



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

**ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS PARA LA MULTIPLICACIÓN *IN VITRO*
DE YEMAS AXILARES DE SAUCE (*Salix humboldtiana* Willd.)**

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

AUTORES: DAVID SEBASTIÁN DELGADO SALINAS

MADAY LISETH RIVERA TELLO

TUTORA: DRA. INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, PhD.

Cuenca - Ecuador

2024

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotros, David Sebastián Delgado Salinas con documento de identificación N° 0106551690 y Maday Liseth Rivera Tello con documento de identificación N° 1450089485; 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, 29 de febrero del 2024

Atentamente,



David Sebastián Delgado Salinas

0106551690



Maday Liseth Rivera Tello

1450089485

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

Nosotros, David Sebastián Delgado Salinas con documento de identificación N° 0106551690 y Maday Liseth Rivera Tello con documento de identificación N° 1450089485, 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: “Establecimiento de protocolos para la multiplicación *in vitro* de yemas axilares de Sauce (*Salix humboldtiana* Willd.)”, 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, 29 de febrero del 2024

Atentamente,



David Sebastián Delgado Salinas

0106551690



Maday Liseth Rivera Tello

1450089485

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Inés Patricia Malo Cevallos con documento de identificación N° 0102291044 docente de la Universidad Politécnica Salesiana declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS PARA LA MULTIPLICACIÓN IN VITRO DE YEMAS AXILARES DE SAUCE (*Salix humboldtiana* Willd.), realizado por David Sebastián Delgado Salinas con documento de identificación N° 0106551690 y por Maday Liseth Rivera Tello con documento de identificación N° 1450089485, 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, 29 de febrero del 2024

Atentamente,



Dra. Inés Patricia Malo Cevallos, PhD.
0102291044

Dedicatoria

A Dios, quien ha sido mi fuente de fortaleza y guía en cada paso de este camino, le dedico con profundo agradecimiento este logro. Su constante amor y protección han sido mi sustento en los momentos más difíciles.

Quiero dedicar esta tesis a mis queridos padres y hermanos: Sergio, Laura, Gabriela, Cristian y Jenny. Su apoyo incondicional ha sido mi mayor fortaleza en los desafíos académicos. Gracias por estar siempre a mi lado y por ser mi inspiración constante.

También deseo expresar mi sincero agradecimiento a mis amigos Alex, Dayanna, David, Camila, Erika y Rossana. Sus risas, consejos y compañía han enriquecido esta etapa académica de manera inigualable. Cada momento compartido ha sido un valioso regalo.

Un agradecimiento especial a David, mi compañero de tesis, por su inquebrantable ayuda y compromiso al cien por ciento en la realización de este trabajo. Tu dedicación y colaboración han sido fundamentales para alcanzar nuestros objetivos.

A todos ustedes, mi familia, amigos y compañero de tesis, les dedico este logro con todo mi cariño y gratitud. Sin su apoyo, este camino habría sido mucho más difícil. Gracias por estar siempre presentes en mi vida y por formar parte esencial de este importante capítulo.

- Maday R.

Dedicatoria

Primeramente, a Dios, fuente de sabiduría y guía en cada paso de mi vida, a quien dedico este logro académico, reconociendo su dirección frente a diversas dificultades presentadas en mi vida académica de la misma forma a mis padres Alexandra y Efrén cuyos consejos han sido mi luz en los momentos de incertidumbre, a quien agradezco por su inquebrantable apoyo y amor incondicional de igual manera por cada experiencia compartida y por ser mi ejemplo de perseverancia y fortaleza.

A mis hermanos, Oswaldo y Nancy, por su apoyo incondicional y por estar siempre presentes en cada etapa de mi vida, siendo mi soporte y motivación constante así mismo a mi sobrina Carolina, por ser mi cómplice en este camino académico, por escucharme con paciencia y por ser mi inspiración para seguir adelante.

A mi familia en general y a las personas cercanas que han brindado su apoyo y comprensión, a quienes les estoy profundamente agradecido por su inquebrantable respaldo, de la misma manera a mis amigos de colegio y de vida, Byron, Jesús, Cristófer y Paula, por su amistad incondicional y por acompañarme en cada paso de este viaje, compartiendo risas, alegrías y desafíos.

A mis amigos de universidad, Alex, Dayanna, Rossana y a mi compañera de tesis, Maday, por enriquecer este estudio con sus valiosos conocimientos y aportes, por ser parte fundamental de estos años de convivencia académica, a todos aquellos que, de una forma u otra, han contribuido a mi formación académica y personal, les dedico este trabajo con profundo agradecimiento y gratitud.

- David D.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento a la Doctora Inés Malo, quien ha desempeñado el papel de directora de carrera y tutora de esta tesis. Su incansable apoyo, orientación y sabias enseñanzas han sido pilares fundamentales a lo largo de este desafiante camino académico. Su dedicación y compromiso han sido de vital importancia para el desarrollo y conclusión exitosa de este proyecto.

Además, deseamos extender nuestro reconocimiento al valioso personal del laboratorio, integrado por Sandy, Tatiana y Marlon. Su colaboración, paciencia y experiencia han enriquecido cada fase de esta investigación de manera invaluable. Sus contribuciones han sido esenciales para el logro de los objetivos planteados en este trabajo.

Agradecemos profundamente a todos aquellos que, de alguna manera, han contribuido a la realización de este proyecto. Su constante apoyo y ánimo han sido una fuente inagotable de motivación durante todo este proceso.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

Resumen	7
Palabras clave: Salix humboldtiana Willd., micropropagación, yemas axilares, fitohormonas, cultivo in vitro.....	7
Abstract	8
Key words: Salix humboldtiana Willd., micropropagation, axillary buds, phytohormones, in vitro culture	8
Abreviaturas	9
Capítulo 1.....	10
INTRODUCCIÓN	10
1.1 Planteamiento del problema	11
1.2 Justificación	13
1.3 Formulación del problema	14
1.4 Objetivos	14
1.4.1 General.....	14
1.4.2 Específicos	14
1.5 Hipótesis	15
Capítulo 2.....	16
FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	16
2.1 Salix humboldtiana	16
2.2 Taxonomía del sauce	16
2.3 Biología reproductiva del sauce	17
2.4 Aplicaciones del sauce	18
2.5 Situación actual del sauce en Azuay	18
2.6 Yema axilar del sauce	19
2.7 Importancia del sauce en un sistema agroforestal	20
2.8 Ecología del sauce	20
2.8.1 Clima.....	21
2.9.2 Fauna y Flora	21
2.10 Regeneración natural del sauce	22
2.11 Micropropagación de especies	22
2.12 Etapas de la micropropagación	23
2.12.1 Fase 0: selección del material vegetal	23
2.12.2 Fase I: establecimiento.....	24

2.12.3 Fase II: multiplicación	24
2.12.4 Fase III: elongación y enraizamiento	25
2.12.5 Fase IV: aclimatización.....	25
2.13 Cultivo in vitro.....	25
2.14 Componentes de un cultivo in vitro	26
2.14.1 Medio de cultivo	26
2.14.2 Medio Murashige y Skoog MS	27
2.14.3 Reguladores de crecimiento	27
2.14.3.1 Auxinas	27
2.14.3.2 Citoquininas	28
2.14.3.3 Giberelinas	29
2.15 Variables que afectan al crecimiento de brotes	30
2.15.1 Contaminación	30
Capítulo 3.....	32
MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1 Materiales.....	32
3.1.1 Ubicación	32
3.1.2 Materiales de laboratorio	33
3.1.3 Equipos	34
3.1.4 Reactivos.....	34
3.2 Nivel de investigación.....	34
3.4 Unidad experimental UE	35
3.5 Variables	35
3.6 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	35
3.7 Técnicas de procesamiento y análisis de datos	36
3.8 Metodología	36
3.8.1 Preparación de medios de cultivo	36
3.8.2 Recolección de explantes	38
3.8.3 Protocolo 1 de desinfección	40
3.8.4 Protocolo 2 de desinfección	41
3.8.5 Siembra de explantes	41
3.8.6 Cámara de crecimiento.....	43
3.9 Diseño experimental.....	44
3.9.1 Establecimiento de los explantes de <i>Salix humboldtiana</i> Willd.....	44
3.9.2 Porcentaje de contaminación	44

3.9.3 Porcentaje de necrosis	45
3.9.4 Porcentaje de viabilidad	45
Capítulo 4.....	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
4.1 Etapa de desinfección de los explantes de Salix humboldtiana Willd	46
4.2 Evaluación de la eficiencia de los tratamientos	47
4.2.1 Pruebas de normalidad	47
4.2.2 Pruebas no paramétricas.....	50
4.2.3 Pruebas Post-Hoc	51
4.3 Porcentaje de contaminación	52
4.4 Porcentaje de necrosis.....	55
4.5 Porcentaje de viabilidad	56
4.6 Análisis global de los tratamientos en micropropagación	59
Capítulo 5.....	61
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	61
5.1 Conclusiones	61
5.2 Recomendaciones	62
5.3 Referencias bibliográficas	63
5.4 Anexos	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Información taxonómica de sauce criollo	17
Tabla 2 Tipos de variables a estudiar	35
Tabla 3 Cantidades para preparar medio de cultivo para micropropagación in vitro	36
Tabla 4 Concentración hormonal usada para los tratamientos 0, 1, 2, 3, 4.....	38
Tabla 5 Tratamientos asignados al estudio para el establecimiento del cultivo in vitro.....	43
Tabla 6 Porcentaje obtenido en contaminación, viabilidad y necrosis en la primera repetición	46
Tabla 7 Porcentaje obtenido en contaminación, viabilidad y necrosis en la segunda repetición	47
Tabla 8 Porcentaje obtenido en contaminación, viabilidad y necrosis en la tercera repetición	47
Tabla 9 Prueba Shapiro-Wilk.....	48
Tabla 10 Prueba Kruskal-Wallis	50
Tabla 11 Análisis Dunn mediante el método Bonferroni aplicado en la variable de contaminación	51
Tabla 12 Análisis Dunn mediante el método Bonferroni aplicado en la variable de viabilidad	52
Tabla 13 Porcentaje global de contaminación, necrosis y viabilidad presente en las tres replicas	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ubicación del Laboratorio de Biotecnología vegetal de la Universidad Politécnica Salesiana	33
Figura 2 Pesaje de los componentes para la preparación de medio de cultivo.....	37
Figura 3 Planta madre de cual se extrajeron los explantes.....	39
Figura 4 Almacenamiento de los explantes en agua destilada	40
Figura 5 Proceso de desinfección del protocolo 1	40
Figura 6 Proceso de desinfección del protocolo 2	41
Figura 7 Proceso de disección de explantes para minimizar posibles daños en el tejido.....	42
Figura 8 Proceso de siembra de explantes y sellado film libre de contaminación	42
Figura 9 Diseño completamente al azar	44
Figura 10 Gráfico Q-Q normal de contaminación donde se observan valores dispersos a la línea central.....	48
Figura 11 Gráfico Q-Q normal de necrosis donde se observan valores dispersos a la línea central	49
Figura 12 Gráfico Q-Q normal de viabilidad donde se observan valores dispersos a la línea central.	49
Figura 13 Diagrama de barras de contaminación presente en las tres replicas	54
Figura 14 Diagrama de barras sobre necrosis presente en las tres replicas.....	56
Figura 15 Diagrama de barras sobre la viabilidad presente en las tres replicas.	58
Figura 16 Diagrama de barras del porcentaje global de contaminación, necrosis y viabilidad.....	60
Figura 17 Extracción de explantes	71
Figura 18 Esterilización de material	72
Figura 19 Siembra de explantes	72
Figura 20 Explante obtenido del tratamiento de control	73
Figura 21 Explante obtenido del tratamiento uno replica dos.....	73
Figura 22 Explante obtenido del tratamiento dos replica dos	74
Figura 23 Explante obtenido del tratamiento tres replica dos.....	74
Figura 24 Explante obtenido del tratamiento cuatro replica tres.....	75

