



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN DE LOS BIORREGULADORES AUXINAS -
GIBERELINAS EN EL DESARROLLO IN VITRO DE PLÁNTULAS DE *Caesalpinia spinosa*
A PARTIR DE SEMILLAS EN DOS ESTADÍOS**

Trabajo de titulación previo a la obtención del
título de Ingeniero Biotecnólogo

AUTORES: JORGE SANTIAGO ROJAS CRESPO

JUAN JOSÉ SOLÓRZANO MOROCHO

TUTORA: DRA. MYRIAM XIMENA MANCHENO CÁRDENAS, MGTR.

Cuenca - Ecuador

2023

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Jorge Santiago Rojas Crespo con documento de identificación N° 0104988779 y Juan José Solórzano Morocho con documento de identificación N° 0706166469; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 06 de marzo del 2023

Atentamente,



Jorge Santiago Rojas Crespo

0104988779



Juan José Solórzano Morocho

0706166469

**CERTIFICACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, Jorge Santiago Rojas Crespo con documento de identificación N° 0104988779 y Juan José Solórzano Morocho con documento de identificación N° 0706166469, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Evaluación de la relación de los biorreguladores auxinas - giberelinas en el desarrollo in vitro de plántulas de *Caesalpinia spinosa* a partir de semillas en dos estadios”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero Biotecnólogo, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 06 de marzo del 2023

Atentamente,

Jorge Santiago Rojas Crespo

0104988779

Juan José Solórzano Morocho

0706166469

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Myriam Ximena Mancheno Cárdenas con documento de identificación N° 0602018160, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN DE LOS BIORREGULADORES AUXINAS - GIBERELINAS EN EL DESARROLLO IN VITRO DE PLÁNTULAS DE *Caesalpinia spinosa* A PARTIR DE SEMILLAS EN DOS ESTADÍOS, realizado por Jorge Santiago Rojas Crespo con documento de identificación N° 0104988779 y por Juan José Solórzano Morocho con documento de identificación N° 0706166469, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 06 de marzo del 2023

Atentamente,



Dra. Myriam Ximena Mancheno Cárdenas, Mgtr.

0602018160

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Jorge y Rocío por el apoyo brindado en todos estos años de estudio, por sus consejos y por no permitirme que me desviara del camino. A mi hermana, Lola, por aguantarme todos los momentos en los que quería darme por vencido y ser un apoyo para mí en todo este proceso.

A mi familia que ya no está presente conmigo en este camino, sin embargo, me cuidan desde el cielo.

A mis profesores que me supieron apoyar en todo este camino, por sus consejos y sus palabras de aliento en este proceso llamado Vida.

A Fer, por ser parte de este camino desde mucho antes que sabía que estaría en él.

Santiago Rojas

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mi familia por estar presente, por sus consejos brindados y sus palabras de aliento en este camino.

Un agradecimiento muy especial a mis amigos y amigas que me apoyaron e hicieron de este proceso más llevadero a: Jose, Fena, Belén, Tatty, a Diego “Gordo” Duy por sus momentos de discusiones y filosofía entre panas. A todo el *Caesalpinia Team*, porque sin ustedes no hubiéramos llegado tan alto.

A Johnatan Luzón por compartir momentos insospechados y sus conocimientos en la vida. A Daniel Proaño por los momentos compartidos.

De manera especial quiero agradecer a mis docentes Dra. Myriam Mancheno, Ing. Mateo León, por sus conocimientos y apoyo en este proceso de investigación. A la Dra. Inés Malo por jalarme las orejas cuando era necesario y poder ayudarme a crecer hasta dónde he llegado.

Agradezco a la Universidad Politécnica Salesiana, y la Iniciativa Tambillo Forest, que en conjunto con la Cooperativa Jima Ltda., por el apoyo brindado en este proyecto de investigación.

Santiago Rojas

DEDICATORIA

Mirando al cielo dedico el esfuerzo que he invertido a lo largo de este camino a mi difunta abuelita Flor Morocho, quien sé que desde alguna parte me observa y apoya a cumplir mis metas.

A mis padres de los que siempre estaré orgulloso y agradecido de tenerlos en mi vida.

Juan José Solórzano

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al pilar de mi vida, mi familia, quienes han forjado en mí los valores que me han hecho el hombre que soy, y me han acompañado y alentado en todo este camino de aprendizaje. Mis padres Mirella Morocho y Jorge Solórzano quienes con sus palabras e incondicional apoyo me motivaron a superar mis límites y sentirme capaz de lograr todo lo que me propongo. Mis abuelos Eusebio Morocho, Jorge Solórzano y Esthela Monserrate con su inquebrantable confianza en que puedo lograr mis metas.

A mis amigos, especialmente a Santiago, Taty, Fena y Elena que han llenado mi camino universitario de experiencias divertidas y aprendizajes.

Al magíster y amigo Mateo León quien solidariamente impartió sus conocimientos con nosotros permitiéndonos culminar con esta tesis.

A nuestra tutora dra. Myriam Mancheno por sus conocimientos impartidos tanto como maestra como asesora de esta investigación.

A la iniciativa Tambillo Forest, en conjunto con la Universidad Politécnica Salesiana y la cooperativa de Desarrollo de la Comunidad Jima Ltda. Por su confianza en nosotros para permitirnos desarrollar y aprender con su proyecto.

Juan José Solórzano

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1.....	19
1. INTRODUCCIÓN.....	19
1.1. Antecedentes	19
1.1.1. Micropropagación de especies arbustivas	19
1.1.2. Cultivo in vitro de especies de la familia <i>Fabaceae</i>	20
1.1.3. Propagación in vitro de especies del género <i>Caesalpinia</i>	20
1.1.4. Cultivo in vitro de <i>Caesalpinia spinosa</i>	21
1.2. Problema de investigación.....	21
1.3. Pregunta de investigación.....	22
1.4. Objetivos	22
1.4.1. Objetivo general	22
1.4.2. Objetivos específicos.....	22
1.5. Hipótesis.....	23
1.5.1. Hipótesis alternativa	23
1.5.2. Hipótesis nula	23
1.6. Justificación.....	23
1.7. Limitaciones	23
2.1. Género <i>Caesalpinia</i>	24
2.2. <i>Caesalpinia spinosa</i>	24
2.2.1. Taxonomía.....	25
2.2.2. Generalidades	25
2.2.3. Distribución geográfica	26
2.2.4. Descripción botánica	26
2.2.4.1. Árbol.....	26
2.2.4.2. Tronco	26
2.2.4.3. Hojas.....	27
2.2.4.4. Flores	27
2.2.4.5. Frutos.....	27
2.2.4.6. Semillas	27
2.2.5. Usos de <i>Caesalpinia spinosa</i>	28

	10
2.2.5.1. Relevancia económica.....	28
2.2.5.2. Uso ancestral	29
2.2.5.3. Protección de suelos	29
2.2.6. Productos de <i>Caesalpinia spinosa</i>	29
2.2.6.1. Productos derivados de la vaina	30
2.2.6.2. Productos derivados de la semilla	30
2.3. Biorreguladores	30
2.3.1. Clasificación de los biorreguladores	31
2.3.2. Auxinas.....	33
2.3.3. Giberelinas.....	33
CAPÍTULO 3.....	35
MARCO METODOLÓGICO.....	35
3.1 Nivel de investigación.....	35
3.2 Diseño de experimentación	35
3.3 Ubicación.....	36
3.4 Población y muestra	36
3.4.1 Población.....	36
3.4.2 Muestra.....	36
3.5 Variables.....	36
3.5.1 Variables Independientes	36
3.5.3 Variables controladas	37
3.6 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	37
3.7 Técnicas de procesamiento y análisis de datos	37
3.8 Equipos, reactivos y materiales	38
3.9 Procedimiento.....	38
3.9.1 Fase 1: Obtención de las semillas.....	38
3.9.2 Fase 2: Tratamientos pre germinativos de las semillas de <i>Caesalpinia spinosa</i>	40
3.9.3 Fase 3: Diseño de los medios de cultivo	41
3.9.4 Fase 4: Protocolo de desinfección de las semillas.....	44
3.9.5 Establecimiento <i>in vitro</i> de las semillas de <i>Caesalpinia spinosa</i>	47
3.9.5.1 Desarrollo y germinación de las semillas de <i>Caesalpinia spinosa</i>	50
3.9.5.2 Cambio de medio basal MS a medios con hormonas de crecimiento	52
CAPÍTULO 4.....	55

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
4.2 Análisis de los resultados obtenidos con respecto a los procedimientos de germinación de semillas [maduras e inmaduras] de <i>Caesalpinia spinosa</i>	61
4.3 Evaluación de la combinación de diferentes concentraciones de auxinas [ANA, AIA] y giberelinas [AG ₃].....	64
4.3.5 Análisis de los tratamientos para la determinación de la mejor combinación de biorreguladores para cada variable.....	84
CAPÍTULO 5.....	89
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	89
5.1 Conclusiones	89
REFERENCIAS	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Presencia a nivel mundial del género <i>Caesalpinia</i>	24
Figura 2: Selección de las semillas de <i>Caesalpinia spinosa</i>	39
Figura 3: Selección de las semillas de <i>Caesalpinia spinosa</i>	40
Figura 4: Esquema de la distribución de las semillas de <i>Caesalpinia spinosa</i> , dentro del medio basal MS.	42
Figura 5: Preparación del medio de cultivo MS.	43
Figura 6: Adición de hormonas vegetales al medio de cultivo.	44
Figura 7: Protocolo de desinfección para las semillas de <i>Caesalpinia spinosa</i>	45
Figura 8: Procedimiento de esterilización del material utilizado.	46
Figura 9: Materiales utilizados en el protocolo de desinfección de las semillas de <i>Caesalpinia spinosa</i>	47
Figura 10: Esquema de la distribución de las semillas de <i>Caesalpinia spinosa</i> , en los diferentes frascos contenedores.	48
Figura 11: Esquema de la distribución de las semillas de <i>Caesalpinia spinosa</i> , dentro del medio basal MS.	48
Figura 13: Utilización de botes de plástico autoclavables de 200 mL, consiguiendo una mejor distribución de las semillas y optimización de medio basal.	50
Figura 14: Distribución de las semillas de <i>Caesalpinia spinosa</i> , dentro del medio basal MS.	51
Figura 15: Disposición del material vegetal dentro de la cámara de crecimiento.	52
Figura 16: Cambio de medio del material vegetal germinado a medios MS con hormonas.	53
Figura 17: Comportamiento de los datos obtenidos con base en el porcentaje de germinación de las semillas con la aplicación de los diferentes tratamientos en la repetición 1.	56
Figura 18: Comportamiento de los datos obtenidos con base en el porcentaje de germinación de las semillas con la aplicación de los diferentes tratamientos en la repetición 2.	57
Figura 19: Comportamiento de los datos obtenidos con base en el porcentaje de germinación de las semillas con la aplicación de los diferentes tratamientos en la repetición 3.	58
Figura 20: Análisis cuantil-cuantil para la distribución normal de semillas germinadas.	59
Figura 21: Gráfico cuantil-cuantil de normalidad.	65
Figura 22: Prueba de Levene.	65
Figura 23: Gráfico de comparación de medias de los grupos de tratamientos.	67
Figura 24: Diagrama de cajas de las medias de los efectos de los tratamientos con combinaciones de biorreguladores en la raíz.	68
Figura 25: Diagrama de barras de las medias de los efectos de los tratamientos con combinaciones de biorreguladores en la raíz.	69

Figura 26: Gráfico cuantil-cuantil de normalidad para longitud de tallo.	70
Figura 27: Diagrama de cajas de las medias de longitud de tallo.	72
Figura 28: Diagrama de barras de las medias de longitud de tallo.	73
Figura 29: Gráfico de comparación de medias por grupos de tratamientos para la longitud de tallos.	74
Figura 30: Gráfico cuantil-cuantil de normalidad para número de hojas.	75
Figura 31: Diagrama de cajas de las medias de número de hojas.	77
Figura 32: Diagrama de barras de las medias de número de hojas	78
Figura 33: Comparación de medias por grupos de tratamientos para el número de hojas.	79
Figura 34: Gráfico cuantil-cuantil de normalidad para diámetro de cotiledones	80
Figura 35: Comparación de medias por grupos de tratamientos para el diámetro de cotiledones .	82
Figura 36: Diagrama de cajas de las medias del diámetro de cotiledones	83
Figura 37: Comparación de medias por grupos de tratamientos para el diámetro de cotiledones .	84
Figura 38. Efectos de los diferentes tratamientos con biorreguladores en función del desarrollo de las plántulas.	86
Figura 39: Ubicación del punto de recolección en la Comunidad Carmen de Zhipta.	102
Figura 40: Recolección de las semillas de <i>Caesalpinia spinosa</i>	106
Figura 41: Selección y separación de las semillas de <i>Caesalpinia spinosa</i> en maduras e inmaduras.	107
Figura 42: Ingreso de los medios y material para cultivos <i>in vitro</i> al autoclave.	108
Figura 43: Observación de estructuras de <i>Caesalpinia spinosa</i> con la ayuda del estereomicroscopio.	108
Figura 44: Ilustración científica de las estructuras de <i>Caesalpinia spinosa</i> . Realizada por Juan José Solórzano, tesista.	109
Figura 45: Proceso de esterilización en cámara de flujo laminar con la aplicación de UV.	110
Figura 46: Plántulas en proceso de desarrollo dentro de la cámara de crecimiento de la Universidad Politécnica Salesiana.	111
Figura 47: Plántulas en proceso de desarrollo dentro de la cámara de crecimiento de la Universidad Politécnica Salesiana.	111
Figura 48: Ejemplar desarrollado <i>in vitro</i> de <i>Caesalpinia spinosa</i>	112
Figura 49: Producción	113
Figuras 50-51: Pruebas de contaminación por agentes fúngicos presentes en los laboratorios de Ciencias de la Vida.	114
Figura 52: Plántula contaminada por levadura.	114
Figura 53: Plántula contaminada por agentes externos.	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de los biorreguladores dependiendo de su acción promotora e inhibidora..	33
Fuente: Tomada de (Azcón y Talón, 2013).	33
Tabla 2 Listado de reactivos, materiales y equipos utilizados.....	38
Tabla 3 Tratamientos pregerminativos propuestos para las semillas de <i>Caesalpinia spinosa</i>	41
Tabla 4. Combinaciones de hormonas propuestas para las semillas de <i>Caesalpinia spinosa</i>	53
Tabla 5. Resultados de los pretratamientos germinativos de la repetición 1, propuestos para las semillas de <i>Caesalpinia spinosa</i>	56
Tabla 6. Resultados de los pretratamientos germinativos de la repetición 2, propuestos para las semillas de <i>Caesalpinia spinosa</i>	57
Tabla 7. Resultados de los pretratamientos germinativos de la repetición 2, propuestos para las semillas de <i>Caesalpinia spinosa</i>	58
Tabla 8. Prueba Kruskal-Wallis de los tratamientos pregerminativos.....	60
Tabla 9. Análisis de significancia entre los pretratamientos utilizados para la germinación de semillas utilizando la prueba de Tukey.	60
Tabla 10. Datos recolectados de la germinación de semillas maduras con respecto a los tratamientos T1 y T2.....	61
Tabla 11. Ensayo del tratamiento T3, con semillas inmaduras para evaluación de porcentaje de germinación y contaminación.....	62
Tabla 12. Ensayo del tratamiento control con semillas maduras en dos sustratos diferentes.....	63
Tabla 13. Combinaciones y sus concentraciones de biorreguladores utilizados en los ensayos de cultivos <i>in vitro</i> de <i>Caesalpinia spinosa</i>	64
Tabla 14. Prueba de Tukey de comparación múltiple.	66
Tabla 16. Prueba ANOVA de longitud de tallo.....	70
Tabla 17: Prueba de Levene para longitud de tallo.	71
Tabla 18. Prueba de Tukey de comparación múltiple para longitud de tallo.	71
Tabla 19: Prueba ANOVA de número de hojas.	75
Tabla 20: Prueba de Levene para número de hojas.	76
Tabla 21: Prueba de Tukey de comparación múltiple para número de hojas.....	76
Tabla 22: Prueba ANOVA de diámetro de cotiledones.	80
Tabla 23: Prueba de Levene para diámetro de cotiledones.	81
ANEXOS	102
Tabla 26. Resultados de los pretratamientos germinativos propuestos de la repetición 2, para las semillas de <i>Caesalpinia spinosa</i>	104

Tabla 27. Resultados de los pretratamientos germinativos propuestos de la repetición 3, para las semillas de <i>Caesalpinia spinosa</i>	105
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

ANA: Ácido Naftalenacético.

AIA: Ácido Indol-3-acético.

AG3: Ácido Giberélico.

MSNM: Metros Sobre el Nivel del Mar.

WPM: Woody Plant Medium

MS: Murashige & Skoog

TDZ: Thidiazurón

PPM: Partes por millón

NaOCl: Hipoclorito de Sodio (cloro comercial).

KOH: Hidróxido de Potasio

HCL: Ácido clorhídrico

PVP: Polivinilpirrolidona

RPM: Revoluciones Por Minuto

PG: Porcentaje de Germinación

atm: Atmósfera de presión

s: segundos

min: minutos

H: horas

mL: mililitros

RESUMEN

Caesalpinia spinosa conocida informalmente como tara o guarango es una planta de gran interés comercial por las propiedades de sus vainas y semillas utilizadas como materia prima para la obtención de subproductos de una considerable demanda internacional, principalmente en los mercados europeos dedicados al sector de la curtiembre, farmacéutico, cosmética y alimentaria. Esta especie también es demandada en programas de reforestación y regeneración de suelos en estado de erosión. En el Ecuador, pese a ser uno de los seis países junto a Perú, Colombia, Venezuela, Chile y Bolivia, en donde *Caesalpinia spinosa* crece de manera a endémica, no se ha promovido la producción a gran escala tanto a nivel agrícola como de laboratorio de esta planta debido al limitado volumen bibliográfico experimental que proponga técnicas de micropropagación in vitro de esta especie arbustiva. En la presente investigación experimental como primera etapa se evaluaron cuatro tratamientos, siendo uno de control, para la germinación de semillas de *Caesalpinia spinosa* en estadios maduros e inmaduros. Tras la germinación de las semillas se evaluó la influencia de biorreguladores auxinas [ANA, y AIA] y giberelinas [AG₃] en el desarrollo de las plántulas previamente obtenidas, mediante cinco tratamientos, siendo uno de control, con diferentes combinaciones de los biorreguladores con un total de tres repeticiones por tratamiento. Los datos, producto de los tratamientos, fueron analizados estadísticamente, arrojando resultados con los que se comprobó bajo una perspectiva de diferenciación de medias de las características morfológicas de las plántulas que existen tratamientos que, en valores no tan altos, producen una mejor respuesta en el desarrollo de órganos específicos.

Palabras clave: *Caesalpinia spinosa*, micropropagación in vitro, biorreguladores.

ABSTRACT

Caesalpinia spinosa, informally known as tara or guarango, is a plant of great commercial interest due to the properties of its pods and seeds used as raw material to obtain by-products of considerable international demand, mainly in European markets dedicated to the tannery, pharmaceutical, cosmetic and food sectors. This species is also in demand in reforestation and regeneration programs for eroding soils. In Ecuador, despite being one of the six countries along with Peru, Colombia, Venezuela, Chile and Bolivia, where *Caesalpinia spinosa* grows endemically, large-scale production of this plant has not been promoted at both the agricultural and laboratory levels due to the limited volume of experimental literature proposing in vitro micropropagation techniques for this shrub species. In the present experimental investigation, as a first stage, four treatments were evaluated, one of them being a control, for the germination of *Caesalpinia spinosa* seeds in mature and immature stages. After seed germination, the influence of auxin bioregulators [ANA and AIA] and gibberellins [AG3] on the development of the previously obtained seedlings was evaluated in five treatments, one of which was a control treatment, with different combinations of bioregulators and a total of three replicates per treatment. The data from the treatments were analyzed statistically, yielding results that showed, under the perspective of differentiation of means of the morphological characteristics of the seedlings, that there are treatments that, at lower values, produce a better response in the development of specific parts of the plant.

Key words: *Caesalpinia spinosa*, in vitro micropropagation, bioregulators.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Los procedimientos de reproducción *in vitro* en cualquier especie vegetal que se elija, sea esta de tipo frutal [que es el campo más desarrollado en reproducción *in vitro*] sea para mejoramiento de las características genéticas (Kessel Domini, 2012; Zarantes, 2020) o para una mayor diversificación en el campo agrícola (Jiménez-Bonilla et al., 2016), se va a necesitar tener la pericia necesaria para obtener productos finales de calidad que satisfagan las necesidades de los investigadores o del proyecto *per sé*.

Con este sistema de cultivos se puede lograr controlar todos los factores que influyen sobre el medio, es decir, se puede simular los factores medioambientales óptimos o que el material vegetal necesite para que pueda desarrollarse de la mejor manera. Además, una de las ventajas por las cuales se ensaya con cultivos *in vitro*, es el poco espacio que se requiere para lograr producciones en masa y los reducidos tiempos que estos requieren versus los tiempos que naturalmente se maneja en un cultivo de tipo tradicional (Las Heras et al., 1995).

1.1. Antecedentes

Mediante bibliografía consultada, se exponen a continuación los antecedentes investigativos relacionados al tema expuesto de experimentación.

1.1.1. Micropropagación de especies arbustivas

Diversos estudios experimentales han concluido en protocolos exitosos para la propagación a nivel *in vitro* de una gran variedad de especies arbustivas. En la investigación de los autores Angulo et al. (2015), lograron exitosamente la micropropagación de *Vaccinium spp.*, a partir de segmentos foliares extraídos de explantes uninodales establecidos *in vitro* y de secciones de hojas directamente del campo, los cuales fueron introducidos en medio WPM enriquecido con TDZ y zeatina.

Fernández (1995), obtuvo resultados positivos en la germinación *in vitro* de semillas maduras e inmaduras de tres especies arbustivas, *Cytisus scoparius*, *Cytisus oromediterraneus* y *Genista florida*, las cuales lograron superar las fases de iniciación, multiplicación y enraizamiento, así mismo se evidenció el desarrollo de callos con la capacidad de regenerar brotes.

1.1.2. Cultivo *in vitro* de especies de la familia *Fabaceae*

Los esfuerzos realizados a nivel internacional en el campo de la conservación vegetal, en la cual incluyen el monitoreo de diferentes especies, en las cuales se incluyen las consideradas “raras”, se concibe como el motivo principal para el desarrollo e implementación de técnicas modernas en la reproducción y el cultivo de especies vegetales en condiciones *ex situ* (Erst & Nuzhdina, 2020), por lo que la micropropagación es una alternativa usada en actividades de propagación masiva conservando las características únicas de las especies de interés. Dentro del campo de la familia de las *Fabáceas*, es imperante su importancia dentro del desarrollo de técnicas de cultivos *in vitro*, debido tanto a su alto valor ecológico para con los sitios en los cuales han sido sembradas, como la versatilidad del material vegetal a obtener para realizar los cultivos [segmentos nodales, regeneración de yemas axilares, semillas, entre otros] los mismos que son utilizados en proyectos de reforestación (Hernández-García et al., 2021; Stambouli et al., 2012).

1.1.3. Propagación *in vitro* de especies del género *Caesalpinia*

Dentro del género *Caesalpinia* varias especies cuentan con estudios científicos en los que se ha logrado con éxito su propagación a nivel *in vitro*, como es el caso de *Caesalpinia pulcherrima* L., *Caesalpinia echinata*, *Caesalpinia bonduc* y *Caesalpinia pyramidalis*. Sin embargo, hasta la actualidad no existe bibliografía experimental que exponga un protocolo exitoso para la propagación *in vitro* de *Caesalpinia spinosa* pese a ser una especie con gran valor ecológico e industrial (Núñez et al., 2017).

