Diferencia significativa entre tratamientos a nivel de significancia 0,05 (Prueba de Tukey $p < 0,05$)

Fuente: Elaborado por el autor

4.4. Efecto de las auxinas en la callogénesis *in vitro*

Luego de instalado el material vegetal en cada uno de los tratamientos ensayados, se realizaron evaluaciones después de 30 días. En la Figura 8 se observa la aplicación de la escala empírica para evaluar el porcentaje de callogénesis, escala que permitió dar valores al experimento para las pruebas estadísticas. La misma evaluación se repitió para los explantes de cotiledón, hipocótilo y raíz.

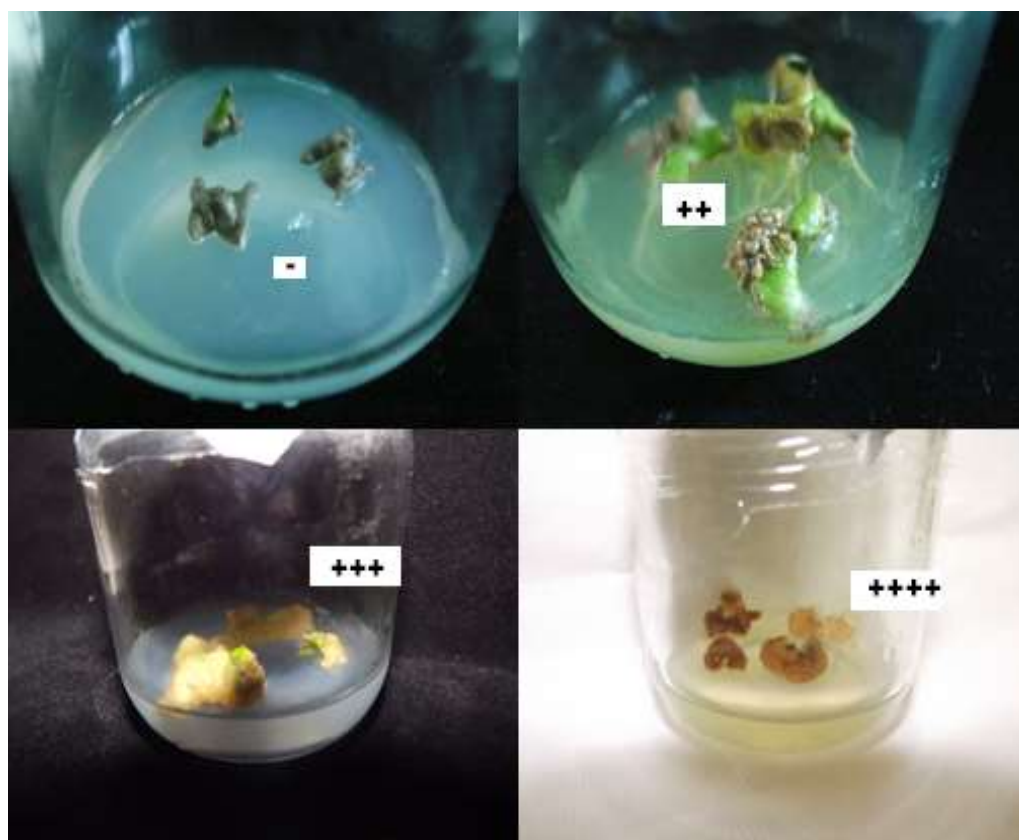


Figura 8. Desarrollo de callos en cotiledones de *T. billbergii*

Luego de establecido el cultivo, se observó el desarrollo de callos, brotes y raíces en *M. calabura* (Cuadro 14 y figura 9). Debido al tamaño y consistencia de las plántulas de *M. calabura* no se tomó en cuenta como explante inicial órganos de la misma (cotiledones, hipocótilos y raíces), sino fragmentos de la plántula que contenían más de un órgano. Teniendo como resultados no solo formación de callos sino otro tipo de respuesta organogénica. También se observó necrosis en concentraciones altas de la auxina 2,4-D (1,0 – 2,0 mg/L), lo que indicaría toxicidad de la hormona.

Cuadro 14. Efecto de las auxinas ANA y 2,4-D en la callogénesis de *M. calabura*.

T	Callo EE*	Brote	Raíz	Necrosis	Nº de brotes	Tamaño del brote (cm)	Callo
T1	++	No	Si	No	0	0	1,53 + 0,25
T2	+	No	Si	No	0	0	1,00 + 0,67
T3	-	No	No	Si	0	0	0
T4	-	No	No	Si	0	0	0
T5	-	Si	Si	No	>10	4,50 + 0,22 a	0
T6	-	Si	Si	No	>10	1,83 + 0,53 c	0
T7	-	Si	Si	No	4	2,43 + 0,59 bc	0
T8	-	Si	Si	No	>10	3,03 + 0,34 b	0

* Evaluación con la escala empírica

Diferencia significativa entre tratamientos a nivel de significancia 0,05 (Prueba de Tukey $p < 0,05$)

Fuente: Elaborado por el autor

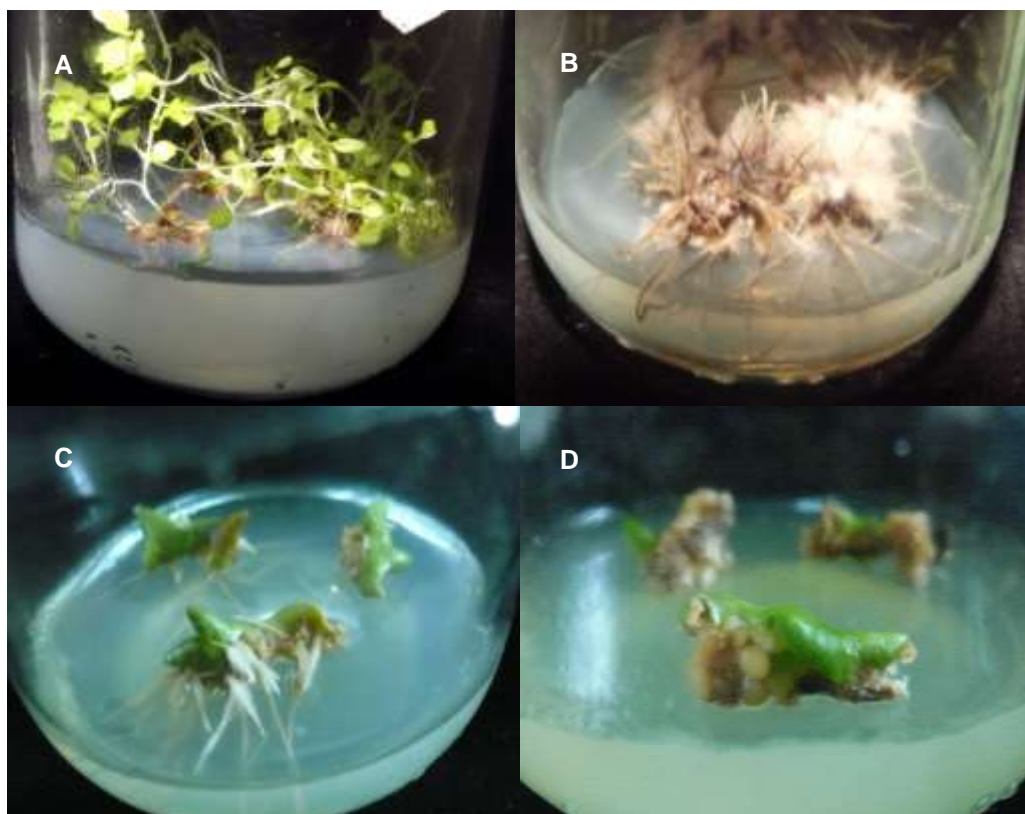


Figura 9. **A.** Efecto de ANA 0,1 mg/L en el desarrollo de brotes de *M. calabura*. **B.** Efecto de 2,4-D 0,1 mg/L en la inducción de callos rizogénicos en *M. calabura*. **C.** Efecto de ANA 0,1 mg/L en la inducción de callo rizogénico en *T. billbergii*. **D.** Efecto de 2,4-D 0,1 mg/L en la inducción de callos en *T. billbergii*.

En el Cuadro 15, se muestra el efecto de la acción de las auxinas: 2,4-D y ANA en *T. billbergii*, observándose una mayor formación de callo en el tratamiento que incluía ANA 2,0 mg/L, en cotiledones.

En los tratamientos para evaluar el efecto de las auxinas en la callogénesis de *T. billbergii* se observó un mayor efecto, en la formación de callos, en los tratamientos T7 y T8 que incluían ANA 1,0 y 2,0 mg/L. Contrariamente, en los tratamientos T3 y T4, con 2,4-D 1,0 y 2,0 mg/L, sólo se observó necrosis en los explantes, durante la fase de incubación (Figuras 8 y 9).