Resumen

El presente estudio se enfocó en la comparación de la eficacia entre diversos protocolos de desinfección y concentraciones hormonales en el establecimiento de un cultivo *in vitro* de *Salix humboldtiana* Willd. Para ello se emplearon yemas axilares como explantes y se realizaron cinco tratamientos, incluido un T0 de control, utilizando desinfectantes como hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno, además se añadieron fitohormonas {6-BAP y AG3} en el cultivo, con tres repeticiones por tratamiento. Entre los tratamientos evaluados, se destacó el tratamiento T3, que implicaba el uso de peróxido de hidrógeno con diversas concentraciones hormonales, se evidenció una eficacia superior mediante el análisis estadístico dando una viabilidad del 100% y porcentajes de necrosis y contaminación del 0%, con un valor de $p=0.0093^*$ inferior al nivel de significancia establecido de $p= 0.025$, lo que señala una diferencia significativa en comparación con el T0, el resto de tratamientos no determinaron una diferencia significativa en viabilidad frente al T0. Finalmente se determinó que la selección adecuada de protocolos de desinfección y concentraciones hormonales es crucial para el éxito de la micropropagación de *Salix humboldtiana* Willd. Estos hallazgos proporcionan una base sólida para futuras investigaciones en la propagación de esta especie, con implicaciones importantes para la reforestación ambiental y la conservación de ecosistemas.

Palabras clave: *Salix humboldtiana* Willd., micropropagación, yemas axilares, fitohormonas, cultivo *in vitro*.

Abstract

The present study focused on the comparison of the efficacy of different disinfection protocols and hormone concentrations in the establishment of an *in vitro* culture of *Salix humboldtiana* Willd. For this purpose, axillary buds were used as explants and five treatments were carried out, including a control T0, using disinfectants such as sodium hypochlorite and hydrogen peroxide, and phytohormones {6-BAP and AG3} in the culture, with three replicates per treatment. Among the treatments evaluated, the T3 treatment, which involved the use of hydrogen peroxide with different hormone concentrations, stood out; it showed a superior efficacy through statistical analysis giving a viability of 100% and percentages of necrosis and contamination of 0%, with a value of $p=0.0093^*$ lower than the established significance level of $p=0.025$, which indicates a significant difference in comparison with the control treatment {T0}, the rest of the treatments did not determine a significant difference in viability compared to T0. Finally, it was determined that the adequate selection of disinfection protocols and hormone concentrations is crucial for the success of micropropagation of *Salix humboldtiana* Willd. These findings provide a solid basis for future research in the propagation of this species, with important implications for environmental reforestation and ecosystem conservation.

Key words: *Salix humboldtiana* Willd., micropropagation, axillary buds, phytohormones, *in vitro* culture.

Abreviaturas

AG3: ácido giberélico

ANA: ácido naftalenoacético

AIB: ácido indol-3-butírico

BAP: 6-bencilaminopurina

2,4-D: 2,4-diclorofenoxiacético

°C: grados centígrados

g: gramos

H₂O₂: agua oxigenada

H₀: hipótesis nula

H₁: hipótesis alternativa

L: litros

NaClO: hipoclorito de sodio

MS: medio Murashige y Skoog

min: minutos

mL: mililitro

mg/L: miligramos sobre litros

mg: miligramos

UE: unidades experimental

v/v: volumen sobre volumen

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

El Ecuador tiene ecosistemas montañosos muy diversos en las distintas regiones del país que incluye la costa, sierra y oriente. Los bosques son parte de los ambientes más diversos del planeta, en comparación con los de las tierras bajas, los andinos han recibido poco interés por parte de científicos y del público en el pasado, pese a sus importantes funciones ecológicas y económicas, como la captación de agua y el control de la erosión. Al mismo tiempo, los bosques de montaña representan un ecosistema vulnerable debido a sus fuertes pendientes, que los hacen propensos a una erosión extrema tras fuertes lluvias (Bussmann, 2005).

Según Sabogal y colaboradores (2015), se observan las repercusiones de la pérdida de follaje a largo y corto plazo. Como resultado, la degradación de bosques y tierras dificulta la conservación de la biodiversidad y la capacidad de los agricultores y comunidades locales para abordar estos problemas mediante la adaptación al cambio climático. Al analizar la erosión en Ecuador, se pueden identificar diversas causas que afectan la cubierta vegetal de los bosques. Entre ellas, los factores climáticos, como las precipitaciones y la velocidad del viento, son responsables de la erosión. Además, las presiones topográficas, las características de la superficie y la actividad humana, que modifica las características de la vegetación natural, también contribuyen a este fenómeno (Quinteros Astudillo, 2012).

Este ecosistema montañoso se distingue por su vulnerabilidad, causada sobre todo por sus fuertes pendientes, que lo someten a una erosión extrema tras fuertes lluvias. El incremento demográfico antropogénico se configura como una amenaza preeminente para los ecosistemas, destacándose, entre sus expresiones más significativas, la modificación en el uso de la tierra (Bussmann, 2005).

Salix humboldtiana Willd. posee ciertas propiedades que la hacen idónea para su uso en la restauración ecológica de humedales y la conservación de la fauna, así como en la recuperación de tierras y la forestación de zonas industriales con una elevada contaminación atmosférica y del suelo. El *Salix* se ha utilizado durante mucho tiempo para la protección del suelo debido a sus capacidades mecánicas para combatir la erosión del suelo por el agua y el viento, así como a su capacidad para construir estructuras protectoras como cortavientos, refugios vitales y muros vivos. Los sauces tienen una gran capacidad de enraizamiento, vastos sistemas radiculares y son tolerantes a la sequía y la sedimentación (Pinilla Suárez et al., 2015).

Es por esto que se propone la micropropagación como una técnica de conservación forestal de plantas libres de contaminación que permita una reforestación rápida y segura de cualquier especie, ya que dicha herramienta puede ser de vital importancia frente a la pérdida de follaje de los bosques andinos causada por factores climáticos y mano del hombre, contrarrestando así de manera activa la erosión del suelo y produciendo una estabilidad medioambiental.

1.1 Planteamiento del problema

De acuerdo con el documento *ACTUALIZACIÓN DEL PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL DEL AZUAY* (s. f.), la pérdida de flora en los bosques interandinos de la provincia del Azuay tiende a facilitar la presencia de amenazas en las que destacan: la erosión eólica e hídrica, que conlleva la pérdida y degradación de los arroyos, de la calidad y cantidad del agua, y el deterioro de la capa de suelo fértil productiva, la alteración de las cuencas hidrográficas conlleva un incremento significativo en la incidencia de deslizamientos de tierra, derrumbes y deslizamientos, emergiendo como riesgos predominantes en este contexto. Adicionalmente, se observa un aumento substancial en la presencia de

material particulado en la atmósfera, factor que puede precipitar problemas respiratorios, alergias y exacerbación del asma.

Existen múltiples factores que contribuyen a que especies como el sauce reduzcan su población, entre los problemas ambientales nacionales la erosión natural del suelo se ha visto acelerada (Ministerio del Ambiente, *ACUERDO-001-ANEXO-PARQUE-NACIONAL-CAJAS.*, 2018) se da debido a la pérdida de cobertura vegetal cada año, ya sea como consecuencia de prácticas abusivas como el sobrepastoreo, métodos inadecuados de cultivo u otros factores. El análisis de estabilidad territorial realizado en el Parque Nacional Cajas muestra que el 33,87%, o la suma del Rango de Inestabilidad Moderada y Protección Total, exhibe un rango potencial de inestabilidad debido a sus pronunciadas pendientes y a su geomorfología, particularmente en algunas quebradas y ríos.

Se recomienda la utilización de cobertura vegetal natural en estas áreas para prevenir problemas de inestabilidad de taludes y erosión del suelo (Curiel Yuste et al., 2017). Considerando las preocupaciones mencionadas, se suma la disminución de la capacidad del páramo para almacenar y regenerar carbono como resultado de los pronósticos de aumento de temperatura para el próximo siglo (Kuhn, 2011). Actualmente, en Ecuador, se han asignado zonas de pastizales para la actividad minera. Un ejemplo de estos proyectos es la mina de Quimsacocha, ubicada en la zona del mismo nombre y que ocupa una extensión total de 12500 hectáreas.

La pérdida de follaje en áreas importantes, no solo contribuyen a la pérdida de especies sino al aumento de otras problemáticas como el caso de los incendios forestales ya que pueden generar altos niveles de dióxido de carbono, que ayudan en las emisiones invernales de gases de efecto invernadero y al cambio climático, dando como resultados diversos estudios que identificaron las parroquias con mayor área afectada mediante el cálculo de los puntos calientes, y estas son Molleturo con 23,11%, Oña con 10,77% y Pucará con 10,37% del área total afectada, además

de la cobertura más sensible con 20,18% del páramo experimentado a causa de incendios forestales entre 2014 y 2018 (Garzón Vergara & Campoverde Molina, 2020).