1.1.4. Cultivo in vitro de *Caesalpinia spinosa*.

La propagación de las especies pertenecientes al género de *Caesalpinia*, utilizando las técnicas *in vitro*, es viable mediante el uso de semillas o con el uso de explantes. La propagación de tipo *in vitro*, es una técnica biotecnológica utilizada donde se explora la totipotencia natural de las células vegetales (Da Silva, Imakawa, et al., 2018), las mismas que proveen una reproducción superior relacionada con el mantenimiento genético (Da Silva, Bruno, et al., 2018) mediante el uso de pequeños fragmentos de tejido vivo llamados explantes, los cuales son aislados de un organismo y cultivados en un medio de cultivo nutritivo (Da Silva, Imakawa, et al., 2018; Gatti et al., 2016).

1.2. Problema de investigación

En las regiones andinas de Ecuador *Caesalpinia spinosa* habita de manera endémica debido a las condiciones geográficas y atmosféricas adecuadas para esta especie vegetal, la cual se desarrolla óptimamente entre los 1600 a 2800 msnm (Melo Ferrari et al., 2013), siendo una especie de gran relevancia industrial principalmente por las sustancias orgánicas almacenadas en sus vainas y semillas de las que por medio de diversos procesos productivos se obtienen productos de gran demanda por la industria del curtido de cuero, alimenticia y farmacéutica, razón por la que la producción internacional de esta especie puede alcanzar hasta las 100 mil toneladas según datos del Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego de Perú (2011).

A pesar de la gran demanda internacional de *Caesalpinia spinosa*, que ha aumentado progresivamente desde el año 2003, según explican los autores Sangay & Duponnois (2018), la cantidad de literatura científica enfocada a plantear protocolos de germinación y micropropagación *in vitro* utilizando biorreguladores de crecimiento para acelerar el desarrollo de esta especie es muy limitada, lo que dificulta programas de investigación experimental dirigida a producir de manera masiva esta especie vegetal, lo que a su vez resulta en que Ecuador, pese a ser hábitat endémico de *Caesalpinia spinosa*, su volumen de producción sea extremadamente bajo de apenas

30 toneladas, basándonos en los datos reportados por el Plan Binacional de Desarrollo de la Región Fronteriza (2022).

1.3. Pregunta de investigación

¿Los biorreguladores de crecimiento de los grupos auxinas y giberelinas intervienen de manera positiva en el desarrollo de plántulas de *Caesalpinia spinosa* con mejores características morfológicas a nivel *in vitro*?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Evaluar la relación de los reguladores de crecimiento auxinas-giberelinas en el desarrollo *in vitro* de plántulas de *Caesalpinia spinosa* obteniendo material vegetal con mejores características morfológicas.

1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar el pretratamiento germinativo en dos estadios [inmaduro y maduro] de las semillas de *Caesalpinia spinosa* conociendo el mayor porcentaje de germinación *in vitro* mediante el registro del porcentaje de germinación de semillas.
- Evaluar la combinación de diferentes concentraciones de auxinas [ANA, AIA] y giberelinas [AG₃] en cultivos *in vitro* de *Caesalpinia spinosa* para la obtención de plántulas con mejores características morfológicas.
- Analizar los datos obtenidos referentes a germinación y obtención de plantas mediante el uso de técnicas estadísticas para la determinación de las diferencias significativas entre los tratamientos.

1.5. Hipótesis

1.5.1. Hipótesis alternativa

Los biorreguladores auxinas y giberelinas poseen efecto en el desarrollo de plántulas de *Caesalpinia spinosa* a nivel *in vitro*

1.5.2. Hipótesis nula

Los biorreguladores auxinas y giberelinas no poseen efecto en el desarrollo de plántulas de *Caesalpinia spinosa* a nivel *in vitro*.

1.6. Justificación

En el proceso de propagación *in vitro* es necesario contar con una cantidad considerable de explantes o segmentos nodales en el menor tiempo posible, para el caso de *Caesalpinia spinosa* la germinación y desarrollo de la nueva plántula en condiciones *in vitro* es un proceso con relativa lentitud, para afrontar esta situación se hace necesario la aplicación de reguladores de crecimiento que permitan un desarrollo mayor de la nueva plántula y esta, a su vez, sea donadora de material para continuar el proceso de micropropagación.

1.7. Limitaciones

Disponibilidad de semillas en ambos estadios [maduras e inmaduras] durante la recolección. Tiempo de respuesta de las semillas para su germinación.

CAPÍTULO 2

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Género *Caesalpinia*

Dentro de la familia de las leguminosas se integra el género *Caesalpinia*, el cual comprende alrededor de 70 a 165 especies con una diversidad numerosa de árboles y arbustos tropicales dispersados a nivel mundial (M. García, 2011).

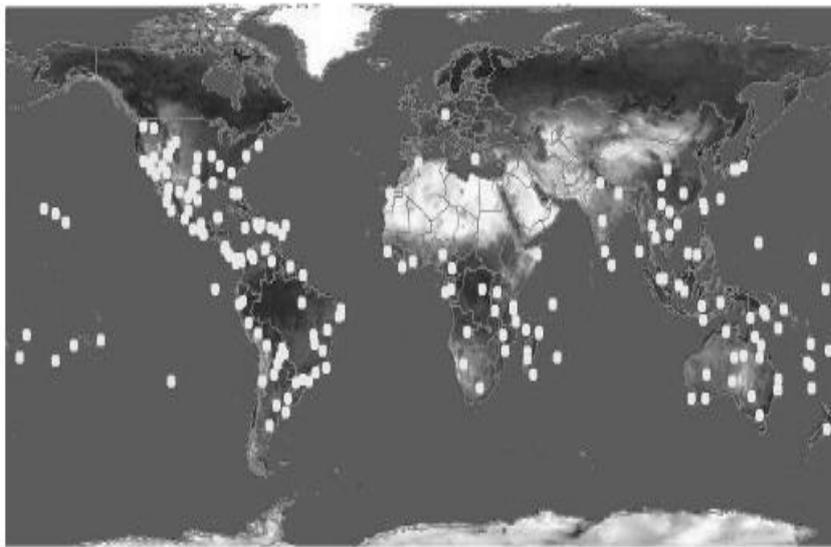


Figura 1. Presencia a nivel mundial del género *Caesalpinia*.

Fuente: (García, 2011)

2.2. *Caesalpinia spinosa*

Para tener una visión más generalizada con respecto a la especie vegetal escogida para esta investigación se exponen a continuación los criterios que comprenden: taxonomía, generalidades, distribución geográfica y botánica.

2.2.1. Taxonomía

Reino: Vegetal

División: Espermatofita

Clase: Angiosperma

Orden: Fabales

Familia: Caesalpinacea

Género: *Caesalpinia*

Especie: *Caesalpinia spinosa* Kuntze

2.2.2. Generalidades

El largo tiempo de vida de *Caesalpinia spinosa* la caracteriza como una planta longeva y a su vez sus requerimientos agrícolas son bajos, por lo que es considerada como una potencial especie en programas de reforestación (Villanueva, 2007).

En Ecuador la especie *Caesalpinia spinosa* es conocida comúnmente como guarango, tara o dividivi. Su presencia es endémica de las regiones de los Andes de Sudamérica, siendo el centro de Perú considerado potencialmente como su lugar de origen (Charco, 2015).

Perú es el país predominante en realizar masivamente el cultivo de *Caesalpinia spinosa* debido a su beneficio ecológico, de mejorar la disponibilidad del agua en zonas áridas y a su valor económico debido a la concentración de taninos presentes en las vainas de este árbol (Cordero et al., 2017). La gran presencia de cultivos de *Caesalpinia spinosa* le otorga a Perú el primer puesto como exportador de harina de tara rica en taninos (Núñez et al., 2017).

La presencia de la tara en Ecuador es endémica de las regiones andinas y considerada con un alto volumen de disposición debido a las diversas zonas geográficas que cuentan con las características ambientales necesarias para el desarrollo de este árbol. Se encuentra principalmente en Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar, Azuay y Loja, sobre todo en altitudes que oscilan entre los 1500 a 3000 msnm (Narvaez-Trujillo, Calvo, y Troya, 2010).

2.2.3. Distribución geográfica

Se distribuye principalmente en zonas de elevada altura sobre el nivel del mar, siendo más fácil localizarla en las regiones andinas de Ecuador, Perú, Colombia, Bolivia y Venezuela, con mayor presencia entre los 4° y 32° S (Lapa, 2004).

2.2.4. Descripción botánica

Las generalidades expuestas en líneas posteriores hacen referencia a una breve descripción botánica de las diferentes partes de la especie elegida.

2.2.4.1. Árbol

En estado adulto el árbol de *Caesalpinia spinosa* es de tamaño pequeño, oscilando entre los dos a tres metros de altura, su tronco presenta una coloración gris opaca caracterizada por espinas que pueden alcanzar hasta los 4 milímetros, se cree que debido a estas estructuras le fue dado su nombre. Puede alcanzar como máximo 40 centímetros de diámetro. La forma de su copa es irregular, conformada por un volumen espeso de hojas compuestas, bipinnada, de coloración verduzca. Su fruto característico son vainas oblongas que almacenan entre 5 a 7 semillas (Cabello Liu, 2010).

2.2.4.2. Tronco

En estado adulto, *Caesalpinia spinosa* puede alcanzar hasta los 3 metros de altura, por lo que es una especie relativamente de longitud baja, por ende, su tronco, con características rugosas, tiende a desarrollar un crecimiento corto que generalmente presenta ramificaciones desde su base.

La característica que lo diferencia de las otras especies dentro de su género es la presencia de espinas o aguijones tanto en su tronco como en las ramas (Dostert et al., 2009).

2.2.4.3. Hojas

Las ramas de *Caesalpinia spinosa* presentan hojas compuestas con una forma ovoide de máximo 4 centímetros de longitud. Su coloración es verde, cuya tonalidad varía dependiendo del estadio del árbol, siendo un verde brillante y vivo en su etapa joven, mientras que en estado adulto su intensidad y brillantez decaen hasta tomar una coloración verde oscura (Loján, 1992).

2.2.4.4. Flores

La forma de las flores es irregulares y de coloración rojiza brillante, con una longitud que oscila entre los 8 centímetros, alcanzando como máximo 15 cm, las cuales se encuentran repartidas en racimos (Nieto e Hidrobo, 2011).

2.2.4.5. Frutos

Los frutos son vainas de forma ligeramente curvada que oscilan entre los 6 a 8 cm de largo y entre 1.5 a 2.5 cm de ancho, su coloración puede ser verde claro, verde-amarillento, rojo opaco o marrón, dependiendo del estado de madurez (Villanueva, 2007).

Las vainas presentan una depresión ocasionada por el contenido de las semillas. El color de los frutos suele ser de tonalidad verde amarillento o verde claro en estado inmaduro y rojo opaco o marrón en estado maduro. Cada vaina puede contener entre cuatro a seis semillas (Villena, Seminario, y Valderrama, 2019).

2.2.4.6. Semillas

Presentan una forma ovoide y pueden llegar a ser mínimamente aplanadas, aunque esta última no es una característica presente en todas las semillas, incluso puede ser señal de viabilidad para la germinación. Su coloración depende de la madurez, siendo que semillas inmaduras son de color verde claro, mientras que las maduras son marrones (Nieto e Hidrobo, 2011)

El ancho de las semillas oscila entre los 6 hasta los 9 mm de diámetro, y su hilo se puede encontrar en el centro superior o recorrido mínimamente hacia un lateral de la semilla (Villena et al., 2019).

2.2.5. Usos de *Caesalpinia spinosa*

A continuación, se enumeran los usos más representativos que se le dan esta especie, como son de tipo económico, ancestral, uso agrícola, así como, sus productos derivados y aplicaciones en medicina ancestral e industrial.

2.2.5.1. Relevancia económica

Caesalpinia spinosa posee una rica fuente de taninos contenidos en sus vainas, los cuales sirven como materia prima para la elaboración de gomas, también es una fuente de galactómanos e hidrocoloides muy demandados comercialmente, lo que la convierte en una especie de gran uso y valor comercial (Terán-Hilares et al., 2018).

El uso y la importancia económica de *Caesalpinia spinosa* es de tal magnitud que Perú, ha destinado gran parte del sector agrícola al cultivo masivo de esta especie, lo que la convierte en el primer exportador de tara a nivel mundial (Rigano et al., 2019)

Pese a que Perú es el líder mundial de exportación de *Caesalpinia spinosa* [tara] dominando un 80% del mercado, gracias a la región Cajamarca, que produce un 40% de su producción total, no cubre por completo la demanda internacional, la cual es de 100 mil toneladas siendo así que apenas exporta 5 mil toneladas, lo que abre las puertas para que países en donde esta especie es endémica compita en su exportación. La gran demanda de *Caesalpinia spinosa* es debido a los productos que pueden obtenerse de sus frutos, los cuales son muy demandados por los mercados químicos, farmacéuticos, cosméticos y alimenticios (MINAGRI, 2019; Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego de Perú, 2011).

2.2.5.2. Uso ancestral

El uso más antiguo documentado de la tara es para curtir cueros y como tinte para teñir lana y algodón (Molina, 1810).

La aplicación ancestral o tradicional más relevante de la tara es del uso de sus vainas para el tratamiento de cuero e incluso para la fabricación de cerámica por medio de moler las semillas hasta obtener polvo, por otro lado, también se ha documentado su uso medicinal gracias a sus propiedades astringentes (De la Torre, 2018).

La medicina ancestral emplea la tara para el tratamiento de malestares de garganta y de estómago, diarreas, evitar infecciones en heridas crónicas y resfriados (Lapa, 2004).

El tronco de la tara en estado adulto es utilizado para la obtención de madera destinada para servir como vigas para la construcción de viviendas, herramientas, leña y como carbón vegetal (Seinfeld et al., 1998).

2.2.5.3. Protección de suelos

Es una especie utilizada también para la regeneración y cuidado de suelos que se encuentran en estado de erosión debido a la falta de agua, ya que es una planta capaz de soportar condiciones adversas (Camp y Daugherty, 1999).

2.2.5.4. Asociación en cultivos

Caesalpinia spinosa es una planta con gran captación y fijación de nitrógeno, por lo que es cultivada en conjunto con otras especies de interés comercial con la finalidad de obtener mejores cultivos, como es el caso del maíz, papa y habas (Lapa, 2004).

2.2.6. Productos de *Caesalpinia spinosa*

A continuación, se expone una breve descripción de los productos que se pueden obtener gracias a esta especie vegetal, siendo estos de interés económico reconocido en el territorio peruano, despertando el interés por el estudio de las bondades de esta fabácea.

2.2.6.1. Productos derivados de la vaina

La vaina de la tara, sin contar las semillas, es una rica fuente de taninos vegetales, siendo así que es la parte que almacena la mayor cantidad de dicha sustancia orgánica (Figuerola, Jimenez, y Oblitas, 2014).

Las semillas son retiradas para usar únicamente las vainas, las cuales son sometidas a un proceso de molienda para obtener el polvo de tara que consiste en un producto utilizado como materia prima para la obtención de ácido tánico (Avilés et al., 2010).

El ácido tánico es un compuesto muy demandado en la industria del tratamiento de cueros, ya que aumenta la calidad del producto mejorando su resistencia, además actúa como bactericida (Santaella y Ureña, 2017).

A partir de las vainas de *Caesalpinia spinosa* también se puede extraer ácido gálico, un producto codiciado dentro de la industria farmacéutica gracias a sus propiedades cicatrizantes y como agente para combatir o tratar afecciones estomacales (Melo Ferrari, Glorio Paulet, y Tarazona Reyes 2013; Nobre et al., 2019).

2.2.6.2. Productos derivados de la semilla

A partir del endosperma de las semillas de *Caesalpinia spinosa* es posible obtener una sustancia gomosa con propiedades gelificantes y espesantes, por lo que es muy demandada en varios campos industriales como la cosmética, alimentaria y farmacéutica (Pavón-Vargas y Valencia-Chamorro, 2016).

2.3. Biorreguladores

Los biorreguladores o también llamados bioestimulantes son sustancias que al ser absorbidas por material vegetal como lo pueden ser semillas, explantes o bien la planta completa, son capaces de potenciar o inhibir el desarrollo fisiológico (León, 2011).

Los biorreguladores son capaces de intervenir en el desarrollo de diferentes tejidos

vegetales debido a cuentan en su composición química con fitohormonas, las cuales son moléculas producidas por las plantas, por lo que su mecanismo de acción es a nivel celular, regulando las etapas de crecimiento de los tejidos (Cortes et al., 2019). Estos compuestos son efectivos a bajas concentraciones en procesos de desarrollo de plántulas a nivel in vitro (Hernández y Diosdado, 2010).

Las fitohormonas son moléculas reguladoras de funciones celulares que desencadenan en el desarrollo correcto de la planta, ya que cuentan con funciones estrictamente establecidas que participan en procesos específicos como por ejemplo el proceso de germinación, desarrollo radicular, captación de luz, elongación de tallo, formación de hojas, etc. (Checa, 1996).

La importancia de los biorreguladores de crecimiento recae en que mediante su aplicación es posible acelerar procesos de germinación de semillas que de manera natural tardarían largos periodos de tiempo en lograrlo, de igual manera es posible el desarrollo de eventos fisiológicos como la elongación de raíces o tallos, floración y aparición de hojas verdaderas, lo que supone en un mejor aprovechamiento del tiempo, especialmente en investigaciones a nivel in vitro o en el sector agrícola para fines comerciales (Diaz, 2017). Así lo comprobó Constantino et al. (2010), en su investigación experimental en la que mediante la aplicación de biorreguladores de crecimiento logró incrementar el volumen de germinación de semillas de *Carica papaya* en un lapso menor de tiempo en comparación a los de tratamiento de control en el que no se aplicó ningún bioestimulante.

2.3.1. Clasificación de los biorreguladores

Según el trabajo realizado por Diaz (2017), sostiene que se han establecido cinco grupos en los que se clasifican los biorreguladores, dependiendo del efecto que cumplen en las plantas, siendo estos:

- Auxinas
- Giberelinas

- Citocininas
- Etileno
- Ácido abscísico

Los autores Azcón y Talón, (2013) indican que los cinco grandes grupos de biorreguladores se subdividen en dos subgrupos dependiendo de su función promotora o inhibidora en el desarrollo de la planta, la cual se detalla en la tabla 1.

Tabla 1 Clasificación de los biorreguladores dependiendo de su acción promotora e inhibidora.

Biorreguladores	
Promotores de crecimiento	Inhibidores de crecimiento
Auxinas	Ácido abscísico
Giberelinas	Etileno
Citocininas	

Fuente: Tomada de (Azcón y Talón, 2013).

2.3.2. Auxinas

Las auxinas estimulan la aparición y elongación de tallos y la formación de raíces adventicias, esto ocurre mediante la estimulación a nivel celular en donde promueven la división, diferenciación y elongación de las células, además de aumentar la síntesis proteica. En esta clasificación los grupos más relevantes son: Ácido Indol-acético [AIA], Ácido Naftalenacético [ANA] y Ácido Indol-butírico [IBA] (Cortés et al., 2019).

Este biorregulador también es fuertemente relacionado con el fototropismo de la planta, es decir, la inclinación en el crecimiento del tallo dependiendo de la dirección de donde provenga la luz, ya que las auxinas, por su afinidad a la luz, al distribuirse por los tejidos provoca que las zonas expuestas a la luz se elonguen de mayor manera en comparación a las zonas que permanecen en oscuridad (Azcón y Talón, 2013)

2.3.3. Giberelinas

Las giberelinas son esenciales en el desarrollo de plántulas desde su germinación, ya que las semillas cuentan con una reserva de giberelinas de gran importancia para poder llevar a cabo la ruptura de la semilla y la formación de la raíz, de igual manera está fuertemente vinculado con el alargamiento de la altura del tallo (Jordán, 2006).

El desarrollo y crecimiento de los tejidos de manera constante está proporcionalmente ligado a la reserva de giberelinas que posea la planta o en los medios de cultivo en donde se haya cultivado el material vegetal, así mismo el alargamiento de los segmentos nodales se encuentra

ligado al proceso de desarrollo y las etapas tempranas de la floración pueden ser potenciadas con este biorregulador. Destacan en este grupo: AG₃, AG₂, AG₁ (Cortés et al., 2019).

CAPÍTULO 3

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Nivel de investigación

El planteamiento del nivel de investigación está relacionado directamente basándose en el alcance del objetivo general y de los objetivos específicos. El alcance exploratorio se relaciona con el objetivo cuya principal finalidad es analizar una problemática con antecedentes experimentales limitados. El alcance descriptivo tiene como objetivo especificar características e información relevante de personas, grupos, procesos, objetos o cualquier fenómeno que sea posible someter a un análisis. El alcance explicativo está centrado en explicar la razón de que ocurra un fenómeno en conjunto con las condiciones que se requieren para que suceda el evento, siendo estas variables a relacionar (Hernández Sampieri, 2014).

La presente propuesta de experimentación abarca los tres niveles de alcance de investigación previamente explicados, siendo estos de carácter exploratorio, descriptivo y explicativo, debido a que es un tema con bajo volumen de antecedentes experimentales bibliográficos en cuyos procesos se implementarán variables relevantes para analizar datos concluyentes.

3.2 Diseño de experimentación

El diseño de investigación de la presente propuesta es de carácter experimental, llevado a cabo en condiciones controladas por los investigadores, en el que se considerarán una o más variables independientes destinadas a la manipulación intencional para analizar las respuestas ocasionadas sobre una o más variables dependientes, basándonos en un diseño experimental de bloques completamente al azar.

Los objetivos específicos cuentan con variables independientes como lo son: tratamientos pre germinativos en los que se incluyen tiempo de remojo [H], corte en la cutícula, tiempo en

ebullición [min], así como la concentración de reguladores de crecimiento [ppm] para el desarrollo de plántulas con mejores características morfogénicas. Siendo así que las variables dependientes a evaluar son: porcentaje de germinación [%], longitud de la raíz [cm], longitud del tallo [cm], diámetro de los cotiledones [cm], número de folíolos.

3.3 Ubicación

La fase experimental del presente proyecto de investigación se llevará a cabo en los Laboratorios de Ciencias de la Vida, pertenecientes a la Universidad Politécnica Salesiana. Las muestras botánicas recolectadas [semillas] se lo hizo en la Comunidad Carmen de Zhipta, perteneciente al cantón Jima, provincia del Azuay en las coordenadas -3.193029, -78.950226 [ver el Anexo 1].

3.4 Población y muestra

3.4.1 Población

En cuanto a la población, la zona destinada a la recogida del material botánico será en la Comunidad Carmen de Zhipta, perteneciente a la provincia del Azuay, esta zona presenta una climatología fría, propicia para el crecimiento y el desarrollo de las especies de *Caesalpinia*. En este espacio se encuentran dos especímenes elegidos para la recolección de las semillas.

3.4.2 Muestra

Para la elección de la muestra dentro de la presente investigación, se aplicará un muestreo aleatorio simple, y se asignará a cada grupo de semillas una identificación como “maduras” e “inmaduras”, según el estadio en el cual se encuentren las muestras obtenidas.

Se determina que el número de individuos por cada unidad muestral corresponde a un número de 10.

3.5 Variables

3.5.1 Variables Independientes

- Tratamiento pre germinativo.
- Concentración [ppm] de los reguladores de crecimiento.

3.5.2 Variables Dependientes

- Porcentaje de germinación [%]
- Longitud de la raíz [cm]
- Longitud del tallo [cm]
- Diámetro de los cotiledones [cm]
- Número de folíolos.

3.5.3 Variables controladas

Temperatura, pH, concentración de reguladores de crecimiento, periodos de luz [12 horas de fotoperíodo].

3.6 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La recolección de muestras vegetales con respecto a campo se realizará mediante técnica de observación, mientras que en cuanto al laboratorio se emplearán tanto técnica de experimentación como de observación.

Los datos recolectados se dividirán en dos grupos con base en el lugar de su recolección. En campo: número de semillas; en laboratorio: longitud de explantes [cm], tasa de contaminación [%], tasa de desarrollo [%], número de brotes por explante, tiempo de respuesta a reguladores de crecimiento [días], número de semillas germinadas. Tanto los datos recolectados en campo como en laboratorio son cuantitativos y serán registrados en listas de control.