Cuadro 15. Efecto de las auxinas ANA y 2,4-D en la callogénesis de *T. billbergii*

TRAT.	Reguladores de crecimiento (mg/L)	E.E.*			Media \pm DS**
		Cotiledón	Hipocótilo	Raíz	
T1	2,4-D 0,1	+	++	+	1,17 \pm 1,0 bc
T2	2,4-D 0,5	-	++	+	1,36 \pm 1,4 bc
T3	2,4-D 1,0	-	+	-	0,33 \pm 0,5 c
T4	2,4-D 2,0	-	-	-	0,00 \pm 0,0 c
T5	ANA 0,1	+	+	-	0,75 \pm 0,6 bc
T6	ANA 0,5	+++	+	+	1,20 \pm 1,3 bc
T7	ANA 1,0	+++	++	+	2,08 \pm 1,4 ab
T8	ANA 2,0	++++	+++	++	2,94 \pm 1,3 a
		1,78 \pm 1,6 a	1,63 \pm 1,2 a	0,67 \pm 1,1 b	

* Evaluación con la escala empírica.

** Diferencia significativa entre tratamientos a nivel de significancia 0,05 (Prueba de Tukey $p < 0,05$)

Fuente: Elaborado por el autor

4.5. Enraizamiento *in vitro*

Al igual que los experimentos anteriores, las evaluaciones se realizaron luego de 30 días de establecido el cultivo. En el caso de *M. calabura*, en el cuadro 16, la presencia de AIB (0,1 mg/L), estimuló el enraizamiento en un alto porcentaje (92,8 %). El incremento de la concentración de AIB a 0,5 mg/L, provocó un ligero incremento en la tasa de mortalidad de los explantes llegando a 16,7 % (Cuadro 16) (Figura 11). El desarrollo de la parte aérea de la planta fue normal; no se observó fenolización en los medio de cultivo.

Cuadro 16. Efecto del AIB en el enraizamiento de ápices de *M. calabura*

	T0		T1		T2	
	N°	%	N°	%	N°	%
Enraizado	28	68,9	37	92,8	33	83,3
No enraizado	9	24,4	0	0,0	0	0,0
Muerto	3	6,7	3	7,2	7	16,7
Contaminado	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Total	40	100	40	100	40	100

Fuente: Elaborado por el autor



Figura 10. Enraizamiento de *M. calabura* en AIB 0,1 mg/L

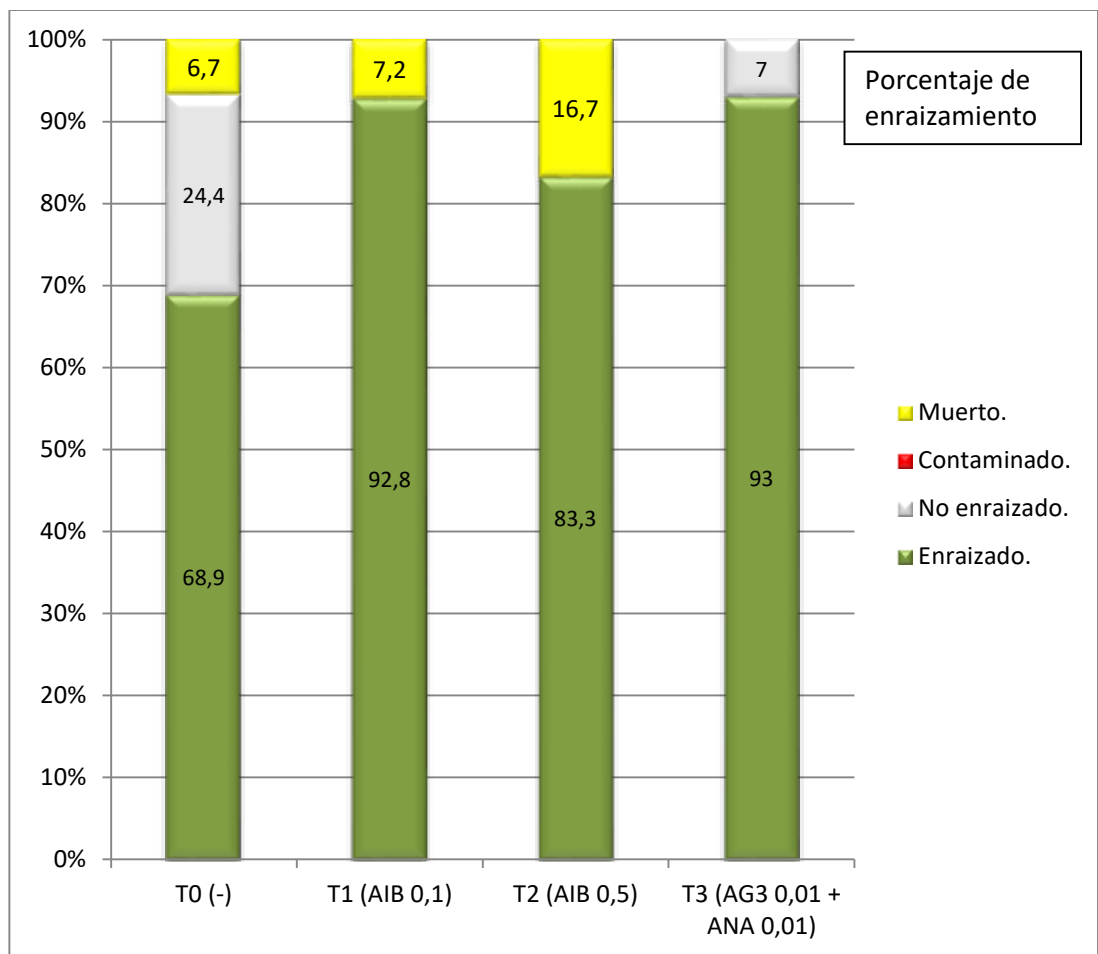


Figura 11. Evaluación comparativa de los tratamientos de enraizamiento en *M. calabura* (T0, T1, T2) y *T. billbergii*. (T3).

En el cuadro 17, se muestra el porcentaje de enraizamiento ápices de *T. billbergii*. Las raíces no pudieron ser medidas en su longitud debido al entrecruzamiento en el fondo del tubo de ensayo (Figura 12); se observó también que sólo 7% de plántulas no desarrollaron raíces, es decir, de 30 yemas cultivadas sólo dos no enraizaron. El medio de cultivo que incluyó AG₃ 0,01 mg/L + ANA 0,01 mg/L (T3) resultó ser el más eficaz. Lo que indicaría que *T. billbergii* es una especie fácil de enraizar *in vitro* con cualquier tratamiento hormonal.

Cuadro 17. Efecto del AG₃ 0,01 + ANA 0,01 mg/L (T3) en el enraizamiento de ápices de *T. billbergii*.

	N°	%
Enraizado	28	93
No enraizado	2	7
Contaminado	0	0
Muerto	0	0
Total	30	100

Fuente: Elaborado por el autor



Figura 12. Enraizamiento de *T. billbergii* en medio de cultivo MS suplementado con AG₃ 0,01 mg/L + ANA 0,01 mg/L.

4.6. Efecto de la interacción auxinas – citocininas en la organogénesis *in vitro*.

En el cuadro 18, luego de 45 días de instalado el material vegetal en cada uno de los tratamientos ensayados, se observan el número y elongación de los brotes de *M. calabura* en los diferentes tratamientos, así como la presencia de múltiples raíces y formación de callos (Figura 13). En los tratamientos T2 y T3 se observó contaminación, por lo tanto fueron descartados de la evaluación.

Cuadro 18. Efecto de la interacción auxinas – citocininas organogénesis en *M. calabura*.

Tratamiento	Número de brotes	Tamaño de brotes (cm)	Callo	Raíz
T1	4	3,70 ± 1,1	Si	Si
T2	-	-	-	-
T3	-	-	-	-
T4	>10	2,24 ± 0,5	Si	No

Fuente: Elaborado por el autor

En el caso de *T. billbergii* se observó la presencia de masas callosas en todos los tejidos. La mejor formación de callos, en 100% de la superficie del tejido (++++), se indujo en el tratamiento T2, que incluía ANA 2,0 mg/L + BAP 0,5 mg/L y el menor efecto (25 %) en presencia de 2,4-D 0,1 + BAP 0,1 mg/L, T3 (Cuadro 19). En cuanto al color, en todos los tratamientos los callos presentaron un color crema, a excepción del tratamiento T4 donde los callos presentaron un color verde.



Figura 13. Efecto de la interacción auxina – citocinina (ANA 2,0 mg/L+ BAP 0,1 mg/L) en *M. calabura*.

Cuadro 19. Efecto de la interacción auxinas – citocininas en la organogénesis en *T. billbergii*.

Tratamiento	Brote	Callo	Evaluación*	Color
T1	No	Si	+++	Crema
T2	No	Si	++++	Crema
T3	No	Si	+	Crema
T4	No	Si	+++	Verde

*Evaluación con la escala empírica

Fuente: Elaborado por el autor

4.7. Conservación de Germoplasma.

Luego de instalado el material vegetal, en cada uno de los tratamientos ensayados, se realizaron evaluaciones cada 30 días, y la evaluación final se realizó después de 180 días. En el Cuadro 20 se observa un alto porcentaje de mortalidad en menos de 30 días de cultivo en *M. calabura*, sobre todo en los tratamientos que incluía el regulador de crecimiento (ABA) en sus diferentes concentraciones: 0,5 y 1,0 mg/L. Algo similar se observó utilizando manitol 2,0 y 4,0%, adicionado al medio de cultivo para reducir el desarrollo de *M. calabura*, donde se obtuvo un bajo porcentaje de supervivencia (< 50%).