1.2 Justificación

Los beneficios de los árboles se relacionan directamente con su estado actual de salud, tamaño y cobertura; en este sentido, su valor eco ambiental aumenta a medida que su eficiencia en la captura de contaminación. Su capacidad para interceptar y absorber contaminantes está determinada por el tipo de arbórea de que se trate, así como por el volumen de sus copas, el área superficial e índice de área foliar, y su topografía foliar (Janhäll, 2015).

Aunque el sauce criollo es una especie introducida, su preservación es muy importante ya que ayuda a la estabilidad de los suelos y retiene mucho carbono acumulado en las hojas, lo que puede ser de gran aporte nutricional para los animales. La importancia del preservar este tipo de especies es por su contribución a la diversidad de los páramos en la zona del Parque Nacional Cajas, estos ecosistemas tienen una gran importancia ya que se encargan de abastecer de agua a las poblaciones de las ciudades circundantes, así como a los valles interandinos. Estas características incluyen la baja evapotranspiración, alta humedad, acumulación de materia orgánica y la morfología de algunas plantas de páramo (Morocho y Chuncho, 2019).

Por la relevancia de esta especie se puede optar por una gran alternativa, la denominada micropropagación *in vitro*, que sirve de gran ayuda, como lo sugiere Viteri G. (2022), en comparación con la propagación convencional, la micropropagación presenta ventajas, como la capacidad de producir muchas plantas homogéneas con una calidad fitosanitaria muy alta en menos tiempo y en espacios más reducidos. La planta se cultiva en un entorno con la

iluminación, la temperatura, la humedad y los nutrientes adecuados para favorecer el crecimiento del trasplante.

1.3 Formulación del problema

¿Qué protocolos de desinfección y propagación son eficaces para el establecimiento del cultivo *in vitro* de *Salix humboldtiana* Willd.?

1.4 Objetivos

1.4.1 General

Comparar dos protocolos de desinfección y concentraciones hormonales mediante la micropropagación y desarrollo de explantes de *Salix humboldtiana* generando una alternativa para la reforestación ambiental.

1.4.2 Específicos

- Probar el efecto de dos protocolos de desinfección mediante el uso de hipoclorito de sodio y agua oxigenada, en la eliminación de contaminantes microbianos de los explantes meristemáticos axilares de *Salix humboldtiana*.
- Evaluar la proliferación de brotes y explantes axilares de *Salix humboldtiana* modificando las concentraciones hormonales {BAP y AG3} en medios MS para un desarrollo *in vitro* adecuado.
- Proporcionar recomendaciones prácticas para la propagación exitosa de *Salix humboldtiana* basados en los resultados obtenidos para el cultivo *in vitro* de esta especie.

1.5 Hipótesis

Existen diferencias significativas en la tasa de supervivencia y multiplicación de *Salix humboldtiana* Willd. al utilizar diferentes protocolos de desinfección y medios de cultivo suplementados con reguladores hormonales

Capítulo 2

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 *Salix humboldtiana*

Salix humboldtiana, nombre científico de la planta del sauce, es una especie de arbusto o árbol pequeño que sólo se encuentra en los Andes ecuatorianos. Especie ampliamente distribuida en México, Perú, Chile y Argentina. Se encuentra principalmente en los valles interandinos de nuestro país, donde se cultiva en riberas de ríos, parques y jardines urbanos, y áreas agrícolas (Minga y Verdugo, 2016).

Esta planta tiende a crecer en lugares húmedos, como a lo largo de las corrientes de agua, se encuentran árboles pequeños de *Salix humboldtiana*, este tipo de vegetación crece en las partes bajas de la mayoría de los valles interandinos entre los 2700 – 3200 msnm (*MBG: Research: Ecuador: Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador*, s. f.). Crece muy bien en suelos temporalmente inundados, prefiere suelos húmedos, arenosos y con buen drenaje. En la ribera del Yanuncay, constituye una especie dominante particularmente la zona urbana y al parecer es un árbol eficiente en la protección de taludes.

2.2 Taxonomía del sauce

Las especies pertenecientes al género *Salix* manifiestan una naturaleza dioica, caracterizada por la presencia de plantas separadas por género, cuyas flores unisexuales se encuentran dispuestas en amentos cilíndricos, ya sea en posición erecta o péndula. Las flores masculinas exhiben una coloración amarilla y típicamente presentan un mínimo de dos estambres, aunque casos excepcionales pueden manifestar hasta ocho. En contraste, las flores femeninas

manifiestan una coloración verde, con un ovario bicarpelar unilocular que alberga múltiples óvulos, además de un estigma bifurcado (Méndez, 2012).

Tabla 1
Información taxonómica de sauce criollo

Reino	Plantae
División	Fanerógama Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malpighiales
Familia	Salicaceae
Genero	<i>Salix</i>
Especie	<i>Salix humboldtiana</i> Willd.

Elaborado por: EcoRegistros (2024).

2.3 Biología reproductiva del sauce

Los representantes del género *Salix* se caracterizan por su condición dioica, con una ocurrencia excepcional de flores bisexuales o inflorescencias que albergan ambos tipos de flores. La disposición de las flores se presenta en amentos, los cuales pueden exhibir una posición erecta, estar sentados o presentar un pedúnculo con una bráctea foliácea. En relación con las flores femeninas, estas consisten en un pistilo que puede ser tanto sentado como pedicelado, presentando una superficie glabra o con indumento, y poseen un estilo acompañado de dos estigmas generalmente bífidios. La fenología de la floración varía según la especie, ocurriendo antes, durante o después de la foliación, con un rango típico entre los meses de enero y mayo en especies riparias. La polinización, a su vez, se realiza tanto por agentes entomófilos como anemófilos, siendo la eficacia del viento como vector variable y posiblemente influenciado por las diferencias morfológicas entre los amentos y las flores femeninas (Karrenberg et al., 2002).

2.4 Aplicaciones del sauce

Sus efectos restauradores desempeñan un papel importante en la conservación del suelo y la prevención de la erosión en el ámbito ecológico, sobre todo en lugares propensos a la erosión eólica o hídrica. La corteza y las hojas de estos árboles se han utilizado medicinalmente durante siglos en diversas regiones del mundo para aliviar la fiebre y tratar enfermedades como el reumatismo. La salicina, el potente componente medicinal de la corteza del sauce a partir del cual se genera el ácido salicílico, se descubrió en el siglo XIX. Las sociedades indígenas utilizan tanto las hojas como la corteza de esta planta como sustrato para tratar la caída del cabello. Además, en el ámbito artesanal, la madera de estos árboles suele utilizarse para fabricar instrumentos musicales como flautas (Sierra et al., 2015).

2.5 Situación actual del sauce en Azuay

La diversidad se define como una variedad existente en un área determinada; los espacios verdes públicos de alto nivel de diversidad y riqueza cumplen funciones, como reducir la contaminación atmosférica y dar hábitat a varios tipos de fauna ecológica (Saavedra-Romero et al., 2019).

Según el estudio realizado por Muñoz y Vásquez (2020), se observó una notable presencia de *Salix humboldtiana*, alcanzando el 11,79% en varios parques pertenecientes a la provincia del Azuay, específicamente en la ciudad de Cuenca. El análisis de las parroquias reveló una distribución irregular de la riqueza de especies, destacándose Huayna Cápac y El Sagrario como las que exhibieron la mayor diversidad, con 35 y 30 especies respectivamente. Entre las

especies identificadas, *Salix humboldtiana* Willd. se destacó como la más abundante, contabilizando un total de 464 individuos en la zona de estudio.

2.6 Yema axilar del sauce

Hoy en día, la técnica de micropropagación *in vitro* se utiliza para producir un gran número de plántulas genéticamente idénticas a partir de meristemos o yemas axilares; las yemas axilares son fragmentos de plantas que se encuentran en la base de las hojas y se separan con fines reproductivos (Martinez, s. f.).

La micropropagación por yemas axilares consiste en estimular los meristemos ya presentes en los explantes utilizados como material de partida para obtener yemas axilares utilizables como unidades vegetativas a lo largo de la fase multiplicativa del método (Hernández Amador, 2017).

Según Adema y colaboradores (2022), la estrategia de desinfección y descontaminación de varios explantes resultó eficaz para yemas juveniles y microestacas. La tasa de contaminación del material juvenil de microestacas fue significativamente inferior, 10% a la del material adulto, 80-90%, lo que indica que es recomendable el uso de material vegetativo propagado mediante estacas como fuente de explantes de esta especie.

La selección del explante es muy importante ya que de este depende también la respuesta *in vitro*; mientras más joven sea la planta de la que se extrae el material vegetal mejor será la respuesta, principalmente debido a que tiene zonas de crecimiento más activas que una planta adulta (Guamán Carrasco, 2018).

Cuando se utiliza como explante primario para iniciar un proceso de micropropagación, el ápice meristemático es eficaz porque permite un crecimiento rápido cuando se cultiva en el

medio adecuado y facilita la obtención de plántulas libres de contaminantes endógenos para la fase de multiplicación (Sigarroa-Rieche y García-Delgado, 2011).

2.7 Importancia del sauce en un sistema agroforestal

Especies como el sauce resultan de gran importancia por su contribución al equilibrio del ecosistema, permitiendo de esta forma seguir preservando territorio natural de gran valor para el Ecuador y para el Azuay, en un sistema agroforestal como el del Azuay una especie como el sauce tiene gran importancia como lo demuestra Muñoz Tello y Vásquez Córdova (2020). Según el estudio se considera a las especies más dominantes *Eucalyptus citriodora*, Hook 35,04%, y, *Salix humboldtiana* Willd. 10,74%, representando un 45,70% en el índice de valor de importancia IVI.

Los sauces son de crecimiento rápido y fácil propagación vegetativa, comprenden una gama diversa de productos manufacturados, no manufacturados y de servicios, y desempeñan un papel clave en la recuperación de tierras degradadas y la rehabilitación de ecosistemas frágiles, así como en la restauración del paisaje forestal. Esta capacidad fitorremediadora podría utilizarse para recuperar suelos contaminados. Si se demuestra que *S. humboldtiana* tiene la capacidad de reparar defectos, podría utilizarse para repoblar zonas afectadas (Adema et al., 2022).