3.7 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Todos los datos obtenidos se analizarán con el software estadístico libre R y el software Minitab, versión 2018. Los resultados de la variable dependiente se presentarán como medias \pm desviación estándar. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se evaluarán con la prueba de Shapiro-Wilk y prueba de Levene, respectivamente. Las diferencias entre los tratamientos se evaluarán con el modelo ANOVA de una vía, con un nivel de significancia de

0,05. Se realizarán comparaciones múltiples por parejas por la prueba de Diferencia Significativa Honesta de Tukey y los resultados se expresarán como intervalos de confianza al 95%.

3.8 Equipos, reactivos y materiales

Se muestran a continuación los equipos, materiales y reactivos utilizados en el presente trabajo de investigación.

Tabla 2 Listado de reactivos, materiales y equipos utilizados.

Reactivos	Materiales	Equipos
Ácido Indol Ácético [AIA]	Frascos	Medidor de pH Mettler Toledo
Ácido Giberélico [AG3]	Matraz Erlenmeyer	Autoclave Biobase
Ácido Naftalenacético [ANA]	Espátula	Balanza analítica Mettler Toledo
Medio de cultivo Murashige Skoog	Parafilm	Cámara de flujo laminar Faithful
Polivinilpirrolidona [PVP] Lobachemie	Balones de aforo	
Agar Culture Plant SRL	Micropipeta	
Agua destilada		
Azúcar		

Fuente: Elaborada por los autores.

3.9 Procedimiento

El procedimiento expuesto a continuación se lo realizó en cuatro fases que se detallan a continuación:

3.9.1 Fase 1: Obtención de las semillas

Las semillas de *Caesalpinia spinosa*, fueron obtenidas de los dos ejemplares antes mencionados, los mismos que se encuentran ubicados en la Comunidad Carmen de Zhipta, Jima.



Figura 2: Selección de las vainas de *Caesalpinia spinosa*.

Fuente: Autores.

Se seleccionan las vainas de *Caesalpinia spinosa*, con mejores características morfológicas [ver Anexo 3], tomando en cuenta que el estado de estas se halle dentro de los parámetros requeridos de madurez e inmadurez. Se evita recoger las vainas que estén caídas en el piso.

Se separan las semillas tanto en maduras como en inmaduras [figura 3 y Anexo 3]. A continuación, se procede a delimitar una muestra entre 40 - 60 semillas para cada uno de los tres pretratamientos germinativos y el grupo control.



Figura 3: Selección de las semillas de *Caesalpinia spinosa*.

Fuente: Autores.

3.9.2 Fase 2: Tratamientos pre germinativos de las semillas de *Caesalpinia spinosa*

En esta segunda fase, las semillas se sometieron a cuatro pretratamientos germinativos, como se detalla en la tabla 3.

Tabla 3 Tratamientos pregerminativos propuestos para las semillas de *Caesalpinia spinosa*

Tratamiento	Repetición	Semillas/Repetición	Semillas/Tratamiento	Referencias
T1: corte en polo opuesto al embrión	3	40	120	Autores.
T2: corte transversal de la semilla	3	40	120	Autores.
T3: remojo en agua [48h] + retiro de la testa	3	40	120	(Scalon et al., 2012; Viveros-Viveros et al., 2018)
Control	3	40	120	
Total semillas			480	

Fuente: Elaborada por los autores.

Los pretratamientos germinativos T1 y T2, fueron propuestas de los autores. El tratamiento T3, se fue desarrollando siguiendo las indicaciones de Scalon et al. (2012); Viveros-Viveros et al., (2018), en el caso del control, fue ensayado con el medio basal MS (Krikorian, 1993).

3.9.3 Fase 3: Diseño de los medios de cultivo

La parte experimental se la realizó en el Laboratorio de Biotecnología, perteneciente a los Laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Cuenca.

El medio basal que se utilizó para el proceso de establecimiento *in vitro*, fue basado en los estudios de Fermino Junior & Scherwinski-Pereira (2012) corresponde a medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con azúcar de mesa [30 g/L], *agar for plant tissue culture SRL* [8% p/v], antioxidante polivinilpirrolidona [PVP] Lobachemie [500 ppm], el pH fue ajustado utilizando KOH 2N y HCl 1N respectivamente.

La mezcla de los componentes del medio se lo realiza en un matraz Erlenmeyer [de capacidad variable, según lo que se requiera], los mismos que serán disueltos en agua destilada o, por el contrario, se puede utilizar agua mili-Q. Los componentes: [i] MS, [ii] azúcar, [iii] PVP, son

agitados con la ayuda de un magneto que se lo coloca en el interior del matraz, y este sobre una placa de agitación, que en este trabajo se usó una placa marca Velp Scientifica, la misma que nos servirá para calentarlo en pasos posteriores [figura 5].

Para la realización de cultivos *in vitro*, como paso previo es imperioso el comprobar que el pH esté en un rango entre 5,8 [sin el uso de hormonas] a 6 [con el uso de hormonas] (Corredor Lara et al., 2022). En este trabajo de titulación se utilizó un equipo de medición marca Mettler-Toledo [figura 4].

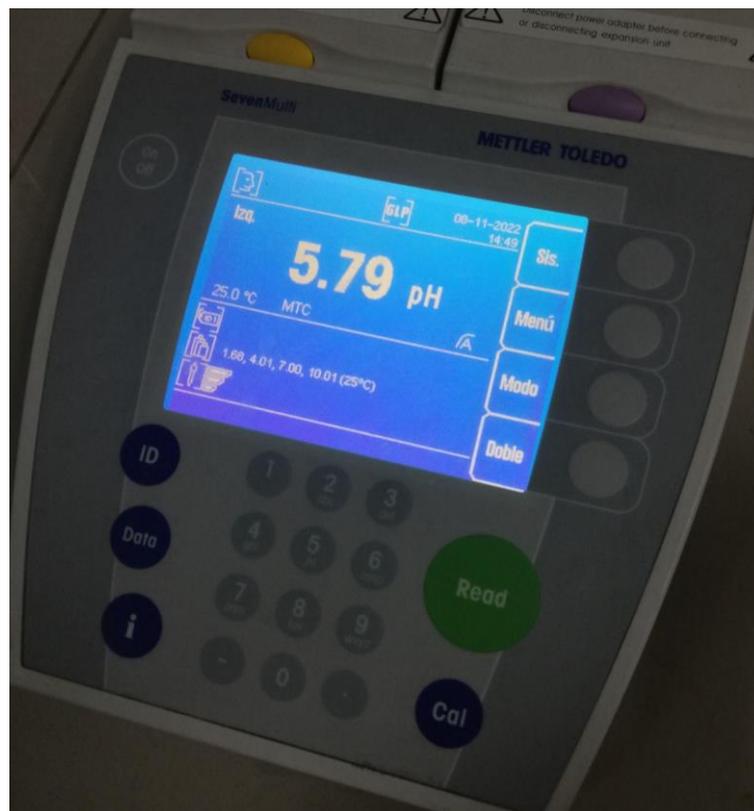


Figura 4: Equipo de medición de pH marca Mettler Toledo usado para la medición de la acidez o basicidad de los medios de cultivo a realizar.

Fuente: Autores

Como siguiente paso se coloca el medio en la placa calefactora con agitación [figura 5] hasta alcanzar el punto de ebullición, consiguiendo de esta manera que el agar se integre al medio

antes de ingresar el autoclave [se obtuvo buenos resultados en relación tiempo-homogeneizado, al calentar en la placa a 400 °C y 2-4 rpm de velocidad].

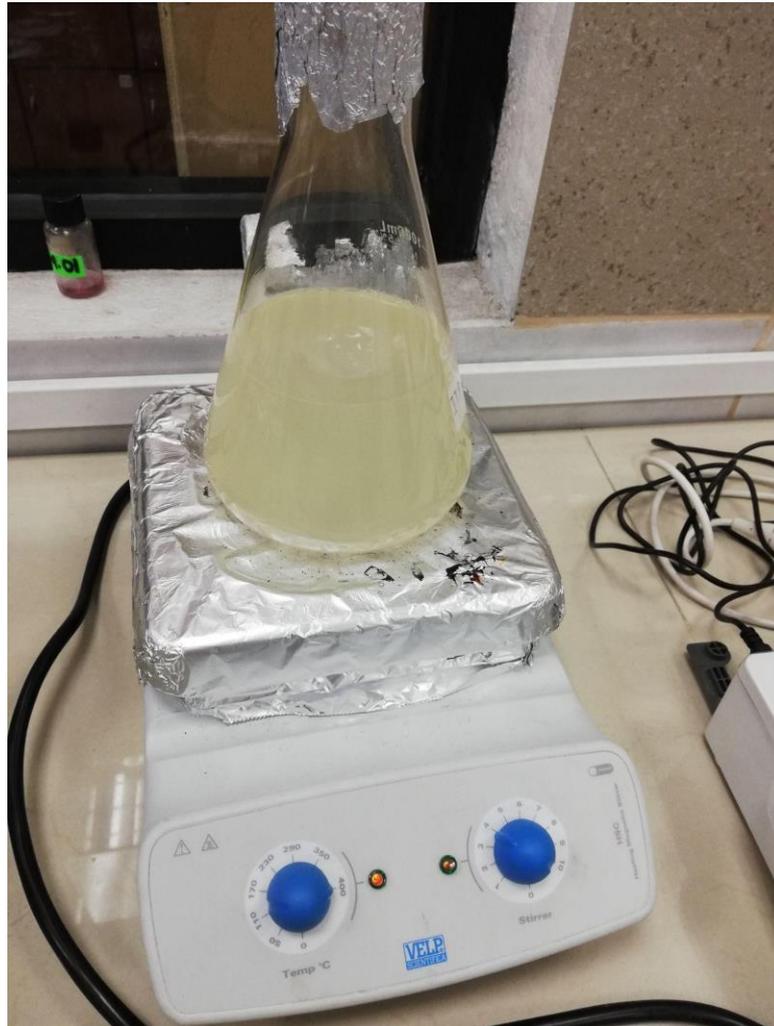


Figura 5: Preparación del medio de cultivo MS.

Fuente: Autores

A continuación, se coloca dentro del autoclave [el equipo utilizado es de marca Biobase] el medio de cultivo, junto con el material de vidrio [frascos] o botes de plástico autoclavables. El ciclo utilizado fue: 121 °C, durante 10 minutos a una atmósfera de presión [1 atm].

Las hormonas utilizadas para inducir el desarrollo de la radícula, cotiledones, hojas y crecimiento del tallo de las plántulas obtenidas después de diez días de germinación fueron: ácido indolacético [AIA] [0.02 ppm] (Silveira et al., 2022), ácido naftalenacético [ANA] Lobachemie

[0.025 ppm] (Cardoso & Teixeira da Silva, 2013; Pramanik & Datta, 1986) y ácido giberélico [AG3] [0.025 ppm] (Gupta & Chakrabarty, 2013), los mismos que se colocaron dentro del medio de cultivo después del ciclo de autoclavado [figura 6].



Figura 6: Adición de hormonas vegetales al medio de cultivo.

Fuente: Autores.

3.9.4 Fase 4: Protocolo de desinfección de las semillas

Para la cuarta fase, el protocolo de desinfección se lo realizó al interior de una cámara de flujo laminar de marca Faithful siguiendo los lineamientos de literatura consultada (Gammoudi et al., 2022; Ishibashi et al., 2017; Silva et al., 2016; Silveira et al., 2022), dichos protocolos han sido adaptados para el procedimiento de desinfección de semillas para cultivos *in vitro* de *Caesalpinia spinosa*. El protocolo de desinfección realizado en el presente trabajo se detalla a continuación: Tween 20 [20 μ L por 1L], durante 10 minutos; etanol 70%, durante 1 minuto; y por último NaOCl 1.5% v/v, durante 10 minutos. Después de cada fase de desinfección, fueron

enjuagadas las semillas con agua estéril, repitiendo el proceso por tres veces por cada fase durante un aproximado de 30 segundos para retirar el exceso de los productos de desinfección utilizados [figura 7].

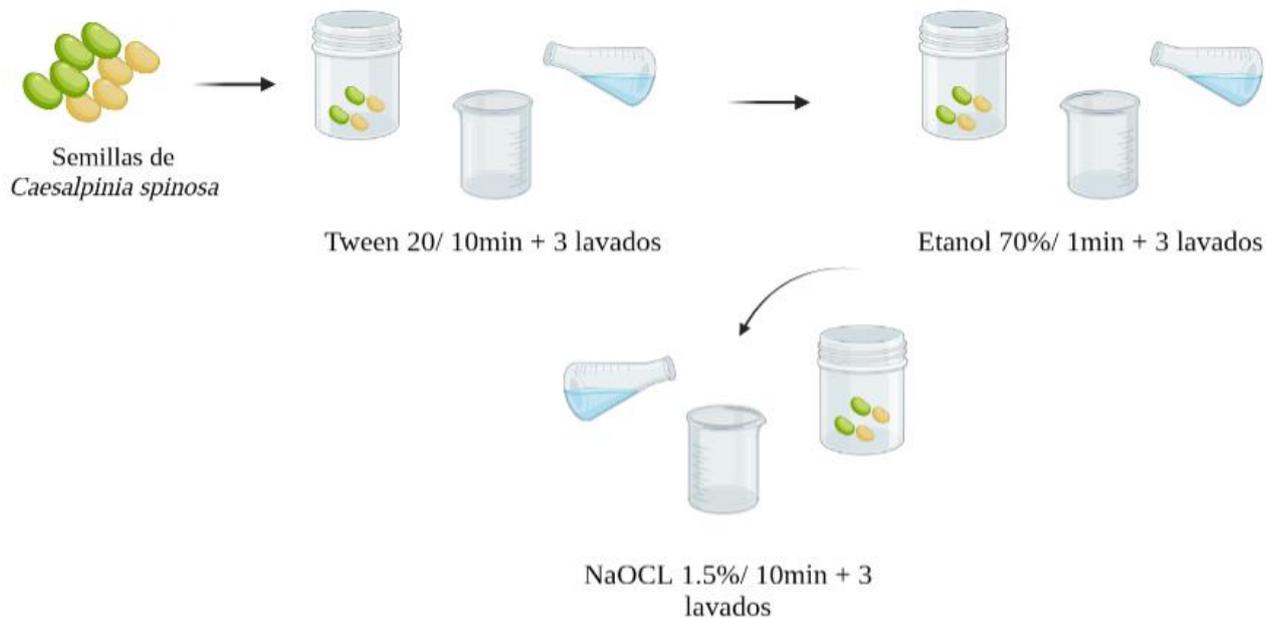


Figura 7: Protocolo de desinfección para las semillas de *Caesalpinia spinosa*.

Fuente: Autores.

El material utilizado para la desinfección consta de: frascos de vidrio [para formulación de las soluciones de Tween 20, etanol, NaOCl, lavado de semillas y descarte], pinzas de varios tamaños [figura 9], el mismo que fue autoclavado previamente, a una temperatura de 120 °C, durante un tiempo de 15 minutos, con una posterior exposición de UV durante 15 minutos dentro de la cámara de flujo laminar de marca Faithful para garantizar la esterilidad en el material –ver anexo 3–. Así mismo, dentro de la cámara de flujo, antes de cada procedimiento se realiza un flameo del material de vidrio destinado para el lavado del material vegetal, y las pinzas fueron sumergidas en alcohol al 96%, acto seguido, flamear y asegurar de esta forma la esterilidad del material, como se detalla en el diagrama a continuación [figura 8]:

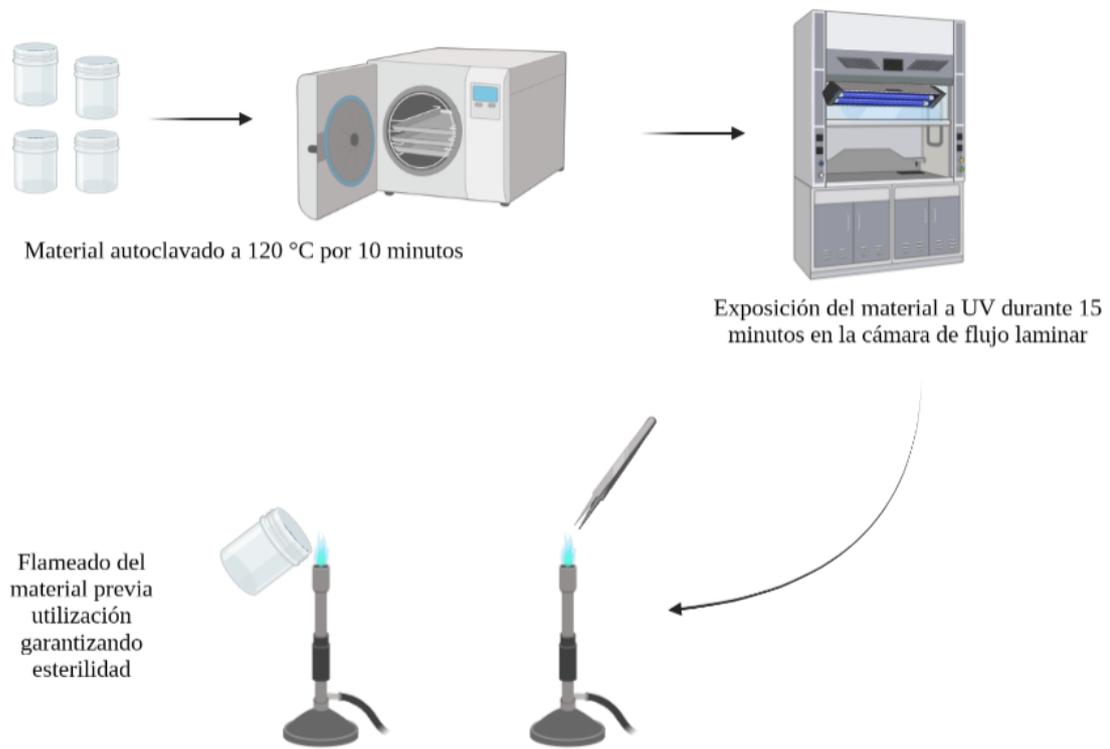


Figura 8: Procedimiento de esterilización del material utilizado.

Fuente: Autores.



Figura 9: Materiales utilizados en el protocolo de desinfección de las semillas de *Caesalpinia spinosa*.

Fuente: Autores.

3.9.5 Establecimiento *in vitro* de las semillas de *Caesalpinia spinosa*

Una vez que se ha realizado el protocolo de desinfección y los diferentes pretratamientos germinativos, se procede a la realización del establecimiento *in vitro* de las semillas de *Caesalpinia spinosa*.

Cada uno de los grupos de semillas, siguiendo los pretratamientos planteados anteriormente [ver tabla 3], fueron distribuidas en un número de 10 semillas [figura 10], en los distintos frascos con el medio basal MS [figura 11].

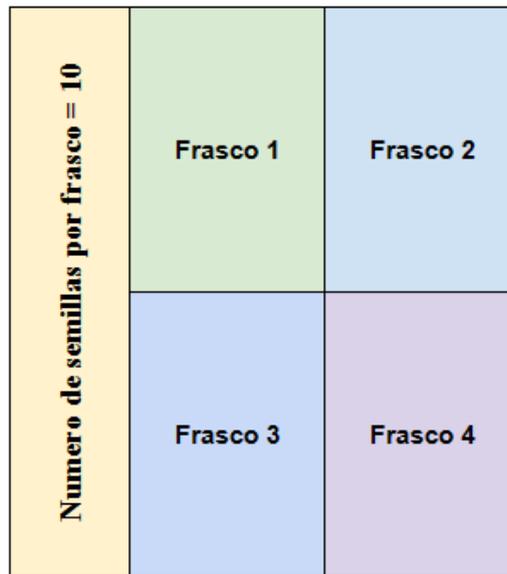


Figura 10: Esquema de la distribución de las semillas de *Caesalpinia spinosa*, en los diferentes frascos contenedores.

Fuente: Autores

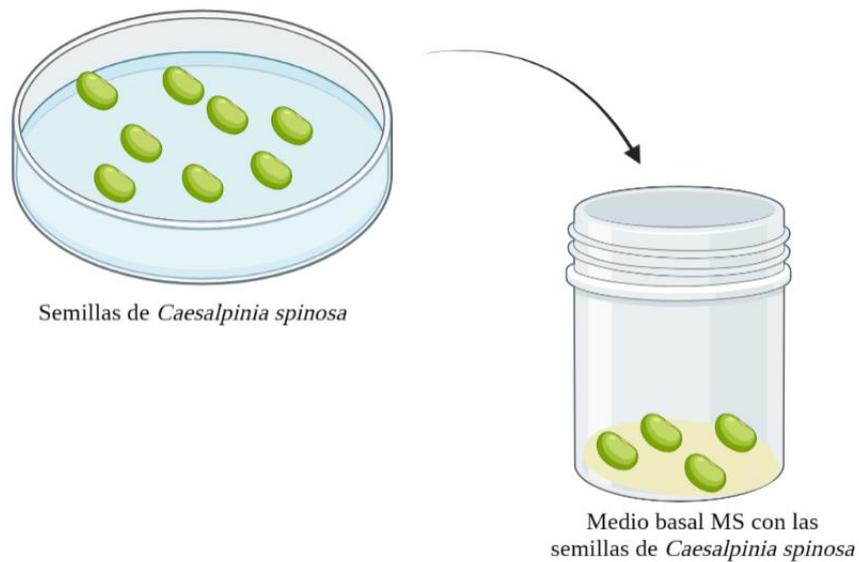


Figura 11: Esquema de la distribución de las semillas de *Caesalpinia spinosa*, dentro del medio basal MS.

Fuente: Autores

En fases preliminares, para los cultivos de semillas, se utilizaron frascos de vidrio de 80 mL con tapa *twist-off* [figura 12].



Figura 12: Ensayos preliminares en frascos de vidrio de 80 mL con tapa *twist-off*.

Fuente: Autores

Para ensayos posteriores, se utilizaron botes de plástico autoclavables de 200 mL [figura 13], los mismos que permitieron optimizar el uso de material [frascos] y la disposición de las semillas se la realizó de una mejor manera, evitando la superposición de las semillas en el medio y posibles contaminaciones entre el material vegetal [consultar el apartado de RESULTADOS y ANEXOS].



Figura 13: Utilización de botes de plástico autoclavables de 200 mL, consiguiendo una mejor distribución de las semillas y optimización de medio basal.

Fuente: Autores

3.9.5.1 Desarrollo y germinación de las semillas de *Caesalpinia spinosa*.

Una vez que han sido colocadas las semillas dentro del medio basal MS [figura 14], se procede a cerrar el frasco o bote contenedor, teniendo en cuenta que se encuentra en un medio hermético, se debe controlar que exista una transferencia de oxígeno óptima en el medio o que el micro medioambiente sea el óptimo para el material vegetal en crecimiento (Casierra-Posada, 2008), puesto que, si ocurre lo contrario provocaría una acumulación de CO₂ en el interior y por ende, se produciría estrés a nivel vegetal (Cañal et al., 2001) lo que induciría a un daño en los tejidos.



Figura 14: Distribución de las semillas de *Caesalpinia spinosa*, dentro del medio basal MS.

Fuente: Autores.

Al final, se dispone a llevar los frascos con el material vegetal a la Cámara de crecimiento en el Laboratorio de Biotecnología [figura 15], la temperatura y niveles de humedad fueron controlados con un higrómetro de marca Boeco Germany [ver Anexo 4].



Figura 15: Disposición del material vegetal dentro de la cámara de crecimiento

Fuente: Autores.

3.9.5.2 Cambio de medio basal MS a medios con hormonas de crecimiento

Pasados diez días desde el establecimiento *in vitro* de las semillas de *Caesalpinia spinosa*, en los medios MS, previa verificación que haya brotado el eje principal de la plántula, se realiza el cambio a un nuevo medio de cultivo que contiene las hormonas destinadas como factores que van a influir en el desarrollo de las plántulas: ANA, AIA y AG3.

Dentro de la cámara de flujo laminar, con el uso de pinzas autoclavadas, se toma una a una las plántulas germinadas previamente en el medio basal MS [figura 16], las cuales serán distribuidas en los diferentes frascos con los tratamientos con hormonas de crecimiento como se indica en la tabla 4:

Tabla 4. Combinaciones de hormonas propuestas para las semillas de *Caesalpinia spinosa*

Tratamiento	Hormonas de crecimiento
T1	ANA + AIA
T2	AG3 + ANA
T3	ANA + AIA + AG3
T4	AIA + AG3
	Control

Fuente: Autores**Figura 16:** Cambio de medio del material vegetal germinado a medios MS con hormonas.**Fuente:** Autores.