Cuadro 20. Conservación de germoplasma *in vitro* de *M. calabura*.

	Osmoregulador		Condición de cultivo	Viabilidad de los explantes	
	ABA (mg/L)	Manitol (%)		Vivos (%)	Muertos (%)
T0	-	-	Con raíz	100	0
			Sin raíz	100	0
T1	0,5	-	Con raíz	0	100
			Sin raíz	0	100
T2	1,0	-	Con raíz	0	100
			Sin raíz	0	100
T3	-	4,0	Con raíz	25	75
			Sin raíz	20	80
T4	-	2,0	Con raíz	16,7	83,3
			Sin raíz	50	50
T5	0,5	2,0	Con raíz	0	100
			Sin raíz	0	100
T6	1,0	2,0	Con raíz	40	60
			Sin raíz	0	100
T7	0,5	4,0	Con raíz	0	100
			Sin raíz	0	100
T8	1,0	4,0	Con raíz	0	100
			Sin raíz	0	100

Fuente: Elaborado por el autor

En el tratamiento ABA 0,0 mg/L el explante alcanzó una tasa de supervivencia de 100%, lo que indicaría que esta suplementación no resultó adecuada para la conservación *in vitro* para esta especie. En el tratamiento T0, sin suplementación de manitol y ácido abscísico, no se observó necrosamiento generalizado en los explantes; este tratamiento posibilitó la expresión de todos los órganos vegetales, con la excepción del sistema radicular (Figura 14).



Figura 14. Explantes de *M. calabura* sometidos a tratamientos para la conservación de germoplasma *in vitro*. T0 (tratamiento testigo), T2 (ABA 1,0 mg/L) y T4 (Manitol 2,0%).

En el Cuadro 21 se observa los resultados de los tratamientos para la conservación de germoplasma en *T. billbergii*, alcanzando un gran porcentaje de sobrevivencia (Figura 15) y el desarrollo normal de las plántulas en la mayoría de tratamientos con los inhibidores de crecimiento utilizados (ABA y manitol), en comparación con el tratamiento testigo T0, sin suplemento de manitol y ácido abscísico (Figura 16).

Cuadro 21. Conservación de germoplasma *in vitro* de *T. billbergii*

		Tamaño (cm)	Número de Hojas	Número de Raíces	Viabilidad (%)
T0	Con raíz	1,8 ± 0,2	2,0 ± 0,0 c	0,6 ± 0,9 b	0,0
	Sin raíz	1,6 ± 0,2		0,0 ± 0,0 b	
T1	Con raíz	4,8 ± 3,3	7,1 ± 3,4 b	2,7 ± 3,0 ab	70,0
	Sin raíz	3,5 ± 1,3		4,0 ± 4,2 ab	
T2	Con raíz	4,5 ± 0,4	8,6 ± 2,8 ab	3,5 ± 1,3 ab	100,0
	Sin raíz	5,3 ± 2,1		3,1 ± 1,9 ab	
T3	Con raíz	4,5 ± 0,2	5,3 ± 2,4 bc	1,0 ± 1,2 ab	80,0
	Sin raíz	4,8 ± 1,3		4,5 ± 1,6 a	
T4	Con raíz	3,6 ± 1,1	5,0 ± 1,7 bc	2,3 ± 2,2 ab	100,0
	Sin raíz	3,3 ± 0,2		2,0 ± 1,4 ab	
T5	Con raíz	3,3 ± 0,5	5,5 ± 2,5 bc	1,8 ± 1,3 ab	100,0
	Sin raíz	3,9 ± 1,2		1,9 ± 1,1 ab	
T6	Con raíz	4,6 ± 1,1	4,9 ± 2,2 bc	0,4 ± 0,8 b	81,8
	Sin raíz	5,2 ± 0,5		6,0 ± 3,6 b	
T7	Con raíz	4,8 ± 0,6	10,9 ± 0,9 a	0,3 ± 0,6 ab	87,5
	Sin raíz	4,6 ± 1,1		2,0 ± 1,4 b	
T8	Con raíz	3,9 ± 1,1	8,1 ± 2,6 ab	0,7 ± 0,8 ab	80,0
	Sin raíz	5,0 ± 1,4		3,0 ± 1,6 b	

Diferencia significativa entre tratamientos a nivel de significancia 0,05 (Prueba de Tukey p<0,05)

Fuente: Elaborado por el autor

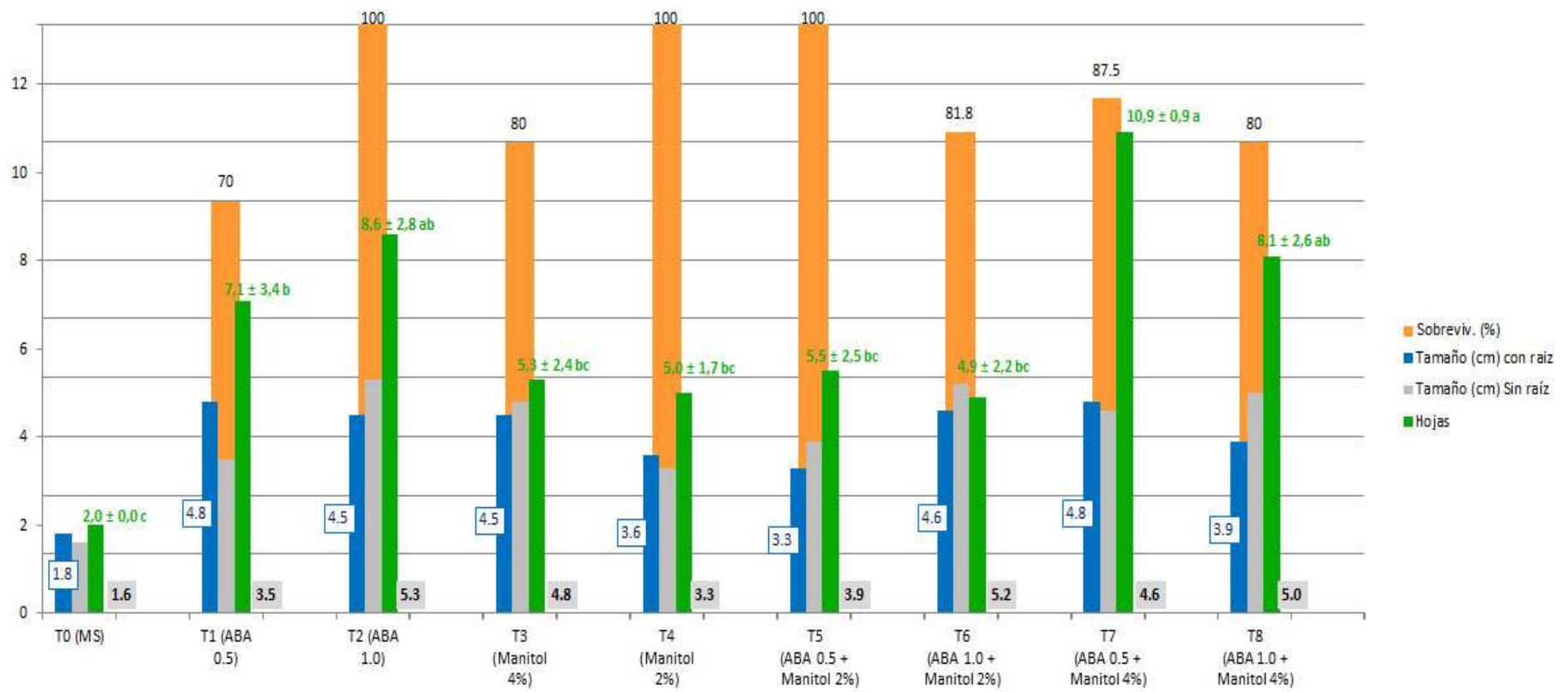


Figura 15. Conservación de germoplasma *in vitro* de *T. billbergii*.

En este experimento no hubo diferencias significativas entre los explantes con raíz y sin raíz inicial, observándose enraizamiento similar para ambos casos. No existen diferencias significativas en la elongación de los explantes entre los tratamientos ensayados con excepción del tratamiento T0, donde se necrosaron las plántulas a los 30 días de instalado el material vegetal. A diferencia de *M.calabura*, los explantes de *T. billbergii* sobrevivieron en todos los medios de cultivo suplementados con manitol y ácido abscísico. El desarrollo de los órganos vegetativos en el medio de cultivo de conservación *in vitro* fue normal.