2.8 Ecología del sauce

2.8.1 Clima

Es común en valles aluviales y llanuras de terrenos bajos, junto a ríos, estuarios y lagos. Se encuentran solos o en pequeños grupos asociada al matorral típico ribereño así mismo en suelos húmedos, con textura arenosa, y tolera periódicas inundaciones (Neyra Velazco, 2015).

El sauce tiende a encontrarse a una altura aproximada de 2500 msnm en bosques tropicales bajo la influencia de varios factores, como la abundancia de neblina, humedad y precipitaciones; la menor disponibilidad de luz, las pendientes empinadas y los frecuentes deslizamientos naturales, contribuye a la formación de un mosaico de tipos de vegetación, con características microclimáticas, edafológicas y de relieve muy diferentes (Muñoz, 2017).

2.9.2 Fauna y Flora

En la zona de Santa Ana de los Ríos de Cuenca, debido a la geomorfología de los lugares donde se cruzan los ríos y quebradas, el bosque de ribera cubre una franja muy amplia, y los bordes de los ríos u orillas se asemejan generalmente a la vegetación autóctona. Esta franja ha sido completamente destruida en varios lugares y muy modificada en otros. Sin embargo, aún quedan pequeñas manchas de vegetación autóctona que sirven de refugio a las numerosas especies vegetales y animales que componían este ecosistema (Minga Ochoa & Verdugo Navas, 2016).

Según un estudio ecológico de la vegetación de ribera en la cuenca del río Yanuncay, la mayor parte de la vegetación original ha sido destruida, quedando sólo algunos remanentes de especies nativas como *Myrsine andina*, *Maytenus verticillata*, *Myrrhinium atropurpureum* y *Phyllanthus salviifolius*; mientras que la mayor parte de este ecosistema ha sido sustituido por

plantas exóticas como *Eucalyptus globulus*, *Salix humboldtiana* y *Pennisetum clandestinum* (Minga Ochoa & Verdugo Navas, 2016).

2.10 Regeneración natural del sauce

La regeneración natural es una característica importante en los bosques tropicales de montaña para garantizar la sostenibilidad de los recursos florísticos a lo largo del tiempo (Muñoz, 2017), es un proceso en el que influyen diversos factores ambientales, como la composición del suelo, la vegetación asociada, las propiedades físicas y la interdependencia esto da lugar a variaciones significativas en el número de caminos regenerados entre dos zonas (Rodríguez García et al., 2007).

La regeneración del sauce se basa únicamente en la reproducción sexual. Se han dedicado grandes esfuerzos a la propagación vegetativa de la especie, con muy poco éxito hasta la fecha. En general, no se pueden crear clones de árboles, ya que proceden de material juvenil. Actualmente, la línea de investigación más prometedora se basa en la embriogénesis somática a partir de embriones inmaduros, más relacionada con las aplicaciones biotecnológicas que utilizan métodos tradicionales de mejora forestal (Neyra Velazco, 2015).

2.11 Micropropagación de especies

La micropropagación permite reproducir miles de plantas por metro cuadrado y tiene la ventaja de que si la planta parental está sana, todas las plantas que crecen a partir de ella también lo están, (*Micropropagación in vitro de rosa rosa sp. a partir de yemas axilares y respuesta callogénica* / *REVISTA DE LA ASOCIACION COLOMBIANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS*, 2022). Las especies amenazadas son especialmente vulnerables a la extinción. En estas circunstancias, es necesario adoptar métodos de propagación eficaces que permitan conservar

y mantener las poblaciones naturales (Coronado *et al.*, 2021). La multiplicación *in vitro*, combinada con una cuidadosa selección del material parental, permite disponer de plantas con excelentes condiciones agronómicas y fitosanitarias para la conservación de la especie (Medina *et al.*, 2015).

De acuerdo a Borges García y colaboradores (2009), el explante más comúnmente utilizado en los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas de plantas. Los frascos que contienen las plantas se alojan en ambientes con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde la temperatura se fija entre 21 y 23 °C y se controla el número de horas de luz.

2.12 Etapas de la micropropagación

2.12.1 Fase 0: selección del material vegetal

Esta fase engloba dos elementos esenciales: la elección adecuada de las especies y el procesamiento previo de la planta progenitora. La identificación taxonómica precisa de la especie, accesión, cultivar o variedad necesaria para su establecimiento se conoce como selección. El explante, que constituye el material vegetal inicial y puede ser cualquier parte de la planta, proviene de una planta élite cuidadosamente seleccionada. Para asegurar la pureza, la planta madre se somete a un tratamiento previo mediante el cultivo en cuarentena, bajo condiciones higiénicas estrictas, con el fin de reducir al mínimo el riesgo de contaminación (Bello-Bello *et al.*, 2023).

Los explantes deben contar con un nivel nutritivo y un grado de desarrollo apropiado para permitir el cultivo en condiciones asépticas. Se sugiere que las plantas donantes de yemas, es decir, las plantas madre, sean mantenidas en un invernadero con condiciones controladas

durante un periodo que varíe entre unas semanas y varios meses, a fin de obtener explantes con el nivel nutritivo y el desarrollo adecuado (Eras-Guamán et al., 2019).

2.12.2 Fase I: establecimiento

El explante elegido se somete a un procedimiento de descontaminación superficial que implica la aplicación de varios agentes desinfectantes, como bactericidas y fungicidas, destacando el hipoclorito de calcio o de sodio. Al final del proceso de desinfección, el explante se traslada a una cámara de flujo laminar para permitir su desarrollo en un entorno de cultivo estéril en condiciones estrictamente estériles (Jones-Castro, 2006).

El objetivo del establecimiento *in vitro* es obtener un entorno libre de contaminantes donde las plántulas se colocan en un medio con una composición química diseñada para su crecimiento y desarrollo. El resultado es disponer de plantas fuertes para el proceso de propagación (Orozco, 2012).

2.12.3 Fase II: multiplicación

Se espera que, durante la fase de multiplicación, los supervivientes de las fases de desinfección y establecimiento produzcan periódicamente nuevas crías por división y resiembra tras ser cultivados en un nuevo medio con auxinas y citoquininas (Remache Yumi, 2012).

Esta etapa puede producirse de tres formas: crecimiento y proliferación de meristemas extirpados de brotes apicales y axilares de la planta madre, inducción y multiplicación de meristemas adventicios mediante organogénesis o embriogénesis somática, o directamente en explantes derivados de órganos, tejidos, células (Flores Alcántara, 2016).

2.12.4 Fase III: elongación y enraizamiento

Los brotes producidos durante la fase de multiplicación desarrollan un sistema radicular y alcanzan una altura suficiente para ser trasladados a un sustrato en condiciones de invernadero para su control climático (Bello-Bello et al., 2023).

Los brotes o plántulas se desarrollan para poder realizar la fotosíntesis y sobrevivir sin una fuente artificial de carbohidratos. Las especies generan raíces adventicias en los brotes durante la etapa III, por lo que se requieren medios específicos u otros procedimientos para estimular la formación de raíces para enraizarlos *in vitro* antes del trasplante al suelo (Flores Alcántara, 2016).

2.12.5 Fase IV: aclimatización

La aclimatación tiene por objeto lograr la supervivencia de las plantas tras el trasplante, ya que en esta fase las plantas pasan de un modo de nutrición heterótrofo a otro autótrofo, sintetizando compuestos orgánicos y estimulando las adaptaciones fisiológicas y morfológicas necesarias para controlar la pérdida de agua, lo que determina la susceptibilidad en la fase de aclimatación (Chavarria Castillo & López Montenegro, 2010).

2.13 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de plantas es un método biotecnológico que permite a las células, tejidos y órganos vegetales crecer y desarrollarse fuera de su hábitat natural en un entorno controlado. Consiste en colocar material vegetal, como células o explantes, en un medio de cultivo rico en nutrientes y agentes de crecimiento para favorecer el crecimiento y desarrollo continuos del material (Norouzi et al., 2022).

La base del cultivo *in vitro* es la "totipotencialidad celular", es decir, la capacidad de una célula vegetal para convertirse en una nueva planta. El uso de meristemas como punto de partida es un método para beneficiarse de esta característica, ya que este conjunto de células origina todos los componentes estructurales de una planta (Ureta Ponce, 2016).

Entre las ventajas de la propagación *in vitro* se incluye la capacidad de producir plantas en masa gracias al cultivo *in vitro*, que permite un rápido crecimiento de las plantas. Cambiando las condiciones de crecimiento y los niveles hormonales de los medios de cultivo, es posible estimular la brotación de plántulas a partir de una pequeña cantidad de tejido vegetal. Esto permite producir un gran número de plantas con características deseables, como resistencia a las enfermedades o mayor rendimiento (Monoclonal Antibodies, 1999).

2.14 Componentes de un cultivo *in vitro*

2.14.1 Medio de cultivo

Un medio de cultivo *in vitro* es una solución o material utilizado en los laboratorios para estimular el crecimiento y desarrollo de células o tejidos fuera de su entorno nativo. Este medio contiene nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes necesarios para la supervivencia y reproducción de células o tejidos. El contenido del medio de cultivo puede variar en función del tipo de células o tejidos que se cultiven y de los objetivos del experimento o estudio.

Se pueden encontrar diversas categorías de medios de cultivo, tales como los medios de selección que estimulan el desarrollo de organismos que responden favorablemente a sustancias específicas, los medios de identificación que emiten señales revelando atributos particulares, los medios esenciales que proveen los nutrientes necesarios para el crecimiento,

y los medios de conservación que posibilitan la prolongación de la supervivencia de los organismos a lo largo del tiempo sin causarles perjuicio, lo que resulta en la extensión de su preservación (Tonato Muzo, 2021).

2.14.2 Medio Murashige y Skoog MS

El medio MS, originalmente diseñado en 1962 para el cultivo de callos de tabaco, se utiliza en la actualidad como un medio fundamental para el cultivo de plantas de valor tanto en la alimentación como en la ornamentación.

Ha demostrado ser eficaz en la germinación y desarrollo de diversas especies vegetales, gracias a su rica composición de sales inorgánicas, carbohidratos y aminoácidos, que proporcionan la cantidad necesaria de nitrógeno y potasio para la nutrición de las plantas (Mercado y Cancino, 2012).