Con el fin de garantizar la esterilidad del medio interno que contiene el medio y el material vegetal. Se cubre la boca del frasco con plástico tipo *parafilm*, procurando templar el plástico para

que garantice el hermetismo del medio y evite la formación de superficies irregulares que puedan afectar a la entrada de luz.

Como último paso, las plántulas son llevadas a la cámara de crecimiento [ver anexo 4] por un lapso de 15 días, tiempo en el cual se procede a tomar los datos de la longitud de raíz, tamaño del tallo, diámetro de los cotiledones y número de hojas, que son reportados en el apartado de **Resultados**.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación del pretratamiento germinativo en dos estadios [inmaduro y maduro] de las semillas de *Caesalpinia spinosa*.

El porcentaje de efectividad de los pretratamientos germinativos aplicados a las semillas de *Caesalpinia spinosa*, fue obtenido aplicando la fórmula [1]:

$$PG = \frac{\text{No.de semillas germinadas}}{\text{No.de semillas totales}} \times 100\% \quad [1]$$

*PG= porcentaje de germinación

Los cálculos y las representaciones gráficas para el porcentaje de germinación se realizaron utilizando el software Microsoft Excel 365 y Minitab.

En las tablas y figuras que se visualizan a continuación, se reflejan los datos obtenidos de manera porcentual, donde se expresan los resultados referentes a germinación, según los diferentes tratamientos.

Considerando que en cada prueba se utilizaron un $n=40$ semillas, por cada tratamiento, al final contó con un número total de $n=480$ semillas [tabla 3].

Para la repetición 1, cuyos datos se encuentran detallados en la tabla 5 y figura 17, los datos recabados arrojaron como resultado una mejor efectividad en el tratamiento T3: remojo en agua [48 h] + retiro de la testa, con un 100% en los valores de germinación y para el experimento de Control, se observa una efectividad del 90% refiriéndonos exclusivamente al grupo de semillas inmaduras.

Tabla 5. Resultados de los pretratamientos germinativos de la repetición 1, propuestos para las semillas de *Caesalpinia spinosa*.

Repetición 1		
Tratamiento	Maduras	Inmaduras
T1	0%	10%
T2	0%	1.88%
T3	0%	100%
Control	5%	90%

Fuente: Autores

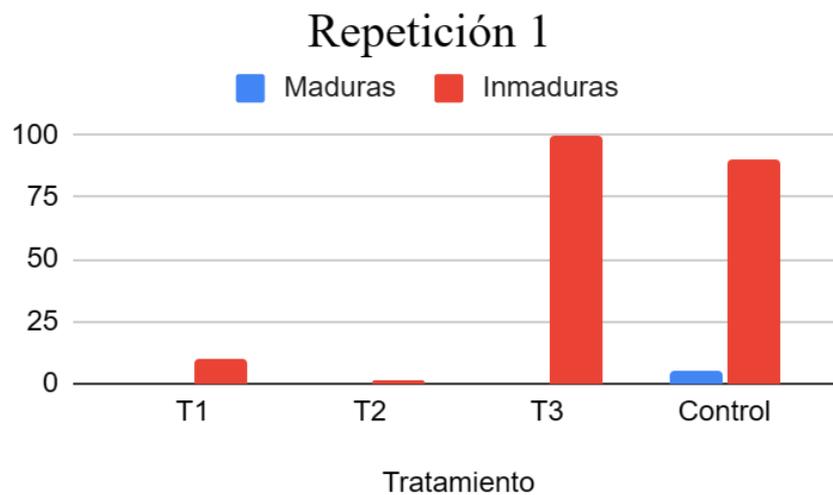


Figura 17: Comportamiento de los datos obtenidos con base en el porcentaje de germinación de las semillas con la aplicación de los diferentes tratamientos en la repetición 1.

Fuente: Autores.

Para la repetición 2, como se observa en la tabla 6 y en la figura 18, los tratamientos que tuvieron una mejor incidencia al momento de inducir la germinación de las semillas, corresponden al tratamiento T3: remojo en agua [48h] + retiro de la testa, con un 100% de efectividad, y el Control, con el 82,50% de efectividad.

Tabla 6. Resultados de los pretratamientos germinativos de la repetición 2, propuestos para las semillas de *Caesalpinia spinosa*.

Repetición 2		
Tratamiento	Maduras	Inmaduras
T1	0	0,5
T2	0	0
T3	0	100
Control	0	80

Fuente: Autores

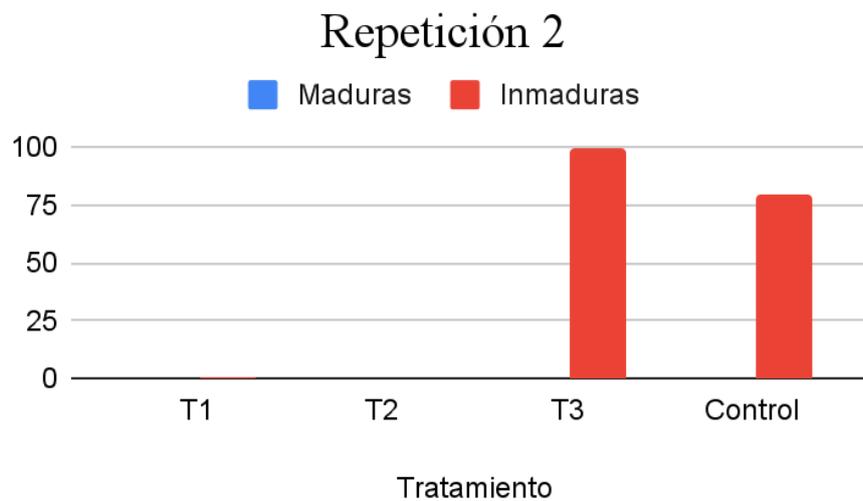


Figura 18: Comportamiento de los datos obtenidos con base en el porcentaje de germinación de las semillas con la aplicación de los diferentes tratamientos en la repetición 2.

Fuente: Autores.

Por último, los resultados que se detallan en la tabla 7 y figura 19, reflejan los datos de la tercera repetición, muestran un comportamiento similar a la repetición 2, cuyos datos reflejan que los mejores pretratamientos fueron el tratamiento T3 y el Control.

Tabla 7. Resultados de los pretratamientos germinativos de la repetición 2, propuestos para las semillas de *Caesalpinia spinosa*.

Repetición 3		
Tratamiento	Maduras	Inmaduras
T1	0	12,5
T2	0	0
T3	0	100
Control	0	82,5

Fuente: Autores

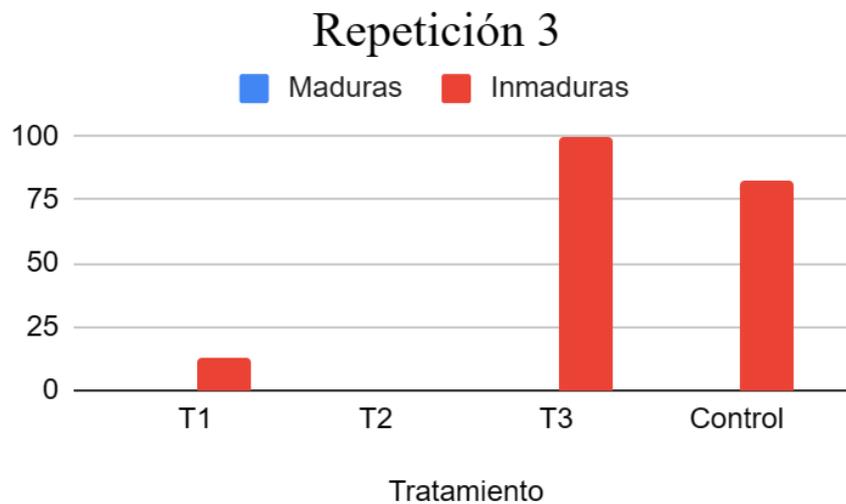


Figura 19: Comportamiento de los datos obtenidos con base en el porcentaje de germinación de las semillas con la aplicación de los diferentes tratamientos en la repetición 3.

Fuente: Autores.

Como se puede observar en los datos anteriores, el tratamiento T3, el mismo que corresponde a la inmersión en agua de las semillas de *Caesalpinia spinosa* durante 48 horas, es el que mejor respuesta brindó con respecto al nivel de germinación necesario para continuar con los ensayos posteriores requeridos.

De la misma forma, considerando el estado de madurez de las semillas de *Caesalpinia spinosa* utilizadas, se contraponen los resultados aquí expuestos con los que existen en la literatura

consultada, puesto que, Moreno et al. (2018), reporta germinación en semillas tanto maduras como inmaduras.

Se analizó la distribución normal de los datos recolectados de los tratamientos, en la figura 20 se aprecia que no cumple con el supuesto de normalidad debido a la abrupta diferencia de los resultados de germinación entre las semillas maduras e inmaduras. Por ende, se procedió a realizar la prueba paramétrica Kruskal-Wallis cuyos resultados se muestran en la tabla 8, en la cual podemos observar que el valor p supera el nivel de significancia 0.05 por lo que deducimos que no existe diferencia significativa entre los tratamientos realizados.

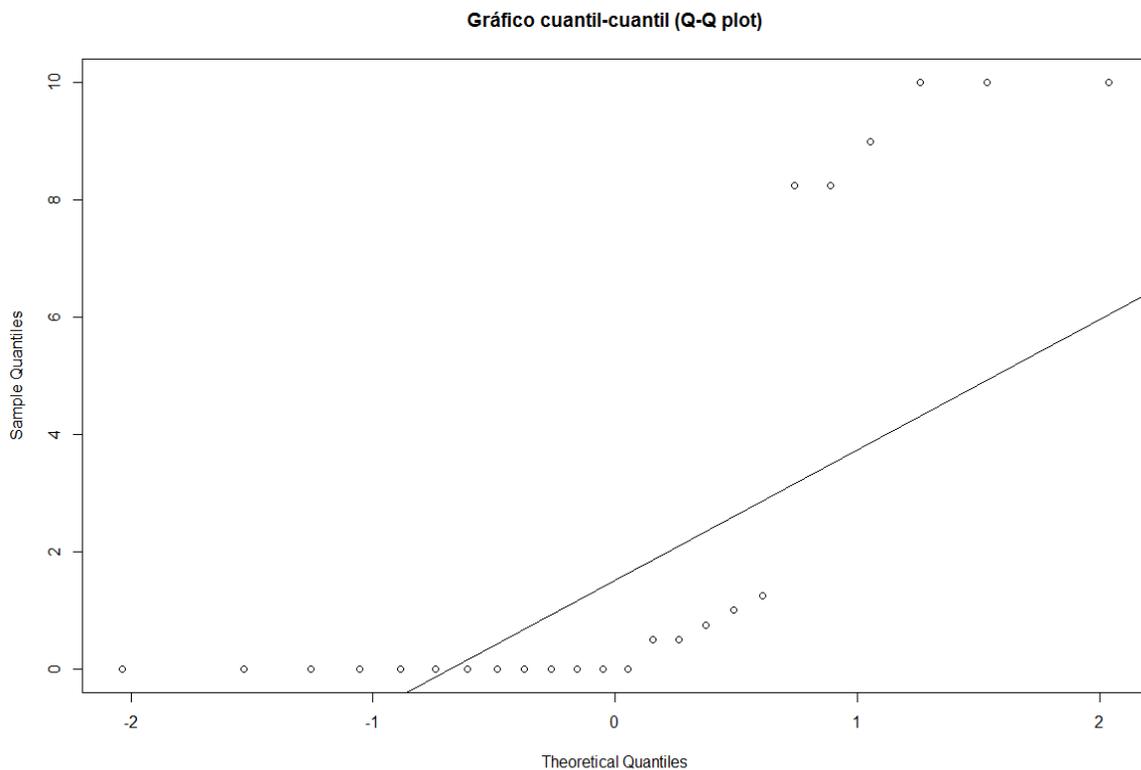


Figura 20: Análisis cuantil-cuantil para la distribución normal de semillas germinadas. Se muestra la distribución de los datos recolectados de la germinación, los cuales no expresan una tendencia establecida concluyendo que no existe distribución normal.

Fuente: autores.

Tabla 8. Prueba Kruskal-Wallis de los tratamientos pregerminativos. Se expone el valor p con un producto superior al valor de significancia 0.05, lo que supone nula diferencia de varianzas entre los tratamientos.

```
Kruskal-wallis rank sum test
data: SemillasGer by Tratamiento
Kruskal-wallis chi-squared = 3.9863, df = 3, p-value = 0.263
```

Fuente: autores.

Se procedió a realizar la prueba de comparación múltiple de Tukey cuyos productos se exponen en la tabla 9, en donde se pueden apreciar que los tratamientos muestran igualdad de medias, por lo que se puede deducir que en cuestión de eficacia son similares. Sin embargo, cabe recalcar que estadísticamente pueden considerarse idénticos, ya que se ha considerado como factor de bloqueo la madurez de las semillas, por ende, es un parámetro no considerado dentro de la tabla expuesta, lo que resulta en que tratamientos que sí mostraron mayor tasa de germinación de semillas inmaduras como lo fue expuesto previamente en las tablas 5, 6 y 7 no sean considerados significativamente diferentes desde un punto de vista estadístico. Esto es debido a que no remarcar la madurez de las semillas como factor determinante evita que el análisis estadístico haga una diferenciación entre las simientes inmaduras germinadas y las maduras no germinadas, por lo que los datos para germinación nula influyen en los de germinación positiva.

Tabla 9. Análisis de significancia entre los pretratamientos utilizados para la germinación de semillas utilizando la prueba de Tukey. Grupos que comparten letras iguales demuestran que no existe diferencia significativa entre sus medias, lo que equivale a un valor p inferior al nivel de significancia 0.05.

	SemillasGer	groups
3	5.000000	a
CONTROL	4.333333	a
1	0.458333	a
2	0.125000	a

Fuente: autores.

4.2 Análisis de los resultados obtenidos con respecto a los procedimientos de germinación de semillas [maduras e inmaduras] de *Caesalpinia spinosa*.

Un punto a considerar son los datos expuestos por Godínez-Álvarez & Flores-Martínez, (1999); Moreno et al., (2018); Sánchez-Paz & Ramírez-Villalobos, (2006); Sánchez-Soto et al., (2016), donde se demuestra que uno de los métodos más óptimos para lograr una germinación con altos porcentajes de efectividad (resultados obtenidos a partir de semillas maduras), es la escarificación mecánica [lijado], contraponiéndose a los experimentos realizados en el presente trabajo de titulación [tabla 10], por lo que se modificó los pretratamientos hasta llegar al tratamiento T1 y tratamiento T2 ensayados. Sin embargo, Caballero-Salas et al. (2021), reporta en sus ensayos con semillas de *Caesalpinia pulcherrina*, una germinación del 67.37% utilizando un tratamiento de corte transversal+remojo por 12 horas y 63.42% de eficacia con un tratamiento de remojo en agua hervida [100 °C] durante 12 horas [tratamiento realizado en semillas maduras e inmaduras].

Tabla 10. Datos recolectados de la germinación de semillas maduras con respecto a los tratamientos T1 y T2.

Germinación semillas maduras		
Tratamiento	% Maduras	% Total
T1	0,00	0,00
T2	0,00	0,00

Fuente: Autores.

Por otro lado, el tratamiento T3, cuyo procedimiento fue retirar la testa en su totalidad de las semillas inmaduras, para dejar expuesto el embrión por completo al medio de cultivo, y a su vez fue eliminada la fuente primaria de contaminación [testa], con lo que se obtuvo un resultado satisfactorio del 100% de germinación [tabla 11].

Tabla 11. Ensayo del tratamiento T3, con semillas inmaduras para evaluación de porcentaje de germinación y contaminación.

Ensayos T3 - semillas inmaduras		
	MS	% Total
Germinación [No. de semillas]	40	100,0
Contaminación [No. de semillas]	0	0,0

Fuente: Autores.

Por lo que, tomando en consideración la información de Ortega Baes et al. (2001), cuyos ensayos se realizaron con semillas de *Caesalpinia paraguariensis*, y se aplicó un tratamiento de destrucción de la testa, demostrando un 44.67% de germinación, reforzando los datos obtenidos con respecto al porcentaje de efectividad del tratamiento T3 [retiro de la testa].

El control, destinado a control en el caso de las semillas maduras, fue ensayado en dos versiones para determinar cuál es el más efectivo, siendo en una primera versión el uso de medio MS (Krikorian, 1993), y posteriormente, se utilizó algodón hidratado con agua destilada [tabla 12]. Se optó por el cambio de sustrato para la germinación de las semillas debido a que, como lo demuestran los datos anteriores, el porcentaje de germinación estaba siendo muy bajo, puesto que, al conservar, todavía la testa y al ser colocadas en medio MS estaban induciendo a contaminación [ver anexo 5].

Tabla 12. Ensayo del Control con semillas maduras en MS.

	Ensayos Control semillas maduras $n=80$	
	Sustrato	% Total
	MS	
Germinación [No. de semillas]	40	50,0
Contaminación (No. de semillas)	80	100

Fuente: Autores.

Es preciso aclarar que a pesar de que el porcentaje de contaminación en los dos casos es del 100%, tanto en MS como en algodón, no se considera una desventaja lo obtenido en el segundo sustrato, debido a que previo a la realización del cambio de medio, se retiró la testa contaminada, y se aplicó un protocolo auxiliar de desinfección [tween 20, 10 min + etanol 70%, 1 min + NaOCl 1.5%, 30 s], con lo que dio resultados favorables en relación de descontaminación del material vegetal.

El cambio de sustrato antes mencionado en el tratamiento de control, fue realizado en función de que no existió una respuesta favorable por parte del material vegetal, y, por otro lado, se encontró contaminación de levaduras [ver anexo 5] conocidas como contaminantes “vitropatógenos” (Hernández & González, 2010) en los cultivos realizados, lo que llevó a formular la hipótesis basada en observaciones *in situ* [ver anexo 5] una correlación entre la contaminación y la falta de germinación de las semillas. Adicional a este factor, se consideró también el tiempo de dormancia de las semillas, el cual superaba los 21 días, frente a un tiempo promedio de 4 a 7 días (Caballero-Salas et al., 2021), lo que resultó en una germinación tardía y la presencia de semillas germinadas, pero en un estado oxidativo avanzado, lo que hizo que no sea viable el uso de este material vegetal.

4.3 Evaluación de la combinación de diferentes concentraciones de auxinas [ANA, AIA] y giberelinas [AG3].

Para el procesamiento de datos y análisis estadístico de la influencia de las combinaciones de biorreguladores de crecimiento [ANA, AIA y AG3] se utilizó el software libre Rstudio. Para garantizar la validez estadística de los resultados obtenidos se realizaron pruebas por triplicado.

Los biorreguladores y sus combinaciones fueron tomados según la literatura consultada (Fermino Junior & Scherwinski-Pereira, 2012; Pereira Almeida, 2018; Stefanel et al., 2021), cuyas combinaciones y sus respectivas concentraciones se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 13. Combinaciones y sus concentraciones de biorreguladores utilizados en los ensayos de cultivos *in vitro* de *Caesalpinia spinosa*

Hormonas	Biorreguladores				
	ANA	AIA	AG3		
Concentración	0.025 ppm	0.02 ppm	0.025 ppm		
Combinación	ANA+AIA	AG3 + ANA	ANA + AIA + AG3	AIA + AG3	CONTROL

Fuente: autores.

4.3.1 Efectos de las combinaciones de biorreguladores en la raíz

Las combinaciones de biorreguladores expresadas en la tabla 10, fueron ensayadas en una población de 10 muestras por tratamiento.

Para garantizar la validez de los resultados obtenidos previo a realizar la respectiva prueba del Análisis de Varianza [ANOVA], se evaluaron los supuestos de normalidad mediante la prueba de Shapiro Wilk [figura 21] y de homogeneidad de varianzas [figura 22] con la prueba de Levene.

En ambos análisis los valores p son superiores al nivel de significancia de 0.05, lo que garantiza que se cumplen los supuestos del análisis de varianza.

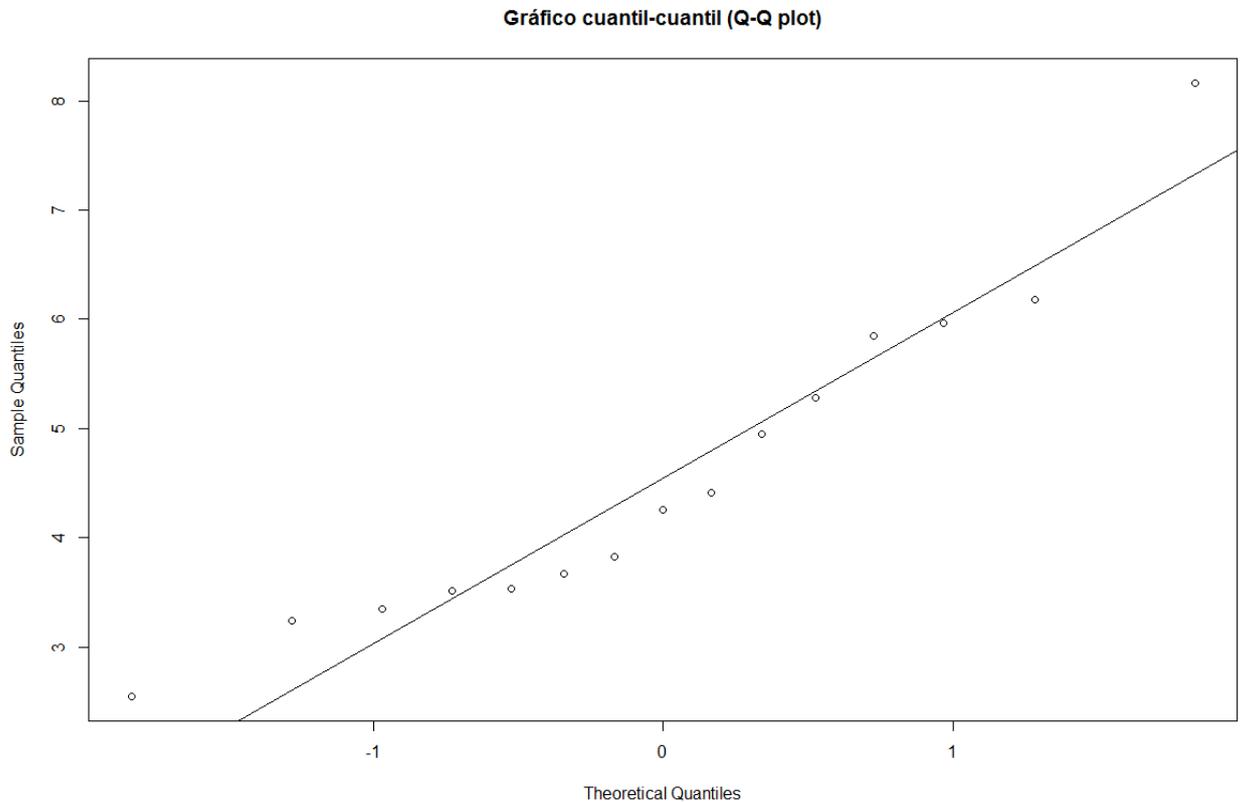


Figura 21: Gráfico cuantil-cuantil de normalidad. Se expresa la distribución de los datos recolectados de la longitud de las raíces sometidas a tratamientos, se evidencia que los valores siguen una tendencia normal.

Fuente: Autores.

	Df	F value	Pr(>F)
group	4	1.7412	0.2172
	10		

Figura 22: Prueba de Levene para las medias de la longitud de las raíces. El valor p 0.2172 supera el valor de significancia 0.05 evidenciando que no existe diferencia significativa entre los

tratamientos

Fuente: Autores.