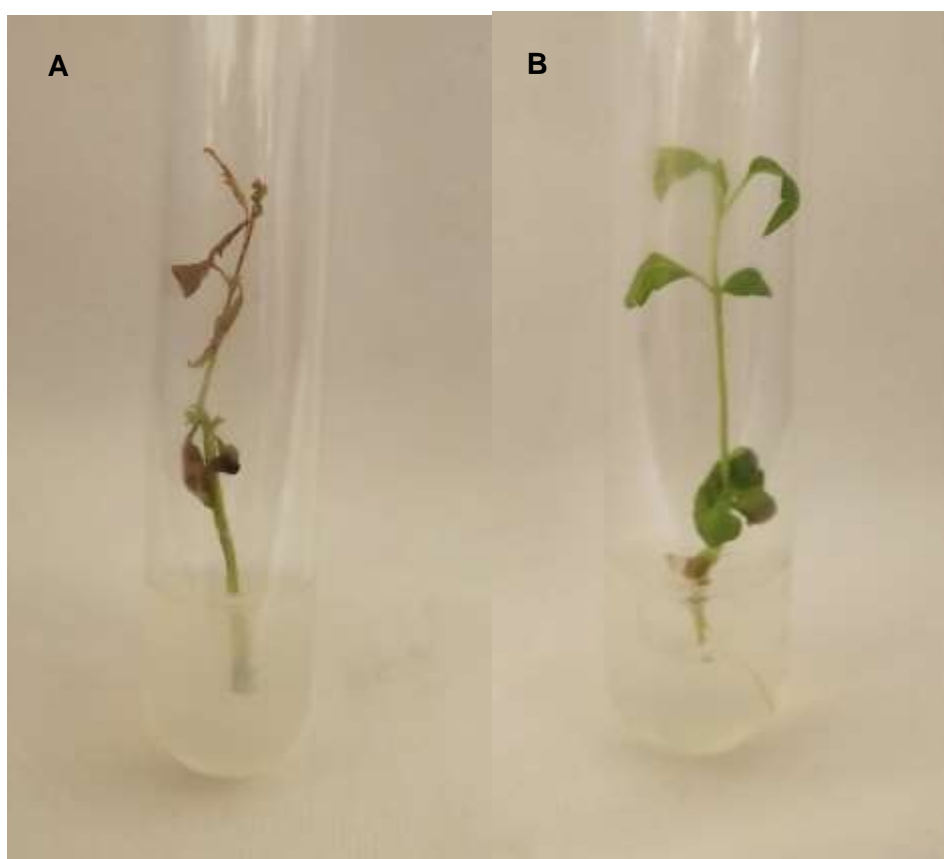


Figura 16. *T. billbergii* sometida a los tratamientos de conservación de germoplasma. Tratamiento testigo (A) y tratamiento T8 suplementado con ABA 1,0 mg/L y manitol 4,0% (B).

4.8. Aclimatación

Luego de instalado el material vegetal, en cada uno de los tratamientos ensayados, se realizaron evaluaciones cada 7 días. En el Cuadro 22 se observan los porcentajes de sobrevivencia de *M. calabura* y *T. billbergii*.

El porcentaje de sobrevivencia de *M. calabura* fue cero, no sobreviviendo los explantes a ningún tratamiento. Los resultados poco eficientes en cuanto a la aclimatación de *M. calabura* se debieron al grosor y fragilidad de las raíces y tallo de las plántulas (<1,0 mm aproximadamente), donde además se observaron plántulas deshidratadas y tallos torcidos. Las plántulas deshidratadas, no desarrollaron raíces adecuadas lo que impidió la absorción de agua del sustrato, a pesar de tener condiciones de alta humedad, el desbalance osmótico en los tallos no permitió la llegada y distribución de agua a las partes apicales de la planta.

Los resultados en cuanto a la aclimatación de *T. billbergii* fueron superiores a 60%, lo que indicaría un éxito en la aclimatación de esta especie.

Cuadro 22. Supervivencia a la aclimataci3n de plantas *in vitro* de *M. calabura* y *T. billbergii*.

TRATAMIENTO	SUSTRATO	ESPECIE	Supervivencia (%) / DIAS				
			0	7	14	21	30
T1	Tierra vegetal	<i>M. calabura</i>	100	40	0	0	0
		<i>T. billbergii.</i>	100	100	60	60	60
T2	Arena + Tierra vegetal 1:1	<i>M. calabura</i>	100	50	0	0	0
		<i>T. billbergii.</i>	100	80	80	80	80
T3	Vermiculita + Tierra vegetal 1:1	<i>M. calabura</i>	100	50	0	0	0
		<i>T. billbergii.</i>	100	100	80	80	80

Fuente: Elaborado por el autor

V. DISCUSIÓN

A. Germinación.

La habilidad para germinar de estas semillas depende del grado de tolerancia a la pérdida de agua, al tiempo y las condiciones de almacenamiento (Berjak y Pammenter, 2004). Las semillas tienen diferencias en el grado de tolerancia a la desecación posterior a su diseminación. De acuerdo con esto, las semillas se les pueden clasificar en ortodoxas y recalcitrantes. En el presente trabajo las semillas de *M. calabura* fueron sembradas juntamente con el mucilago presente en el fruto teniendo así porcentajes altos de germinación *in vitro*; dicho mucilago contiene: carbohidratos, alcaloides, flavonoides y antraquinonas (Krishnaveni y Dhanalakshmi, 2014) y aun cuando López et al, (2002) concluye que el mucilago de las semillas de *M. calabura* inhibe el proceso germinativo, mientras que el lavado de las semillas en agua corriente mejora la capacidad germinativa de las semillas.

Los resultados observados en *T. billbergii*, no son coincidentes con los obtenidos por Minchala et al. (2014) donde las semillas de la misma especie, con buenas condiciones morfológicas y desinfectadas con alcohol 70% e hipoclorito de sodio (5,25% cloro activo), tuvo 30% de contaminación y una tasa de germinación de 65%. Otro trabajo en semillas de *T. rosea* la contaminación provocó la reducción del 43% en el número de las vitroplántulas, donde el 81% de esta contaminación fue causada por hongos y 19% bacterias (Pavón, 2002). Y un porcentaje de contaminación de 37% en semillas de *T. guayacan* (Espinosa, 2001). En algunos casos, la germinación de semillas de la misma especie, como es el caso de *T. rosea*, puede presentar diferencias (Schuler et al, 2005); sin embargo, en otros estudios realizados en germinación de semillas donde incluyen a *T. rosa*, la germinación observada estuvo sobre 90%, siendo indiferente a la influencia de luz y temperatura (25 - 30°C), recomendándose su uso en planes de reforestación de bosques secos tropicales, por su

tolerancia y germinación en condiciones ambientales con intervalos amplios de temperatura y luminosidad (Vargas et al, 2015). Ex vitro las semillas de *T. donell-smith* “Guayacán Blanco” tienen un porcentaje de germinación promedio de 47% (Vozzo, 2010), el cual es un porcentaje bajo.

Albinismo y fenolización

El albinismo es una condición poco común que se observó en plántulas de *T. billbergii* con un porcentaje de 5,3% de plantas germinadas, siendo un factor importante la temperatura, que puede inducir inestabilidad cariotípica y/o incrementar el número de plantas albinas y también la deficiencia de oxígeno que se genera durante el transcurso del cultivo (Cardone et al, 2010). Puede haber también un efecto de algún componente del medio de cultivo interfiriendo en la biosíntesis de carotenoides por tanto bloquea la acumulación de éstos y por consiguiente las plántulas germinadas poseen una apariencia albina (Rodríguez et al, 2016). Por otro lado, se conoce también que el gen del albinismo estaría ligado a los gametos masculino, caracterizado este fenómeno por el hecho de que los proplastos no se llegan a diferenciar en cloroplastos (Makowska y Oleszczuk, 2014)

En cuanto a la fenolización, se observó en semillas de *M. calabura*, sobre todo en semillas acompañadas con parte del fruto. La fenolización está relacionada con el estado fisiológico de los tejidos o explante, es decir que la edad ontogenética está vinculada a la presencia y acumulación de compuestos fenólicos en el vegetal (Concepción et al, 2005); sin embargo, se afirma que los materiales utilizados en el proceso de desinfestación, también tendrían influencia en la estimulación de este fenómeno (Indacochea et al, 2018)

B. Efecto de las citocininas en el brotamiento *in vitro*

Se observaron mayor promedio de número de brotes en los medios de cultivos donde se incluyó KIN 0,5 mg/L (T3) y TDZ 1,0 mg/L (T8) para *M. calabura*. La kinetina es una de las citocininas recomendadas en las técnicas de propagación *in vitro*, han sido utilizadas en la regeneración *in vitro* en especies semileñosas como *Gossypium hirsutum* (Chen, 2008). Por otro, lado la exposición de explantes a altas concentraciones de citocininas como KIN, BAP, 2iP y TDZ disminuye el incremento en la proliferación de brotes en especies como *Curcuma longa* (Chamorro et al, 2007). Las respuestas no deben ser tomadas en cuenta únicamente por el tipo de citocinina, sino también por el tipo de tejido y genotipo.

El BAP es otra de las citocininas de amplio uso en la micropropagación. Suárez et al. (2006) hace uso de este de este reguladores de crecimiento en concentraciones de 2,0 y 4,0 mg/L teniendo un promedio de más de dos brotes por explante en *T. rosea*. No se obtienen también resultados similares con BAP y KIN 1,0 mg/L, donde solo hay como promedio un brote por explante, esto es debido a que los tratamientos fueron combinados con sustancias complejas (Minchala et al. 2014).