2.14.3 Reguladores de crecimiento

La adición de reguladores del crecimiento a los medios de cultivo es necesaria para el desarrollo óptimo de una especie vegetal en cultivo *in vitro*. Los medios de cultivo deben complementarse con reguladores del crecimiento. Las fitohormonas son moléculas químicas que provocan una respuesta fisiológica. Las auxinas, las citoquininas y las giberelinas son algunos de los reguladores más importantes (Carrasco, 2018).

2.14.3.1 Auxinas

Auxina, término que deriva de la palabra griega que significa "crecer", fue acuñado por Kögl y Haagen-Smith unos años después al investigar una sustancia promotora de crecimiento vegetal presente en la orina humana, pero con una estructura diferente a la hormona vegetal. Posteriormente, la hormona vegetal fue aislada tanto del maíz como de hongos, identificándose finalmente como ácido indol-3-acético. Las auxinas son conocidas por inducir el alargamiento celular y la expansión de tejidos, así como la división celular {desarrollo de callos} y la generación de raíces adventicias, además de suprimir la formación de brotes axilares. En cultivos en suspensión, se observa comúnmente embriogénesis y formación de brotes adventicios. No obstante, debido a su potencial para causar mutaciones, se recomienda restringir al máximo su uso (Loya Navarrete, 2014).

Las auxinas constituyen un grupo de hormonas vegetales naturales que desempeñan un papel crucial en la regulación de diversos aspectos del desarrollo y crecimiento de las plantas. La forma predominante en las plantas es el ácido indolacético (IAA), altamente activo en bioensayos y presente en concentraciones nanomolares de manera común. Otras formas naturales de auxinas incluyen el ácido 4-cloro-indolacético (4-CIIAA), ácido fenilacético (PAA), ácido indol butírico (IBA) y ácido indol propiónico (Jordán y Casaretto, 2006).

2.14.3.2 Citoquininas

Las citoquininas naturales desempeñan un papel crucial en el proceso de crecimiento y desarrollo de las plantas, dado que poseen la capacidad de inducir el crecimiento de nuevos brotes en distintos tejidos vegetales. Este fenómeno tiene lugar a medida que las citoquininas se desplazan desde las regiones de crecimiento de las raíces a través del sistema vascular,

distribuyéndose de manera uniforme por toda la planta. La acumulación de estas sustancias en diversas partes de la planta inhibe la dominancia del brote terminal en los meristemas apicales del tallo, generando así un estímulo propicio para la formación de múltiples brotes laterales (Álvarez Acuña y Pozo Cruz, 2021).

2.14.3.3 Giberelinas

Las giberelinas {GAs} constituyen un grupo de hormonas de crecimiento diterpenoides tetracíclicos que desempeñan un papel crucial en diversos procesos de desarrollo en plantas. Este compuesto bioactivo fue inicialmente aislado del hongo *Gibberella fujikoro*i por Eichi Kurosawa en 1926, siendo denominado posteriormente "giberelina". El impacto observado en las plantas afectadas por este hongo se tradujo en un significativo aumento en la altura, aunque acompañado de una marcada disminución en la producción de granos. El incremento en el crecimiento se atribuyó al elevado contenido de este factor de crecimiento generado como respuesta al ataque fúngico (Jordán y Casaretto, 2006).

Las giberelinas están estrechamente vinculadas a la proliferación de las células madre, este fenómeno se atribuye a su capacidad para estimular la elongación celular y potenciar la extensibilidad de la pared celular. La primera giberelina identificada fue el ácido giberélico {AG3}, una hormona que propicia la elongación de los entrenudos, así como el crecimiento de los meristemas o yemas (Carrasco, 2018).

Otro efecto interesante de la giberelina es que favorece la juventud de los árboles jóvenes, haciendo que florezcan antes de lo esperado. R.P. Pharis, físico canadiense, ha investigado ampliamente este fenómeno, que ha demostrado ser extremadamente beneficioso en la hibridación de árboles al acortar los ciclos generacionales en algunas especies forestales, (*Fisiología Vegetal (F.A. Squeo & L. Cardemil, eds.), s. f.*).

2.15 Variables que afectan al crecimiento de brotes

La desinfección de los explantes es fundamental para esta técnica, y la concentración del desinfectante puede ser determinante para su éxito (Díaz Lezcano *et al.*, 2016).

El cultivo *in vitro* de plantas es una técnica que requiere controles medioambientales extremadamente estrictos, tanto físicos como químicos, que deben controlarse y optimizarse. Entre los factores biológicos más importantes a considerar están: la composición del suelo, el pH, la temperatura, la humedad, la luz y el fotoperiodo. Se trata de factores críticos, cuyo control determina el crecimiento y el desarrollo de los tejidos vegetales (Loberant y Altman, 2010).

2.15.1 Contaminación

La contaminación microbiana es uno de los problemas más graves en la micropropagación global de especies vegetales, lo que provoca pérdidas masivas de material tanto en investigación como en micropropagación comercial. Puede haber dos orígenes: a) microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante {endófitos}, y, b) microorganismos introducidos durante la manipulación en laboratorio (Hernández & González, 2010).

Dicha contaminación se prolifera significativamente en gran medida por las plantas del campo, o viveros ya que están expuestas a una amplia gama de gérmenes que se encuentran en el aire, el suelo o incluso dentro de la propia planta. Estos microorganismos pueden propagarse rápidamente en el medio de cultivo porque contienen agua, azúcar y nutrientes beneficiosos para su crecimiento. Al establecer un cultivo, es importante evitar la presencia de

microorganismos, ya que pueden interferir en el crecimiento de la planta y liberar toxinas que podrían dañarla, (Soltero y colaboradores, 2013). Se destaca que los contaminantes pueden afectar negativamente a la calidad de las plantas propagadas y por ende siempre se debe plantear un buen tratamiento de desinfección ante esto.

Las bacterias son los contaminantes *in vitro* más comunes y causan graves problemas, ya que pueden ser simbióticas y difíciles de identificar y eliminar. Estos microorganismos son resistentes a los efectos de los esterilizantes de superficie y pueden ser intercelulares o intracelulares. Entre estos últimos se encuentran virus, viroides y varios géneros bacterianos como *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* (Hernández & González, 2010).

Capítulo 3

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se presenta un análisis detallado del nivel de investigación y el diseño metodológico empleado, que incluye la identificación y especificación de las variables del estudio, así como sus respectivos tratamientos. Este enfoque investigativo tiene como objetivo principal proporcionar una base sólida para discernir de manera efectiva el tratamiento de desinfección óptimo en el proceso de micropropagación de la especie *Salix humboldtiana* Willd., la cual forma parte integral de la flora que caracteriza el ecosistema del bosque andino en la provincia del Azuay. La exhaustividad de este estudio no solo amplía el entendimiento de las prácticas de desinfección en la micropropagación de dicha especie, sino que también contribuye al conocimiento general sobre la conservación y manejo sostenible de los recursos naturales en el contexto específico del bosque andino en la región.

3.1 Materiales

3.1.1 Ubicación

El estudio se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Politécnica Salesiana, en la provincia de Azuay, cantón Cuenca.

Figura 1

Ubicación del Laboratorio de Biotecnología vegetal de la Universidad Politécnica Salesiana



Fuente: Google Maps

3.1.2 Materiales de laboratorio

- Vasos de precipitación
- Mecheros
- Probeta
- Matraz Erlenmeyer
- Tubos de ensayo
- Frascos de vidrio
- Cajas Petri
- Pinzas
- Bisturí
- Servilletas
- Plástico
- Papel aluminio
- Mascarilla
- Cofia

3.1.3 Equipos

- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Balanza analítica
- Plancha de calentamiento
- Agitador magnético
- pH- metro

3.1.4 Reactivos

- Medio Murashige Skoog (MS)
- Bencilamino purina (BAP)
- Ácido giberélico (GA3)
- Alcohol 70% - 96%
- Agua oxigenada 20%

3.2 Nivel de investigación

Establecer un protocolo de desinfección eficaz frente a explantes de *Salix humboldtiana*, tomando en cuenta las variables independientes como lo son concentraciones de desinfectantes y reguladores hormonales, con la finalidad de observar los resultados y determinar así la eficacia de dichos protocolos.

3.3 Diseño de investigación

Este estudio emplea un diseño experimental debido a los estímulos a los que se someten las variables independientes para la investigación de los efectos creados sobre la variable dependiente.

3.4 Unidad experimental UE

Según Contreras Cruz (2023), la unidad experimental es aquella a la cual se le aplican los tratamientos, en este caso, la unidad experimental para el control y la erradicación de infecciones será un tubo de ensayo con un explante incrustado en un medio de cultivo de composición química definida, las cuales constan de un total de 90 unidades experimentales, seis UE por los cinco tratamientos, todos con tres réplicas.

3.5 Variables

Las variables tanto dependientes como independientes consideradas en la micropropagación del sauce criollo se describen en la tabla 2.

Tabla 2

Tipos de variables a estudiar

Variables independientes	
Concentración de hipoclorito de sodio	NaClO 8% v/v
Concentración de agua oxigenada	H ₂ O ₂ 20% v/v
Concentración de hormona AG3	AG3 (2 mg/L), AG3 (5 mg/L)
ConcentracIón de hormona BAP	BAP (2.5 mg/L), BAP (4 mg/L)
Variables dependientes	Desarrollo de explantes viables sin la presencia de contaminación.

Elaborado por: los autores

3.6 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La técnica empleada será de observación cuantitativa para recoger datos que se someterán a análisis estadísticos y numéricos para identificar patrones y tendencias asociadas a la contaminación y propagación *in vitro*, el uso de instrumentos permitirá contemplar datos precisos con cámara fotográfica, libreta de notas, tablas de Excel.

3.7 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Para el procesamiento de datos se utilizó tanto gráficos como tablas, que facilitaron la interpretación de los resultados obtenidos, y para el análisis estadístico se aplicó el test de normalidad Shapiro-Wilk, para establecer después, una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, para verificar cuál de los tratamientos evaluados es más eficiente. Finalmente se realizaron pruebas *post-hoc* con el fin de determinar diferencias significativas entre los tratamientos.