En la tabla 14 y figura 23 se muestran respectivamente los resultados obtenidos a partir de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples y la gráfica de comparación de medias de los grupos, reafirmando la conclusión del análisis de varianza realizado que expone que no existe diferencia estadística significativa entre la longitud de las raíces producto de los tratamientos. Sin embargo, se realizaron diagramas de cajas [figura 24] y de barras [figura 25] en donde se aprecian desemejanzas entre las medias de la longitud de las raíces de las plántulas por tratamiento, por lo que se concluye en que no existe diferencia estadística significativa, pero al centrarnos exclusivamente en el análisis de los promedios deducimos que el tratamiento ANA+AIA+AG₃ presenta la mayor media de longitud de raíz, con un producto de 5.85 cm, seguido se posiciona el tratamiento AIA+AG₃ con promedio de raíces de 5.47 cm. Estos valores nos conducen a deducir que dichos tratamientos, presentan resultados con niveles ligeramente más eficientes.

Tabla 14. Prueba de Tukey de comparación múltiple.

	Raiz groups	
ANA+AIA+AG3	5.846667	a
AIA+AG3	5.470000	a
ANA+AIA	4.255000	a
CONTROL	3.826667	a
AG3+ANA	3.510000	a

Fuente: Autores.

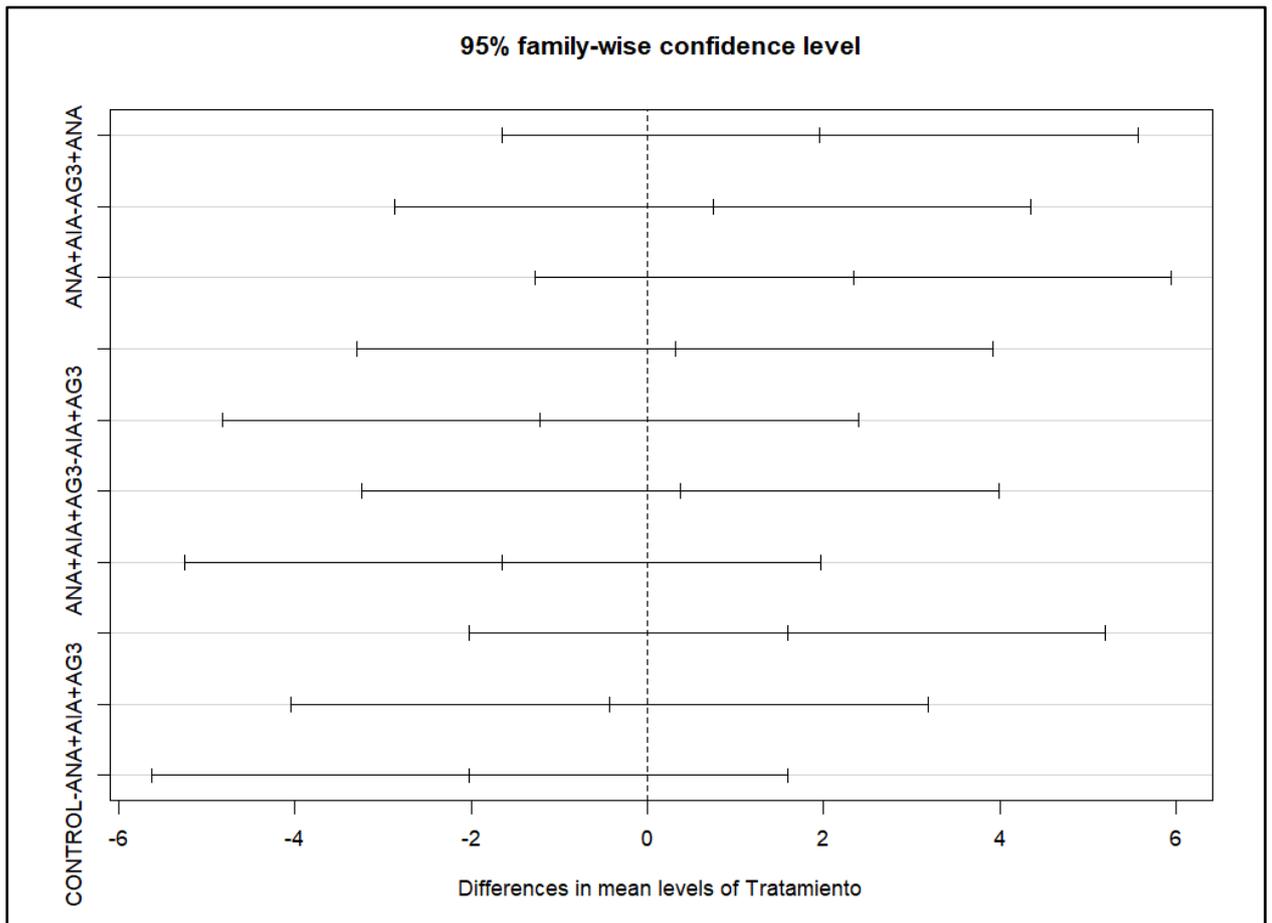


Figura 23: Gráfico de comparación de medias de longitud de las raíces de los grupos de tratamientos. Valores que contienen 0 son considerados estadísticamente iguales.

Fuente: Autores.

Se realizó la prueba ANOVA para determinar si existe diferencia de varianzas entre los cinco tratamientos realizados, cuyos resultados se exponen en la tabla 15. El valor p refleja un producto de 0.216 el cual supera el valor de significancia planteado (0.05) lo que concluye en que no existe diferencia estadística significativa en los métodos efectuados.

Tabla 15. Resultado del análisis de varianza [ANOVA].

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tratamiento	4	12.64	3.161	1.748	0.216
Residuals	10	18.08	1.808		

Fuente: autores

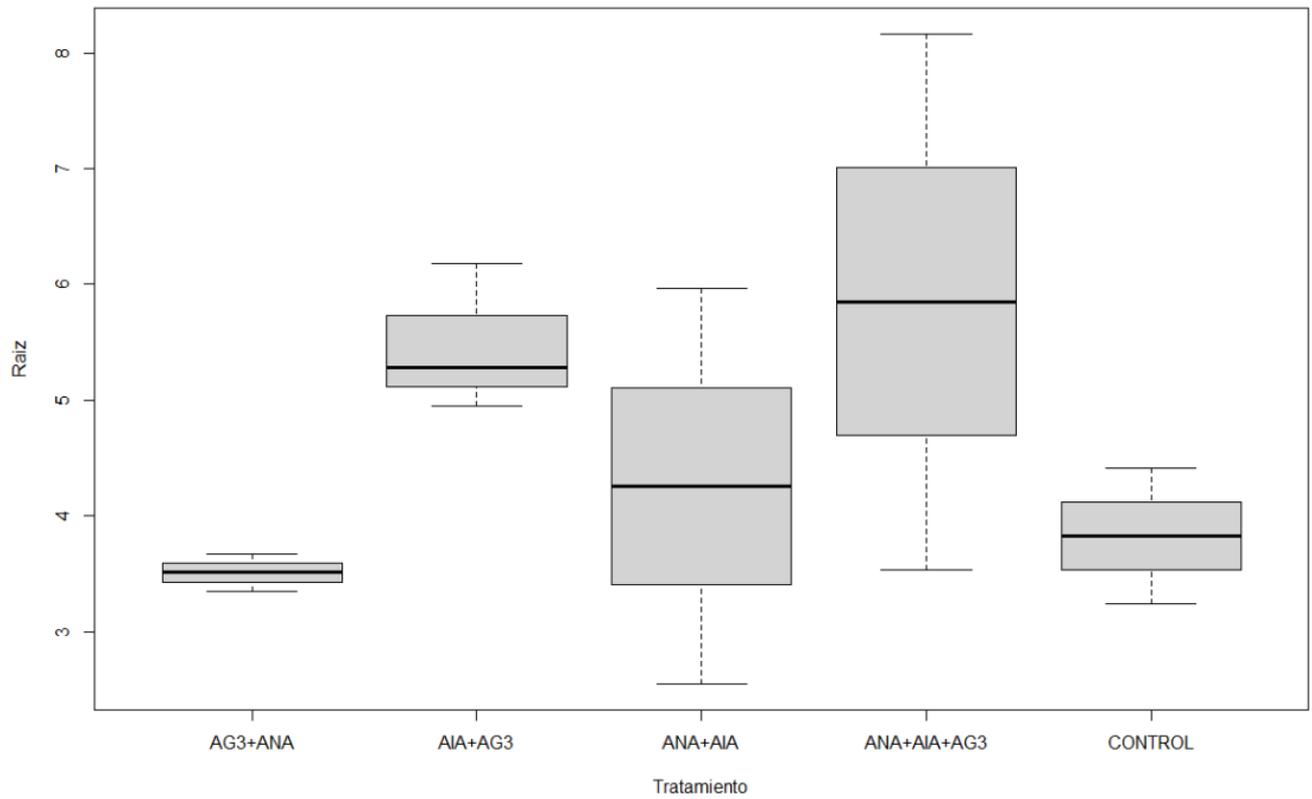


Figura 24: Diagrama de cajas para longitud de raíz. Se exponen las medias de los efectos de los tratamientos con combinaciones de biorreguladores.

Fuente: Autores.

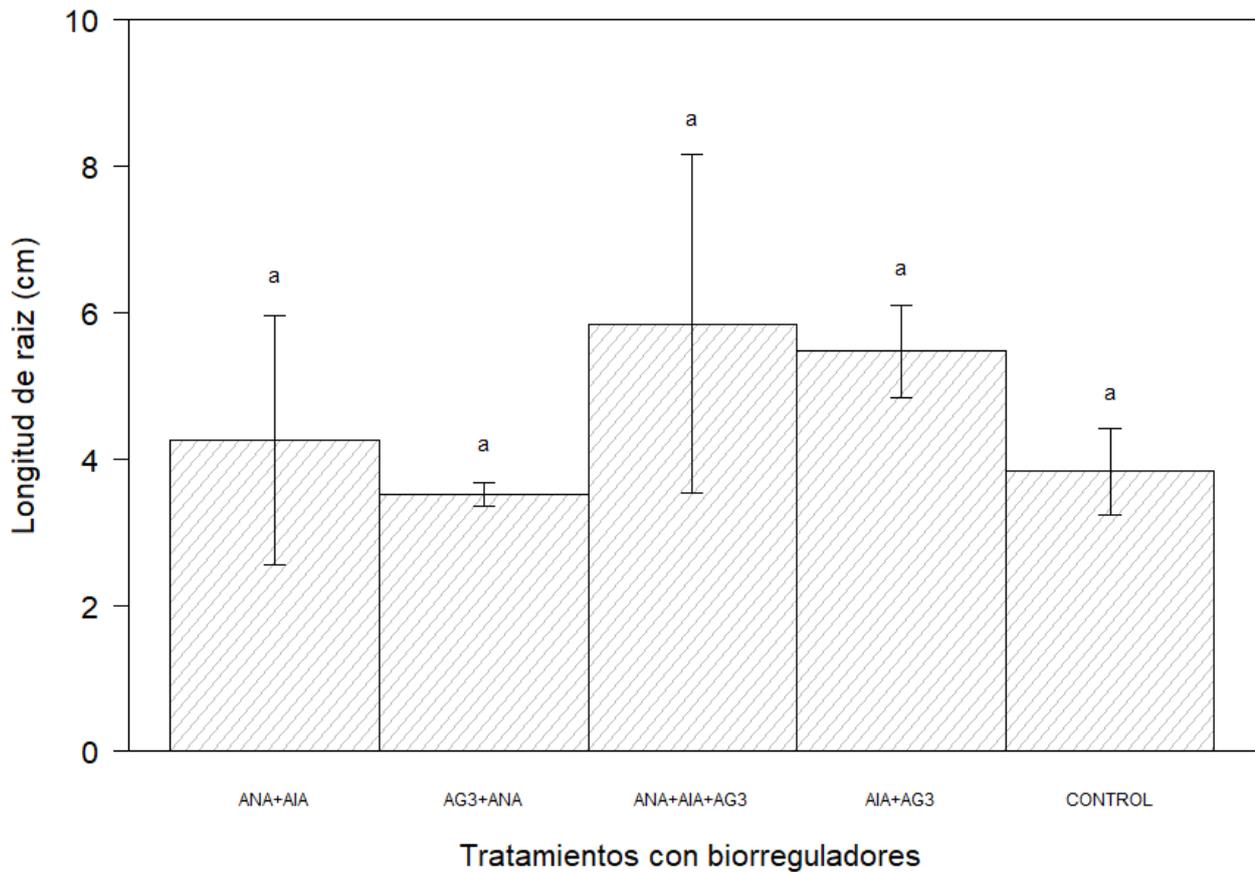


Figura 25: Diagrama de barras de las medias de los efectos de los tratamientos con combinaciones de biorreguladores en la raíz. Se exponen las medias de los resultados \pm DS. Grupos con letras iguales representan que el valor p supera al valor de significancia 0.05 por lo que no existe diferencia estadística significativa.

Fuente: Autores.

4.3.2 Efectos de las combinaciones de biorreguladores en el tallo

La tabla 16 refleja los resultados obtenidos de la prueba ANOVA para la comparación de las medias de longitud de tallo por cada tratamiento. Al obtener un valor p de 0.685, el cual es

superior al nivel de significancia de 0.05, deducimos que no existe diferencia significativa entre la eficiencia de los tratamientos. Las figuras 26 y 27 muestran la gráfica y los resultados de la normalidad y homogeneidad de varianzas respectivamente, realizados mediante prueba de Shapiro Wilk y Levene, cumpliendo correctamente con ambos supuestos.

Tabla 16. Prueba ANOVA de longitud de tallo. Se expone el resultado del valor p 0.685, el cual supera al nivel de significancia 0.05, concluyendo en que no existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tratamiento	4	0.682	0.1705	0.579	0.685
Residuals	10	2.944	0.2944		

Fuente: Autores

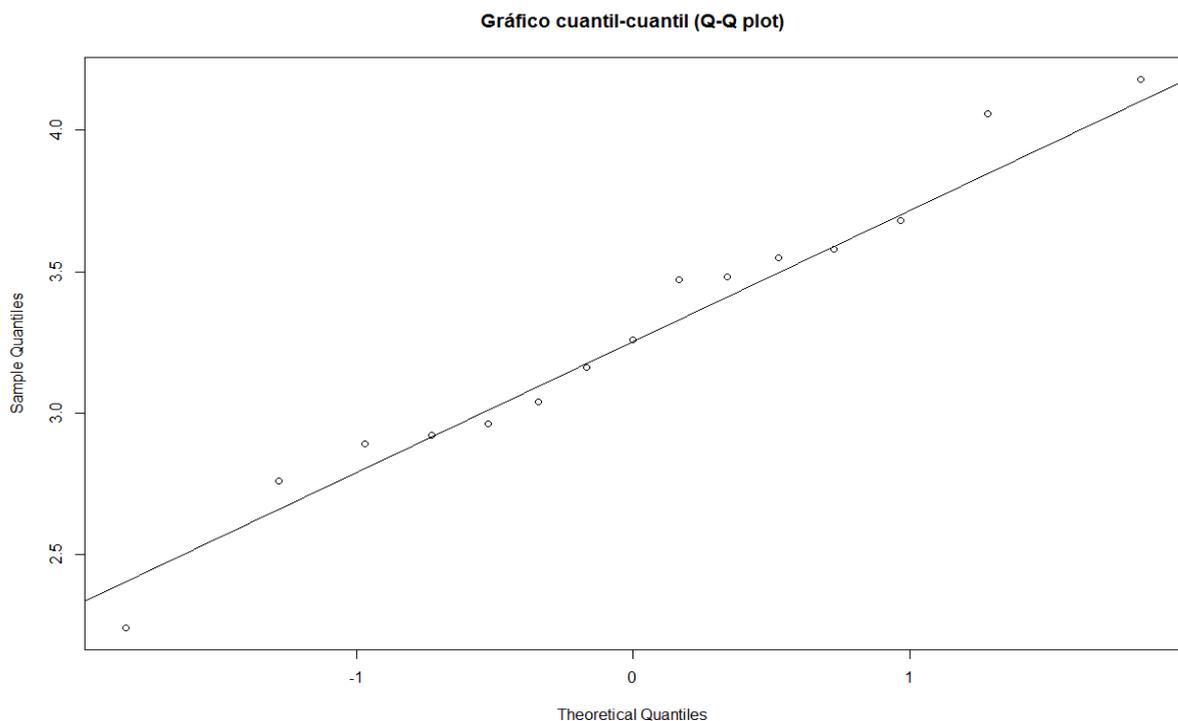


Figura 26: Gráfico cuantil-cuantil de normalidad para longitud de tallo. Los datos recolectados siguen una tendencia normal, cumpliendo con el supuesto de normalidad.

Fuente: Autores

Tabla 17: Prueba de Levene para longitud de tallo. El valor p de 0.7508 supera al valor de significancia 0.05, por lo que se cumple con el supuesto de homogeneidad.

	Df	F value	Pr(>F)
group	4	0.4791	0.7508
	10		

Fuente: Autores

Se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey, cuyos resultados se exponen en la figura 28, en los que se puede apreciar que no existe diferencia estadística significativa entre los productos obtenidos por los tratamientos. Analizando los resultados desde una perspectiva basada en los promedios, la diferencia aun así es mínima, ya que comparando el mejor tratamiento AG₃ + ANA, con una media de 3.55, con el peor el tratamiento siendo el de control, con un promedio de 2.96, la diferencia es de apenas 0.59 décimas. Esta mínima diferencia entre las medias de cada tratamiento se aprecia mejor en las figuras 29, 30 y 31.

Tabla 18. Prueba de Tukey de comparación múltiple para longitud de tallo. Grupos que comparten misma letra no muestran un valor p mayor al nivel de significancia 0.05, por lo que no se pueden considerar estadísticamente diferentes.

	Tallo	groups
AG3+ANA	3.550000	a
ANA+AIA+AG3	3.476667	a
ANA+AIA	3.256667	a
AIA+AG3	3.166667	a
CONTROL	2.960000	a

Fuente: Autores

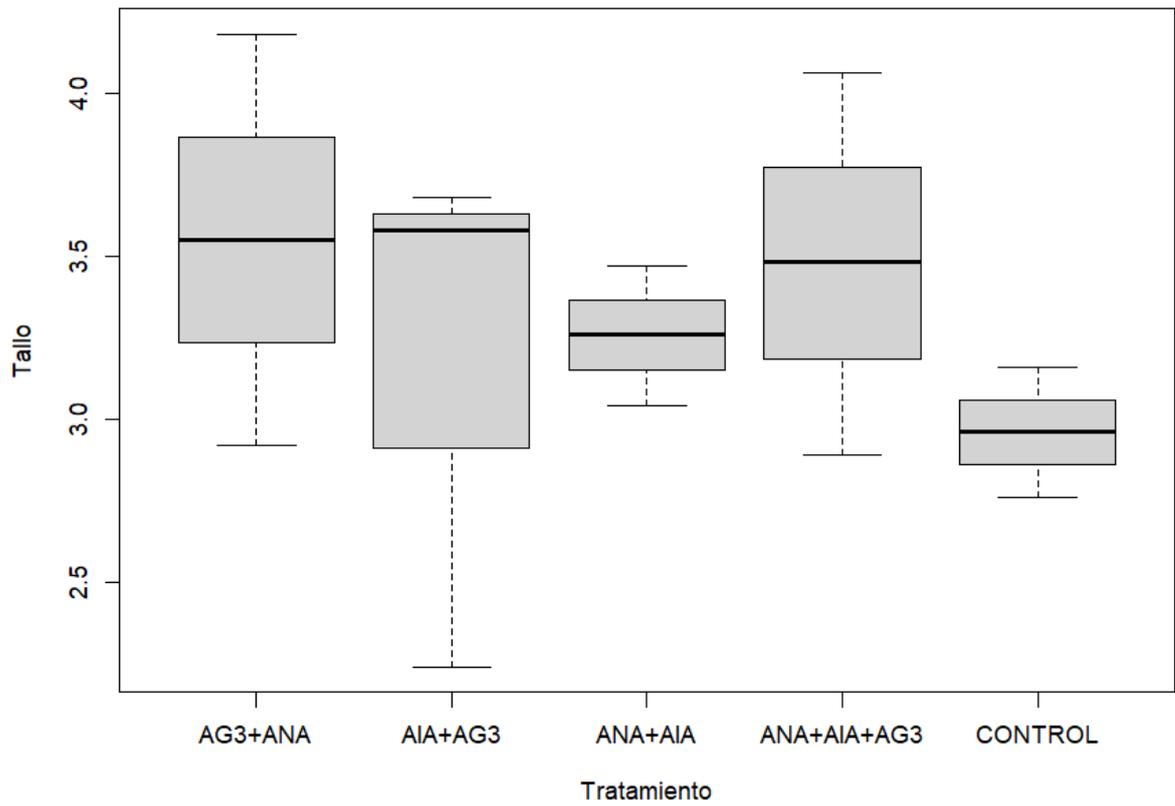


Figura 27: Diagrama de cajas de las medias de longitud de tallo. Se expresa la variación de medias entre los diferentes tratamientos.

Fuente: Autores

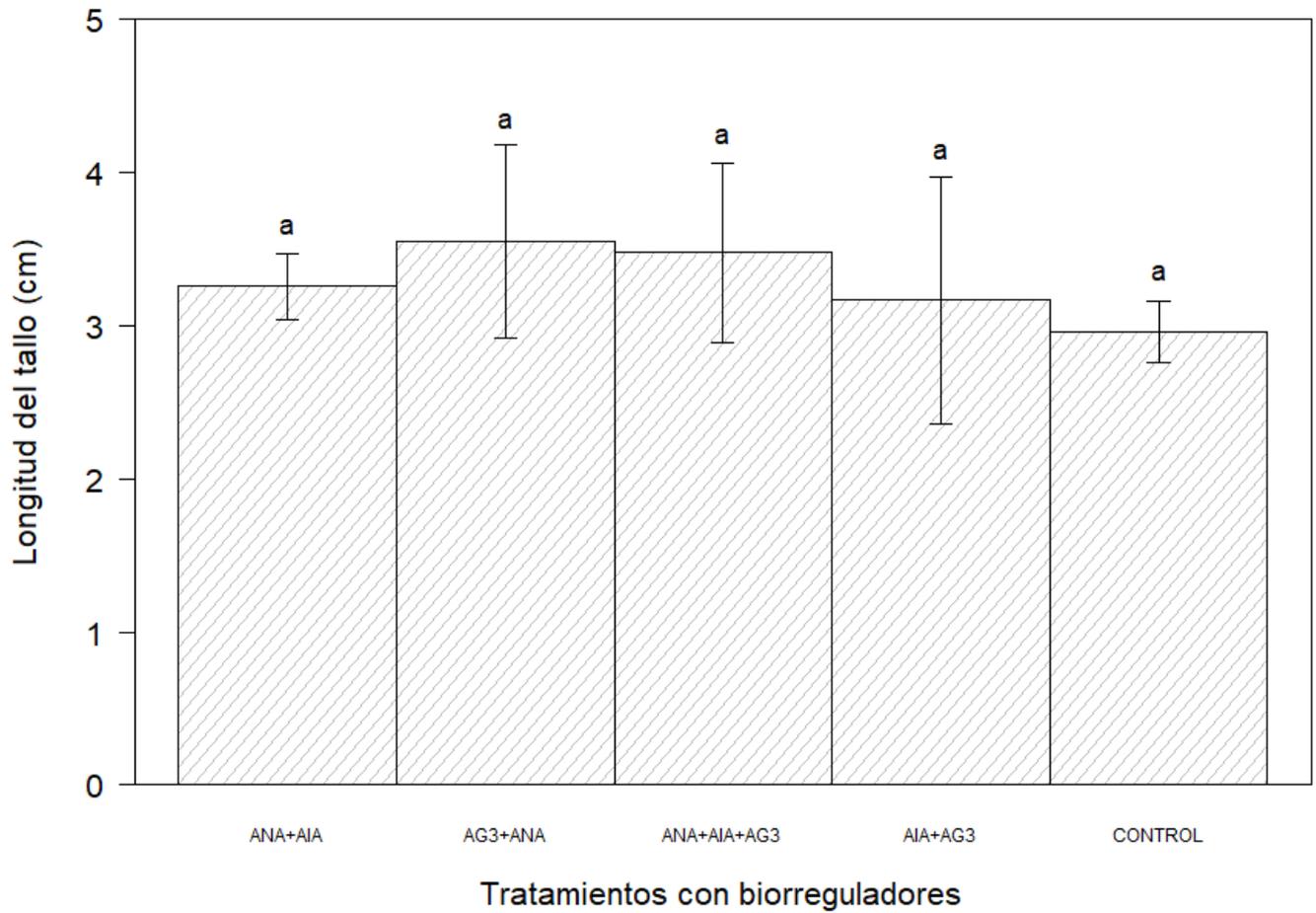


Figura 28: Diagrama de barras de las medias de longitud de tallo. Se expresan las medias de la longitud de los tallos \pm DS. Grupos con letras iguales representan que el valor p no supera el nivel de significancia, por lo que se evidencia la igualdad de medias entre los tratamientos.

