



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

OPTIMIZACIÓN DEL BIORREGULADOR 6-BENCILAMINOPURINA EN LA
INDUCCIÓN A BROTES DE *Caesalpinia spinosa* A NIVEL *in vitro*

Trabajo de titulación previo a la obtención del
título de Ingeniera Biotecnóloga

AUTORAS: MARÍA FERNANDA ALVAREZ YUMBLA

JESSICA TATIANA MUÑOZ ORTEGA

TUTORA: DRA. MYRIAM XIMENA MANCHENO CÁRDENAS, MGTR.

Cuenca - Ecuador

2023

1

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotras, María Fernanda Alvarez Yumbra con documento de identificación N° 0301977773 y Jessica Tatiana Muñoz Ortega con documento de identificación N° 0105278725; manifestamos que:

Somos las autoras 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, 08 de febrero del 2023

Atentamente,



María Fernanda Alvarez Yumbra
0301977773



Jessica Tatiana Muñoz Ortega
0105278725

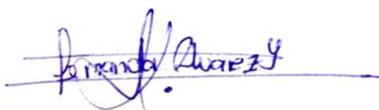
**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotras, María Fernanda Alvarez Yumbla con documento de identificación N° 0301977773 y Jessica Tatiana Muñoz Ortega con documento de identificación N° 0105278725, 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 autoras del Trabajo experimental: “Optimización del biorregulador 6-Bencilaminopurina en la inducción a brotes de *Caesalpinia spinosa* a nivel *in vitro*”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera Biotecnóloga, 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, 08 de febrero del 2023

Atentamente,



María Fernanda Alvarez Yumbla

0301977773



Jessica Tatiana Muñoz Ortega

0105278725

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: OPTIMIZACIÓN DEL BIORREGULADOR 6-BENCILAMINOPURINA EN LA INDUCCIÓN A BROTES DE *Caesalpinia spinosa* A NIVEL *in vitro*, realizado por María Fernanda Alvarez Yumbla con documento de identificación N° 0301977773 y por Jessica Tatiana Muñoz Ortega con documento de identificación N° 0105278725, 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, 08 de febrero del 2023

Atentamente,



Dra. Myriam Ximena Mancheno Cárdenas, Mgtr.

0602018160

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen por haberme dado la sabiduría y la fuerza para cumplir uno de mis más anhelados sueños.

A mis padres, Pablo y Obdulia quienes son un pilar fundamental en mi vida y que gracias a su paciencia, trabajo y sacrificio me han permitido llegar a esta gran meta.

A mis hermanos, Javier, Cristina y Jeniffer que a pesar de nuestras diferencias siempre estuvieron presentes, motivándome todos los días en este proceso de formación personal y profesional.

A todos mis familiares porque con sus consejos, palabras de aliento y oraciones han hecho de mí una mujer valiente y perseverante.

Fenita

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien me acompaña en cada paso que doy y me ha permitido subir este nuevo peldaño en mi vida.

A mi ejemplo de mujer, mi madre, jamás lo hubiese logrado sola, siempre me acompaña a todas horas y siempre me espera con su comidita lista. Gracias mamiOb.

A mi papi, por su incansable sacrificio, porque a pesar de la distancia siento su apoyo y cariño siempre.

A mis maestros, Dra. Myriam Mancheno e Ing. Mateo León mis agradecimientos por brindarme su tiempo, sus conocimientos y tener la mejor predisposición para la culminación de esta tesis. De igual manera a la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca por abrirme sus puertas y brindarme un ambiente de aprendizaje.

Gracias Tati, Santi y José por su amistad sincera, por ayudarme y por compartir todo este tiempo. Gracias Caesalpinia TEAM.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a la Iniciativa Tambillo Forest y la Cooperativa de Desarrollo de la Comunidad Jima Ltda. por su invaluable contribución a nuestro trabajo de titulación. ¡Gracias por su generosidad y por ser parte de esta historia de éxito!.

De manera especial, a mi apoyo incondicional, gracias Paquito que con su amor y sus palabras he logrado esta gran meta. Mi mayor admiración para usted.

Fenita

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía y fuente de fortaleza en todo momento. A mis padres Xavier y Alexandra, por su amor incondicional y apoyo constante en todos los aspectos de mi vida. Gracias por creer en mí y alentarme a seguir adelante siempre. Este logro es también suyo.

A mi familia, por su amor y compañía a lo largo de mi vida y por ser mi pilar en momentos difíciles.

Esta tesis es un reflejo de mi arduo trabajo y dedicación, pero también de la influencia y apoyo de todos aquellos que han estado presentes en mi vida. Gracias a todos por ser parte de este logro y por hacer que valga la pena el esfuerzo. Dedico esta tesis con todo mi amor y gratitud.

Taty

AGRADECIMIENTOS

Ante todo, quiero agradecer a Dios por brindarme la sabiduría y el coraje para enfrentar los desafíos. Este logro es gracias a su amor y su bendición.

A mis padres, por enseñarme valores y principios que me han guiado en mi camino y por ser mi pilar en todo momento. Este logro es en gran parte gracias a su sacrificio y dedicación.

A mis profesores, Dra. Myriam Mancheno e Ing. Mateo León por su experiencia y conocimiento para enriquecer mi investigación. Les agradezco por ser un ejemplo a seguir y por ser parte de mi crecimiento académico y personal. Agradezco también, a la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca por proporcionarme un ambiente de aprendizaje y crecimiento, así como la oportunidad de tener acceso a los recursos necesarios para realizar mi tesis de manera exitosa.

A mis amigos, por su camaradería y apoyo. Gracias por compartir esta experiencia conmigo.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a la Iniciativa Tambillo Forest y la Cooperativa de Desarrollo de la Comunidad Jima Ltda. por su invaluable contribución a nuestro trabajo de titulación. ¡Gracias por su generosidad y por ser parte de esta historia de éxito!.

Taty

TABLA DE CONTENIDO

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	II
CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA	II
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	III
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
DEDICATORIA	6
AGRADECIMIENTOS	7
TABLA DE CONTENIDO.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ÍNDICE DE TABLAS	12
RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	15
PROBLEMA.....	17
OBJETIVOS	18
General	18
Específicos.....	18
CAPÍTULO 1	20
INTRODUCCIÓN	20
1.1 Guarango (<i>Caesalpinia spinosa</i>)	21
1.1.1 Descripción general de la especie	21
1.1.2 Descripción botánica de la especie	22
1.1.3 Requerimientos climatológicos y distribución geográfica.....	24
1.1.4 Usos del guarango.....	29
1.1.5 Importancia del guarango	30
1.2 Cultivo de tejidos vegetales.....	31

1.3 Micropropagación de especies leñosas.....	32
1.3.1 Factores que intervienen en la micropropagación de especies leñosas	32
1.3.2 Antecedentes del cultivo de tejidos vegetales en especies leñosas.....	35
CAPÍTULO 2	37
METODOLOGÍA	37
2.1 Nivel de investigación	37
2.2 Diseño de investigación.....	37
2.3 Población y muestra	37
2.4 Técnicas de recolección de datos	38
2.5 Instrumentos de recolección de datos.....	38
2.6 Manejo de datos estadísticos	38
2.7 Procedimientos experimentales	38
2.7.1 Unidad experimental.....	38
2.7.2 Determinación del efecto en la inducción a brotes de <i>Caesalpinia spinosa</i> variando la concentración del biorregulador 6-Bencilaminopurina para la obtención de explantes a nivel <i>in vitro</i>	39
2.7.3 Establecimiento de las condiciones operacionales variando tiempo y concentración en una etapa temprana de la morfogénesis de <i>Caesalpinia spinosa</i> obteniendo una mayor eficiencia en la producción de brotes a nivel <i>in vitro</i>	42
2.7.4 Análisis de los datos obtenidos para la determinación del tratamiento más eficiente.....	43
CAPÍTULO 3	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
3.1 Determinación del efecto en la inducción a brotes de <i>Caesalpinia spinosa</i> variando la concentración del biorregulador 6-Bencilaminopurina para la obtención de explantes a nivel <i>in vitro</i>	46
3.1.1 Prueba de la normalidad	46
3.1.2 Efecto de 6-bencilaminopurina en la producción de brotes.....	47
3.2 Establecimiento de las condiciones operacionales variando tiempo y concentración en una etapa temprana de la morfogénesis de <i>Caesalpinia spinosa</i> obteniendo una mayor eficiencia en la producción de brotes a nivel <i>in vitro</i>	48
3.2.1 Prueba de la normalidad	49

3.2.2 Tiempo y concentración óptimos de adición de 6-BAP para la producción de brotes	49
CAPÍTULO 4	53
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	53
4.1 Conclusiones	53
4.2 Recomendaciones	53
REFERENCIAS	56
ANEXOS	65
Anexo 1. Abreviaturas.....	65
Anexo 2. Material Vegetal	66
Anexo 3. Establecimiento de fase de inducción.....	67
Anexo 4. Análisis estadísticos.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Caesalpinia spinosa</i>	21
Figura 2. Plántulas <i>in vitro</i> de <i>C. spinosa</i>	40
Figura 3. Establecimiento de cultivo <i>in vitro</i> de <i>C. spinosa</i>	42
Figura 4. Explantes de <i>C. spinosa</i> con concentración de 0,25 ppm de 6-BAP en: 13 (A), 18 (B) y 23 (C) días respectivamente	43
Figura 5. Gráfico cuantil-cuantil (Q-Q plot) de los datos originales del objetivo 1 .	46
Figura 6. Efecto de 6-BAP en la producción de brotes.....	47
Fuente: Software estadístico libre R versión 4.2.1.....	47
Figura 7. Gráfico cuantil-cuantil (Q-Q plot) de los datos originales del objetivo 2 .	49
Figura 8. Diagrama de Pareto estandarizado para número de brotes.....	50
Figura 9. Gráfica de efectos principales para el número de brotes	50
Figura 10. Máxima producción de número de brotes esperados con 6-BAP con una concentración de 0,25 ppm en un tiempo de 23 días	51
Figura 11. Plántula de <i>Caesalpinia spinosa</i>	66
Figura 12. Plántula de <i>Caesalpinia spinosa</i> vista desde el estereoscopio.....	66
Figura 13. Proceso de defoliación, previo a la obtención de explantes	67
Figura 14. Siembra de los explantes de <i>C. spinosa</i> en cultivo MS + 6-BAP.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Clasificación taxonómica</i>	24
Tabla 2. <i>Distribución geográfica del guarango en el Ecuador</i>	27
Tabla 3. <i>Materiales, equipos y reactivos utilizados durante el estudio</i>	39
Tabla 4. <i>Cantidades de los suplementos para los medios de cultivo</i>	41
Tabla 5. <i>Combinaciones de las variables: concentración del biorregulador 6-BAP, tiempo y número de brotes</i>	43
Tabla 6. <i>Análisis de varianza ANOVA de los datos del objetivo 1</i>	48
Tabla 7. <i>Resumen del análisis de varianza (ANOVA) para el número de brotes</i>	68
Tabla 8. <i>Resumen de la combinación de los niveles de los factores</i>	68

RESUMEN

Actualmente los cultivos *in vitro* son utilizados como una herramienta para la multiplicación masiva de diversas especies leñosas. *Caesalpinia spinosa*, conocida también como tara o guarango, es un árbol endémico que pese a su potencial industrial ha ido disminuyendo su diversidad genética de esta especie. Por ende, el objetivo del presente trabajo es evaluar el proceso de optimización del efecto del biorregulador 6-Bencilaminopurina para la inducción a brotes de *C. spinosa* a nivel *in vitro* para la conservación de esta especie de gran importancia industrial así como ambiental.