3.8 Metodología

3.8.1 Preparación de medios de cultivo

Se elaboró los medios de cultivo usando la siguiente tabla de cálculo como referencia para preparar 1000 mL.

Tabla 3

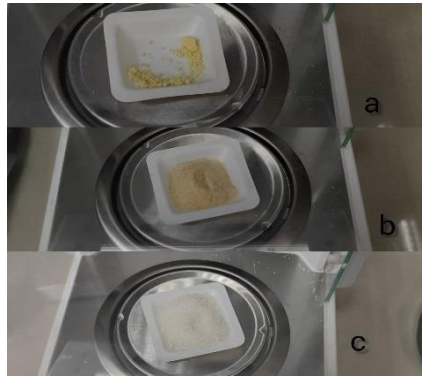
Cantidades para preparar medio de cultivo para micropropagación in vitro

Componentes	g/L
Sacarosa	30
Medio MS	4.44
Agar	7

Elaborado por: los autores

Figura 2

Pesaje de los componentes para la preparación de medio de cultivo



Nota. a) Sal MS con vitaminas Gamborg, b) Agar, c) Sacarosa

Elaborado por: los autores

En primer lugar, se llevaron a cabo las mediciones de los componentes detallados en la Tabla 3, según el volumen deseado para la preparación. Posteriormente, se vertieron la sacarosa y las sales MS con vitaminas Gamborg en un matraz de Erlenmeyer, ajustándose al volumen medio necesario. Se disolvieron de manera homogénea y se midió el pH, el cual se ajustó a un rango de 5.9 a 6. Una vez logrado el ajuste de pH, se procedió a la incorporación del agar y se llevó la mezcla a punto de ebullición.

Para el tratamiento de control o T0, no fue necesario aplicar una concentración hormonal.

En el caso de los tratamientos 1, 2, 3 y 4, se añadieron las cantidades correspondientes de hormonas al medio. Cabe destacar que los tratamientos 1 y 3, así como los tratamientos 2 y 4, poseían la misma concentración hormonal. Por lo tanto, el medio restante se dividió en dos partes, conforme se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4

Concentración hormonal usada para los tratamientos 0, 1, 2, 3, 4

Hormona	Tratamiento 0	Tratamiento 1 y 3	Tratamiento 2 y 4
AG3	-	5 mg/L	4 mg/L
BAP	-	2 mg/L	2.5 mg/L

Elaborado por: los autores

En última instancia, los medios fueron tapados y transferidos a la autoclave, donde se sometieron a un proceso de esterilización a través de un aumento gradual de temperatura hasta alcanzar los 120 °C a 1 atm de presión controlada.

El envasado se realizó en la cámara de flujo laminar, con tubos de ensayo estériles específicos, cada uno equipado con una tapa correspondiente. En cada tubo se dispusieron aproximadamente 10 mL de medio. Posteriormente, se cerraron herméticamente y se aplicó una cinta *film* alrededor de la tapa para asegurar un sellado adecuado. Luego, se permitió que los tubos enfriaran, facilitando así la gelificación del medio contenido en su interior. Este procedimiento se realizó bajo condiciones controladas para mantener la esterilidad del medio y garantizar la integridad del envasado.

Finalmente, los tubos se rotularon y colocaron en una bolsa Ziploc, almacenada en el refrigerador. Como medida preventiva contra contaminaciones no deseadas, se aplicó amonio cuaternario al 1% sobre los tubos antes de su almacenamiento. Este proceso garantiza la preservación de las condiciones estériles de los tubos, contribuyendo a mantener la integridad de los contenidos almacenados y asegurando la calidad del material para su uso futuro.

3.8.2 Recolección de explantes

Para la obtención de las yemas axilares de *Salix humboldtiana* Willd., se empleó un espécimen juvenil, con el propósito de garantizar una mayor eficiencia en la absorción de nutrientes. Las

ramas seleccionadas para la obtención de los explantes fueron tomadas de la porción apical del sauce, con el fin de minimizar la posibilidad de contaminación excesiva en las muestras.

Figura 3

Planta madre de cual se extrajeron los explantes



Elaborado por: los autores

Este procedimiento se llevó a cabo 24 horas antes del proceso de siembra, realizando cortes transversales en las ramas para identificar y seleccionar las yemas axilares más apropiadas. Estas yemas fueron posteriormente tratadas con etanol al 70% y almacenadas en agua destilada hasta el momento de la siembra, asegurando así condiciones óptimas para la posterior propagación de la especie.

Figura 4

Almacenamiento de los explantes en agua destilada



Elaborado por: los autores

3.8.3 Protocolo 1 de desinfección

En el marco del primer protocolo de desinfección, se llevaron a cabo diluciones de los agentes desinfectantes primarios contenidos en el sistema. Estas diluciones se aplicaron mediante diversos lavados, utilizando Tween 80 durante un lapso de 5 minutos, alcohol al 70% durante 2 minutos, y, finalmente, un lavado con hipoclorito de sodio al 8% v/v durante 8 minutos. Es imperativo señalar que, como parte integral de cada fase de lavado, se efectuaron tres enjuagues consecutivos, cada uno con una duración de 1 minuto. En su conjunto, el protocolo uno demanda un tiempo total de 24 minutos, permitiendo así una limpieza profunda a los explantes sometidos a este protocolo.

Figura 5

Proceso de desinfección del protocolo 1



Elaborado por: los autores

3.8.4 Protocolo 2 de desinfección

En el contexto del segundo protocolo de desinfección, se ejecutaron diluciones de los agentes desinfectantes primordiales contenidos en el sistema. Estas diluciones fueron aplicadas mediante distintos lavados, utilizando Tween 80 durante un periodo de 5 minutos, alcohol al 70% durante 2 minutos, y, como variante respecto al primer protocolo, un lavado con agua oxigenada al 20% durante 10 minutos. Como componente esencial de cada fase de lavado, se realizaron tres enjuagues sucesivos, cada uno de 1 minuto. En su conjunto, el protocolo dos requiere un tiempo total de 24 minutos.

Figura 6
Proceso de desinfección del protocolo 2



Elaborado por: los autores

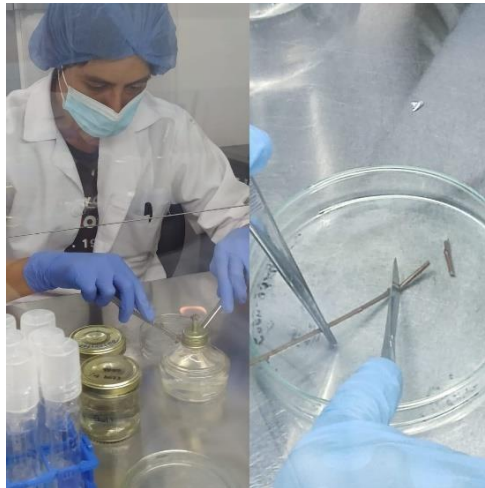
3.8.5 Siembra de explantes

La siembra de explantes se llevó a cabo al término de los protocolos de desinfección, en estricta conformidad con las buenas prácticas de laboratorio. Dentro de la cámara de flujo laminar, se dispusieron los explantes en cajas Petri previamente autoclavadas con el propósito de minimizar cualquier potencial daño al material durante el proceso de desinfección. Tras

concluir los recortes necesarios, se procedió a la identificación de los polos apicales de cada explante con el fin de prevenir el crecimiento inadecuado de los brotes.

Figura 7

Proceso de disección de explantes para minimizar posibles daños en el tejido

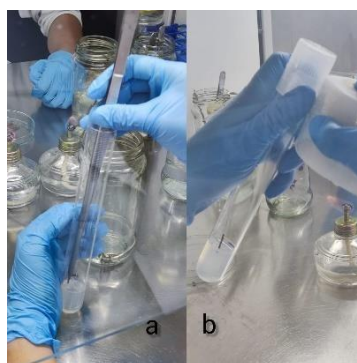


Elaborado por: los autores

En el proceso de siembra, se emplearon pinzas largas para ubicar cada explante en los tubos que contenían medio de cultivo y diversas concentraciones hormonales. Posterior a cada siembra, las pinzas fueron sumergidas en alcohol al 96%, y el tubo que albergaba el explante fue sellado con cinta para impedir la exposición a microorganismos. Este riguroso procedimiento garantiza la integridad y viabilidad de los explantes durante el crucial proceso de siembra.

Figura 8

Proceso de siembra de explantes y sellado film libre de contaminación



Nota. a) uso de pinzas metálicas para el proceso de siembra, b) sellado con *film*

Elaborado por: los autores

Cabe destacar que el proceso de siembra se rigió en base distintos tratamientos que permiten determinar cuál de los mismos es favorable para una mayor viabilidad de los explantes, considerando que se realizó tres replicas y por cada una de ellas se sembraron treinta explantes, seis explantes por cada tratamiento como lo muestra la Tabla 5.

Tabla 5

Tratamientos asignados al estudio para el establecimiento del cultivo in vitro.

Tratamientos	Descripción	
	Desinfectantes	Reguladores hormonales
T0	-	-
T1	Tween 80 (5 min) + alcohol al 70% (1 min) + NaClO 8% v/v (8 min).	BAP 2 mg/L; AG3 5 mg/L; pH 5.8
T2	Tween 80 (5 min) + alcohol al 70% (1 min) + NaClO 8% v/v (8 min).	BAP 2.5 mg/L; AG3 4 mg/L; pH 5.8
T3	Tween 80 (5 min) + alcohol al 70% (1 min) + H2O2 20% v/v (10 min).	BAP 2 mg/L; AG3 5 mg/L; pH 5.8
T4	Tween 80 (5 min) + alcohol al 70% (1 min) + H2O2 20% v/v (10 min).	BAP 2.5 mg/L; AG3 4 mg/L; pH 5.8

Elaborado por: los autores

3.8.6 Cámara de crecimiento

La fase de crecimiento vegetal y aclimatación se llevó a cabo en una cámara de crecimiento, mantenida a una temperatura controlada de 20 °C - 25 °C, con una humedad relativa del 60%, y un ciclo de iluminación de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de oscuridad.

3.9 Diseño experimental

3.9.1 Establecimiento de los explantes de *Salix humboldtiana* Willd.

En esta etapa se evaluará el efecto producido en el nivel de contaminación y viabilidad de los explantes sometidos a una variación de la concentración de hipoclorito de sodio y agua oxigenada con alcohol al 70%, los datos fueron evaluados mediante un diseño completamente al azar {DCA} con tres réplicas.