Fuente: Autores.

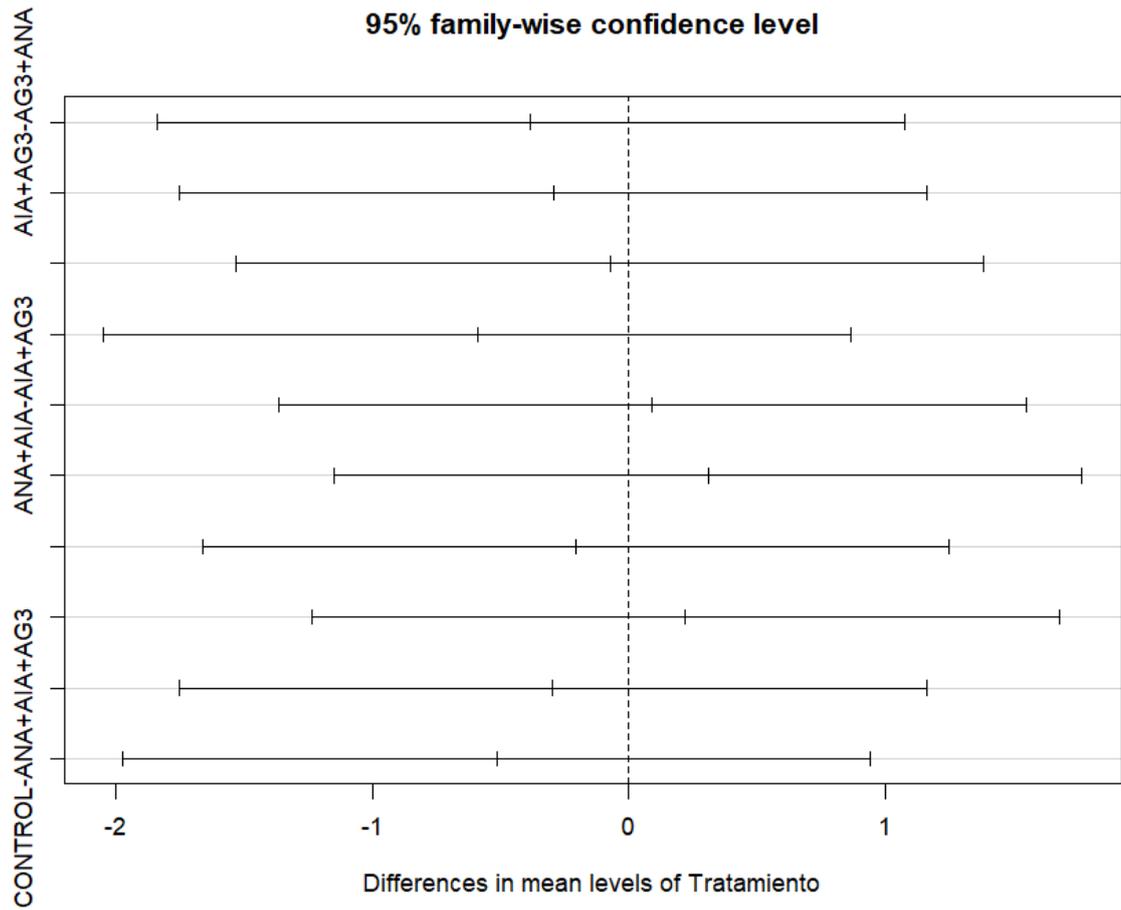


Figura 29: Gráfico de comparación de medias por grupos de tratamientos para la longitud de tallos. Valores que contienen 0 son considerados con igualdad de medias.

Fuente: Autores

4.3.3 Efectos de las combinaciones de biorreguladores en el número de hojas

Los resultados de la prueba ANOVA para la comparación de medias del número de hojas por tratamiento son expuestos en la figura 31, con la que podemos deducir por medio del valor p de 0.057 que por muy poca diferencia no existe variación significativa estadística entre los tratamientos. En las figuras 32 y 33 podemos comprobar que se cumplen con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas por medio de la prueba de Shapiro Wilk y de Levene respectivamente.

Tabla 19: Prueba ANOVA de número de hojas. Se evidencia el valor p ligeramente superior al valor de significancia 0.05 evidenciando igualdad de varianzas entre los tratamientos.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tratamiento	4	76.13	19.033	3.3	0.0572
Residuals	10	57.67	5.767		

Fuente: Autores.

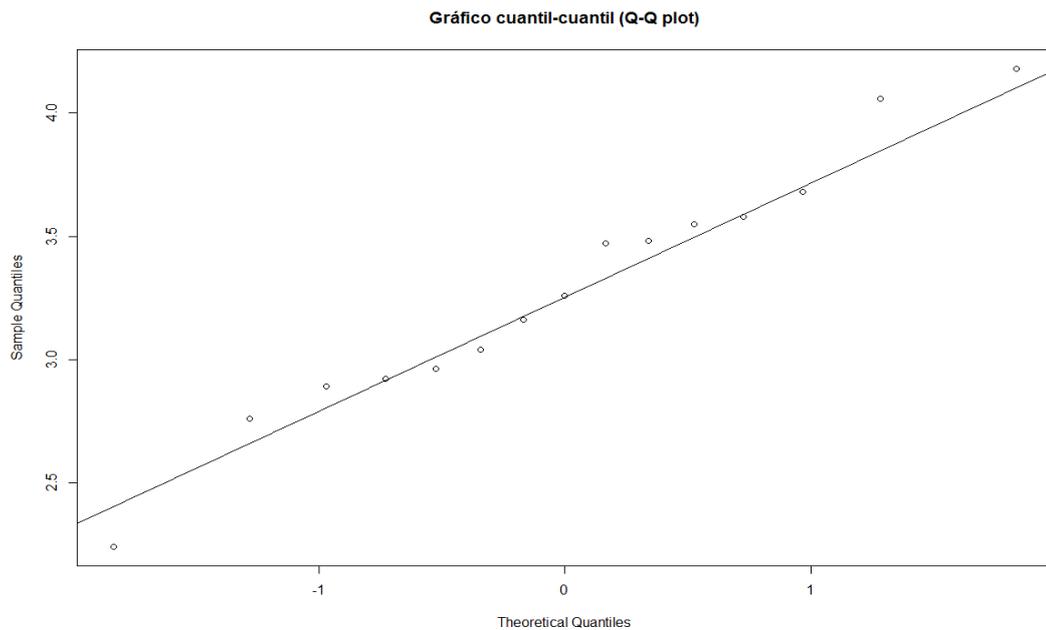


Figura 30: Gráfico cuantil-cuantil de normalidad para número de hojas. La tendencia muestra una distribución normal de los datos recolectados, por lo que se concluye en que el valor p supera el nivel de significancia 0.05.

Fuente: Autores.

Tabla 20: Prueba de Levene para número de hojas. Se evidencia el valor p superior al nivel de significancia 0.4225 lo que evidencia el cumplimiento del supuesto de homogeneidad de varianzas.

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)			
	Df	F value	Pr(>F)
group	4	1.0659	0.4225
	10		

Fuente: Autores.

Los resultados obtenidos al analizar la comparación de medias por medio de la prueba de Tukey se muestran la tabla 21, en la misma se puede apreciar que de manera estadística por muy poca diferencia no se considera una varianza significativa entre los tratamientos tal como los resultados de la prueba ANOVA lo expusieron en la tabla 19. Sin embargo, acudiendo a una comparación de promedios, notamos que si existe una diferencia notable entre la media de cantidad de hojas producidas por cada método. Así confirmamos que los tratamientos AIA+AG₃ y ANA+AIA, muestran las mejores respuestas con medias de hojas de 6.7 y 6.3 respectivamente. En las figuras 31, 32 se puede apreciar gráficamente la diferencia entre los resultados y en la figura 33 se exponen la comparación de las medias por paridad entre los métodos aplicados.

Tabla 21: Prueba de Tukey de comparación múltiple para número de hojas. Grupos que muestran letras iguales significan un valor p mayor al nivel de significancia 0.05 lo que evidencia que no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

	Hojas	groups
AIA+AG3	6.700000	a
ANA+AIA	6.333333	a
CONTROL	4.400000	a
AG3+ANA	1.600000	a
ANA+AIA+AG3	1.400000	a

Fuente: Autores

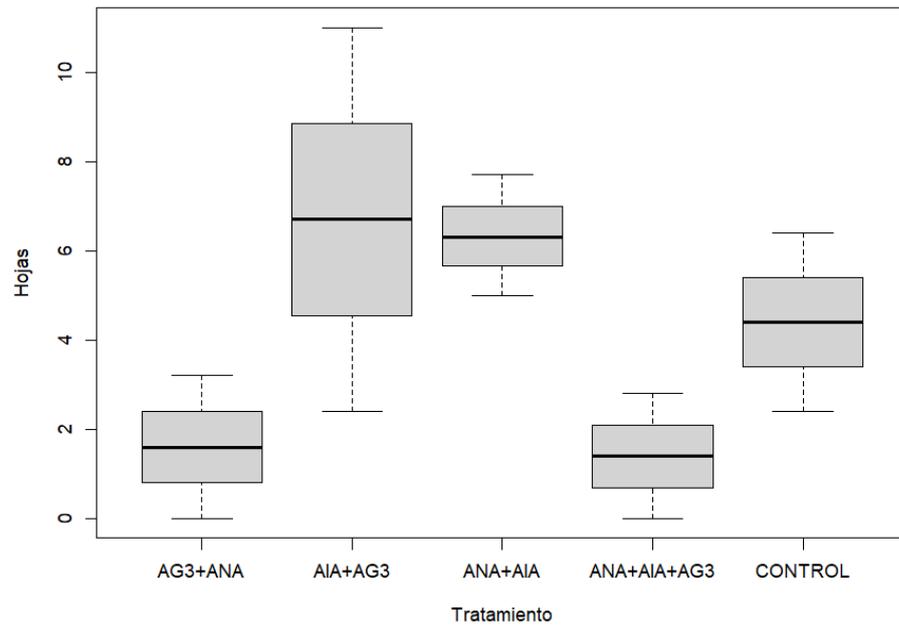


Figura 31: Diagrama de cajas de las medias de número de hojas. Se muestran las medias del número de hojas por tratamiento.

Fuente: Autores

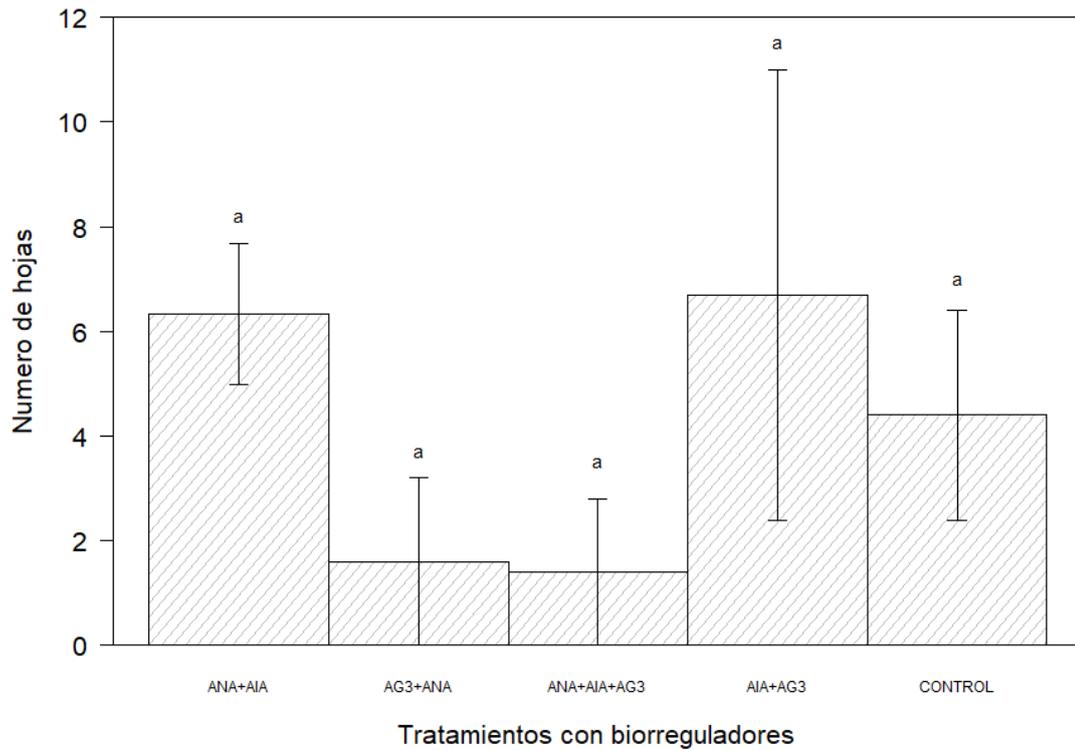


Figura 32: Diagrama de barras de las medias de número de hojas. Los resultados expresan las medias del número de hojas por tratamiento. Grupos con letras iguales evidencian que no existe diferencia estadística entre los tratamientos.

Fuente: Autores

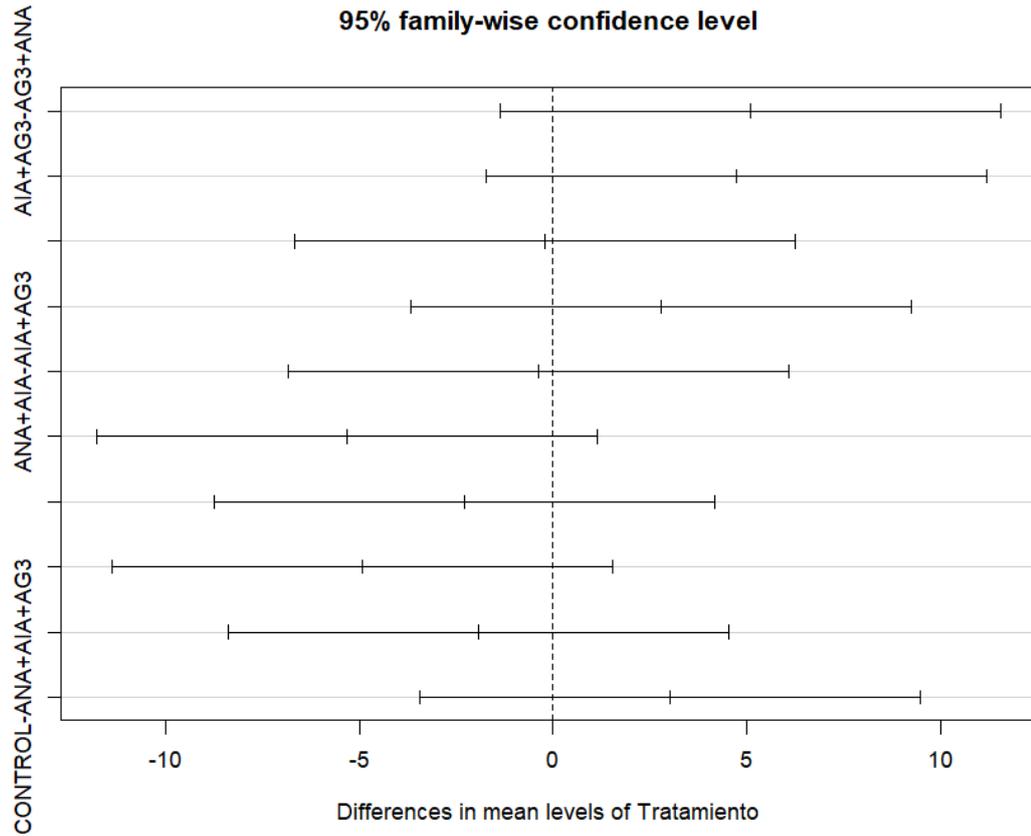


Figura 33: Comparación de medias por grupos de tratamientos para el número de hojas. Los valores que contienen 0 representan grupos significativamente iguales.

Fuente: Autores

4.3.4 Efectos de las combinaciones de biorreguladores en los cotiledones

La prueba ANOVA realizada con base en el diámetro de los cotiledones se expone en la tabla 22, en la cual basándonos en el valor p podemos refutar la hipótesis nula correspondiente a que al menos un tratamiento aplicado presenta una varianza estadísticamente significativa. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se muestran en la figura 34 y tabla 23.

Tabla 22: Prueba ANOVA de diámetro de cotiledones. Se expresa el valor p mayor al nivel de significancia 0.05 lo que evidencia que no existe diferencia significativa entre las varianzas de los tratamientos.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Tratamiento	4	163.0	40.75	1.47	0.282
Residuals	10	277.2	27.72		

Fuente: Autores.

Gráfico cuantil-cuantil (Q-Q plot)

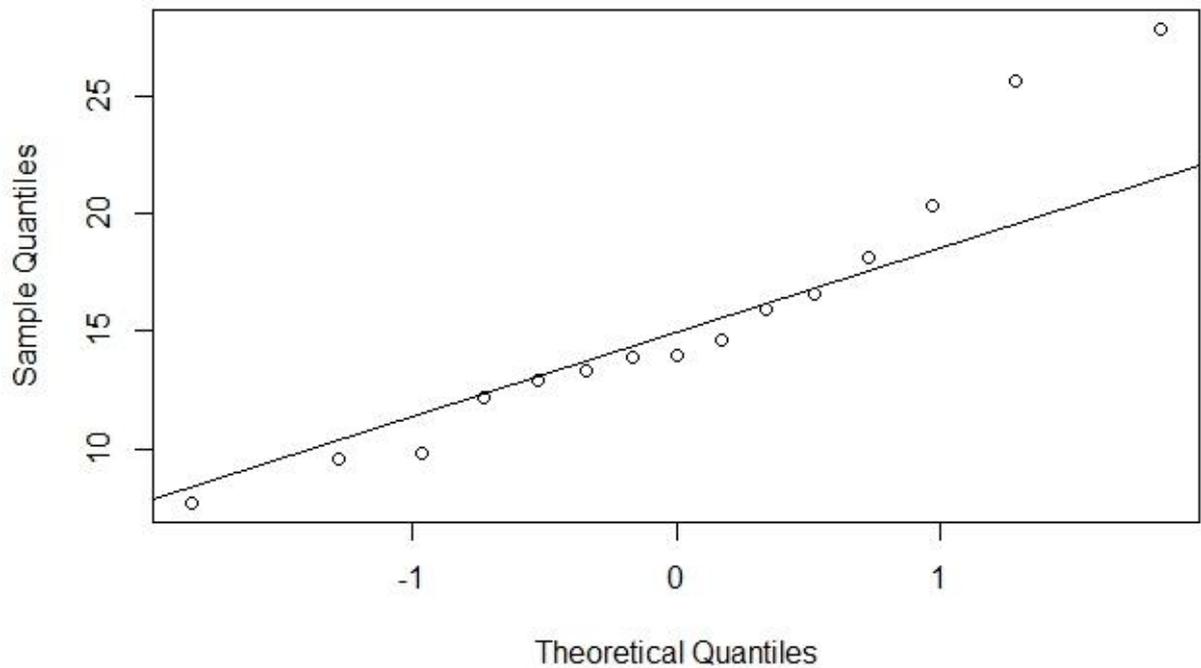


Figura 34: Gráfico cuantil-cuantil de normalidad para diámetro de cotiledones. Se evidencia que los datos recolectados siguen con una tendencia normal cumpliendo el supuesto de normalidad.

Fuente: Autores.

Tabla 23: Prueba de Levene para diámetro de cotiledones. Se evidencia el valor p mayor al nivel de significancia 0.05, por lo que se cumple el supuesto de homogeneidad de varianzas.

	Df	F value	Pr(>F)
group	4	0.9456	0.477
	10		

Fuente: Autores.

Se realizó la comparación de medias mediante el método de Tukey (Tabla 24), en los resultados arrojados indican que no existe diferencia estadística significativa, la misma que se puede apreciar gráficamente en la figura 35. Al realizar un diagrama de cajas (figura 36) y diagrama de barras (figura 37) se puede apreciar desde una perspectiva de promedios que si existe diferencia entre los tratamientos, considerando a AG₃ + ANA como el método con mejor respuesta, puesto que su media de diámetro de cotiledones es de 19.76 cm, y siendo el de peor resultado el control con apenas 9.9 cm de superficie.

Tabla 24: Prueba de Tukey de comparación múltiple para diámetro de cotiledones. Grupos con letras iguales evidencian que el valor p no supera el nivel de significancia 0.05 lo que concluye en que no existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos.

	Cotiledon groups	
AG3+ANA	19.763333	a
ANA+AIA+AG3	17.173333	a
AIA+AG3	16.400000	a
ANA+AIA	14.253333	a
CONTROL	9.933333	a

Fuente: Autores

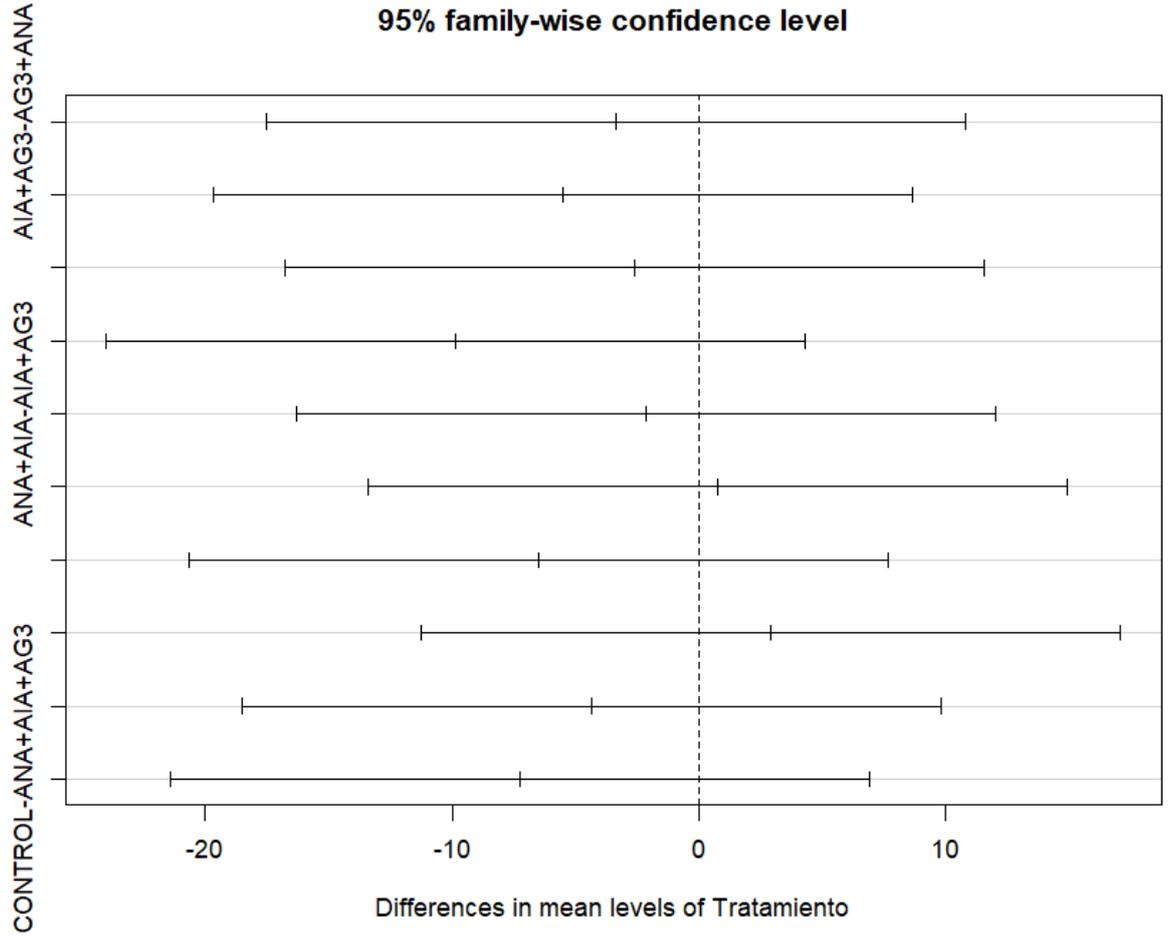


Figura 35: Comparación de medias por grupos de tratamientos para el diámetro de cotiledones.