La parte experimental se realizó a partir de plántulas de *C. spinosa* de 3 meses de edad donadas por el laboratorio Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca. Primeramente, se determinó el efecto del biorregulador 6-BAP variando su concentración para la producción de brotes. En segundo lugar, para el establecimiento de los parámetros operacionales se consideraron el tiempo y la concentración con el fin de ser optimizados. Por último, los resultados se corroboraron mediante pruebas estadísticas.

En la primera parte, la concentración de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ mostró el mayor número de brotes con un promedio de 2,00 números de brotes en 13 días, lo que representa un promedio de 0,72 veces más número de brotes en comparación con el testigo, sin embargo, los tratamientos no presentaron diferencias significativas. En la segunda parte, el mayor número de brotes fueron generados entre los intervalos de 0,05 a 0,30 ppm y de 13 a 23 días respectivamente.

El número de brotes se ve influenciado por la duración de la exposición al biorregulador. Para lograr resultados más efectivos, es importante tener en cuenta la duración de dicha exposición. En consecuencia, los parámetros óptimos que se

obtuvieron se consideran aptos para ser utilizados como punto de partida para futuras investigaciones en la conservación de especies a través de técnicas de micropropagación.

Palabras clave: concentración, explante, parámetros operacionales, micropropagación.

ABSTRACT

Currently, *in vitro* cultures are used as a tool for the massive multiplication of various woody species *Caesalpinia spinosa*, also known as tara or guarango, is an endemic tree that despite its industrial potential has been decreasing the genetic diversity of this species. Therefore, the objective of the present work is to evaluate the optimization process of the effect of the bioregulator 6-Benzylaminopurine for the induction of *C. spinosa* shoots *in vitro* for the conservation of this species of great industrial and environmental importance.

The experimental part was carried out with 3-month-old *C. spinosa* seedlings donated by the Life Sciences laboratory of the Salesian Polytechnic University, Cuenca. First, the effect of the bioregulator 6-BAP was determined by varying its concentration for the production of shoots. Secondly, for the establishment of the operational parameters, time and concentration were considered in order to be optimized. Finally, the results were corroborated by statistical tests.

In the first part, the concentration of 0.25 mg L^{-1} showed the highest number of shoots with an average of 2.00 numbers of shoots in 13 days, which represents an average of 0.72 times more number of shoots compared to the control, however, the treatments did not show significant differences. In the second part, the highest number of shoots were generated between the intervals of 0.05 to 0.30 ppm and 13 to 23 days respectively.

The number of outbreaks is influenced by the duration of exposure to the bioregulator. In order to achieve more effective results, it is important to take into account the duration of such exposure. Consequently, the optimal parameters obtained

can be used as a starting point for future research in the conservation of species through micropropagation techniques.

Key words: concentration, explant, operational parameters, micropropagation.

PROBLEMA

En el año de 1962, el país aún conservaba alrededor del 65% de bosques, pero dado el desmedido uso de la tierra, en la actualidad, el área forestal sobrante es menor del 50% de su revestimiento original. La transformación del suelo agrícola, principalmente para cultivos migratorios, está produciendo impactos ambientales y socioeconómicos significativos a escala nacional. Por esta razón, desarrollar programas de siembra y producción de especies autóctonas es imprescindible. De acuerdo con el Centro Internacional de Mejoramiento Maíz y Trigo (CIMMYT, 2004) la tasa de deforestación del país es de 137,000 hectáreas (ha) de bosque natural al año. Existe una estimación de que el país cuenta con unas 160,000 ha de plantaciones forestales, con un promedio de menos de 5000 ha reforestadas anualmente. Y según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2003) las tasas anuales de reforestación son superiores a las 3500 ha por año.

En la actualidad, existe escasa información de especies forestales nativas que sean obtenidas a partir de laboratorio y que se empleen en restauración ecosistémica y conservación de áreas protegidas. Las técnicas experimentales de cultivo *in vitro* permiten la obtención de nuevas plántulas en un tiempo y espacio relativamente cortos, debido al control que existe sobre determinados factores externos (intensidad luminosa, humedad, patógenos, etc.), esta técnica es viable cuando existe una limitada disponibilidad de fuentes semilleras o agentes encargados en su dispersión (Sharma, 2015).

OBJETIVOS

General

Evaluar el proceso de optimización del efecto del biorregulador 6-Bencilaminopurina para la inducción a brotes de *Caesalpinia spinosa* a nivel *in vitro*.

Específicos

- Determinar el efecto en la inducción a brotes de *Caesalpinia spinosa* variando la concentración del biorregulador 6-Bencilaminopurina para la obtención de explantes a nivel *in vitro*.
- Establecer las condiciones operacionales variando tiempo y concentración en una etapa temprana de la morfogénesis de *Caesalpinia spinosa* obteniendo una mayor eficiencia en la producción de brotes a nivel *in vitro*.
- Analizar los datos obtenidos mediante técnicas estadísticas para la determinación del tratamiento más eficiente.

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

La forestación con especies endémicas es un instrumento prometedor para restaurar ecosistemas degradados en Ecuador (Aguirre et al., 2007). Entre las especies endémicas, *Caesalpinia spinosa*, también conocida como guarango, tara o vinillo, cobra especial importancia por su gran utilidad en programas de reforestación (Morante, 2018), además de tener interés económico por sus múltiples usos ligados a su alto contenido en gomas y taninos (Núñez et al., 2017).

Pese al gran potencial industrial y ecológico del guarango, esta especie ha sido desplazada por cultivos como la cebada, el maíz, la papa, entre otros, lo que ha provocado una importante disminución de la diversidad genética de esta especie (Villena Velásquez et al., 2019). Además, al ser una Fabaceae, sus semillas presentan latencia física debido a su testa dura, impermeable y lignificada (Sanhueza & Zalba, 2014). Autores como Janzen (1981) y Catalan & Balzarini (1992) mencionan que se han obtenido resultados contradictorios al pasar las semillas de fabáceas por el tracto digestivo de los animales para romper su latencia.

A causa de su poca germinación natural, los métodos experimentales de cultivo *in vitro* representan una alternativa para el suministro de grandes cantidades de plantas para la propagación de esta especie nativa de gran importancia industrial así como ambiental (Núñez et al., 2017).

1.1 Guarango (*Caesalpinia spinosa*)



Figura 1. *Caesalpinia spinosa*

Fuente: (Cañadas Cruz, 2000)

1.1.1 Descripción general de la especie

La tara o guarango, cuyo nombre botánico es *Caesalpinia spinosa*, perteneciente al género de los Caesalpinias de la familia Caesalpinaceae, que a su vez está dentro de la orden Fabales (*Cadenas Agroproductivas by Fondo para la Protección del Agua - FONAG - Issuu*, 2012), es una planta que crece entre los 1000 y 2900 msnm y se encuentra distribuida a lo largo de la región Andina. Se trata de un árbol que fue empleado a partir de las culturas pre-incas e incas, en la elaboración de tintes para cerámica, textilería, cerámica y medicina (HIDROBO UNDA, 2011).

Esta especie arbórea posee de forma natural taninos, gomas, colorantes y otros derivados que actualmente son utilizados en la industria alimentaria, colorantes, farmacéutica, entre otras. Esta aplicación revela el potencial de la especie para usos no maderables (HIDROBO UNDA, 2011).

El guarango es una especie de árbol perenne, que debido a su capacidad de fijación de nitrógeno y raíces profundas son resistentes en zonas áridas o semiáridas. Sus características silvícolas y su adaptación a condiciones climáticas adversas lo

convierten en un árbol ideal para sistemas agroforestales y programas de reforestación a gran escala con fines productivos en la región andina (Garay & Giobellina, 2016).

El rango de distribución geográfica del guarango se extiende a través de los países de Colombia, Venezuela, Perú, Ecuador, Bolivia, hasta el norte de Chile (HIDROBO UNDA, 2011). En Ecuador, el guarango se encuentra en la mayor parte de la Sierra, en las provincias de Carchi, Chimborazo, Imbabura, Cotopaxi, Loja, Tungurahua, Pichincha y Azuay (Baquero et al., 2004). El incremento de este cultivo se da en zonas xerofíticas de la región interandina. Estas áreas están ubicadas en valles áridos tales como los valles de Chota, Malacatos, Guayllabamba, Patate, Vilcabamba, entre otros (Benavides, 2006).

Los productos derivados de las semillas del guarango tienen una gran demanda en el mercado internacional ya que la tendencia actual en la industria es hacia el uso de productos naturales. Por ello, la comercialización de estos productos requiere inevitablemente de una industrialización previa, siendo fundamental el establecimiento de una cadena agroindustrial. Además, contribuye a la creación de empleo y a la reducción de la migración desde las zonas rurales hacia los núcleos más poblados (HIDROBO UNDA, 2011).

1.1.2 Descripción botánica de la especie

Morfológicamente es un pequeño árbol de 2 a 5 m de altura, caracterizado por un tronco recto y corto, cubierto por una corteza agrietada de color gris, que termina con una copa comúnmente irregular formada por ramas cortas y ascendentes cubiertas de espinas cónicas (Haro, 2011).

Las hojas son compuestas y bipinnadas, con 2-3 pares de pinnas que se articulan al raquis, teniendo entre 5 y 8 pares de hojuelas coriáceas y oblongas ubicadas

oblicuamente a la base. Las flores son hermafroditas, de color variable entre rojizas y amarillas, dispuestas en racimos entre 8 y 12 cm de diámetro con eje pubescente, cáliz con tubo corto en forma de embudo, 5 sépalos de 7 mm, de los cuales el inferior es más grande, cóncavo, pectinado – dentado y salientes (*The Agroforestry*, 2009).

El fruto es una vaina rojiza que presenta las siguientes características longitudinales: 8 y 10 cm de largo por 1,5 a 2,5 cm de ancho, que contiene entre 8 y 10 semillas, de forma redonda, que se vuelven de color marrón oscuro cuando maduran. El mesocarpio se distingue por su consistencia blanda y transparente con elevadas concentraciones de metionina y triptófano, además de otras grasas y proteínas (Haro, 2011).

La floración generalmente comienza en septiembre y continúa hasta enero, con algunas variaciones según la ubicación. De igual forma, la recolección puede comenzar en enero y prolongarse hasta agosto. Su vida comercial comienza entre 4 y 6 años dependiendo de las condiciones de riego y alcanza su máxima producción a los 15 años, comenzando a declinar desde los 65 años hasta ser improductiva a los 85 años (Morante, 2018).

Tabla 1. Clasificación taxonómica

REINO	Plantae
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
SUBCLASE	Rosidae
ORDEN	Fabales
FAMILIA	Caesalpinaceae
GÉNERO	Caesalpinia
ESPECIE	spinosa
NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Caesalpinia spinosa</i>
NOMBRE COMÚN	Tara, taya (Perú); divi divi de tierra fría, guarango, serrano, cuica, tara (Colombia); vinillo, guarango (Ecuador); tara (Bolivia, Chile, Venezuela); Acacia amarilla, Dividivi de los Andes (Europa) (León-Yáñez, 1999).
ETIMOLOGÍA	<i>Caesalpinia</i> , en honor de Andrea Cesalpino (1594-1663), filósofo italiano y botánico. <i>Spinosa</i> , del latín <i>spinusus-a-um</i> , con espinas.

Fuente: (HIDROBO UNDA, 2011).