C. Efecto de las auxinas en la callogénesis *in vitro*

Una de las auxinas con mayor eficacia para la inducción de callos es el 2,4-D; sin embargo, también es considerada importante para la determinación celular en procesos de embriogénesis, previa formación de callos. Existen números trabajos realizados en ciertas especies leñosas, donde coinciden que el nivel óptimo para la inducción de callos en diferentes tipos de explantes, está entre 1,0 y 2,0 mg/L de esta hormona (Dhiya et al, 2013). En *Tectona grandis*,

fragmentos de hoja sometidos a cultivo con 2,4-D 2,0 mg/L, desarrollaron un alto número de callos (93%) inducidos tanto en luz como en oscuridad, con la particularidad de tener color beige y ser friables, pero con un enorme potencial de generar embriones en ausencia de la hormona en el medio de cultivo (Karunaratne et al, 2014). Se encontró mayor multiplicación del tejido callógeno con el tratamiento sin contenido hormonal en explantes de *Tabebuia rosea* (Pavón, 2002). Las respuestas a los diferentes tratamientos, más que la presión ejercida por el medio de cultivo, se debe fundamentalmente al genotipo receptor de los estímulos, en este caso para los tejidos de *T. billbergii*, en presencia de las concentraciones estudiadas resultaron tóxicas. En el caso de plantas herbáceas y monocotiledóneas, al parecer entre los efectos, es formar callos compactos de carácter caulogénico o rizogénico, como lo demuestran muchos trabajos en caña de azúcar, o en el caso de la sábila (*Aloe vera*) (Matos, 2007).

D. Enraizamiento *in vitro*

El incremento de la concentración de AIB a 0,5 mg/L, provocó un ligero incremento en la tasa de mortalidad de los explantes llegando a 16,7 % Hartmann et al. (2002) señala que el AIB no es tóxico en un amplio rango de concentraciones, sin embargo se observa un efecto negativo, mortalidad, al incrementar las concentraciones hormonales de AIB. En numerosas especies herbáceas, semileñosas y leñosas, la combinación de AG₃ y ANA (0,01 mg/L, respectivamente) en bajas concentraciones estimulan el enraizamiento *in vitro*; sin embargo, en otros casos se han obtenido mejores resultados al utilizar AIB (0,5 mg/L), aun tratándose de especies la misma especie (Minchala et al, 2014). Es indudable que las condiciones ambientales deben jugar un rol muy importante. En algunos casos utilizando ANA en un rango de 0,25 a 1,0 mg/L también estimula el enraizamiento, como ocurre en *Tabebuia rosea*, donde en la mayor concentración se obtuvo mejor

enraizamiento (Suárez et al, 2006), llegando a 100% (Schuler et al, 2005). Usar concentraciones altas de AIB no es recomendable, Pavón (2002) concluye que una concentración de 3,0 mg/L no fue adecuada para la estimulación del sistema radicular y más bien permitió la formación de callos.

E. Efecto de la interacción auxina-citocininas en la organogénesis *in vitro*.

La combinación de concentraciones altas de auxina y bajas de citocinina (ANA 2,0 mg/L + BAP 0,1 mg/L), como en el tratamiento T1, favoreció la diferenciación de brotes; sin embargo, en otras especies como *Myroxylon balsamum*, *T. crysantha* y *T. billbergii* se observó de 80 a 87% de diferenciación de brotes en medio de cultivo suplementados con BAP 0,2 mg/L+ ANA 0,1 mg/L (Indacochea et al, 2018). El genotipo juega un rol importante en el proceso de diferenciación de brotes, como es el caso de *Cedrela montana* donde se indujo tres brotes por explante en medio de cultivo suplementado con BAP 1,0 mg/L, en tanto que en *C. salvadorensis* se diferenció un promedio de dos brotes por explante en concentraciones de BAP 0,05 a 0,5 mg/L (Soto et al, 2010)

En especies leñosas, como es el caso de *Soymida febrifuga*, una especie de importancia medicinal de la familia *Meliaceae*, donde sólo se observó la formación de callos organogénicos en combinaciones de BAP y ANA (Chiruvella et al, 2014). En especies herbáceas, los resultados positivos en la formación de callos organogénicos es más factible, como el caso de *Arachis Burkartii*, donde se evaluó la interacción del ANA, BAP y KIN observándose un alto porcentaje de formación de callos (Kobelak et al, 2004).

En tratamientos combinando BAP 1,1 mg/L y 2,4-D 0,2 mg/L se obtuvo un mayor porcentaje de formación de callos (96 %) en

hipocótilo de *T. rosea* (Pavón, 2002). Una de las auxinas muy utilizadas para la inducción de callos es el 2,4-D, sobre todo en tejidos de especies herbáceas y monocotiledóneas. El 95% de explantes formaron callo a los 30 días de cultivo de *Aloe vera* utilizando 2,4-D 1,0 mg/L con BAP 2,0 mg/L y 68% en 2,4-D 2,0 mg/L y KIN 1,0 mg/L (Matos, 2007).

F. Conservación de germoplasma

El sistema de conservación de germoplasma *in vitro* consiste en minimizar la tasa de crecimiento del explante prolongando el periodo de subcultivo a medio de cultivo fresco. Existen dos formas de reducir la tasa de crecimiento: La primera es modificando los componentes del medio de cultivo, suplementándolo con sustancias químicas que retardan el crecimiento, el uso de compuesto osmoreguladores y la modificación de las concentraciones de sales del medio de cultivo basal. La segunda, es modificando los factores físicos de incubación como la reducción de la temperatura de incubación, uso de irradiancia baja, entre otros factores. Los reguladores osmóticos como la sacarosa y el manitol actúan como retardantes del crecimiento al causar estrés osmótico en los explantes cultivados.

En *P. aduncum* el aumento de las concentraciones de ABA (0,0, 0,5 y 1,0 mg/l) indujo una disminución en el desarrollo de las plantas (Loureiro, 2011). Similares resultados se observó en los experimentos con *M. calabura* donde las concentraciones de ABA (0,5 y 1,0 mg/L) causaron necrosis en los explantes, lo que también se observó en la combinación ABA con manitol.

Similares resultados obtuvo Cruz et al. (2011) donde los explantes cultivados en medio de cultivo suplementado con manitol resultaron en explantes oxidados y muertos, por lo que su utilización como

agente osmótico en *U. tomentosa* fue descartado. El ABA generalmente actúa como un retardante de crecimiento endógeno y se ha usado para la reducción del crecimiento de varios cultivos *in vitro* (Gopal et al, 2005). Como fue mencionado anteriormente, los tratamientos de conservación de germoplasma *in vitro*, sin la suplementación de inhibidores de crecimiento, por lo general van acompañado con la modificación de las condiciones físicas de incubación, lo que sería ideal para *M. calabura*.

En *T. billbergii* se observó presencia de raíces en todos los tratamientos de conservación de germoplasma y estas raíces fueron similares a las raíces del experimento de enraizamiento. En *Ochroma pyramidale* la presencia de manitol en el medio de cultivo indujo el desarrollo de raíces engrosadas y oxidadas al cabo de 30 días de cultivo, acompañado de necrosis en los explantes (Morante, 2013). Otros estudios han mostrado que la adición de diversos nutrientes para la conservación de germoplasma *in vitro*, como la suplementación de nitrato de plata, cuya concentración de 4,0 mg/L combinado con manitol 4,0% resultó efectivo para la conservación de *Xanthosoma spp.* (Rayas et al, 2013), uso de sorbitol (Díaz et al, 2013) y aumento de las concentraciones de sacarosa (Cruz et al, 2011).

G. Aclimatación

Los resultados en cuanto a la aclimatación de *T. billbergii* fueron superiores a 60%, lo que indicaría un éxito en la aclimatación de esta especie, siendo estos resultados bajos con respecto al porcentaje de supervivencia con Schuler et al. (2005) donde solamente hubo pérdidas de plantas con tamaño inferiores representando el 1% en *T. rosea*. La aclimatación *ex vitro* de especies forestales llega a ser crítica y en algunos casos la sobrevivencia es inferior a 10% (Castro et al, 1999). El porcentaje de supervivencia de *T. rosea*

micropropagadas transferidas a condiciones *ex vitro* fue del 12% (Suárez et al, 2006).

VI. CONCLUSIONES

1. El porcentaje de germinación *in vitro* en semillas de “Cerecillo” *M. calabura* L. y “Guayacán negro” *T. billbergii* (Bureau & K. Schum.) Standl, equivalente a 96,0% y 76,5% respectivamente.
2. Son efectivos los tratamientos con concentraciones inferiores a 0,5 mg/L de citocinicas BAP, KIN, 2iP y TDZ para el brotamiento y las concentraciones de 0,5 – 2,0 mg/L de ANA para la inducción a callos en explantes de *M. calabura* y *T. billbergii*.
3. La conservación de germoplasma *in vitro* de *M. calabura* se estableció que es favorable la no adición de suplementos hormonales y en *T. billbergii* la adición de ABA y manitol fueron indispensables.
4. Fue optimo el uso de los sustratos: tierra vegetal, arena y vermiculita en *T. billbergii*, mas no en *M. calabura*, en el proceso de aclimatación en condiciones de invernadero.