Valores que contienen 0 son considerados como grupos sin diferencia estadística significativa.

Fuente: Autores

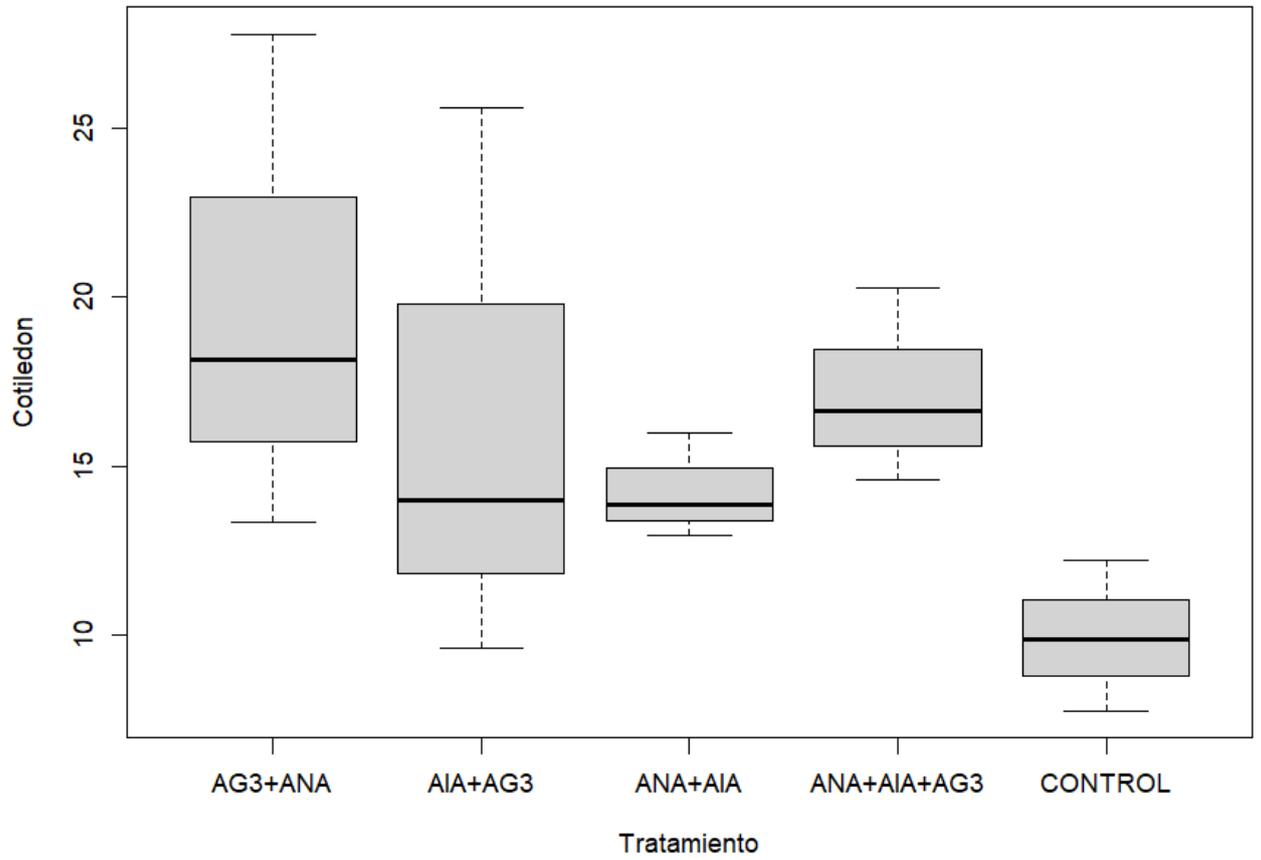


Figura 36: Diagrama de cajas de las medias del diámetro de cotiledones. Se muestran la diferencia de medias entre los tratamientos.

Fuente: Autores

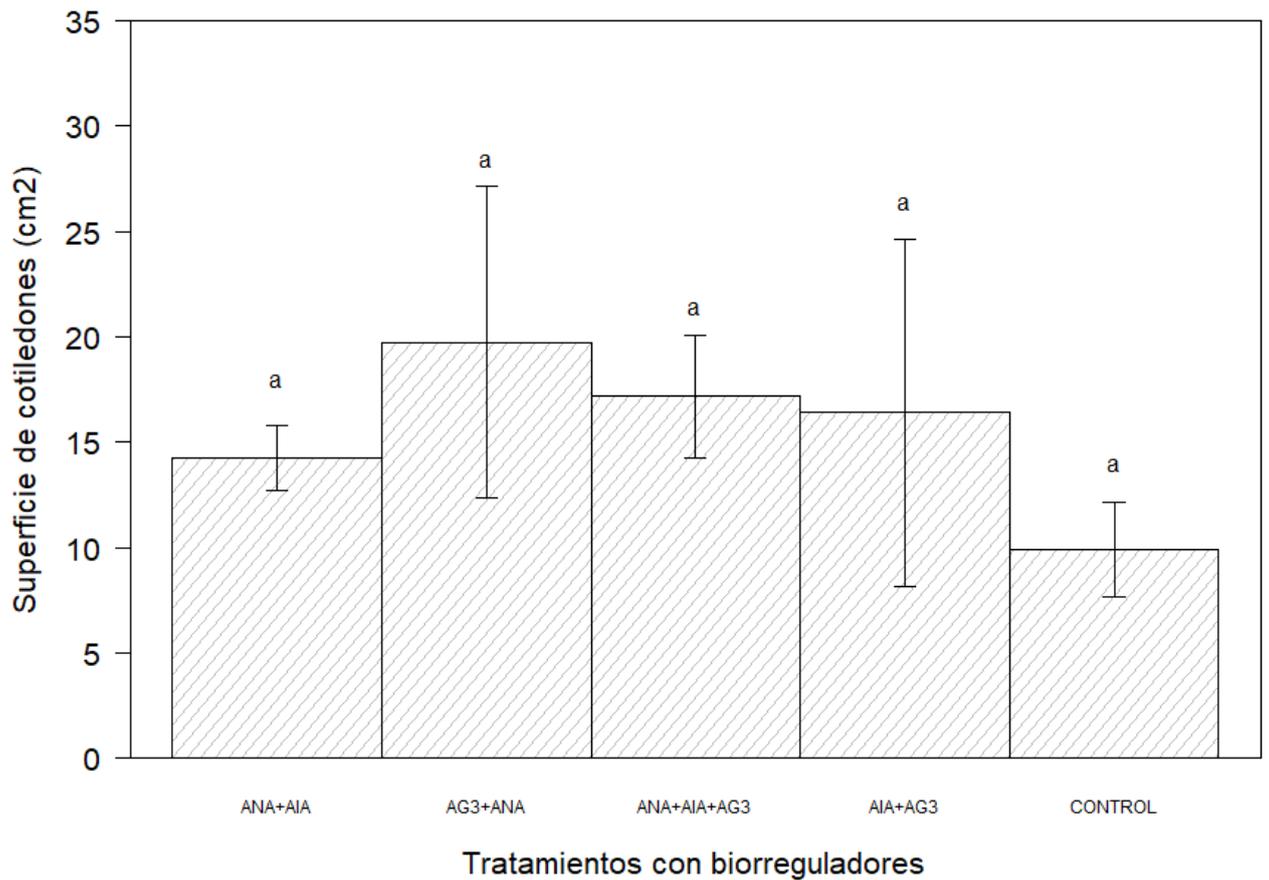


Figura 37: Comparación de medias por grupos de tratamientos para el diámetro de cotiledones.

Los resultados representan las medias de diámetros de los cotiledones \pm DS. Grupos con letras iguales representan que no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

Fuente: Autores

4.3.5 Análisis de los tratamientos para la determinación de la mejor combinación de biorreguladores para cada variable

Los resultados obtenidos con respecto al efecto de las combinaciones de hormonas en los diferentes tratamientos [tabla 4], se pueden observar consolidados en la figura 38, en donde se demuestra que la presencia de hormonas auxinas y giberelinas, sí estimulan el desarrollo de las estructuras vegetales cultivadas de manera *in vitro*. Autores como Castrillón et al. (2008); Fermino Junior & Scherwinski-Pereira (2012); Stefanel et al. (2021), han obtenido buenos resultados en la

aplicación de biorreguladores [ANA, AIA, AG3] en experimentaciones de cultivos *in vitro*. Por citar el caso de Stefanel et al. (2021), en su estudio denominado “*Antioxidante e giberelina no cultivo in vitro de Eugenia involucrata DC*”, reporta una media general de crecimiento en los brotes de un 73% con el uso de ácido giberélico [AG3]. Para el caso de la presente investigación se puede determinar que los mejores tratamientos corresponden a las combinaciones de ANA+AIA+AG3 para la raíz, con un promedio de 6 cm; AG3+ANA y ANA+AIA+AG3 para el tallo, con una longitud promedio de 3.5 cm; con respecto al desarrollo foliar las mejores combinaciones son AIA+AG3 y ANA+AIA, promedio de 6 hojas por plántula. Por último, en el desarrollo de la superficie de los cotiledones con un promedio de 20 cm², se destacan AG3+ANA, ANA+AIA+AG3 y AIA+AG3.

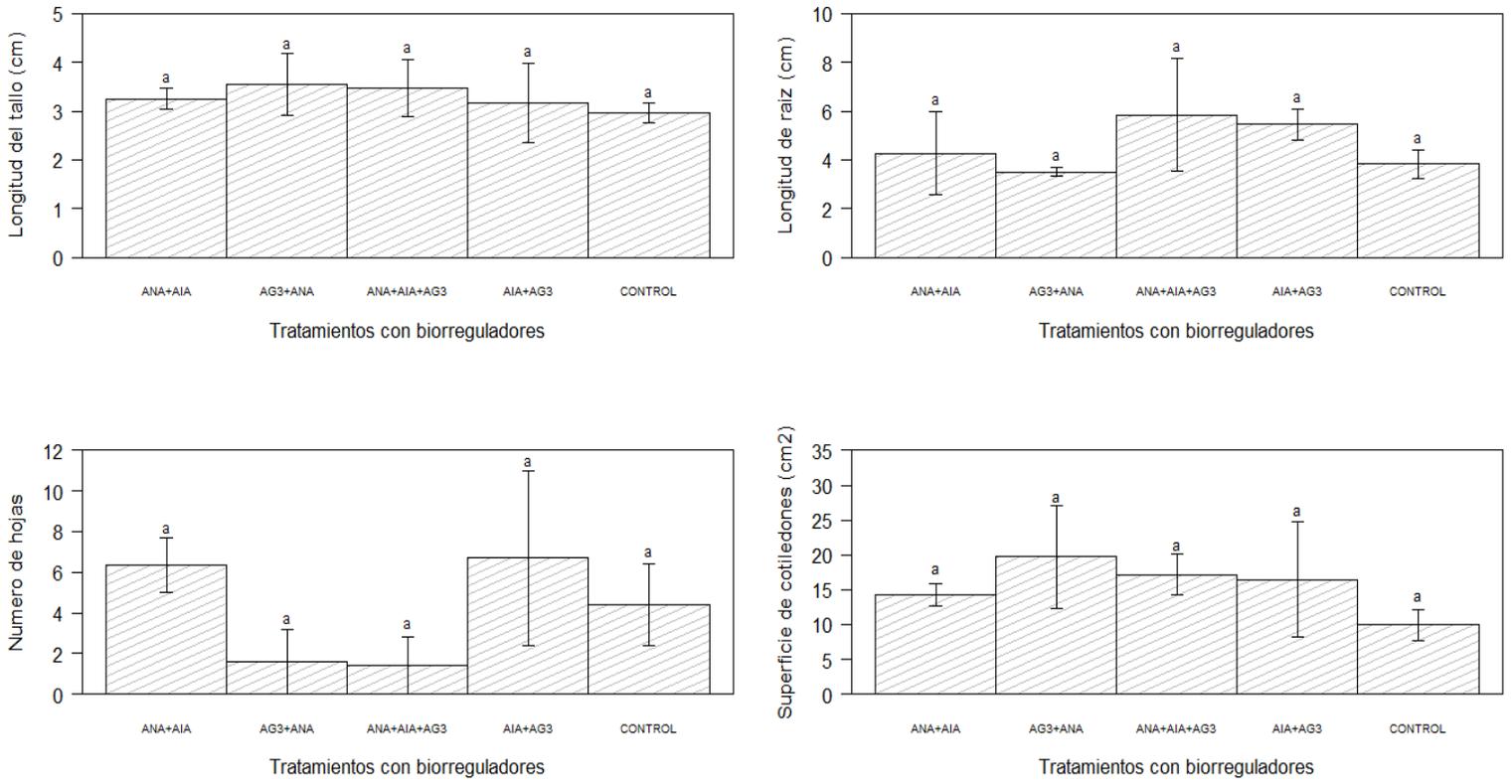


Figura 38. Efectos de los diferentes tratamientos con biorreguladores en función del desarrollo de las plántulas. Se muestran las medias superiores entre los tratamientos realizados para cada una de las variables.

Fuente: Autores

4.5 Discusión científica

La principal consideración a tomar en cuenta cuando se realizan cultivos *in vitro* es la capacidad de germinación de las semillas, puesto que, algunas especies, al tener una testa muy dura o poco permeable, es necesaria la aplicación de tratamientos externos para lograr una permeabilidad en la misma y así acceder al embrión (Moreno et al., 2018; Muñoz & Sánchez, 2004), siendo este el caso de las semillas de *Caesalpinia spinosa*, las cuales fueron sometidas a pretratamientos germinativos T1, T2, T3 y Control], logrando un resultado favorable con el tratamiento T3 y el control. Por su parte, el tratamiento T3 demuestra una viabilidad completa de germinación debido a que al mantenerse expuesto el embrión y los cotiledones directamente al medio, el desarrollo fisiológico aumenta al existir un mayor contacto con el medio y por ende por los nutrientes, agua, y gases necesarios que se encuentran disueltos que son aprovechados por la semilla para romper la dormancia fisiológica natural de las fabáceas, la misma que se ve afectada por su textura dura y poco permeable de su testa (Moreno et al., 2018; Muñoz & Sánchez, 2004).

Al momento de analizar los resultados posteriores al desarrollo de las plántulas de *Caesalpinia spinosa*, debemos hacer énfasis en los datos obtenidos con respecto a los tratamientos con biorreguladores [hormonas de crecimiento], puesto que consultando en diferentes fuentes bibliográficas se considera un tiempo estimado entre 60 a 90 días observación óptima para obtener resultados que sean acordes con las técnicas de cultivos *in vitro* (Moreno et al., 2018; Poma-Angamarca et al., 2014), siendo este una variable a considerar, que nos ayuda a refutar los resultados de la presente investigación, debido a que la toma de datos fue realizada en un periodo promedio de 15 días por cada toma de datos debido al factor tiempo, y con esto se puede corroborar la falta de diferencia estadísticamente significativa en nuestros análisis.

Sin embargo, a nivel fisiológico, las respuestas de las combinaciones de biorreguladores caen dentro de lo estipulado en estudios preliminares con el uso de auxinas y giberelinas para

cultivos *in vitro* de fabáceas, en los cuales se consideró el crecimiento radicular, foliar, y el nivel de supervivencia del material vegetal utilizado en anteriores investigaciones (Castrillón et al., 2008; A. H. García et al., 2007; Gratieri-Sossella et al., 2008).

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

En el presente estudio se evaluó la relación existente entre los biorreguladores auxinas-giberelinas en la producción de plántulas a nivel *in vitro* de *Caesalpinia spinosa*. Las pautas seleccionadas para este estudio fueron entre ellas el estado de madurez de las semillas, siendo clasificadas en maduras e inmaduras.

Los resultados obtenidos con respecto a los índices de germinación, se determinó porcentualmente que el mejor tratamiento observado en este trabajo de investigación corresponde al tratamiento T3, referente al retiro completo de la testa con un 82.5% de efectividad.

A pesar de haber obtenido los resultados en tiempos muchos más cortos que lo recomendado en la literatura, se llegó a determinar que las combinaciones de hormonas [ANA+AG3, AIA+AG3 y ANA+AIA+AG3], con sus respectivas concentraciones [0.02 AIA; 0.025 ANA, 0.025 AG3], sí poseen un efecto en las diferentes estructuras vegetales de las plántulas de *Caesalpinia spinosa*, tanto a nivel radicular se obtuvo un promedio de 6 cm de longitud, como en estructuras foliares, con datos promediados de 6 hojas por espécimen y el tallo con una longitud promedio de 3.5 cm.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda seguir con el estudio de las bondades de esta especie, realizando experimentación, que haga énfasis en la multiplicación de brotes con técnicas de escalamiento con biorreactores, para optimizar la producción vegetal y no depender únicamente de semillas.

Se sugiere realizar estudios referentes a los protocolos de desinfección para encontrar una vía óptima y evitar una contaminación generalizada, como se reportó en este trabajo.

Realizar una desinfección generalizada del espacio de trabajo, tanto cámara de flujo laminar, como sectores aledaños. Así mismo, se exhorta en el mantenimiento periódico de los equipos utilizados para que no existan efectos adversos en los resultados obtenidos por cuestiones técnicas.

Utilizar generadores de ozono cerca del lugar de trabajo, para limitar el efecto de las fuentes de contaminación aérea, y al terminar el trabajo, dejar toda la noche el generador encendido para garantizar esterilidad en el laboratorio.

APOYO FINANCIANCIERO

Agradecemos por el apoyo financiero brindado por la Fundación Rufford 35230-1, y al apoyo del Grupo de Investigación de la Valoración de la Biodiversidad GIBAVI de la Universidad Politécnica Salesiana, en el proyecto titulado “Establecimiento de un protocolo de micropropagación de *Caesalpinia sp.*, con fines de uso para un futuro plan de restauración ecosistémica y conservación”, bajo resolución de consejo número: 005-004-2022-10-06.

REFERENCIAS

- Angulo, A. B., Matamoros, R. C., & Gómez-Alpízar, L. (2015). MICROPROPAGACIÓN DE CUATRO CULTIVARES DE ARÁNDANO (*Vaccinium* spp.) A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE DOS. *AGRONOMÍA COSTARRICENSE*, 39(1), 7-23.
- Avilés, R., Carrión, J., Bravo, M., Rivera, D., & Rojas, N. (2010). ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, POLIFENOLES TOTALES Y CONTENIDO DE TANINOS DE EXTRACTOS DE TARA, . 13(2), 5-11.
- Azcón, J., & Talón, M. (2013). *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (2°). Mc. Graw-Hill.
- Caballero-Salas, R. G., Caballero-Miranda, M. L., & Casimiro Soriano, E. M. (2021). Germination and phenology assessment of two varieties of *Caesalpinia pulcherrima*. *Manglar*, 18(3), 295-300. <https://doi.org/10.17268/manglar.2021.039>
- Cabello Liu, I. (2010). *Monografía: Tara Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze* [Perúbiodiverso]. <https://repositorio.promperu.gob.pe/handle/20.500.14152/1373>
- Camp, W., & Daugherty, T. (1999). *MANEJO DE NUESTROS RECURSOS NATURALES* (1.^a ed.). Ediciones Paraninfo. <https://www.casadellibro.com/libro-manejo-de-nuestros-recursos-naturales/9788428326421/680435>
- Cañal, M. J., Rodríguez, R., & Fernández, B. (2001). Fisiología del cultivo in vitro. *Bioteología Vegetal*, 1(1), 4-6. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/59/47>
- Cardoso, J. C., & Teixeira da Silva, J. A. (2013). Gerbera micropropagation. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1344-1357. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.05.008>
- Casierra-Posada, F. (2008). Crecimiento foliar y radical en plantas de fique (*Furcraea castilla* y *F. macrophylla*) bajo estrés por encharcamiento. *Agronomía Colombiana*, 26(3), 382. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652008000300002
- Castrillón, J. C., Carvajal, E., & Ligarreto, G. (2008). *El efecto de auxinas sobre el enraizamiento*

de las estacas de agraz (Vaccinium meridionale Swartz) en diferentes sustratos.

- Charco, J. (2015). *La Tara: Ficha técnica # 9*. <http://ecuadorforestal.org/wp-content/uploads/2010/08/TARA.pdf>
- Checa, L. (1996). *Las hormonas vegetales*. 1-14.
- Constantino, M., Gómez Álvarez, R., Álvarez-Solís, J. D., Pat-Fernández, J., & Espín, G. (2010). Efecto de la biofertilización y los biorreguladores en la germinación y el crecimiento de *Carica papaya* L. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 103-115.
- Cordero, I., Ruiz-Díez, B., Balaguer, L., Richter, A., Pueyo, J. J., & Rincón, A. (2017). Rhizospheric microbial community of *Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze in conserved and deforested zones of the Atiquipa fog forest in Peru. *Applied Soil Ecology*, 114, 132-141. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.02.015>
- Corredor Lara, E. Y., Imakawa, M. A., Da Silva, D., & De Tarso Barbosa Sampaio, P. (2022). In vitro regeneration of *Senna alata* (L.) Robx. (Fabaceae): An ancient medicinal plant. *Advances in Forestry Science*, 9(3), 1831-1838. <https://doi.org/10.34062/afs.v9i3.12252>
- Cortes, J. S. A., Jovanna, A. G., David, A. C. J., & Melida, S. M. R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*, 17(32), 109-129.
- Da Silva, D., Bruno, F., Imakawa, A., Costa, S., & Sampaio, P. (2018). In vitro propagation and seedling acclimatization of *Caesalpinia ferrea* Mart., a valuable medicinal plant in the Amazon (Fabaceae). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais*, 13, 57-65. <https://doi.org/10.46357/bcnaturais.v13i1.368>
- Da Silva, D., Imakawa, A. M., Costa, S. de S., & Sampaio, P. de T. B. (2018). In vitro culture of zygotic embryos and seeds of *Caesalpinia ferrea* Martius. *Hoehnea*, 45(4), 663-668. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-65/2018>
- De la Torre, L. (2018). *La Tara, beneficios ambientales y recomendaciones para su manejo*

- sostenible en relictos de bosque y sistemas agroforestales*. CONDESAN.
- Díaz, M. (2017). Biorreguladores de Crecimiento en las Plantas. *INTAGRI*, 5.
- Erst, A. A., & Nuzhdina, N. S. (2020). In vitro propagation of endemic species *Hedysarum chaiyrakanicum* (Tuva Republic, Russia) and its widespread congener, *H. gmelini* (Fabaceae). *BIO Web of Conferences*, 24, 00021.
<https://doi.org/10.1051/bioconf/20202400021>
- Fermino Junior, P. C. P., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2012). Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C.Smith—Fabaceae). *Ciência Florestal*, 22(1). <https://doi.org/10.5902/198050985074>
- Fernández, B. (1995). *Micropropagación de leguminosas arbustivas que pueden crecer en escombreras* [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universidad de León].
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=150772>
- Figueroa, J., Jimenez, J., & Oblitas, J. (2014). *Mercado y productos derivados de la tara*. Universidad Nacional de Cajamarca.
- Gammoudi, N., Nagaz, K., & Ferchichi, A. (2022). Establishment of optimized in vitro disinfection protocol of *Pistacia vera* L. explants mediated a computational approach: Multilayer perceptron–multi–objective genetic algorithm. *BMC Plant Biology*, 22, 324.
<https://doi.org/10.1186/s12870-022-03674-x>
- García, A. H., Garciglia, R. S., & Parra, E. A. (2007). *Revista Electrónica Nova Scientia*. . . pp, 8.
- García, M. (2011). *El Genero Caesalpinia en la medicina tradicional*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gatti, I., Guindón, F., Bermejo, C., Espósito, A., & Cointry, E. (2016). In vitro tissue culture in breeding programs of leguminous pulses: Use and current status. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 127(3), 543-559. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1082-6>
- Godínez-Álvarez, H., & Flores-Martínez, A. (1999). *GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE 32*

ESPECIES DE PLANTAS DE LA COSTA DE GUERRERO: SU UTILIDAD PARA LA RESTAURACIÓN ECOLÓGICA.