1.1.3 Requerimientos climatológicos y distribución geográfica

Para el crecimiento óptimo y desarrollo del guarango, se requieren condiciones climáticas ideales y una ubicación geográfica adecuada las cuales se detallan a continuación.

1.1.3.1 Requerimientos climatológicos del guarango para su plantación y cosecha

- **Clima**

Para su óptimo desarrollo requiere temperaturas que varían de 12° a 17°C, localidades con 400 a 600 mm de precipitación, pero también se encuentra en zonas con 200 a 750 mm de precipitación anual. Es una planta que se denomina rústica porque es resistente a la sequía, plagas y enfermedades, y se considera una especie

bastante plástica. La especie prospera en climas templados a semitemplados con una temperatura promedio de 12-16°C. La temperatura mínima es de 6-8°C, y cuanto mayor sea la temperatura, mayor será la tasa de crecimiento de la plantación (Orozco Montero, 2011).

- **Suelo**

El guarango es una especie que se adapta a todo tipo de suelos texturales, incluyendo franco, franco arenoso, franco arcilloso, franco arcilloso limoso, suelos superficiales arcillosos, calcáreos, bien drenados, ligeramente ácidos a ligeramente alcalinos y alcalinos salinos (el agua debe estar bien controlada bajo estas condiciones), suelos arcillosos pesados con pH ácido, a menudo utilizando suelos agrícolas marginales (Orozco Montero, 2011).

Aceptando suelos pedregosos, degradados e incluso lateríticos, aunque en estas condiciones existe baja producción; pero se desarrolla óptimamente y con un robusto aporte arbóreo en suelos de labor; es decir, suelos franco arenosos y arcillosos ligeramente ácidos a moderadamente alcalinos (Lara Díaz, 2019).

- **Agua**

En condiciones naturales, esta especie requiere una precipitación de (250 mm - 400 mm a 110 mm. El requerimiento en una plantación de 4,000/5,000 a 6,000 m³/ha/año es de 1,5 L/planta/día de lluvia y/o riego. Sin embargo, el exceso de agua afecta la producción de taninos (Orozco Montero, 2011).

- **Humedad relativa**

En condiciones naturales, el guarango requiere una humedad relativa del 70%. Esta especie requiere un rango de temperatura entre el día y la noche/verano e invierno y/o alta humedad. Una humedad relativa del 70% (Orozco Montero, 2011).

- **Altitud**

Existe una distribución natural de esta especie desde los 500 a los 3200 msnm; pero hay plantaciones desde los 500 hasta los 2800 msnm, la mayor concentración de bosque y la mayor producción se da por debajo de los 2800 msnm (Orozco Montero, 2011). El guarango es una especie que se adapta a ecosistemas de bosque seco o bosque espinoso con una tolerancia a la sequía; sin embargo, es sensible al frío intenso y a la excesiva humedad ambiental (Nieto & Hidrobo, 2011).

1.1.3.2 Distribución geográfica

El guarango o tara es una especie perenne extendida por toda la región andina con presencia predominante en el Perú. Se localiza principalmente en ecosistemas como Bosque Seco Montano, Montano Bajo y Matorral Seco Montano y en altitudes que varían de 1500 a 3200 msnm (Narváez et al., 2010).

Considerada una especie "rústica", es de gran plasticidad, ya que tolera la sequía y se adapta sin esfuerzo a diferentes tipos de suelo. Aunque cabe recalcar que, el guarango es sensible al frío extremo y ambientes con humedad relativa superior al 80% (De la Torre, 2018).

Pese a su gran adaptabilidad, el guarango se establece mejor bajo ciertos parámetros edafoclimáticos, tales como: un suelo con un pH entre 6,8 y 7,5; temperaturas entre 14 y 28 °C y una precipitación anual que varía entre 660 y 1730 mm (*The Agroforestry*, 2009).

El guarango se encuentra distribuido en el Ecuador, en los valles bajos de la Sierra, en lugares semiáridos, con baja humedad relativa y precipitación. Se encuentra en estado silvestre formando parte de linderos o cercas vivas (*Cadenas Agroproductivas by Fondo para la Protección del Agua - FONAG - Issue*, 2012).

Tabla 2. *Distribución geográfica del guarango en el Ecuador*

Provincia	Lugares donde están presentes
Carchi	Valle del Chota, Mira, Bolívar.
Imbabura	Atuntaqui, Ambuquí, Angochagua, Chuga, Chaltura, San Roque, Ibarra, Urcuquí, Pimampiro.
Pichincha	San Antonio de Pichincha, San José de Minas, Perucho, Tumbaco, Pomasqui, Quinche, Guayllabamba.
Cotopaxi	Salcedo.
Tungurahua	Patate, Panzaleo, Ambato.
Chimborazo	Alausi, Chunchi, Guano, Guasuntos, Riobamba, Penipe.
Bolívar	Chimbo, Guaranda.
Cañar	Azogues, Biblian, Gualleturo, Loyola, Solano.
Azuay	Solano, Santa Isabel, Llacao, Girón, Oña, La Dolorosa.
Loja	Celica, Catamayo, Gonzanamá, Saraguro.

Fuente: Solís, 1961.

Ecuador, Perú y Bolivia muestran un gran potencial industrial del guarango en el mercado mundial. Perú es el mayor productor de guarango, representando el 80% de la producción mundial. La producción es principalmente de bosques naturales y en algunas zonas agroforestales. Dicho de otro modo, Perú es el país andino con el bosque de guarango más grande, seguido de Ecuador, Bolivia y Chile (Stalin Efrén & Saltos Aguilar, 2017).

En el Perú, desde fines del siglo pasado, la producción de guarango se ha convertido en una actividad rentable, y sus extensas plantaciones se concentran principalmente en cuatro regiones: Ayacucho, Cajamarca, Huánuco y La Libertad, las cuales aportan a la economía de más de 40,000 personas en zonas rurales. Actualmente, se estima que la producción del Perú supera las 24,000 toneladas, destinadas únicamente a la exportación de productos (De la Torre, 2018).

En Bolivia, en cambio, la cadena productiva está en una etapa inicial y la mayor parte de la producción proviene de plantas silvestres mal manejadas, por lo que su producción debe ser alta. En sectores más distantes, el guarango es menos explotado debido a la falta de vías de comunicación, lo que hace poco atractivo para los agricultores recolectar, transportar y comercializar el producto, que eventualmente es consumido por el ganado, especialmente caprino, o permanece en parcelas por algún tiempo (*LOS BOSQUES ANDINOS Y EL AGUA*, 2009).

En el caso de Ecuador, como señala Narváez et al., (2010), hasta hace poco tiempo el guarango fue reemplazado sistemáticamente por especies maderables exóticas como el pino y el eucalipto, quedando ejemplares silvestres destinados a cercas vivas, de los cuales quedaron pocos para la producción de carbón vegetal.

En la actualidad, con la popularización de las propiedades de los derivados del guarango, se ha dado un gran impulso a la producción en nuestro país, atrayendo la atención tanto de organismos gubernamentales como privados. El Estado de Ecuador impulsa su programa agroforestal a través de PROFORESTAL, la Secretaría de Promoción y Desarrollo Forestal de Ecuador. CONAPROG, consorcio de productores de guarango, reúne a productores de los valles montañosos con el objetivo de plantar al menos 5000 ha en una variedad de sistemas, recolectar, procesar y exportar subproductos y productos de guarango, principalmente taninos y gomas (Narváez et al., 2010).

Los datos recabados en el Ecuador apuntan a que el comercio representa alrededor de unas 84 toneladas de vaina de guarango, de las cuales el 75% se procesa en forma de polvo para la exportación y el 25% cubrirá la demanda interna de los

curtidores en zonas como Imbabura, Cotacachi, Ambato y Salcedo (*LOS BOSQUES ANDINOS Y EL AGUA*, 2009).

Cada sistema tiene sus propias características que van más allá del manejo silvícola e incluyen un conocimiento profundo de la planta y sus beneficios potenciales (Narváez et al., 2010).

1.1.4 Usos del guarango

Los derivados del guarango, comercializados en el mercado externo e interno, surgen principalmente de formaciones silvestres. A partir de 2010, esta especie comenzó a cobrar importancia para el establecimiento de plantaciones con fines comerciales, así como para la ornamentación en calles de la ciudad y parques (Villena Velásquez et al., 2019).

La vaina es un fruto del guarango que aprovecha la parte exterior o pericarpio, que tiene mayor contenido de taninos y la goma se obtiene de la semilla (Stalin Efrén & Saltos Aguilar, 2017).

Parte del valor económico lo proporciona el contenido de taninos de las vainas, convirtiéndolas en un producto altamente exportable en mercados, que representan un ingreso económico importante para los agricultores e indirectamente para la economía de sectores urbanos (Haro, 2011).

El polvo del guarango producido por la molienda consiste en ácido gálico (53%), uno de sus principales usos es en pieles de animales en bruto, lo que permite obtener cueros claros, resistentes a la luz, con una flor firme y fina, deseable para revestimientos debido a su alta calidad que no se logra al utilizar otros curtidores vegetales (*Taninos de tara*, 2015).

En la fabricación de tintes por su fácil reacción con las sales de hierro, obteniéndose productos de tonalidades variadas. También se utiliza como conservante y de envasado (zumos, vinos, encurtidos, jabones, etc.) o en la elaboración de cerveza, ya que sirve como complemento de la malta, además, los taninos reducen la cohesión de los lodos, por lo que se emplea en grandes cantidades en perforaciones de pozos petroleros (Goycochea Ricci, 2010).

La goma o hidrocoloide se obtiene al moler el endospermo de la semilla, contiene grandes cantidades de proteína (metionina y triptófano); aceites y grasas de gran valor nutricional para el ser humano y como alimento para animales (Haro, 2011).

En la medicina ancestral, las hojas, flores, frutos y semillas se utilizan para tratar erupciones en la piel, curar heridas, prevenir y aliviar el dolor de las muelas, trastornos nerviosos, dolores de estómago y pecho (De la Torre, 2018).

1.1.5 Importancia del guarango

El guarango es una especie polivalente. Se utiliza para proteger terrenos erosionados ya que fija el nitrógeno del aire mejorando la fertilidad del suelo. Planta rústica poco exigente de suelo y agua pero que requiere de cuidados para lograr su productividad, riego, cuidados de poda y, como todo árbol frutal, supone una inversión económica. Permite que las gomas, taninos y otros productos sean aprovechados por su fruto sin dañar el árbol, a comparación de la extracción de taninos por medio de la corteza como sucede en otras especies forestales (De la Torre, 2018)

Es una especie forestal productora de madera, utilizada en la artesanía y la industria; así como también, en programas agroforestales, cercas vivas, cuencas hidrográficas, senderos y protección de fuentes de agua. Aunque lo más destacable de esta especie es su adaptación a ecosistemas propensos a la sequía y la desertificación,

lo que la convierte en una opción para la reforestación de suelos degradados en ambientes de bosques áridos. Adicionalmente, esta especie tiene otros usos ambientales, entre los que *The Agroforestry*, (2009) señala que es un componente importante en cuanto a la captura de carbono se trata. Además, tiene un potencial paisajístico, protege cuencas hidrográficas e incluso es utilizado como barreras rompevientos.

En los mercados actuales, existe un mayor interés por parte de los compradores por utilizar productos que sean amigables con el medio ambiente, tanto en el curtido como en la industria alimentaria. El proceso industrial de curtido del cuero se basa en compuestos de cromo lo que ocasiona preocupación debido a la acumulación de estos compuestos en el medio ambiente y a la vez su potencial cancerígeno. Debido a esto, se está optando por crear innovadores métodos de curtido sin cromo. Entre estos métodos destaca el uso de taninos vegetales como los que se encuentran en el guarango (De la Torre, 2018).