Figura 9
Diseño completamente al azar

Experimentos	Tratamientos			Replicas	%Contaminación UE						T	%Viabilidad UE						T
	T	D	H		1	2	3	4	5	6		-	-	-	-	-	-	
1	T0	-	-	1	1	2	3	4	5	6	-	-	-	-	-	-	-	
2	T1	A	X	1	1	2	3	4	5	6	-	-	-	-	-	-	-	
3	T2	A	Y	1	1	2	3	4	5	6	-	-	-	-	-	-	-	
4	T3	B	X	1	1	2	3	4	5	6	-	-	-	-	-	-	-	
5	T4	B	Y	1	1	2	3	4	5	6	-	-	-	-	-	-	-	
6	T0	-	-	2	1	2	3	4	5	6	-	-	-	-	-	-	-	
7	T1	A	X	2	1	2	3	4	5	6	-	-	-	-	-	-	-	
8	T2	A	Y	2	1	2	3	4	5	6	-	-	-	-	-	-	-	
9	T3	B	X	2	1	2	3	4	5	6	-	-	-	-	-	-	-	
10	T4	B	Y	2	1	2	3	4	5	6	-	-	-	-	-	-	-	
11	T0	-	-	3	1	2	3	4	5	6	-	-	-	-	-	-	-	
12	T1	A	X	3	1	2	3	4	5	6	-	-	-	-	-	-	-	
13	T2	A	Y	3	1	2	3	4	5	6	-	-	-	-	-	-	-	
14	T3	B	X	3	1	2	3	4	5	6	-	-	-	-	-	-	-	
15	T4	B	Y	3	1	2	3	4	5	6	-	-	-	-	-	-	-	

Nota: la variable 'D' denota el desinfectante utilizado en cada tratamiento de desinfección, donde 'A' se refiere al hipoclorito de sodio al 8% v/v, y 'B' corresponde a agua oxigenada al 20%. La variable 'H' representa la concentración hormonal empleada en la micropropagación. En este contexto, 'X' se asocia con la combinación de BAP a 2 mg/L y AG3 a 5 mg/L, mientras que 'Y' corresponde a la combinación de BAP a 2.5 mg/L y AG3 a 4 mg/L.

Elaborado por: los autores

3.9.2 Porcentaje de contaminación

El porcentaje de contaminación se calculará mediante observaciones frecuentes de los tratamientos desde el día de cultivo hasta 15 días después, y se determinará si la contaminación

estaba causada por bacterias o por hongos. Para la evaluación de contaminación se utilizará la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de contaminación} = \frac{\# \text{ de explantes contaminados}}{\text{total de explantes}} * 100$$

3.9.3 Porcentaje de necrosis

El porcentaje de necrosis se determinará contando los explantes establecidos sin éxito desde el día de la siembra hasta 25 días después y se calculará mediante la fórmula:

$$\% \text{ de necrosis} = \frac{\# \text{ de explantes necrosados}}{\text{total de explantes}} * 100$$

3.9.4 Porcentaje de viabilidad

El porcentaje de viabilidad se determinará contando los explantes establecidos con éxito desde el día de la siembra hasta 35 días después y se calculará mediante la fórmula:

$$\% \text{ de contaminación} = \frac{\# \text{ de explantes contaminados}}{\text{total de explantes}} * 100$$

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Etapa de desinfección de los explantes de *Salix humboldtiana* Willd.

En esta etapa, se propusieron cuatro tratamientos detallados en la Tabla 5. En ella se incluyó el T0 control, obtenido para evaluar la evolución de los explantes sin ningún tipo de tratamiento.

Las variables analizadas fueron la contaminación, necrosis y viabilidad. Los datos correspondientes a estas variables se obtuvieron a los 15, 25 y 35 días después del día de siembra, respectivamente.

En las Tablas 6, 7 y 8 se presentan los porcentajes obtenidos para cada variable en cada repetición, respectivamente, después de llevar a cabo la etapa de desinfección.

Tabla 6

Porcentaje obtenido en contaminación, viabilidad y necrosis en la primera repetición

Tratamientos	% Contaminación (15 días)	% Necrosis (25 días)	% Viabilidad (35 días)	Total
T0	100	0.00	0.00	100
T1	0.00	66.66	33.33	100
T2	0.00	33.33	66.66	100
T3	0.00	0.00	100	100
T4	33.33	0.00	66.66	100

Elaborado por: los autores

Tabla 7*Porcentaje obtenido en contaminación, viabilidad y necrosis en la segunda repetición*

Tratamientos	% Contaminación (15 días)	% Necrosis (25 días)	% Viabilidad (35 días)	Total
T0	100	0.00	0.00	100
T1	16.66	0.00	83.33	100
T2	0.00	0.00	100	100
T3	0.00	0.00	100	100
T4	16.66	66.66	16.66	100

Elaborado por: los autores**Tabla 8***Porcentaje obtenido en contaminación, viabilidad y necrosis en la tercera repetición*

Tratamientos	% Contaminación (15 días)	% Necrosis (25 días)	% Viabilidad (35 días)	Total
T0	100	0.00	0.00	100
T1	0.00	16.66	83.33	100
T2	0.00	33.33	66.66	100
T3	0.00	0.00	100	100
T4	0.00	0.00	100	100

Elaborado por: los autores

4.2 Evaluación de la eficiencia de los tratamientos

4.2.1 Pruebas de normalidad

Se determino la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos mediante el análisis de los datos porcentuales de cada variable: contaminación, viabilidad y necrosis. Estos datos fueron sometidos a pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk en conjunto con gráficas Q-Q normal, bajo las siguientes hipótesis.

- **Hipótesis Nula (H0):** los tratamientos siguen una distribución normal.
- **Hipótesis Alternativa (H1):** los tratamientos no siguen una distribución normal.

Tabla 9
Prueba Shapiro-Wilk

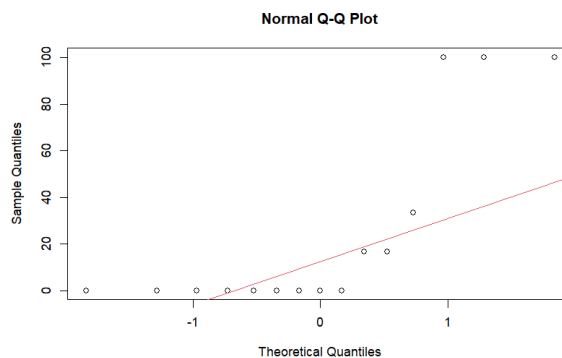
Variable	Hipótesis nula	Valor p	Resultado
Contaminación	Distribución normal	4.728e-05	Se rechaza la hipótesis nula
Necrosis	Distribución normal	7.491e-05	Se rechaza la hipótesis nula
Viabilidad	Distribución normal	0.004806	Se rechaza la hipótesis nula

Elaborado por: los autores

Los valores de p obtenidos en la tabla 8 para cada variable fueron inferiores al nivel de significancia establecido $\alpha=0.05$. Por consiguiente, existe evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula de normalidad. Además, la distribución anormal se confirmó mediante los gráficos Q-Q normal correspondientes a cada variable, como se muestra en las figuras 10, 11 y 12.

Figura 10

Gráfico Q-Q normal de contaminación donde se observan valores dispersos a la línea central

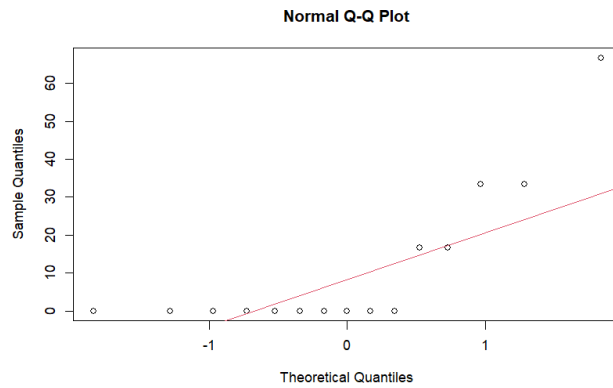


Elaborado por: los autores

Los datos recopilados sobre la variable de contaminación, presentados en las tablas 6, 7 y 8, se sometieron a una prueba de normalidad conocida como Q-Q normal. Según se puede observar en la figura 10, los datos no exhiben una distribución normal, ya que los puntos se encuentran significativamente alejados de la línea correspondiente a la distribución normal estándar.

Figura 11

Gráfico Q-Q normal de necrosis donde se observan valores dispersos a la línea central

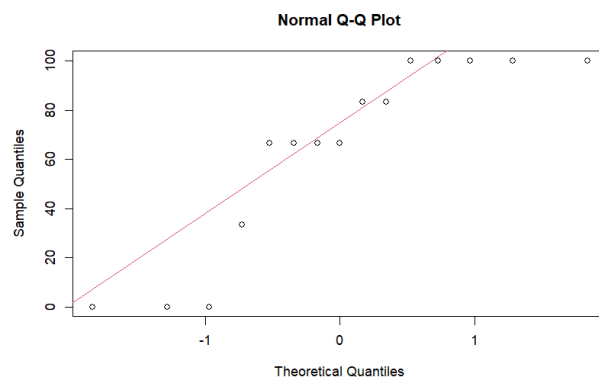


Elaborado por: los autores

Los datos recopilados sobre la variable de necrosis, presentados en las tablas 6, 7 y 8, se sometieron a una prueba de normalidad conocida como Q-Q normal. Según se puede observar en la figura 11, los datos no exhiben una distribución normal, ya que los puntos se encuentran significativamente alejados de la línea correspondiente a la distribución normal estándar.

Figura 12

Gráfico Q-Q normal de viabilidad donde se observan valores dispersos a la línea central



Elaborado por: los autores

Los datos recopilados sobre la variable de viabilidad, presentados en las tablas 6, 7 y 8, se sometieron a una prueba de normalidad conocida como Q-Q normal. Según se puede observar

en la figura 12, los datos no exhiben una distribución normal, ya que los puntos se encuentran significativamente alejados de la línea correspondiente a la distribución normal estándar.