- Gratieri-Sossella, A., Petry, C., & Nienow, A. A. (2008). Propagação da corticeira do banhado (*Erythrina crista-galli* L.) (FABACEAE) pelo processo de estaquia. *Revista Árvore*, 32, 163-171. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622008000100018>
- Gupta, R., & Chakrabarty, S. K. (2013). Gibberellic acid in plant: Still a mystery unresolved. *Plant Signaling & Behavior*, 8(9), e25504. <https://doi.org/10.4161/psb.25504>
- Hernández, R. M., & Diosdado, E. (2010). EFECTO DE LOS BIORREGULADORES DEL CRECIMIENTO EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE MANDARINA. *Cultivos Tropicales*, 31(3), 32-38.
- Hernández Sampieri, R. (2014). *Metodología de la Investigación—Sexta Edición* (R. Fernández Collado & M. del P. Baptista Lucio, Eds.; 6ta ed.). McGraw Hill Education.
- Hernández, Y., & González, M. E. (2010). EFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA Y OXIDACIÓN FENÓLICA EN EL ESTABLECIMIENTO In Vitro DE FRUTALES PERENNES. *Cultivos Tropicales*, 31(4).
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0258-59362010000400015&lng=es&nrm=iso&tlng=pt
- Hernández-García, A., Ambriz-Parra, E., López-Albarrán, P., Cruz-de León, J., & Salgado-Garciglia, R. (2021). In vitro propagation from axillary buds of the endangered tree *Dalbergia congestiflora* Pittier (Fabaceae). *Plant Biotechnology*, 38(4), 409-414.
<https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.21.0901a>
- Ishibashi, V., Koguta, K. V., Junior, P. C. F., & Higa, A. R. (2017). Estabelecimento in vitro de *Acacia mearnsii* De Wild. (Fabaceae). *Plant Cell Culture & Micropropagation - ISSN 1808-9909*, 13(1), Art. 1.
<http://pccm.ufla.br/index.php/plantcellculturemicropropagation/article/view/104>

- Jiménez-Bonilla, V., Abdelnour-Esquivel, A., Jiménez-Bonilla, V., & Abdelnour-Esquivel, A. (2016). Establecimiento in vitro de (*Vaccinium consanguineum*), un arándano nativo de Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*, 29(2), 77-84.
<https://doi.org/10.18845/tm.v29i2.2692>
- Jordán, M. (2006). *Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas*. Universidad de La Serena.
- Kessel Domini, A. (2012). Mejora genética de la fresa (*Fragaria ananassa* Duch.), a través de métodos biotecnológicos. *Cultivos Tropicales*, 33(3), 34-41.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0258-59362012000300005&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- Krikorian, A. D. (1993). Medios de cultivo: Generalidades, composición y preparación. En *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. (Primera, pp. 46-48). CIAT.
- Lapa, P. D. la C. (2004). Aprovechamiento integral y racional de la tara *Caesalpinia spinosa*—*Caesalpinia tinctoria*. *Revista del Instituto de investigación de la Facultad de minas, metalurgia y ciencias geográficas*, 7(14), 64-73.
- Las Heras, T., Gil García, M. J., Núñez Olivera, E., & Martínez Abaigar, J. (1995). *Micropropagación in vitro de variedades de vid (Vitis vinifera L.) cultivadas en La Rioja (España)* [Monografía].
- León, N. (2011). *BIORREGULADORES DE CRECIMIENTO, FERTILIZANTES QUÍMICOS Y ORGÁNICOS EN TOMATE (Lycopersicon esculentum MILL.) DE INVERNADERO*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Loján, I. (1992). *El verdor de los Andes. Árboles y arbustos nativos para el desarrollo forestal Alto Andino*.
- Melo Ferrari, M., Glorio Paulet, P., & Tarazona Reyes, G. (2013). Efecto de la madurez en los componentes de valor comercial (taninos y goma) de tara *Caesalpinia spinosa* (Molina)

- Kuntze. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 79(3), 218-228.
- MINAGRI. (2019). *Producción y Comercio de la TARA en el Perú. Boletín. DIRECCIÓN GENERAL DE POLÍTICAS AGRARIAS.*
<https://www.siicex.gob.pe/siicex/documentosportal/alertas/documento/doc/168510289radF57F7.pdf>
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego de Perú. (2011). *MINISTERIO DE AGRICULTURA FOMENTA PRODUCCIÓN DE TARA A GRAN ESCALA PARA EXPORTACIÓN.*
 MINISTERIO DE AGRICULTURA FOMENTA PRODUCCIÓN DE TARA A GRAN ESCALA PARA EXPORTACIÓN. <https://www.midagri.gob.pe/portal/notas-de-prensa/2009/2900-peruproduce-el-80-de-la-tara-a-nivel-mundial#:~:text=El%20Per%C3%BA%20produce%20el%2080,iniciativas%20en%20Ica%20y%20Lambayeque>.
- Molina, J. (1810). *Ensayo sobre la historia natural de Chile: Bolonia 1810 - Memoria Chilena.*
<http://www.memoriachilena.gob.cl/602/w3-article-7886.html>
- Moreno, D., Duplancic, A., Navas, A. L., & Moratta, M. H. (2018). *Evaluación de la germinación de Caesalpinia gilliesii Wall. Ex Diatr.*
- Muñoz, B. C., & Sánchez, J. A. (2004). *Germinación, dormancia y longevidad potencial de las semillas de Guazuma ulmifolia.* 27(1).
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Narvaez-Trujillo, A., Calvo, A., & Troya, A. (2010). *Las poblaciones naturales de la tara (Caesalpinia spinosa) en el Ecuador: Una aproximación al conocimiento de la diversidad genética y el contenido de taninos por medio de estudios moleculares y bioquímicos.*
- Nicolas Dostert, Roque, J., Brokamp, G., Cano, A., La Torre, M., & Weigend, M. (2009).

Factsheet: Datos botánicos de Tara.

http://200.62.231.13/bitstream/handle/20.500.14152/1339/Factsheet_datos_botanicos_tara_2009_keyword_principal.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Nieto, C., & Hidrobo, G. (2011). *LA CADENA AGRO-PRODUCTIVA DEL GUARANGO (CAESALPINIA SPINOSA KUNTZE), ELEMENTOS QUE RESALTAN SU COMPETITIVIDAD* (1.^a ed.). SENESCYT.

<http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/809>

Nobre, D. A. C., Macedo, W. R., Silva, G. H., Lopes, L. S., & Jaimes, E. H. L. (2019). Aplicación y efecto antioxidante del ácido gálico sobre la calidad de semillas de trigo. *Revista de Ciências Agrárias*, 42(1), Art. 1. <https://doi.org/10.19084/RCA18184>

Núñez, J., Quiala, E., De Fera, M., Mestanza, S., & Teanga, S. (2017). *Propagación in vitro de Caesalpinia spinosa (Mol.) O. Kuntz a partir de yemas axilares de árboles plus seleccionados*. 17(2), 67-75.

Ortega Baes, P., de Viana, M. L., Larenas, G., & Saravia, M. (2001). Germinación de semillas de *Caesalpinia paraguariensis* (Fabaceae): Agentes escarificadores y efecto del ganado. *Revista de Biología Tropical*, 49(1), 301-304.

http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-77442001000100028&lng=en&nrm=iso&tlng=en

Pavón-Vargas, D., & Valencia-Chamorro, S. (2016). EFECTO DE RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES COMPUESTOS A BASE DE GOMA TARA EN LA CALIDAD POSCOSECHA DE FRUTILLA (*Fragaria ananassa*). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 17(1), 65-70.

Pereira Almeida, J. (2018). Multiplicación in vitro de *Bauhinia monandra* Kurz (FABACEAE). *Anais dos Seminários de Iniciação Científica*, 20.

<https://doi.org/10.13102/semic.v0i20.3072>

- Plan Binacional de Desarrollo de la Región Fronteriza. (2022, enero 14). *Plan Binacional concreta la primera venta de 30 toneladas de Tara, a empresa italiana con sede en Perú—Plan Binacional*. <https://planbinacional.org.ec/plan-binacional-concreta-la-primera-venta-de-30-toneladas-de-tara-a-empresa-italiana-con-sede-en-peru/>, <https://planbinacional.org.ec/plan-binacional-concreta-la-primera-venta-de-30-toneladas-de-tara-a-empresa-italiana-con-sede-en-peru/>
- Poma-Angamarca, R., Muñoz-Chamba, L., Yaguana, M., González-Zaruma, D., Eras-Guamán, V. H., & Rojas-Idrogo, C. (2014). Propagación in vitro de *Prosopis limensis* Benth. In Hook. (Fabaceae—Mimosoideae). *Quebracho (Santiago del Estero)*, 22, 96.
- Pramanik, T. K., & Datta, S. K. (1986). Plant regeneration and ploidy variation in culture derived plants of *Asclepias curassavica* L. *Plant Cell Reports*, 5(3), 219-222.
<https://doi.org/10.1007/BF00269124>
- Rigano, L., Deola, M., Zaccariotto, F., Colleoni, T., & Lionetti, N. (2019). A New Gelling Agent and Rheology Modifier in Cosmetics: *Caesalpinia spinosa* Gum. *Cosmetics*, 6(2), Art. 2.
<https://doi.org/10.3390/cosmetics6020034>
- Sánchez-Paz, Y., & Ramírez-Villalobos, M. (2006). Tratamientos pregerminativos en semillas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. Y *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 23(3), 257-272.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0378-78182006000300001&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Sánchez-Soto, B. H., Pacheco-Aispuro, E., Reyes-Olivas, Á., & Lugo-García, G. A. (2016). *RUPTURA DE LATENCIA FÍSICA EN SEMILLAS DE. 41*.
- Sangay - Tucto, S., & Duponnois, R. (2018). Ecological characteristics of Tara (*Caesalpinia spinosa*), a multipurpose legume tree of high ecological and commercial value. *Agricultural Research Updates*, 22, 189-208.

- Santaella, A. P., & Ureña, G. (2017). La importancia del ácido tánico en nuestros días. *MoleQla: revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide*, 25, 13.
- Scalon, S. P. Q., Mussury, R. M., & Lima, A. A. (2012). Germination of *Croton urucurana* L. seeds exposed to different storage temperatures and pre-germinative treatments. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84(1), 191-200. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652012000100020>
- Seinfeld, J., Cuzquén, G., Farje, G., & Zaldívar, S. (1998). Introducción a la economía de los recursos naturales y del medio ambiente. *Repositorio de la Universidad del Pacífico - UP*. <http://repositorio.up.edu.pe/handle/11354/1163>
- Silva, H. F. de J., Asmar, S. A., Oliveira, R. C. de, Melo, B. D., Luz, J. M. Q., & Pasqual, M. (2016). In vitro establishment and early development of barueiro (*Dipteryx alata* Vogel). *Semina: Ciências Agrárias*, 37(4), 1779. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n4p1779>
- Silveira, A. A. da C., Silva, L. C. da, & Sibov, S. T. (2022). Germinação in vitro de *Dipteryx alata* Vogel (Fabaceae) e proliferação de brotos sob sistema de ventilação convencional e natural. *Ciência Florestal*, 32(2), 996-1010. <https://doi.org/10.5902/1980509841400>
- Stambouli, S., Bouzid, S., Dutuit, P., & Harzallah-Skhiri, F. (2012). In vitro growth and organogenesis of *Prosopis farcta* plantlets (Fabaceae, Mimosoideae) in culture medium supplemented with various concentrations of Ca⁺⁺ and Na⁺. *Acta Biologica Hungarica*, 63(1), 113-127. <https://doi.org/10.1556/ABiol.63.2012.1.9>
- Stefanel, C. M., Reiniger, L. R. S., Rabaiolli, S. M. S., Silva, K. B., & Andreolla, T. L. P. (2021). Antioxidante e giberelina no cultivo in vitro de *Eugenia involucrata* DC. *Revista de Ciências Agrárias*, 44(1), Art. 1. <https://doi.org/10.19084/rca.23704>
- Terán-Hilares, R., Chirinos, R., Pedreschi, R., & Campos, D. (2018). Enhanced antioxidant properties of tara (*Caesalpinia spinosa*) gallotannins by thermal hydrolysis and its

- synergistic effects with α -tocopherol, ascorbyl palmitate, and citric acid on sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) oil. *Journal of Food Process Engineering*, 41(1), e12613.
<https://doi.org/10.1111/jfpe.12613>
- Villanueva, C. (2007). *La Tara Es El Oro Verde de Los Incas para El Mundo | PDF | Imperio Inca | Alimentos*. Scribd. <https://es.scribd.com/document/419815054/La-Tara-Es-El-Oro-Verde-de-Los-Incas-Para-El-Mundo>
- Villena, J., Seminario, J., & Valderrama, M. (2019). Variabilidad morfológica de la “tara” *Caesalpinia spinosa* (Molina.) Kuntze (Fabaceae), en poblaciones naturales de Cajamarca: Descriptores de fruto y semilla. *Arnaldoa*, 20.
- Viveros-Viveros, H., Hernández Palmeros, J. D., Velasco García, M. V., Robles Silva, R., Ruiz Montiel, C., Aparicio Rentería, A., Martínez Hernández, M. D. J., Hernández Villa, J., & Hernández Hernández, M. L. (2018). Análisis de semilla, tratamientos pregerminativos de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. Y su crecimiento inicial. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(30), 52-65. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v6i30.207>
- Zarantes, V. M. N. (2020). La tecnología doble haploide en el mejoramiento genético de frutas exóticas: Uchuva, *Physalis peruviana* L., como estudio de caso. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(1), Art. 1. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.88590>

ANEXOS

Anexo 1. Ubicación por Google Maps de la Comunidad Carmen de Zhipta



Figura 39: Ubicación del punto de recolección en la Comunidad Carmen de Zhipta.

Fuente: Google Maps, 2023.

Anexo 2. Resultados obtenidos de los datos de germinación y desarrollo de las plántulas de *Caesalpinia spinosa*

Tabla 25. Resultados de los pretratamientos germinativos propuestos de la repetición 1, para las semillas de *Caesalpinia spinosa*

Germinación Semillas Repetición 1		
Estadio	Tratamiento	% de Germinación
Maduro	T1: corte en polo opuesto al embrión	0%
Inmaduro	T1: corte en polo opuesto al embrión	10%
Maduro	T2: corte transversal de la semilla	0%
Inmaduro	T2: corte transversal de la semilla	1,88%
Maduro	T3: remojo en agua (48h) + retiro de la testa	0%
Inmaduro	T3: remojo en agua (48h) + retiro de la testa	100%
Maduro	Control	5%
Inmaduro	Control	90%

Fuente: Autores.

Tabla 26. Resultados de los pretratamientos germinativos propuestos de la repetición 2, para las semillas de *Caesalpinia spinosa*

Germinación Semillas Repetición 2		
Estadio	Tratamiento	% de Germinación
Maduro	T1: corte en polo opuesto al embrión	0%
Inmaduro	T1: corte en polo opuesto al embrión	0%
Maduro	T2: corte transversal de la semilla	0%
Inmaduro	T2: corte transversal de la semilla	5%
Maduro	T3: remojo en agua (48h) + retiro de la testa	0%
Inmaduro	T3: remojo en agua (48h) + retiro de la testa	100%
Maduro	Control	0%
Inmaduro	Control	80%

Fuente: Autores.

Tabla 27. Resultados de los pretratamientos germinativos propuestos de la repetición 3, para las semillas de *Caesalpinia spinosa*

Germinación Semillas Repetición 3		
Estadio	Tratamiento	% de Germinación
Maduro	T1: corte en polo opuesto al embrión	0%
Inmaduro	T1: corte en polo opuesto al embrión	12,50%
Maduro	T2: corte transversal de la semilla	0%
Inmaduro	T2: corte transversal de la semilla	0,00%
Maduro	T3: remojo en agua (48h) + retiro de la testa	0%
Inmaduro	T3: remojo en agua (48h) + retiro de la testa	100%
Maduro	Control	0%
Inmaduro	Control	82,50%

Fuente: Autores.

Anexo 3. Recolección y selección del material vegetal



Figura 40: Recolección de las semillas de *Caesalpinia spinosa*.

Fuente: Autores.



Figura 41: Selección y separación de las semillas de *Caesalpinia spinosa* en maduras e inmaduras.

Fuente: Autores.

Anexo 4. Trabajo de laboratorio en la Universidad Politécnica Salesiana



Figura 42: Ingreso de los medios y material para cultivos *in vitro* al autoclave.

Fuente: Autores.



Figura 43: Observación de estructuras de *Caesalpinia spinosa* con la ayuda del estereomicroscopio.

Fuente: Autores.

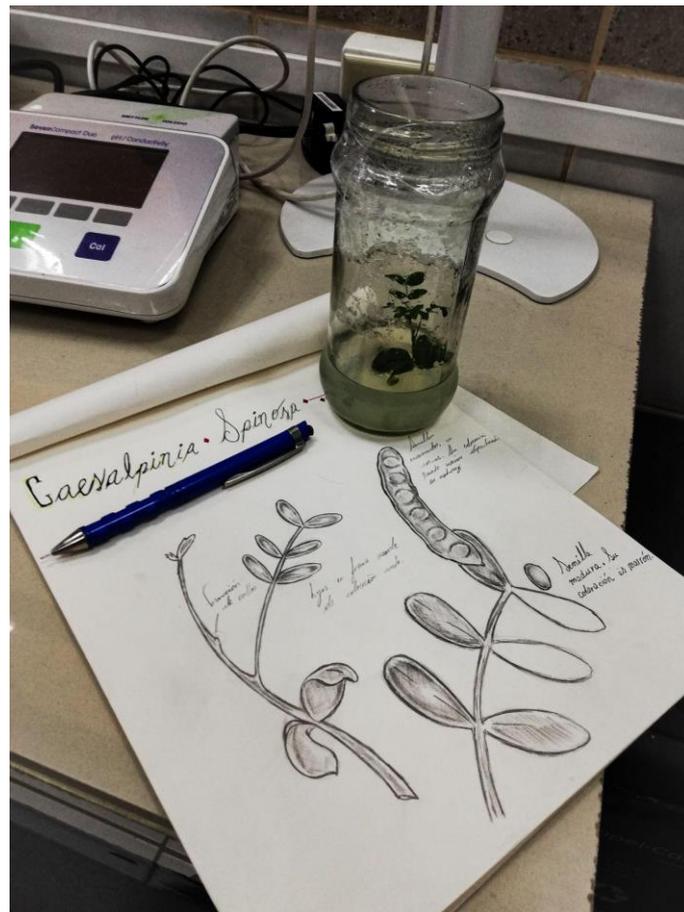


Figura 44: Ilustración científica de las estructuras de *Caesalpinia spinosa*. Realizada por Juan José Solórzano, tesista.

Fuente: Autores.



Figura 45: Proceso de esterilización en cámara de flujo laminar con la aplicación de UV.

Fuente: Autores.



Figura 46: Plántulas en proceso de desarrollo dentro de la cámara de crecimiento de la Universidad Politécnica Salesiana.

Fuente: Autores.



Figura 47: Plántulas en proceso de desarrollo dentro de la cámara de crecimiento de la Universidad Politécnica Salesiana.

Fuente: Autores.



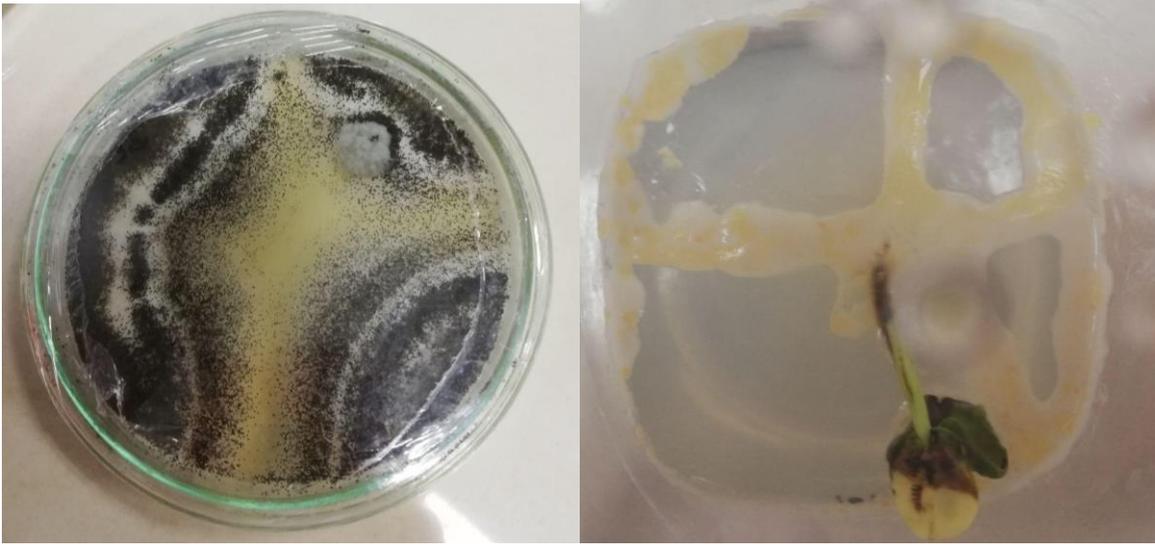
Figura 48: Ejemplar desarrollado *in vitro* de *Caesalpinia spinosa*.

Fuente: Autores.



Figura 49: Producción de material vegetal realizado por los tesisistas de la cátedra de Biotecnología Vegetal.

Fuente: Autores.

Anexo 5. Ensayos contaminados

Figuras 50-51: Pruebas de contaminación por agentes fúngicos presentes en los laboratorios de Ciencias de la Vida.

Fuente: Autores.



Figura 52: Plántula contaminada por levadura.

Fuente: Autores.

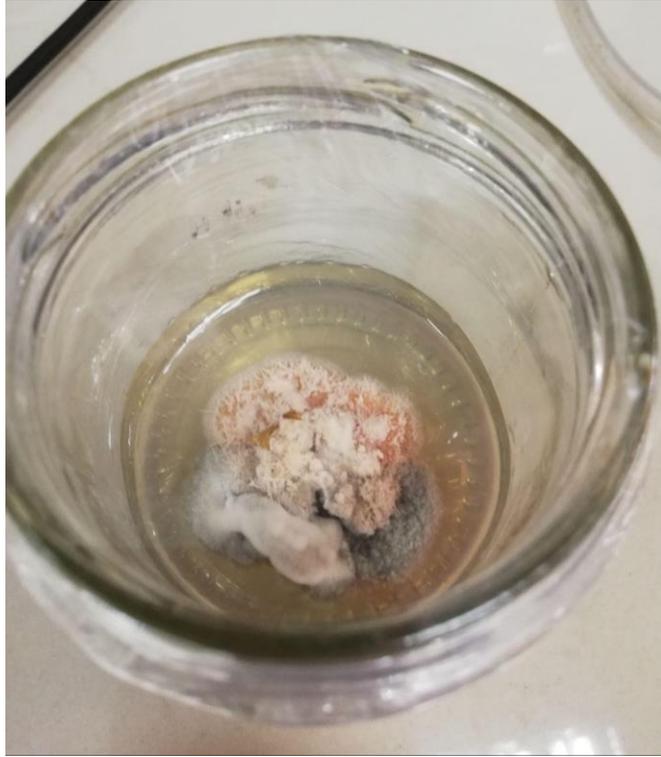


Figura 53: Plántula contaminada por agentes externos.

Fuente: Autores.