VII. RECOMENDACIONES

1. En la conservación de germoplasma *in vitro* de *M. calabura* se sugiere modificar los factores físicos externos como: temperatura, irradiancia, fotoperiodo u otros.
2. Las cámaras de alta humedad con temperaturas controladas son imprescindibles para la aclimatación de *M. calabura*.
3. Los experimentos realizados en esta tesis se pueden aplicar en especies vegetales, nunca antes estudiadas, del Bosque estacionalmente seco.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Angulo F. (2009). "*Áreas Importantes para la conservación de aves America – Peru. BirdLife International*". Quito-Ecuador. Recuperado el 20 febrero 2018. Disponible en: http://datazone.birdlife.org/userfiles/file/IBAs/AmCntryPDFs/Peru_es.pdf
2. Bao S, Eun P, Vigo J, Grahama J. & Cabieses F. (2003) "*Activity-guided isolation of the chemical constituents of Muntingia calabura using a quinone reductase induction assay*". Phytochemistry. 63 (3). 335-341.
3. Berjak P. & Pammenter N. (2004). "*Recalcitrant seeds*". R.L. Benech-Arnold, R.A. Sanchez (Eds.), Handbook of Seed Physiology: Applications to Agriculture, Haworth Press Inc, New York (2004). ISBN 1–56022–928–4
4. Brack, A. (1986). "*Las ecorregiones del Perú*". Bol. Lima 44: 57-70
5. Brack A. & Mendiola C. (2004). "*Ecología del Perú*". PNUD. Asociación Editorial Bruño. Lima, Perú. 495 pp.
6. Cardone S, Olmos S. & Echenique V. (2010). "*Biotechnología y Mejoramiento Vegetal II*". Capítulo 5: Variación Somaclonal. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.-Argentina. 229 pp.
7. Castro D, Díaz J. & Murillo M. (1999). "*Estrategias de trabajo para la multiplicación clonal in vitro de árboles adultos de Teca (Tectona grandis), Melina (Gmelina arborea) y Roble (Tabebuia rosea)*". Universidad Católica de Oriente, Rionegro. 16 – 51.
8. Chamorro A, Martínez S, Fernández J. & Mosquera T. (2007) "*Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento in vitro de Limonium var. Misty blue*". Agronómica colombiana. Bogotá-Colombia. 25: 47-53.

9. Chen T, Wu S, Li F, Guo W. & Zhang T. (2008). "*In Vitro Regeneration of Four Commercial Cotton Cultivars (Gossypium hirsutum L.) Grown in Xinjuang, China*". Acta Agronómica Sinica, China. 34 (8): 1374-1380.
10. Chízmar C. (2009). "*Plantas comestibles de Centroamérica*". Instituto Nacional de Biodiversidad, Editorial INBio, 1ª Edición, Costa Rica, pp. 244-246.
11. Chiruvella K, Mohammed A. & Ghanta R. (2014). "*In vitro calus induction and plantkedt regeneration of indian rel Wood, Soymida febrífuga A. Juss (Roxb.)*". Journal of Medicinal Plant Research. 8 (24): 847 – 856.
12. Concepción O, Pérez A, Nápoles L, Hernández M, Peralta N & Trujillo R. (2005) "*Efecto de tres Antioxidantes en el cultivo in vitro de ápices de Guayaba (Psidium guajava L.)*". Cultivos Tropicales. 26 (1): 33-39. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/1932/193215916005/>
13. Cruz N, Brenes M, Abdelnour A. & Alvarenga S. (2011) "*Establecimiento de un protocolo para la conservación in vitro a mediano plazo de uña de gato (Uncaria tomentosa (Wild). D.C.)*". Tecnología en Marcha. Costa Rica. 24 (4): 19-29.
14. Dhiya D, Jaafar H. & Manaf A. (2013). "*Effects of 2,4-D and Kinetim on Callus Induction of Barringtonia racemosa Leaf and Endosperm Explants in Different Type of Basal Media*". Asian Journal of Plant Science. 12 (1): 21-27.
15. Díaz G, Poma R, Minchala J, Gonzales D, Rojas C. & Delgado G. (2013). "*In vitro Conal Propagation and Germplasm Conservation in the Tropical Timber Tree Spanish White Cedar (C. montana Moritz Ex Turez.) (Meliaceae)*". EJBS. Loja-Ecuador. 7(1): 59-69.
16. Espinosa C. (2001). "*Evaluación del uso de ápices meristematicos y explantes cotiledonares e hipocotiledonares para el establecimiento in*

- vitro de Tabebuia guayacan*". Tesis para optar título profesional de ingeniero agrónomo. Carrera de ciencia y producción agropecuaria. Zamorano – Honduras.
17. FAO (2016) "*Bosques y cambio climático documento de trabajo 14: Los bosques y eal cmbio climático en el Perú*". Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma. Recuperado 20 de febrero 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i5184s.pdf>
 18. Gaur A, Kumar P, Kumar A. & Kumar D. (2016) "*In vitro plant regeneration studies and their potential applications in Populus spp.: A review.*" Israel Journal of Plant Sciences. 63 (2): 77 – 84.
 19. Gopal J, Chamail A & Sarkar D. (2005). "*Use of microtubers for slow-growth in vitro conservation of potato germplasm*". Plant Genetic 141: 56-60.
 20. Gushiken S. (1994). "*Estructura y análisis de los algarrobales de Sechura y Tambo Grande*". Tesis para optar título en Biología. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima – Perú.
 21. Hartmann T, Kester, D., Davies T. & Geneve L. (2002). "*Plant propagation: Principles and Practice*". Prentice Hall Inc. 7° Edición. Nueva Jersey – USA.
 22. Hernández R, Carrillo M. & Reyes A. (2011). "*PUAM (Muntingia calabura): POTENCIAL ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANO*". Revista Académica de Investigación. Universidad Autónoma de San Luis. Recuperado el 28 Febrero 2015. Disponible en: <http://www.eumed.net/rev/tlatemoani/08/him.pdf>
 23. Indacochea B, Hernández A, Castro C, VERA, M., Zhindón A. & Gabriel 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.
24. INRENA. (2002). "*Manual divulgativo de las especies forestales de la Reserva de Biosfera del Noroeste*". Tumbes, Perú.
25. Karunaratne M, Peries E. & Egodawatta C. (2014). "*Callus induction and organogenesis from leaf explants of Tectonagrandis*". Annals of Biological Research. 5 (4): 74-82.
26. Krishnaveni M. & Dhanalakshmi D. (2014). "*Qualitative and quantitative study of phytochemicals in Muntingia calabura L. leaf and fruit*". World Journal of Pharmaceutical Research. 3: 1687-1696.
27. Kobelak A, Rey H. & Mroginski L. (2004). "*Efecto del ANA en combinación con BAP y CIN en la organogénesis in vitro de Arachis Burkartii (Leguminosae)*". Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen A-005. Corrientes-Argentina.
28. Kumar N. & Reddy M. (2011). "*In vitro Plant Propagation: A Review*". Journal of Forest Science. 27 (2): 61- 7.
29. Leal J. & Linares R. (2005) "*Los Bosques Secos de la Reserva de la Biosfera del Noroeste (Perú): Diversidad arbórea y estado de conservación*". Caldasia. La libertad – Perú. 27(2):195-211.
30. Llatas S. (2009). "*Claves para el reconocimiento de los grupos vegetales*". Lambayeque – Perú. 179 pp.
31. López J, Dias M & Matins S. (2002). "*Germinação de sementes de calabura (Muntingia calabura L.)*" Revista Brasileira de Sementes. Londrina. 24 (1): 59 – 66.
32. Makowka K. & Oleszczuk S. (2014). "*Albinism in barley androgenesis*". Plant Cell Rep. 33 (3): 385 -392.

33. Maldonado F, Vargas G, Molina R. & Sol A. (2004). "*Frutas tropicales de Tabasco*". Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas. 3ª edición, México. 57 pp.
34. Márquez R, Mendoza D, Parejo M, Hernández R, Martínez A. & Vanegas A. (2007). "*Evaluación química del extracto total etanólico de las hojas y corteza fresca de Muntingia calabura (Elaeocarpaceae)*". Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. 8(33): 455-456, Pereira, Colombia. Recuperado el 09 Marzo 2015. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84933129>
35. Martos J, Scarpatti M, Rojas C. & Delgado G. (2009). "*Fenología de algunas especies que son alimento para la pava aliblanca Penelope albipennis*". Rev. peru. biol. 15(2): 51- 58.
36. Matos A. (2007). "*Inducción de callo en plantas silvestres de Aloe vera "zábila" con diferentes combinaciones de 2,4-D, BA y Kinetina*". Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela. 41(4): 503–516.
37. Minchala J. Eras V. Poma, R. Yaguama M. Muñoz L. & Delgado G. (2014). "*Propagación in vitro de Guayacan negro, Tabebuia billbergii (Bignoniaceae), a partir de explantes obtenidos de plántulas in vitro*". Centro de Biotecnología. 3 (1): 8-16.
38. Motto P. (2005). "*Plantas medicinales del bosque seco cantón Zapotillo y Macará*". UNL-COSV. Loja, Ecuador.
39. Morante V. (2013). "*Propagación, morfogénesis, conservación de germoplasma in vitro y aclimatación de Palo de Balsa Ochroma pyramidale (Cav.ex Lam.) Urban. (Malvaceae – Bombacoideae)*" Tesis para optar título profesional en Biología. UNPRG. Lambayeque – Perú.