Son especies forrajeras y melíferas de gran interés para las familias del sector rural, mejorando la calidad de vida y haciendo eficiente su productividad y producción en el mercado, compitiendo tanto en precio como en calidad del producto. A pesar de su gran importancia y significado, el guarango se encuentra en peligro de extinción, por lo que se debe tomar conciencia de que gracias a esta especie los suelos pobres mejoran, paisajes desvalorizados pueden llegar a ser reforestados y dan sustento a sectores rurales fortaleciendo la economía del país (De la Torre, 2018).

1.2 Cultivo de tejidos vegetales

Es el conjunto de técnicas empleadas para el desarrollo de tejidos, células u órganos vegetales en condiciones controladas (Perea, 2009). Se basa en el principio de totipotencia, que es el potencial de una célula vegetal para regenerar una nueva planta

completa; bajo condiciones controladas, asépticas y libres de microorganismos dadas en el cultivo *in vitro* (*Revista Digital Universitaria*, 2005).

En la actualidad las técnicas de cultivo *in vitro* se han utilizado amplia y eficazmente como instrumento para la multiplicación masiva y la conservación de germoplasma de leguminosas, así como de varias especies leñosas como, *Acacia sinuata*, *Dalbergia sissoo*, *Hagenia abyssinica*, *Melia azedarach*, *Sesbania rostrata* y *Swartzia madagascarensis* (Goyal et al., 2012).

1.3 Micropropagación de especies leñosas

La micropropagación en especies leñosas garantiza la obtención de plantas de manera rápida, libre de patógenos y en numerosas cantidades (Valverde-Cerdas et al., 1997), esto contribuye con la conservación de un ecosistema forestal (Pérez-Miranda et al., 2022).

La propagación vegetativa de especies forestales es generalmente difícil, un factor crítico en las especies leñosas es la edad del explante, la micropropagación es relativamente fácil utilizando tejidos juveniles, y es cada vez más difícil con tejidos adolescentes y maduros (Indacochea et al., 2018); por otro lado, para los brotes adventicios se sugiere producirlos directamente del explante, ya que a partir de callos su formación se ha visto muy difícil además de que frecuentemente generan anomalías. En cuanto a los árboles usados como patrones se recomienda que estos sean lo suficientemente maduros para que expresen su potencial genético (Rodríguez Beraud et al., 2014).

1.3.1 Factores que intervienen en la micropropagación de especies leñosas

Para asegurar una micropropagación exitosa en especies leñosas es esencial tener en cuenta los siguientes aspectos.

1.3.1.1 Explante

En la micropropagación de especies leñosas se recomienda utilizar explantes jóvenes (Benson, 2000). Además, Kriaa et al., (2012) menciona que el uso de explantes adultos induce la secreción de polifenoles oxidados en el medio de cultivo, por lo que se recomienda el uso de segmentos primarios.

Según los estudios de Wang et al., (2006) las secciones de las plántulas con presencia de brotes, las yemas axilares extraídas mediante procesos de rejuvenecimiento de material vegetal en estado maduro y plántulas obtenidas de semillas de origen sexual, son los tipos de tejidos más utilizados para el establecimiento *in vitro*.

1.3.1.2 Medio de cultivo

En el cultivo de tejidos *in vitro*, una limitación en el desarrollo y morfogénesis es el medio de cultivo utilizado, el cual contiene los nutrientes básicos necesarios para el crecimiento del tejido vegetal (Olmos et al., 2002).

El medio de cultivo es una combinación de nutrientes y agua, que se puede complementar con un regulador de crecimiento (Cortés et al., 2019). Los requerimientos nutricionales para un cultivo *in vitro* varían de acuerdo al genotipo de la especie (Universidad de Cundinamarca et al., 2019).

Para las angiospermas los medios de crecimiento más utilizados son: WPM - Lloyd & McCown- y MS -Murashige & Skoog-. En el caso de las gimnospermas, el uso de medios reducidos en sales minerales y con poca cantidad de nitrógeno es mucho mejor que el uso de un medio altamente salino y nitrogenado como el medio MS, por lo que para su uso en especies leñosas se recomienda diluirlo a la mitad o a la cuarta parte de su formulación original (Hussain et al., 2012). También se utilizan como

medios de propagación: Perinet & Lalonde y BTM (broadleaved tree medium) (UNESUM, 2017).

1.3.1.3 Reguladores de crecimiento

Una hormona vegetal o fitohormona es un compuesto producido internamente por una planta, que ejerce su función en muy bajas concentraciones y cuyo principal efecto se produce a nivel celular, cambiando los patrones de crecimiento de los vegetales y permitiendo su control (*Fundamentos de Fisiología Vegetal*, 2013). Los reguladores vegetales son compuestos sintetizados químicamente u obtenidos de otros organismos y son, en general, mucho más potentes que los análogos naturales (Hussain et al., 2012).

En el caso de las especies leñosas para la inducción de brotes, tanto en gimnospermas como en angiospermas, se requiere el uso de citoquininas, siendo la 6-Bencilaminopurina (6-BAP) y el tidiazurón (TDZ) las fitohormonas más utilizadas (Olmos et al., 2002).

Las citoquininas son biorreguladores usados para inducir el crecimiento de brotes en muchas especies vegetales (Sharry et al., 2015), por su capacidad de estimular la división celular y promover la expansión celular (*Fundamentos de Fisiología Vegetal*, 2013). La principal citoquinina es la 6-Bencilaminopurina (6-BAP) cuya composición química deriva de la adenina, cuya función es promover el crecimiento, división y elongación de las células (Lazar, 2003). Además de estimular la germinación y de regular el crecimiento de las raíces e inhibir el proceso de senescencia de las hojas (Pino et al., 2012).

Para la fase de inducción se utiliza generalmente 6-BAP a una concentración de alrededor de 5 ppm o en combinación con otras citoquininas. Si bien la adición de

auxinas puede ser beneficiosa, se ha demostrado que en las coníferas promueve la formación de callos y reduce el proceso de organogénesis (Garay-Arroyo et al., 2014).

1.3.2 Antecedentes del cultivo de tejidos vegetales en especies leñosas

En la actualidad las técnicas de cultivo *in vitro* se han utilizado amplia y eficientemente como instrumento para la multiplicación masiva y la conservación de germoplasma de leguminosas, así como de varias especies de árboles leñosos, como por ejemplo: *Acacia sinuata*, *Dalbergia sissoo*, *Hagenia abyssinica*, *Melia azedarach*, *Sesbania rostrata* y *Swartzia madagascarensis* (Goyal et al., 2012).

Existen trabajos descritos en el género *Caesalpinia*, como es el caso de las especies *Caesalpinia pulcherrima* L. (Núñez et al., 2017), *Caesalpinia echinata* (Werner et al., 2010), *Caesalpinia bonduc* (Cheruvathur et al., 2010), y *Caesalpinia pyramidalis* (Núñez et al., 2017).

En investigaciones experimentales previas se ha evidenciado el papel fundamental de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) en la inducción de brotes en especies leguminosas, como: *Albizzia lebbek*, *Dalbergia sissoo*, *Leucaena leucocephala* y *Prosopis laevigata* (González et al., 2007).

En la especie de *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb, estudio de Cheruvathur et al., (2010) se estableció un método de regeneración vegetal eficiente, mediante el cultivo de explantes de epicótilo inmaduros, los explantes de epicótilo en medio MS se suplementaron con 4,0 mg/L de 6-BAP (6-bencilaminopurina) y 1,0 mg/L de NAA (ácido naftaleno acético), como resultado se obtuvo un porcentaje máximo de organogénesis del 84%.

En investigaciones de Núñez et al., (2017) se determinó que una concentración de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de 6-BAP resultó ser la más eficiente para el establecimiento *in vitro* de los brotes de *C. spinosa*, con la cual alcanzó un 90% de brotes establecidos *in vitro*.

CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA

2.1 Nivel de investigación

A nivel de investigación, esta propuesta presenta dos alcances: el alcance descriptivo, que es aquel que busca precisar tanto las particularidades y cualidades de las personas, grupos, elementos, procesos o cualquier otro fenómeno que sea objeto de análisis; y el alcance explicativo, que busca dar respuesta a las causas de los hechos y fenómenos físicos o sociales. La razón es que es un tema nuevo y con pocos reportes en la literatura, para los diversos procesos se tendrán en cuenta las variables que generarán respuestas parciales o finales, las cuales serán analizadas críticamente.

2.2 Diseño de investigación

Esta investigación llevará a cabo un estudio con enfoque experimental, que se refiere a un estudio en el que una o más variables independientes se manipulan intencionalmente para analizar las consecuencias que la manipulación tiene sobre un individuo o más variables dependientes, en una situación de control para el investigador.

En este estudio para cada objetivo específico, están presentes variables cuantitativas independientes, tales como: concentración de reguladores de crecimiento (ppm) y tiempo (días).

2.3 Población y muestra

Para el presente estudio se contó con explantes de *C. spinosa* a partir de plántulas *in vitro* desarrolladas previamente en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca.

Se utilizaron 10 explantes de *C. spinosa* para cada uno de los tratamientos.

2.4 Técnicas de recolección de datos

La técnica de recolección de datos será de experimentación, esta técnica tiene aplicación en el control de los distintos tratamientos, está sujeta a cambios y se utiliza para verificar los cambios que se producen.

2.5 Instrumentos de recolección de datos

Teniendo en cuenta que los datos son cuantitativos, para su manejo se crearon listas de control, que incluyeron las variables consideradas, como: número de brotes por explante y tiempo de respuesta a las diferentes concentraciones del regulador de crecimiento (días).

2.6 Manejo de datos estadísticos

El manejo de datos estadísticos, inicialmente se evaluaron los supuestos del modelo de normalidad mediante una gráficos cuantil - cuantil (Q-Q plot) y pruebas de hipótesis; para las diferencias entre los tratamientos, se analizaron mediante un ANOVA basado en un Diseño Completamente al Azar (DCA). Para el establecimiento de las condiciones óptimas se plantearon una estructura de dos vías con un esquema de aleatorización de una superficie de respuesta.

2.7 Procedimientos experimentales

Este estudio incluyó los siguientes procedimientos experimentales descritos a continuación.

2.7.1 Unidad experimental

La unidad experimental consta de 10 explantes para cada uno de los 4 tratamientos, con un total de 3 repeticiones por tratamiento.

2.7.2 Determinación del efecto en la inducción a brotes de *Caesalpinia spinosa* variando la concentración del biorregulador 6-Bencilaminopurina para la obtención de explantes a nivel *in vitro*

Para la evaluación exhaustiva del impacto de la concentración del biorregulador 6-BAP en la obtención de brotes de *C. spinosa*; se abordaron varios aspectos críticos con el objetivo de lograr la máxima producción, mismo que se detallan a continuación.

2.7.2.1 Materiales y Reactivos

Tabla 3. *Materiales, equipos y reactivos utilizados durante el estudio*

Materiales de laboratorio	Recipientes para pesar, espátula, barra magnética, matraz volumétrico (500 mL), frascos, tubos de vidrio, pipeta, mechero, bisturí, tijeras, cajas Petri, Medio Murashige & Skoog (MS) a $4,44 \text{ g L}^{-1}$, 6-Bencilaminopurina (6-BAP) (100 ppm), polivinilpirrolidona (PVP) a 0,5% , Agar a 0,8%, sacarosa a 3%.
Equipos	Autoclave, balanza analítica, pH-metro, plato agitador calefactor, cámara de flujo laminar y estufa.
Reactivos	HCl 1 N, NaOH 2 N.