40. Murashige T. & Skoog F. (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
41. Neto G, Gomez A, Martins M, Barros R, Muhammad S. & Akhtar Y. (2013). "Insecticidal activity of *Muntingia calabura* extracts against larvae and pupae of diamondback, *Plutella xylostella* (Lepidoptera, Plutellidae)". *Journal of King Saud University – Science.* 25 (1): 83-89.
42. Pavón C. (2002). "Evaluación del uso de ápices meristimáticos y explantes cotiledonares e hipocotiledonares en el establecimiento in vitro de *Tabebuia rosea* (Bertol) DC (macuelizo)" Tesis para optar título profesional de ingeniero agrónomo. Carrera de ciencia y producción agropecuaria. Zamorano – Honduras.
43. Peña M, Pennington, Reynel C. & Zevallos P. (2010). "Guía ilustrada de la flora leñosa de los bosques estacionalmente secos de Jaén, Perú". Universidad Nacional Agraria La Molina / Royal Botanic Garden Edinburgh. Lima. 288 pp.
44. Pathak M. & Abido M. (2014). "The Role of Biotechnology in the conservation of Biodiversity". *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences.* 2 (4): 352 – 363.
45. Rayas A, Santos A, Cabrera M, López J, Medrero V, Beovides Y. & Rodríguez G. (2013) "Efecto del manitol y el nitrato de plata en la conservación in vitro de la malanga (*Xanthosoma spp*)". *Revista Colombiana de Biotecnología.* Villa Clara – Santo Domingo. 15(1): 167-171.
46. Roca M. & Mroginski L. (1991). "Cultivo de Tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones". Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali - Colombia. 969 pp.
47. Rodríguez M, Hormazabal N, Araneda X, Tampe J, Lobos V. & Castillo C. (2016) "Efectos del ácido giberélico, bencilaminopurina y fluridona en

- la germinación in vitro de Ugni molinae Turcz. (Myrtaceae)*” Gayana Botánica. 73(1): 77-84, 2016. ISSN 0016-5301.
48. Rout G, Samantray S. & Das P. (1996). “*In vitro somatic embryogenesis and plantlet regeneration in callus cultures of Muntingia calabura L.*” Bangladesh Association for Plant Tissue Culture & Biotechnology. Bangladesh - India. 6 (1): 15-24. Recuperado el 28 Febrero 2015. Disponible en: <http://www.baptcb.org/ptc/abstracts.asp?YEAR=61>
49. Salazar R. & Soihet C. (2001). “*Manejo de semillas de 75 especies forestales de América Latina*”. Vol. II Serie técnica, Manual técnico: N° 48. CATIE, Turrialba, CR, p 48.
50. Sánchez O, Kvist L. & Aguirre Z. (2006). “*Bosques secos en Ecuador y sus plantas útiles Botánica*”. Económica de los Andes Centrales. Paz. Recuperado el 28 Febrero 2015. Disponible en:
a. <http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdf/Capitulo%2012.pdf>
51. Schuler I, Baquero S, Gaona D, Vega E, Rodríguez J, Ramírez C, Nieto V. & Hodson E. (2005). “*Propagación in vitro de material seleccionado de Tabebuia rosea (Bertol.) DC. (Ocobo) y Cordia allidora (Ruiz & Pav.) Oken (Nogal cafetero)*”. Rev. Colombiana de Biotecnología 8 (1): 39-50.
52. Sharma D. & Sharma K. (2013). “*Biotechnological approaches for Biodiversity Conservation*”. Indian J. Sci. Res.1 (1): 183 – 186.
53. Soto B, Valverde L, Rojas A. & Hine A. (2010). “*Establecimiento in vitro de Cedrela salvadorensis*”. Tecnología en Marcha. 23(4): 66 – 73.
54. Suárez I, Jarma A. & Avila M. (2006) “*Desarrollo de un protocolo para propagación in vitro de roble (Tabebuia rosea Bertol DC)*”. Tema Agrarios. Córdoba – Colombia. 11 (2): 52-62.

55. Vargas J, Duque O. & Torres A. (2015). "*Germinación de semillas de cuatro especies arbóreas del bosque seco tropical del Valle del Cauca, Colombia*". *Revista de Biología Tropical*. 63 (1): 249 – 261.
56. Venegas P. (2005). "*Herpetofauna del Bosque Seco Ecuatorial de Perú: Taxonomía, Ecología y Biogeografía*". *Zonas Áridas*. Lambayeque -Perú. 9: 9-19.
57. Vozzo J. (2010). "*Tropical tree seed manual*". Washington DC, USDA Forest Service.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza para el efecto de las citocininas en el brotamiento *in vitro* (Tamaño de brotes) en *M. calabura*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	108,388	8	13,549	22,056	0,000
Intra-grupos	20,271	117	0,173		
Total	128,659	125			

Anexo 2. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (0.05) para el efecto de las citocininas en el brotamiento *in vitro* (Tamaño de brotes) en *M. calabura*.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mg/L)				Tamaño (cm)	Signifi- cación
	BAP	KIN	2iP	TDZ		
T0	-	-	-	-	0,3750	c
T1	0,5	-	-	-	2,0920	b
T2	1,0	-	-	-	2,0367	b
T3	-	0,5	-	-	2,2660	ab
T4	-	1,0	-	-	1,8333	b
T5	-	-	0,5	-	3,1150	a
T6	-	-	1,0	-	2,7625	ab
T7	-	-	-	0,5	0,7500	c
T8	-	-	-	1,0	0,1250	c

Anexo 3. Análisis de varianza para el efecto de las citocininas en el brotamiento *in vitro* (Número de brotes) en *M. calabura*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	870,185	8	108,773	38,753	0,000
Intra-grupos	61,750	117	2,807		
Total	931,935	125			

Anexo 4. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (0.05) para el efecto de las citocininas en el brotamiento *in vitro* (Número de brotes) en *M. calabura*.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mg/L)				N° de brotes	Signifi- cación
	BAP	KIN	2iP	TDZ		
T0	-	-	-	-	1,5000	e
T1	0,5	-	-	-	10,673	b
T2	1,0	-	-	-	2,672	de
T3	-	0,5	-	-	18,004	a
T4	-	1,0	-	-	7,251	bc
T5	-	-	0,5	-	6,502	cd
T6	-	-	1,0	-	7,503	bc
T7	-	-	-	0,5	11,333	b
T8	-	-	-	1,0	16,001	a

Anexo 5. Análisis de varianza para el efecto de las citocininas en el brotamiento *in vitro* (Tamaño de brotes) en *T. billbergii*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	9,120	8	1,140	20,021	0,000
Intra-grupos	6,776	119	0,057		
Total	15,896	127			

Anexo 6. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (0.05) para el efecto de las citocininas en el brotamiento *in vitro* (Tamaño de brotes) en *T. billbergii*.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mg/L)				Tamaño (cm)	Signifi- cación
	BAP	KIN	2iP	TDZ		
T0	-	-	-	-	1,1333	f
T1	0,5	-	-	-	1,6533	de
T2	1,0	-	-	-	1,6200	e
T3	-	0,5	-	-	1,8867	bcd
T4	-	1,0	-	-	2,1071	ab
T5	-	-	0,5	-	1,9133	bcd
T6	-	-	1,0	-	2,2000	a
T7	-	-	-	0,5	1,8333	cde
T8	-	-	-	1,0	1,9867	abc

Anexo 7. Análisis de varianza para el efecto de las citocininas en el brotamiento *in vitro* (Número de brotes) en *T. billbergii*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	41,889	8	5,236	35,146	0,000
Intra-grupos	17,729	119	0,149		
Total	59,617	127			

Anexo 8. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (0.05) para el efecto de las citocininas en el brotamiento *in vitro* (Número de brotes) en *T. billbergii*.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mg/L)				N° de brotes	Signifi- cación
	BAP	KIN	2iP	TDZ		
T0	-	-	-	-	1,333	b
T1	0,5	-	-	-	2,400	a
T2	1,0	-	-	-	2,533	a
T3	-	0,5	-	-	1,067	b
T4	-	1,0	-	-	1,071	b
T5	-	-	0,5	-	1,133	b
T6	-	-	1,0	-	1,200	b
T7	-	-	-	0,5	1,200	b
T8	-	-	-	1,0	1,000	b

Anexo 9. Análisis de varianza para el efecto de las citocininas en el brotamiento *in vitro* (Número de hojas) en *T. billbergii*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	311,532	8	38,942	27,676	0,000
Intra-grupos	167,437	119	1,407		
Total	478,969	127			