Fuente: Autores

2.7.2.2 Material vegetal

Se tomaron explantes de *C. spinosa* obtenidos de plántulas *in vitro* desarrolladas previamente en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca.

Las plántulas utilizadas tenían una edad aproximada de tres meses, las mismas presentaban las características morfológicas deseadas y fueron desarrolladas en condiciones controladas de $80 \pm 5\%$ de humedad relativa, fotoperíodo (12 h luz/12 h oscuridad) y temperatura $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.



Figura 2. Plántulas *in vitro* de *C. spinosa*.

Fuente: Autores

2.7.2.3 Medios de cultivo y condiciones de mantenimiento

Para la inducción a brotes de *C. spinosa* se utilizó el medio MS (Murashige & Skoog), suplementado con sacarosa al 3%, polivinilpirrolidona 500 mg L^{-1} y solidificado con 8 g L^{-1} de agar -Agar Powder®-. El pH fue ajustado a $\pm 6,00$ (con NaOH 2N o HCl 1N). El medio fue esterilizado a 121°C a 1 atm de presión por 15 minutos. Posteriormente, en cámara de flujo laminar se agregó 6-bencilaminopurina a 100 ppm. Se dosificó 15 mL del medio de cultivo en tubos de ensayo de 100 mL.

El rango de concentraciones de 6-BAP utilizado para los tratamientos, así como las cantidades de los suplementos se detalla en la tabla 4.

Tabla 4. *Cantidades de los suplementos para los medios de cultivo*

Tratamiento	Vol. mL	MS 4,44 g L⁻¹	Agar 0,8%	Azúcar 30 g mL⁻¹	PVP 0,5%	BAP ppm
Medio MS (testigo)	200 mL	0,88 g	1,6 g mL ⁻¹	6 g mL ⁻¹	100 g mL ⁻¹	–
Medio MS + 6-BAP (0,05) (tratamiento 1)	200 mL	0,88 g	1,6 g mL ⁻¹	6 g mL ⁻¹	100 g mL ⁻¹	0,1 g mL ⁻¹
Medio MS + 6-BAP (0,25) (tratamiento 2)	200 mL	0,88 g	1,6 g mL ⁻¹	6 g mL ⁻¹	100 g mL ⁻¹	0,5 g mL ⁻¹
Medio MS + 6-BAP (0,50) (tratamiento 3)	200 mL	0,88 g	1,6 g mL ⁻¹	6 g mL ⁻¹	100 g mL ⁻¹	1 g mL ⁻¹

Fuente: Autores

Los explantes asépticos se sembraron en los medios de cultivo, un explante por cada tubo de ensayo, esto se llevó a cabo en condiciones asépticas en cámara de flujo laminar y siguiendo el mismo procedimiento para todos los tratamientos.

Posteriormente, los tubos de ensayo con los explantes se almacenaron en el cuarto de crecimiento y se mantuvieron a $80 \pm 5\%$ de humedad relativa, 25 ± 2 °C de temperatura con fotoperiodo de 12/12 hrs de luz/oscuridad.

La evaluación de los cultivos durante la inducción a los brotes, se realizó periódicamente cada semana. Posteriormente a los 13 días se procedió al análisis de los datos.



Figura 3. Establecimiento de cultivo *in vitro* de *C. spinosa*.

Fuente: Autores

2.7.3 Establecimiento de las condiciones operacionales variando tiempo y concentración en una etapa temprana de la morfogénesis de *Caesalpinia spinosa* obteniendo una mayor eficiencia en la producción de brotes a nivel *in vitro*

Se planteó una estructura de dos vías con aleatorización para establecer las condiciones óptimas para el número de brotes. La superficie de respuesta incluyó los parámetros operacionales de tiempo y concentración de biorregulador, con un registro transversal secuencial, que se detallan en los siguientes apartados.

2.7.3.1 Tiempo y concentración óptimos de adición de 6-BAP para la producción de brotes

La experimentación se realizó a partir de plántulas previamente desarrolladas con las características anteriormente mencionadas en el apartado 2.7.2.2, se transfirieron a tubos de ensayo de 100 *mL* para un volumen final de 15 *mL* de medio de cultivo. La preparación de dichos medios se detalla en la tabla 4.

En la tabla 5 se encuentran los valores establecidos para: concentración del biorregulador 6-BAP, tiempo y número de brotes, estos datos fueron seleccionados a partir de estudios realizados por Núñez et al., (2017).

Tabla 5. Combinaciones de las variables: concentración del biorregulador 6-BAP, tiempo y número de brotes

N° de corridas	Concentración ppm	Tiempo días	Brotes número
1	0,35	13	0,25
1	0,35	23	1
1	0,05	18	1,5
1	0,05	13	1
1	0,05	23	2,5
1	0,25	18	2
1	0,25	23	2,33
1	0,35	18	0,5
1	0,25	18	2
1	0,25	13	1,3

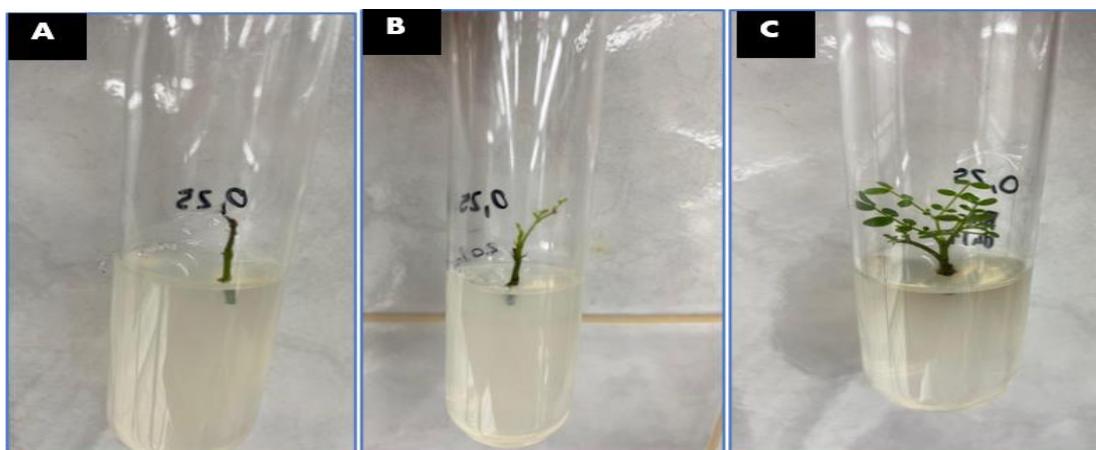


Figura 4. Explantes de *C. spinosa* con concentración de 0,25 ppm de 6-BAP en: 13 (A), 18 (B) y 23 (C) días respectivamente

Fuente: Autores

2.7.4 Análisis de los datos obtenidos para la determinación del tratamiento más eficiente

Con el fin de examinar y evaluar la información recopilada se realizaron análisis estadísticos de los datos obtenidos del objetivo 1 y objetivo 2, respectivamente.

2.7.4.1 Datos del objetivo específico 1

- **Diseño experimental**

Los datos obtenidos de la parte experimental se sometieron a pruebas de distribución normal a partir de gráficos cuantil - cuantil (Q-Q plot) y pruebas de hipótesis.

Para la determinación del efecto en la inducción a brotes de *Caesalpinia spinosa* variando la concentración del biorregulador 6-BAP para la obtención de explantes a nivel *in vitro* se estableció una estructura de una vía con esquema de aleatorización fundamentado en un Diseño Completamente al Azar (DCA) y una secuencialidad en registro transversal con 3 repeticiones.

- **Análisis estadístico**

Los datos recolectados basados en la respuesta del biorregulador 6-BAP sobre la formación de brotes fueron analizados con el software libre Rstudio versión 4.2.1 tomando en cuenta el efecto de la desviación estándar sobre las medias tomando como base un Diseño Completamente al Azar. Se realizó un análisis de varianza un factor con un nivel de significancia de 0,05. Para evidenciar el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se realizaron pruebas de Shapiro Wilk y Levene respectivamente. Para analizar la diferencia de medias entre tratamientos se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de confiabilidad del 95%.

2.7.4.2 Datos del objetivo específico 2

- Diseño experimental

Los datos obtenidos de la parte experimental se sometieron a pruebas de distribución normal a partir de gráficos cuantil - cuantil (Q-Q plot) y pruebas de hipótesis.

Para el establecimiento de las condiciones operacionales se planteó una estructura de dos vías con un esquema de aleatorización una superficie de respuesta con los parámetros operacionales: día de siembra, concentración del biorregulador 6-BAP; además, con una secuencialidad de registro transversal.

- Análisis estadístico

Los datos obtenidos para la optimización fueron evaluados con el programa estadístico Statgraphics Centurion Versión XVI. Los resultados se analizaron utilizando un ANOVA de dos vías de un modelo de superficie de respuesta basado en un diseño compuesto central con un nivel de significación de 0,05.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación del efecto en la inducción a brotes de *Caesalpinia spinosa* variando la concentración del biorregulador 6-Bencilaminopurina para la obtención de explantes a nivel *in vitro*

Los resultados del efecto de la concentración del biorregulador 6-BAP para la producción de brotes se demostraron con las siguientes pruebas estadísticas.

3.1.1 Prueba de la normalidad

La normalidad de los datos experimentales del objetivo 1 se presenta en la figura 5; la misma que evidencia el supuesto de normalidad:

Si el valor de $p > 0,01$, $\varepsilon_{ij} \sim n(\mu, \sigma^2)$

Si el valor de $p \leq 0,01$, $\varepsilon_{ij} \neq n(\mu, \sigma^2)$

Obteniéndose un valor de p de 0,1752, por lo que se rechaza la hipótesis alternativa y se acepta la hipótesis nula.

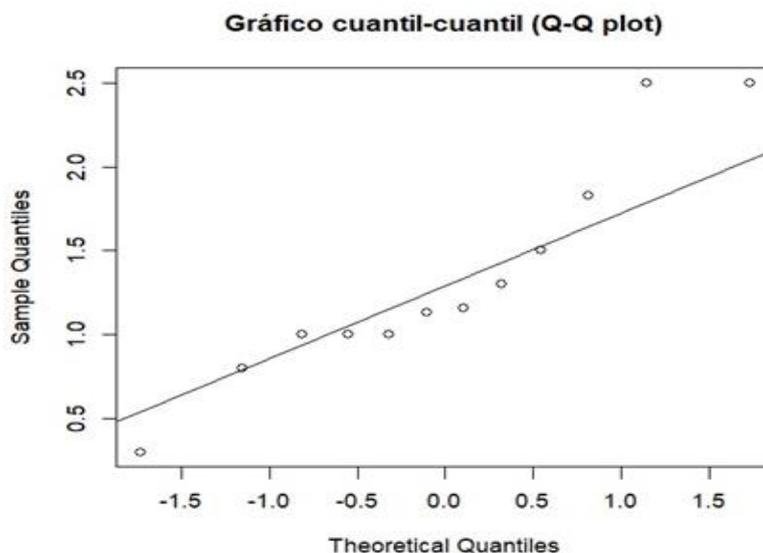


Figura 5. Gráfico cuantil-cuantil (Q-Q plot) de los datos originales del objetivo 1

Fuente: Software estadístico libre R versión 4.2.1

3.1.2 Efecto de 6-bencilaminopurina en la producción de brotes

En la figura 6 se observó el promedio del contenido de número de brotes generados por la acción de 6-BAP para el testigo, tratamiento 1 (0,05 ppm), tratamiento 2 (0,25 ppm) y tratamiento 3 (0,50 ppm); fueron: 1,22; 1,32; 2 y 0,8 número de brotes respectivamente. En la tabla 6 se muestra que los tratamientos no presentaron diferencia significativa (valor $p > 0,05$). En promedio el tratamiento 2 aumento 0,72 veces el número de brotes en comparación con el control.

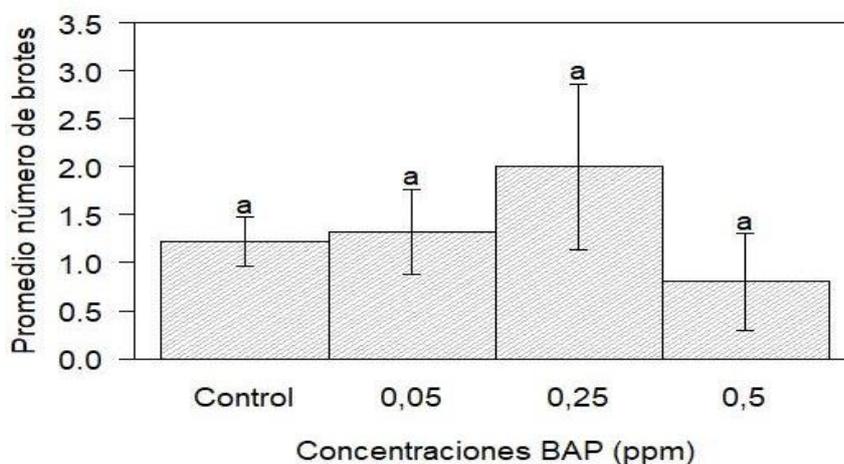


Figura 6. Efecto de 6-BAP en la producción de brotes. Los resultados son expresados como promedio del número de brotes \pm DS, $n = 10$. Tratamientos con una letra en común no difieren al 5 %, de acuerdo con la prueba de DSH de Tukey

Fuente: Software estadístico libre R versión 4.2.1

Tabla 6. Análisis de varianza ANOVA de los datos del objetivo 1

	<i>Df</i>	<i>Sum Sq</i>	<i>Mean Sq</i>	<i>F value</i>	<i>Pr (>F)</i>
<i>Tratamientos</i>	3	2,226	0,7419	2,347	0,149
<i>Residuals</i>	8	2,529	0,3161		

Fuente: Software estadístico libre R versión 4.2.1

Si bien los tratamientos no presentaron diferencias significativas, se observó que la concentración de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ presentó el mayor número de brotes (promedio de 2,00 número de brotes en 13 días) que representa un promedio de 0,72 veces más número de brotes en comparación con el testigo, lo que concuerda con los estudios de Núñez et al., (2017), el mismo que utilizó una concentración $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de 6-BAP con la que alcanzó un 90% de brotes establecidos *in vitro* con un promedio de 2,07 yemas brotadas al cabo de 30 días.

En los estudios de Silva, (2018), se observaron resultados similares al utilizar una concentración de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de 6-BAP en combinación con otros biorreguladores: ácido naftalenoacético (NAA), ácido indol-3-acético (IAA) y ácido 3-indolbutírico (AIB) en concentraciones de 0,0; 0,1; 1,0; 3,0 y $5,0 \text{ mg L}^{-1}$. A los 30 días de crecimiento, obtuvo un promedio de 3,37 brotes por tallo.

3.2 Establecimiento de las condiciones operacionales variando tiempo y concentración en una etapa temprana de la morfogénesis de *Caesalpinia spinosa* obteniendo una mayor eficiencia en la producción de brotes a nivel *in vitro*

Los resultados de las condiciones operacionales para la producción de brotes se demostraron con las siguientes pruebas estadísticas.

3.2.1 Prueba de la normalidad

La normalidad de los datos experimentales del objetivo 2 se presenta en la figura 7; la misma que evidencia el supuesto de normalidad:

Si el valor de $p > 0,01$, $\varepsilon_{ij} \sim n(\mu, \sigma^2)$

Si el valor de $p \leq 0,01$, $\varepsilon_{ij} \neq n(\mu, \sigma^2)$

Obteniéndose un valor de p de 0,7102, por lo que se rechaza la hipótesis alternativa y se acepta la hipótesis nula.

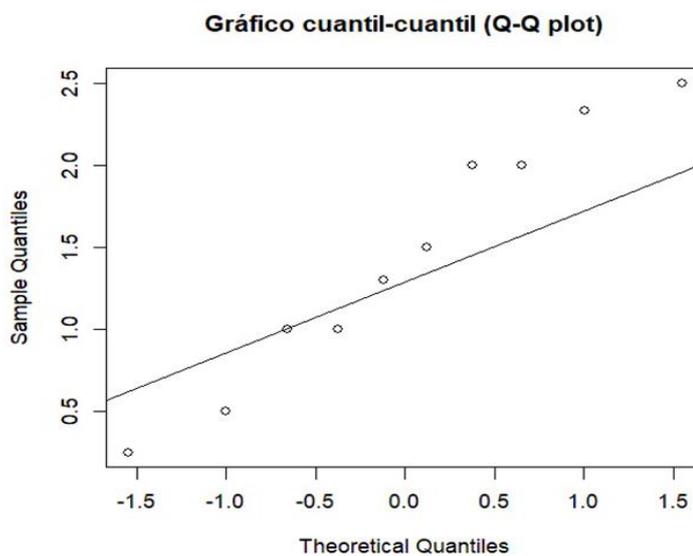


Figura 7. Gráfico cuantil-cuantil (Q-Q plot) de los datos originales del objetivo 2

Fuente: Software estadístico libre R versión 4.2.1

3.2.2 Tiempo y concentración óptimos de adición de 6-BAP para la producción de brotes

En la figura 8 se mostró la significancia para los efectos principales e interacciones, los parámetros para el tiempo ($p = 0,007$) y la concentración ($p = 0,008$) fueron significativos. El modelo se ajustó al 98,38%.

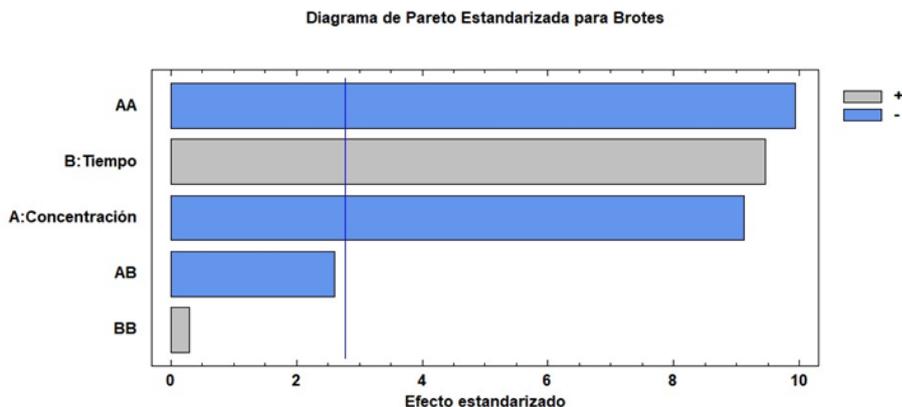


Figura 8. Diagrama de Pareto estandarizado para número de brotes

Fuente: Statgraphics Centurion Versión XVI

En la figura 9 se observó los valores que deben tomar los efectos principales para conseguir un mayor número de brotes.

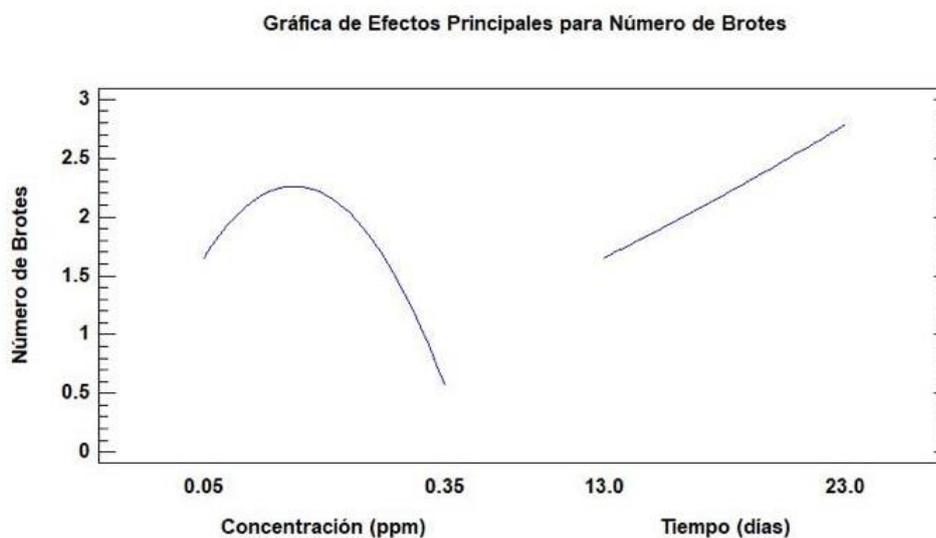


Figura 9. Gráfica de efectos principales para el número de brotes

Fuente: Statgraphics Centurion Versión XVI

La figura 9 mostró los valores que deben tomar los efectos principales para conseguir un mayor número de brotes. Dichos valores se establecieron entre intervalos

de 0,05 a 0,30 ppm y de 13 a 23 días respectivamente. Para la primera variable la zona de exploración fue alrededor de una concentración de 0,15 ppm mientras que, para la segunda variable la zona de exploración fue alrededor de 23 días.

La figura 10 estableció que el máximo número de brotes fue estimado entre 2,70 y 3,12 (nivel de confianza 95%), con una concentración 0,25 ppm y un tiempo de 23 días.

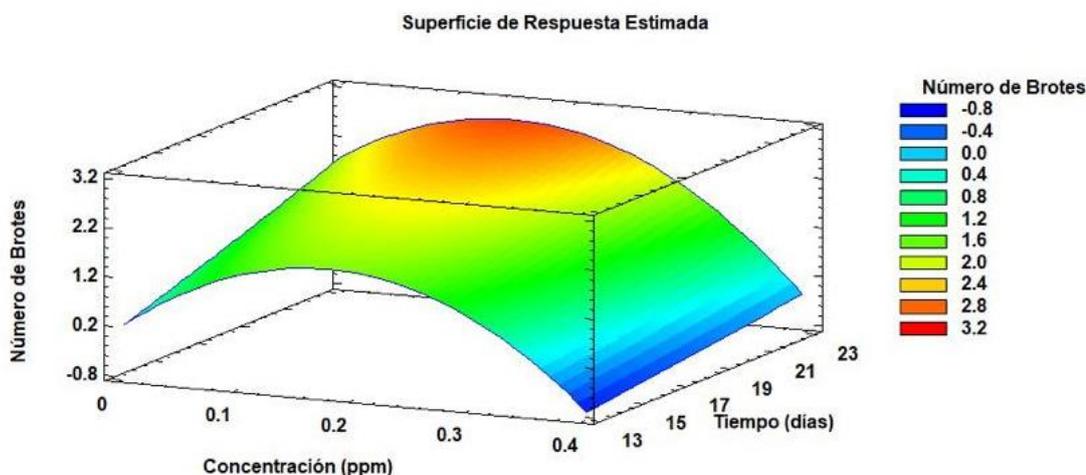


Figura 10. Máxima producción de número de brotes esperados con 6-BAP con una concentración de 0,25 ppm en un tiempo de 23 días

Fuente: Statgraphics Centurion Versión XVI

Los modelos de superficie de respuesta plantados fueron basados en un diseño central compuesto, que tiene la característica de ser flexible y ajustarse a diferentes circunstancias.