Anexo 10. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (0.05) para el efecto de las citocininas en el brotamiento *in vitro* (Número de hojas) en *T. billbergii*.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mg/L)				N° de Hojas	Signifi- cación
	BAP	KIN	2iP	TDZ		
T0	-	-	-	-	2,778	b
T1	0,5	-	-	-	6,000	a
T2	1,0	-	-	-	6,133	a
T3	-	0,5	-	-	2,333	b
T4	-	1,0	-	-	2,643	b
T5	-	-	0,5	-	2,333	b
T6	-	-	1,0	-	2,467	b
T7	-	-	-	0,5	2,400	b
T8	-	-	-	1,0	2,067	b

Anexo 11. Análisis de varianza para el efecto de las auxinas en la callogénesis *in vitro* (Escala del callo) en *M. calabura*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	32,657	7	4,665	45,487	0,000
Intra-grupos	9,231	90	0,103		
Total	41,888	97			

Anexo 12. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (0.05) para el efecto de las auxinas en la callogénesis *in vitro* (Escala del callo) en *M. calabura*.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mg/L)		Callo	Signifi- cación
	2,4-D	ANA		
T1	0,1	-	1,530	a
T2	0,5	-	1,000	a
T3	1,0	-	0,000	b
T4	2,0	-	0,000	b
T5	-	0,1	0,000	b
T6	-	0,5	0,000	b
T7	-	1,0	0,000	b
T8	-	2,0	0,000	b

Anexo 13. Análisis de varianza para el efecto de las auxinas en la callogénesis *in vitro* (Tamaño de brotes) en *M. calabura*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	229,602	7	32,800	63,221	0,000
Intra-grupos	40,987	79	0,519		
Total	270,589	86			

Anexo 14. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (0.05) para el efecto de las auxinas en la callogénesis *in vitro*. (Tamaño de brotes) en *M. calabura*.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mg/L)		Callo	Signifi- cación
	2,4-D	ANA		
T1	0,1	-	0,000	d
T2	0,5	-	0,000	d
T3	1,0	-	0,000	d
T4	2,0	-	0,000	d
T5	-	0,1	4,450	a
T6	-	0,5	1,830	c
T7	-	1,0	2,430	bc
T8	-	2,0	3,033	b

Anexo 15. Análisis de varianza para el efecto de las auxinas en la callogénesis *in vitro* (escala del callo) en *T. billbergii*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	129,799	1	129,799	139,132	0,000
Tratamiento	66,891	7	9,556	10,243	0,000
Tipo de Explante ^a	15,623	2	7,812	8,373	0,000
Trat * Tipo Explante ^a	23,533	13	1,810	1,940	0,037
Error	74,633	80	0,933		

^a Tipo de explantes usados: Cotiledón, Hipocótilo y raíz.

Anexo 16. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (0.05) para el efecto de las auxinas en la callogénesis *in vitro*. (Escala del callo) en *T. billbergii*.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mg/L)		Callo	Signifi- cación
	2,4-D	ANA		
T1	0,1	-	1,17	bc
T2	0,5	-	1,36	bc
T3	1,0	-	0,33	c
T4	2,0	-	0,00	c
T5	-	0,1	0,75	bc
T6	-	0,5	1,20	bc
T7	-	1,0	2,08	ab
T8	-	2,0	2,94	a

Anexo 17. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (0.05) para el efecto de las auxinas en la callogénesis *in vitro* (Tipo de explante inicial) en *T. billbergii*.

Tipo de explante	Callo	Significación
Raiz	0,67	b
Cotiledón	1,63	a
Hipocotilo	1,78	a

Anexo 18. Análisis de varianza para el efecto de la conservación de germoplasma *in vitro* (Supervivencia) en *M. calabura*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	20,786	1	20,786	170,836	0,000
Tratamiento	0,684	8	0,228	1,873	0,000
Tipo de Explante	0,224	1	0,224	1,844	0,184
Trat * Tipo Expl.	0,143	8	0,071	0,586	0,562
Error	4,015	33	0,122		

Anexo 19. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (0.05) para el efecto de las auxinas en la conservación de germoplasma *in vitro* (Superivencia) en *M. calabura*.

Tratamiento	Osmoregulador		Viabilidad	Significación
	ABA (mg/L)	Manitol (%)		
T0	-	-	1,00	a
T1	0,5	-	0,00	b
T2	1,0	-	0,00	b
T3	-	4,0	0,23	b
T4	-	2,0	0,33	b
T5	0,5	2,0	0,00	b
T6	1,0	2,0	0,20	b
T7	0,5	4,0	0,00	b
T8	1,0	4,0	0,00	b

Anexo 20. Análisis de varianza para el efecto de la conservación de germoplasma *in vitro* (Elongación de la plántula) en *M. calabura*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	378,130	1	378,130	90,355	0,000
Tratamiento	8,123	8	2,708	0,647	0,591
Tipo de Explante	0,892	1	0,892	0,213	0,648
Trat * Tipo Expl.	6,194	8	3,097	0,740	0,486
Error	121,363	29	4,185		

Anexo 21. Análisis de varianza para el efecto de la conservación de germoplasma *in vitro* (Supervivencia) en *T. billbergii*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	46,617	1	46,617	443,565	0,000
Tratamiento	7,697	8	0,962	9,155	0,000
Tipo de Explante	0,003	1	0,003	0,027	0,871
Trat * Tipo Expl.	0,702	8	0,088	0,835	0,575
Error	7,777	74	0,105		

Anexo 22. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (0.05) para el efecto de la conservación de germoplasma *in vitro* (Superivencia) en *T. billbergii*.

Tratamiento	Osmoregulador		Viabilidad	Significación
	ABA (mg/L)	Manitol (%)		
T0	-	-	0,00	b
T1	0,5	-	0,69	a
T2	1,0	-	1,00	a
T3	-	4,0	0,80	a
T4	-	2,0	1,00	a
T5	0,5	2,0	1,00	a
T6	1,0	2,0	0,82	a
T7	0,5	4,0	0,88	a
T8	1,0	4,0	0,80	a

Anexo 23. Análisis de varianza para el efecto de la conservación de germoplasma *in vitro* (Elongación de la plántula) en *T. billbergii*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	943,156	1	943,156	377,021	0,000
Tratamiento	182,751	8	22,844	9,132	0,000
Tipo de Explante	0,125	1	0,125	0,050	0,824
Trat * Tipo Expl.	8,074	8	1,009	0,403	0,915
Error	172,610	69	2,502		

Anexo 24. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (0.05) para el efecto de la conservación de germoplasma *in vitro* (Elongación de la plántula) en *T. billbergii*.

Tratamiento	Osmoregulador		Tamaño (cm)	Significación
	ABA (mg/L)	Manitol (%)		
T0	-	-	0,00	b
T1	0,5	-	4,533	a
T2	1,0	-	4,982	a
T3	-	4,0	4,680	a
T4	-	2,0	3,488	a
T5	0,5	2,0	3,655	a
T6	1,0	2,0	4,836	a
T7	0,5	4,0	4,700	a
T8	1,0	4,0	3,820	a

Anexo 25. Análisis de varianza para el efecto de la conservación de germoplasma *in vitro* (Número de hojas) en *T. billbergii*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	2696,912	1	2696,912	412,536	0,000
Tratamiento	423,984	8	52,998	8,107	0,000
Tipo de Explante	2,539	1	2,539	0,388	0,535
Trat * Tipo Expl.	86,967	8	10,871	1,663	0,124
Error	431,468	66	6,537		

Anexo 26. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (0.05) para el efecto de la conservación de germoplasma *in vitro* (Número de hojas) en *T. billbergii*.

Tratamiento	Osmoregulador		N° de hojas	Significación
	ABA (mg/L)	Manitol (%)		
T0	-	-	2,00	c
T1	0,5	-	7,10	b
T2	1,0	-	8,55	ab
T3	-	4,0	5,25	bc
T4	-	2,0	5,00	bc
T5	0,5	2,0	5,45	bc
T6	1,0	2,0	5,00	bc
T7	0,5	4,0	10,86	a
T8	1,0	4,0	8,08	ab

Anexo 27. Análisis de varianza para el efecto de la conservación de germoplasma *in vitro* (Número de raíces) en *T. billbergii*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	362,046	1	362,046	109,125	0,000
Tratamiento	93,921	8	11,740	3,539	0,002
Tipo de Explante	44,526	1	44,526	13,421	0,000
Trat * Tipo Expl.	77,716	8	9,714	2,928	0,007
Error	242,194	73	3,318		

Anexo 28. Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (0.05) para el efecto de la conservación de germoplasma *in vitro* (Número de raíces) en *T. billbergii*.

Tratamiento	Osmoregulador		N° de raíces	Significación
	ABA (mg/L)	Manitol (%)		
T0	-	-	0,00	b
T1	0,5	-	2,92	a
T2	1,0	-	3,10	a
T3	-	4,0	3,27	a
T4	-	2,0	2,25	ab
T5	0,5	2,0	1,82	ab
T6	1,0	2,0	2,45	ab
T7	0,5	4,0	1,29	ab
T8	1,0	4,0	1,60	ab