A lo largo del experimento, se notó un aumento progresivo en el número de brotes, indicando la acción de 6-BAP en la inducción en *C. spinosa*. Según Lazar (2003), el 6-BAP fomenta el crecimiento, la división y la elongación de las células. De acuerdo con Paneque et al., (2011), el balance adecuado de los reguladores del

crecimiento en el medio de cultivo *in vitro* puede ser clave para determinar las características de los brotes en el proceso embriogénico. Esto coincide con los hallazgos de Bermúdez et al., (2019), que afirman que un balance adecuado de los reguladores del crecimiento puede generar una gran cantidad de brotes con diferentes características morfológicas.

La producción de brotes que se obtuvieron en la presente investigación en función de la concentración, fueron consistentes comparando con estudios previamente realizados. En el cultivo de *Petunia hybrida* Vilm. Farooq et al., (2021) con $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ de 6-BAP se obtuvo un porcentaje de proliferación de brotes en un 97,90%. En un cultivo *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth Goyal (2012), adicionó $4,4 \mu\text{M}$ de 6-BAP y $0,73 \mu\text{M}$ de PAA; y obtuvieron hasta 7 brotes por explante en un período de 40 días. Concentraciones bajas de 6-BAP incrementan la producción de brotes de *C. spinosa*.

Se debe tener presente que la concentración de 6-BAP que se va a adicionar a un medio de cultivo no siempre debe ser alta, según Peña et al., (2014) en cultivo de *Juglans neotropica* con 6-BAP $0,07 \text{ mg L}^{-1}$ incrementaron la producción de brotes en un 75-87%.

La regulación de la concentración del biorregulador 6-BAP es un factor que afecta directamente la inducción a brotes; las citoquininas se han identificado como factor clave en la estimulación de la división y crecimiento celular (Mok & Mok, 2001). La ausencia de esta fitohormona en un sistema celular resulta en un rendimiento menor en comparación con aquellos sistemas que contienen niveles regulados de citoquininas (Basantes Mantilla, 2011). Por lo tanto, es importante tener en cuenta la regulación de 6-BAP en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

En el presente estudio se determinó y optimizó el efecto del 6-BAP en la producción de brotes de *C. spinosa*; mediante la técnica de micropropagación se logró aumentar el número de brotes siendo una alternativa efectiva para la conservación de especies endémicas.

Las diferentes concentraciones de 6-BAP (0,05; 0,25 y 0,50 ppm) no presentaron diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos, por lo que es necesario ampliar el periodo de tiempo para la evaluación; no obstante, la concentración de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ favoreció el número de brotes con un promedio de 2 en 13 días, lo que equivale a un aumento del 0,72 en comparación con el grupo control.

En función de la optimización de los parámetros concentración y tiempo, se logró reducir la zona de exploración; para el primer parámetro alrededor de $0,15 \text{ mg L}^{-1}$ y el segundo parámetro con una proyección de 23 días.

De acuerdo con el análisis estadístico, se determinó que los datos de los objetivos específicos presentaron normalidad, además, se ha podido evaluar que los tratamientos no presentaron diferencia significativa, sin embargo, al incrementar el tiempo de evaluación se podría inferir en este parámetro, así mismo, se concluyó que en un tiempo de 23 días a una concentración de 0,15 ppm se obtendría un mayor número de brotes.

4.2 Recomendaciones

En caso de que los resultados no presenten diferencias significativas, se sugiere emplear las concentraciones más bajas para obtener los mismos resultados. Esto

permitirá ahorrar hormonas, haciendo que el proceso sea más económico reduciendo costos y manteniendo la eficacia del mismo.

Para lograr una obtención eficiente de brotes, es fundamental considerar su estado fisiológico, se recomienda seleccionar explantes jóvenes para evitar pérdidas durante la fase de introducción.

La duración de la exposición al biorregulador es clave en la obtención de un mayor número de brotes. Por esta razón, se recomienda tener en cuenta los días de exposición para optimizar el proceso y lograr resultados óptimos.

Se recomienda tener en cuenta el factor tiempo al planificar investigaciones futuras, ya que el establecimiento de cultivos *in vitro* puede requerir entre 40 y 60 días.

Apoyo financiero

Esta investigación fue llevada a cabo gracias al apoyo financiero de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca y la colaboración de la Fundación Rufford 35230-1 en el proyecto titulado “Establecimiento de un protocolo de micropropagación de *Caesalpinia sp.* con fines de uso para un futuro plan de restauración ecosistema y conservación”, bajo el número de resolución 005-004-2022-10-06.

REFERENCIAS

- Aguirre, N., Günter, S., & Stimm, B. (2007). *Mejoramiento de la propagación de especies forestales nativas del bosque montano en el Sur del Ecuador* (pp. 1-8). Profesor Area Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, Universidad Nacional de Loja. https://www.rncalliance.org/WebRoot/rncalliance/Shops/rncalliance/4C15/957A/9D0B/09EB/B5F4/C0A8/D218/8324/Aguirre_et_al_2007_mejoramiento_propagacion.pdf
- Baquero, F., Sierra, R., Ordóñez, L., Tipán, M., Espinosa, L., Rivera, M. B., & Soria, P. (s. f.). *EcoCiencia / CESLA / EcoPar / MAG SIGAGRO / CDC- JATUN SACHA / División Geográfica—IGM*.
- Basantes Mantilla, M. J. (2011). *Evaluación del efecto de ácido α -Naftalenacético (ANA), 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido Giberélico (GA3) en las fases de inducción, multiplicación y enraizamiento in vitro a partir de yemas apicales de valeriana Scandens* [BachelorThesis, SANGOLQUÍ / ESPE / 2011]. <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/4928>
- Benavides, A. (s. f.). *Informe especies*. Recuperado 30 de enero de 2023, de https://www.academia.edu/7032939/Informe_especies
- Benson, E. E. (2000). Special symposium: In vitro plant recalcitrance in vitro plant recalcitrance: An introduction. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 36(3), 141-148. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0029-z>
- Bermúdez-Carabaloso, I., Rodríguez Urquiza, M., Reyes Vega, M., Jiménez Padrón, A., Bermúdez-Carabaloso, I., Rodríguez Urquiza, M., Reyes Vega, M., & Jiménez Padrón, A. (2019). Efecto del uso combinado de dos citoquininas en la multiplicación y regeneración de yemas adventicias de banano cv. ‘Gros

- Michel' (Musa AAA). *Bioteconología Vegetal*, 19(2), 139-146.
- Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Chávez-Ávila, V. M., Vernon-Carter, E. J., & Newton, R. J. (2007). Clonal propagation of mesquite tree (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. Ex Willd. M.C. Johnston). I. Vía cotyledonary nodes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9027-8>
- Cadenas Agroproductivas by Fondo para la Protección del Agua—FONAG - Issuu*. (2012, noviembre 28). https://issuu.com/fonag/docs/cadenas_agroproductivas
- Cañadas Cruz, L. (2000). *EL MAPA BIOCLIMÁTICO Y ECOLÓGICO DEL ECUADOR*.
- Catalan, L. A., & Balzarini, M. (1992). Improved laboratory germination conditions for several arboreal *Prosopis* species: *Prosopis chilensis*, *Prosopis flexuosa*, *Prosopis nigra*, *Prosopis alba*, *Prosopis caldenia* and *Prosopis affinis*. *Proceedings of the International Seed Testing Association*. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Improved+laboratory+germination+conditions+for+several+arboreal+Prosopis+species%3A+Prosopis+chilensis%2C+Prosopis+flexuosa%2C+Prosopis+nigra%2C+Prosopis+alba%2C+Prosopis+caldenia+and+Prosopis+affinis&author=Catalan%2C+L.A.&publication_year=1992
- Cheruvathur, M. K., Britto, J., & Thomas, T. D. (2010). Callus induction and shoot regeneration from epicotyl explants of ethnomedicinally important *Caesalpinia bon-duc* (L.) Roxb. *IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY*, 8(4), 7.
- Cortés, J. S. A., Jovanna, A. G., David, A. C. J., & Mélida, S. M. R. (s. f.). *Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal*.
- De la Torre, L. (2018). *LA TARA, BENEFICIOS AMBIENTALES Y*

RECOMENDACIONES PARA SU MANEJO SOSTENIBLE EN RELICTOS DE BOSQUE Y SISTEMAS AGROFORESTALES. CONDESAN.
www.condesan-ecoandes.org

Farooq, I., Qadri, Z. A., Rather, Z., Nazki, I., Banday, N., Rafiq, S., Masoodi, K., Alotaibi, S., & Mansoor, S. (2021). Optimization of an improved, efficient and rapid in vitro micropropagation protocol for *Petunia hybrida* Vilm. Cv. “Bravo”. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.05.018>

Fundamentos de Fisiología Vegetal. (s. f.).

Garay, C., & Giobellina, G. B. B. (s. f.). *Programa de Capacitación Laboral en Producción y Emprendedurismo Agroecológico en Estación Juárez Celman, Córdoba.*

Garay-Arroyo, A., de la Paz Sánchez, M., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E. R., & Gutiérrez, C. (2014). La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia en el Desarrollo de *Arabidopsis Thaliana*. *REB. Revista de educación bioquímica*, 33(1), 13-22.

Goyal, P., Kachhwaha, S., & Kothari, S. L. (2012). Micropropagation of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth-a multipurpose leguminous tree and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using molecular markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants: An International Journal of Functional Plant Biology*, 18(2), 169-176.
<https://doi.org/10.1007/s12298-012-0112-z>

Goycochea Ricci, R. A. (2010). *Evaluación de taninos y goma del fruto de la Tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze provenientes de las lomas de Atiquipa, Arequipa—Perú.* [Tesis para optar el Título de INGENIERO FORESTAL,

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA Facultad de Ciencias Forestales].

<https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/419/K50.G7-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Grace, M., Damian, M., Godstevan, M., Deusdedit, K., & Josephine, U. (2020). Developmental Variation among Improved Coffee Hybrids Propagated through Somatic Embryogenesis. *World Journal of Agricultural Research*, 8(3), Art. 3. <https://doi.org/10.12691/wjar-8-3-1>

Haro, Z. J. L. (s. f.). *Ingeniera en Biotecnología*.

HIDROBO UNDA, G. C. (2011). *DESARROLLO DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN, A ESCALA DE LABORATORIO, DE GOMAS PROVENIENTES DE LAS SEMILLAS DE GUARANGO (Caesalpinia spinosa), PARA APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTICIA [PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA AGROINDUSTRIAL, ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL]*. <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/4067/1/CD-3796.pdf>

Hussain, A., Ahmed, I., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). *Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities*. <https://doi.org/10.5772/50568>

Indacochea, B., Parrales, J., Hernández, A., Castro, C., Vera, M., Zhindón, A., & Gabriel, J. (2018). Evaluación de medios de cultivo in vitro para especies forestales nativas en peligro de extinción en Ecuador. *Agronomía Costarricense*, 42(1), 63-89.

Janzen, D. H. (1981). Enterolobium Cyclocarpum Seed Passage Rate and Survival in Horses, Costa Rican Pleistocene Seed Dispersal Agents. *Ecology*, 62(3), 593-601. <https://doi.org/10.2307/1937726>

- Kriaa, W., Sghaier-Hammami, B., Masmoudi-Allouche, F., Benjemaa-Masmoudi, R., & Drira, N. (2012). The date palm (*Phoenix dactylifera* L.) micropropagation using completely mature female flowers. *Comptes Rendus Biologies*, 335(3), 194-204. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2012.01.005>
- Lara Díaz, R. M. (2019a). “*EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE PLÁNTULAS DE GUARANGO (Caesalpinia spinosa), EN EL VIVERO EXPERIMENTAL CEASA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI, 2019.*” [Universidad Técnica de Cotopaxi]. <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/5269/6/PC-000724.pdf>
- Lara Díaz, R. M. (2019b). *Evaluación de Métodos de Producción de Plántulas de Guarango (caesalpinia spinosa), en el Vivero Experimental CEASA de la Universidad Técnica de Cotopaxi, 2019.* [BachelorThesis, Ecuador, Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC)]. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/5269>
- Lazar, T. (2003). Taiz, L. and Zeiger, E. Plant physiology. 3rd edn. *Annals of Botany*, 91(6), 750-751. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg079>
- Léon-Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador*. Missouri Botanical Garden Press.
- Mok, D. W., & Mok, M. C. (2001). Cytokinin Metabolism and Action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1), 89-118. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.89>
- Morante, M. C. (2018). Wilt Disease of Tara (*Caesalpinia spinose* Molina Kuntz) in Nursery in the Inter Andean Valley of Cochabamba, Bolivia. *American Journal of Plant Sciences*, 9(9), Art. 9. <https://doi.org/10.4236/ajps.2018.99142>

- 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.*
- Nieto, C., & Hidrobo, G. (2011). *LA CADENA AGRO-PRODUCTIVA DEL GUARANGO (CAESALPINIA SPINOSA KUNTZE), ELEMENTOS QUE RESALTAN SU COMPETITIVIDAD.*
<http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/809>
- Núñez, J. E. N., Núñez, J. E. N., Quiala, E., Feria, M. de, Mestanza, S., & Teanga, S. (2017). Propagación *in vitro* de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz a partir de yemas axilares de árboles más seleccionados. *Bioteología Vegetal*, 17(2).
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/543>
- Olmos, S. E., Lavia, G., Di Renzo, M., Mroginski, L., & Echenique, V. (2002). Genetic analysis of variation in micropropagated plants of *Melia azedarach* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38(6), 617-622.
<https://doi.org/10.1079/IVP2002319>
- Orozco Montero, M. E. (2011). *Evaluación de cuatro dosis de Hidroretenedor Luquasorb y tres tipos de Sustratos en la Plantación de Guarango (Caesalpinia spinosa (Mol) O. Kuntz, en el cantón Guano [BachelorThesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo].*
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/720>
- Paneque, O. S. G., Espinosa, M. H., Pupo, J. J. S., & Reyes, Á. E. (2011). Evaluación de la dinámica del crecimiento *in vitro* en callos de *Ipomoea batatas*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1), Art. 1.
- Peña, D., Rocano, M., Salazar, J., & Torres, C. (2014). Inducción de la brotación in

- vitro de microplántulas de Nogal (*Juglans neotropica*) tratadas con Thidiazuron (TDZ) y 6-Bencilaminopurina (BAP). *MASKANA*, 5(2), 81-85. <https://doi.org/10.18537/mskn.05.02.07>
- Perea, M. (2009). *Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro*. http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad_de_Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas_Libros/Biologia/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro.pdf?fbclid=IwAR2xLhdtU-7yKztpAvuWQjdZYh-ltzpcYT6PnzpAErkw__ZozfqclxwYy-Y
- Pérez-Miranda, R., Bautista, E. V., Romero-Sánchez, M. E., & Hernández-Ramos, J. (2022). Análisis de contingencia de la distribución natural de pinos mexicanos en categoría de riesgo. *Terra Latinoamericana*, 40. <https://www.redalyc.org/journal/573/57371833007/html/>
- Pino, A. S., Jova, M. C., Gómez-Kosky, R., Torres, J. L., Guerra, D. G., Reinaldo, D., Cabrera, A. R., Pérez, M. B., Vega, V. M., & García, Y. B. (2012). Multiplicación in vitro del clon de malanga 'Viequera' (*Xanthosoma* spp.) en sistemas de cultivo semiautomatizado. *Bioteología Vegetal*, 12(2), Art. 2. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/162>
- Revista Digital Universitaria*. (s. f.). Recuperado 30 de enero de 2023, de <https://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/art104a-1a.htm>
- Rodríguez Beraud, M. M., Latsague Vidal, M. I., Chacón Fuentes, M. A., & Astorga Brevis, P. K. (2014). Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, 35(1), 21-22. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>
- Sanhueza, C., & Zalba, S. (2014). Banco de semillas, germinación y longevidad de

semillas de retama (*Spartium junceum*, Fabaceae): Implicancias para su control. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 49(1), 67-76.

Serie LOS BOSQUES ANDINOS Y EL AGUA. (s. f.). Recuperado 30 de enero de 2023, de <https://www.yumpu.com/en/document/read/52860129/serie-los-bosques-andinos-y-el-agua>

Sharry, S. E., Adema, M., & Abedini, W. (Eds.). (2015). *Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/46738>

Solís, M. A. (1961). *Los bosques del Ecuador y sus productos*. Editorial Ecuador.

Stalin Efrén, A. E., & Saltos Aguilar, W. M. (2017). El Guarango en el Cantón Guano de la Provincia de Chimborazo – Ecuador. *Industrial Data*, 20(1), 43. <https://doi.org/10.15381/idata.v20i1.13508>

Taninos de tara. (2015, mayo 15). Silvateam. <https://www.silvateam.com/es/productos-y-servicios/productos-para-curtiembre/extractos-vegetales/taninos-de-tara.html>

The Agroforestry Database. (s. f.). World Agroforestry | Transforming Lives and Landscapes with Trees. Recuperado 30 de enero de 2023, de <https://www.worldagroforestry.org/output/agroforestry-database>

UNESUM Aporta a la biotecnología de plantas (Primera edición, : Blanca Indacochea PhD Docente Universidad Estatal del Sur de Manabí. Julio Gabriel PhD Docente Universidad Estatal del Sur de Manabí. Johann Parrales MSc Docente Universidad Estatal del Sur de Manabí). (2017). <http://repositorio.unesum.edu.ec/bitstream/53000/2100/1/UNESUM%20APORTA%20A%20LA%20BIOTECNOLOGIA%20DE%20PLANTAS.pdf>

- Universidad de Cundinamarca, Gil C., A. I., Ariza C., C. A., Universidad de Cundinamarca, Castillo T., L. M., Universidad de Cundinamarca, Salgado D., L. E., Universidad de Cundinamarca, Banda Sánchez, L., Universidad de Cundinamarca, Vanegas M., L. E., & Universidad de Cundinamarca. (2019). Inducción de organogénesis in vitro con 6-bencilaminopurina en *Cattleya trianae* Linden & Rchb.f. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 22(2). <https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n2.2019.1275>
- Valverde-Cerdas, L., Dufour, M., & Villalobos, V. M. (1997). In vitro propagation of *Pithecellobium saman* (Raintree). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 33(1), 38-42. <https://doi.org/10.1007/s11627-997-0038-2>
- Villena Velásquez, J. J., Seminario Cunha, J. F., & Valderrama Cabrera, M. A. (2019). Variabilidad morfológica de la «tara» *Caesalpinia spinosa* (Molina.) Kuntze (Fabaceae), en poblaciones naturales de Cajamarca: Descriptores de fruto y semilla. *Arnaldoa*, 26(2), 555-574. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.262.26203>
- Wang, H. C., Chen, J. T., & Chang, W. C. (2006). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, root and stem-derived callus cultures of *Areca catechu*. *Biologia Plantarum*, 50(2), 279-282. <https://doi.org/10.1007/s10535-006-0020-6>
- Werner, E. T., Milanez, C. R. D., Mengarda, L. H. G., Vendrame, W. A., & Cuzzuol, G. R. F. (2010). Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). *Acta Botanica Brasilica*, 24, 1046-1051. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062010000400019>

ANEXOS

Anexo 1. Abreviaturas

6-BAP: 6 - Bencilaminopurina

AIB: 3-indolbutírico

atm: Atmósfera

DCA: Diseño completamente al Azar

IAA: Ácido indol-3-acético

mg L⁻¹: Miligramo / Litro

MS: Murashige & Skoog

msnm: Metros sobre el nivel del mar.

NAA: Ácido naftalenoacético

PAA: Ácido fenilacético

ppm: Partes por millón

PVP: Polivinilpirrolidona

TDZ: Tiazurón

μM: Micromol

WPM: Lloyd & McCown

Anexo 2. Material Vegetal



Figura 11. Plántula de *Caesalpinia spinosa*

Fuente: Autores



Figura 12. Plántula de *Caesalpinia spinosa* vista desde el estereoscopio

Fuente: Autores

Anexo 3. Establecimiento de fase de inducción



Figura 13. Proceso de defoliación, previo a la obtención de explantes

Fuente: Autores

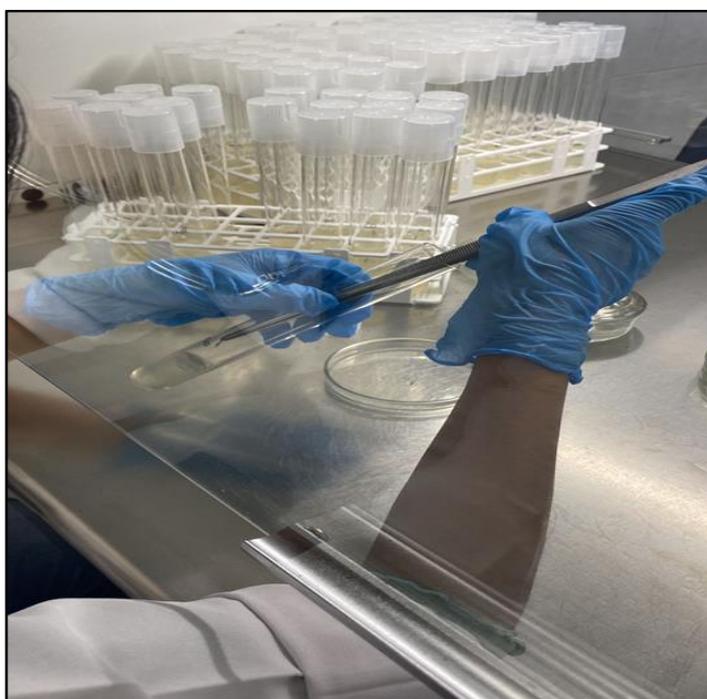


Figura 14. Siembra de los explantes de *C. spinosa* en cultivo MS + 6-BAP

Fuente: Autores

Anexo 4. Análisis estadísticos

El presente análisis estadístico corresponde al modelo ortogonalizado de dos vías para 6-BAP.

Tabla 7. Resumen del análisis de varianza (ANOVA) para el número de brotes

Fuente	Suma de cuadrado	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Concentración	1,76042	1	1,76042	83,05	0,0008
Tiempo	1,89724	1	1,89724	89,51	0,0007
Residuales	0,08478	1	0,02119		

Fuente: Statgraphics Centurion Versión XVI

Tabla 8. Resumen de la combinación de los niveles de los factores

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Concentración	0,05	0,35	0,14989
Tiempo	13,0	23,0	23,0

Fuente: Statgraphics Centurion Versión XVI