4.2.2 Pruebas no paramétricas

Se optó por llevar a cabo un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis para investigar la presencia de diferencias significativas entre los tratamientos. Las hipótesis planteadas en base al valor de p de las variables son las siguientes:

- **Hipótesis Nula (H0):** no hay diferencias significativas entre al menos dos tratamientos.
- **Hipótesis Alternativa (H1):** existen diferencias significativas entre al menos dos tratamientos.

Tabla 10
Prueba Kruskal-Wallis

Variable	Hipótesis nula	Valor p	Resultado
Contaminación	No hay diferencias significativas	0.02709	Se rechaza la hipótesis nula
Necrosis	No hay diferencias significativas	0.2021	Se acepta la hipótesis nula
Viabilidad	No hay diferencias significativas	0.0418	Se rechaza la hipótesis nula

Elaborado por: los autores

Los resultados de la prueba Kruskal-Wallis muestran valores de $p < 0.05$ para las variables de contaminación y viabilidad, lo que sugiere evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula y concluir que existen diferencias significativas entre al menos dos tratamientos. Por otro lado, el valor de p para la variable de necrosis es > 0.05 , indicando que no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula y concluir que no existen diferencias significativas entre al menos dos tratamientos.

4.2.3 Pruebas *Post-Hoc*

Dados los resultados generados por la prueba Kruskal-Wallis, se decidió realizar un análisis Dunn con las variables que obtuvieron un valor de $p < 0.05$, contaminación y viabilidad, con el fin de determinar que tratamientos difieren entre sí.

Tabla 11

Análisis Dunn mediante el método Bonferroni aplicado en la variable de contaminación

Comparison of x by group (Bonferroni)				
	T0	T1	T2	T3
T1	2.226882 0.1298			
T2	2.796549 0.0258	0.569667 1.0000		
T3	2.796549 0.0258	0.569667 1.0000	0.000000 1.0000	
T4	1.501850 0.6657	-0.725031 1.0000	-1.294698 0.9771	-1.294698 0.9771

Elaborado por: los autores

El análisis Dunn realiza un ajuste al nivel de significancia establecido de $\alpha=0.05$ con el fin de controlar el error tipo I de manera más estricta. El nivel de significancia para esta prueba *post-hoc* es de $p= 0.025$. Según los resultados de la Tabla 11, no se observa ningún valor de p ajustado menor a 0.025 . Esto sugiere que, en la variable de contaminación, no existe evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, lo que significa que no hay diferencias significativas entre al menos dos tratamientos.

Tabla 12*Análisis Dunn mediante el método Bonferroni aplicado en la variable de viabilidad*

Comparison of x by group (Bonferroni)				
	T0	T1	T2	T3
T1	-1.602775 0.5449			
T2	-1.885618 0.2967	-0.282842 1.0000		
T3	-3.111269 0.0093*	-1.508494 0.6571	-1.225651 1.0000	
T4	-1.885618 0.2967	-0.282842 1.0000	0.000000 1.0000	1.225651 1.0000

Elaborado por: los autores

En la Tabla 12 referente a la variable viabilidad se puede observar que el T3 presenta un valor de $p= 0.0093^*$, siendo menor al nivel de significancia establecido, lo que indica que en la variable viabilidad se presenta evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, dando a entender que existen diferencias significativas entre al menos dos tratamientos, en nuestro caso T3 y T0.

4.3 Porcentaje de contaminación

La problemática de la contaminación microbiológica constituye un desafío significativo en el ámbito de la micropropagación de especies vegetales a nivel global. Esta situación conlleva importantes pérdidas tanto en la investigación como en las actividades comerciales asociadas. La contaminación microbiológica suele ser ocasionada por dos factores principales: la presencia de microorganismos que colonizan la superficie o el interior de un explante, denominados endófitos, y la introducción de microorganismos durante las manipulaciones en laboratorio (Hernández & González, 2010).

Los resultados obtenidos en las tres réplicas revelaron diferencias significativas en términos de contaminación. Se observó un rendimiento satisfactorio en los tratamientos T2 y T3, como se puede apreciar en la Figura 13, en comparación con los tratamientos T0, T1 y T4. Los

tratamientos favorables incluyeron la utilización de diversos desinfectantes, detallados en la Tabla 5, lo que contribuyó a evitar la proliferación de hongos y bacterias perjudiciales para el explante.

En relación al empleo de hipoclorito de sodio en el tratamiento, se observaron resultados contrastantes con los obtenidos por Adema et al. (2022). En su estudio, utilizaron un enjuague con hipoclorito de sodio comercial durante 20 minutos en yemas como material vegetal para micropropagación, lo que resultó en un 8% de contaminación. Además, todos los brotes cultivados *in vitro* se necrosaron al cabo de 40 días. En contraste, en nuestra investigación, el tratamiento T2 consistió en un enjuague con hipoclorito de sodio al 8% durante 8 minutos. Este enfoque logró reducir la contaminación al 0% y la necrosis de los explantes al 33.33%. Por lo tanto, se concluye que el uso de desinfectantes como el hipoclorito de sodio debe ser controlado, como lo indican Camacho et al. (2006). Es esencial encontrar un equilibrio entre la desinfección y la prevención de la oxidación, ya que métodos de desinfección demasiado efectivos podrían dañar los explantes.

De acuerdo a una investigación previa realizada por Guin-po y Gálvez (1998) sobre *Salix spp*, se logró alcanzar un nivel de descontaminación del 70% al sumergir las ramitas en una solución que combinaba fungicidas e hipoclorito de sodio al 10%, con tiempos de inmersión de 30 y 20 minutos respectivamente. Estos hallazgos generaron más coherencia a los resultados obtenidos en la presente investigación, cabe destacar que de igual manera hace hincapié en el tiempo de uso de un desinfectante ya que en ellos el uso de cloro comercial por un periodo superior a 30 minutos indujo necrosis.

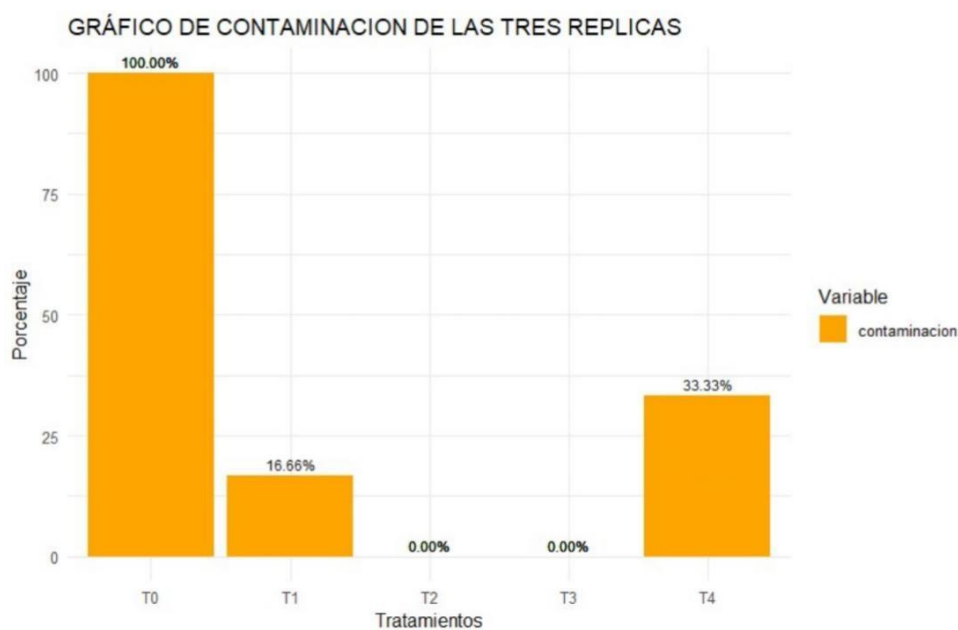
En los T3 y T4, se empleó un segundo agente desinfectante, el agua oxigenada o peróxido de hidrógeno. Este agente ha sido recientemente introducido en la desinfección, como resalta Ramos (2012), en contraste con otros desinfectantes como el hidróxido de sodio, el hidróxido

de calcio, el nitrato de plata o el cloro comercial. Se destaca que tanto los peróxidos como otros desinfectantes pueden actuar como bactericidas o bacteriostáticos. Esto se debe a que los peróxidos poseen una actividad antimicrobiana al oxidar los componentes celulares de los microorganismos tratados, según lo señalado por Tortora y colaboradores (2007).

El empleo del peróxido de hidrógeno en nuestros procedimientos ha resultado en la disminución de la contaminación, tal como evidencian los hallazgos de Pérez y Demetrio (2012). En su estudio, establecieron un método de desinfección utilizando una solución de H_2O_2 al 10% v/v en embriones cigóticos de *Abies guatemalensis*, lo que condujo a una reducción de la contaminación a un nivel del 0.28% después de 24 horas de inmersión. En comparación, nuestro T3 demostró una tasa de contaminación del 0%, mientras que el T4 presentó un nivel del 33.33%, como se observa en la Figura 13. Este aumento en la contaminación en el T4 podría atribuirse a una manipulación deficiente o a diferencias en el tiempo de exposición. No obstante, en cuanto al tiempo de desinfección con peróxido de hidrógeno, no se observaron diferencias significativas entre el T3 y T4.

Figura 13

Diagrama de barras de contaminación presente en las tres replicas



Elaborado por: los autores

4.4 Porcentaje de necrosis

La muerte del tejido vegetal puede ser originada por diversas causas. En el proceso de micropropagación, se extraen secciones de la planta madre para generar los explantes utilizados en la propagación. Si estas secciones no se desinfectan de manera adecuada, existe el riesgo de introducir patógenos, lo que puede provocar infecciones en los explantes y, por consiguiente, ocasionar la muerte del tejido. Además, condiciones de cultivo inapropiadas, como desequilibrios en la disponibilidad de nutrientes, variaciones hormonales o estrés ambiental, también pueden propiciar la aparición de la muerte del tejido durante el proceso de micropropagación de plantas (Rivera et al., 1999).

El fenómeno del ennegrecimiento se produce debido a la actividad de enzimas como las polifenoloxidasas y tirosinasas, las cuales se liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren lesiones o daños. Estas enzimas actúan sobre los polifenoles y la tirosina, oxidándolos y formando quinonas que son sustancias fitotóxicas. Estas sustancias, a su vez, pueden polimerizarse, afectar las proteínas y, en consecuencia, inhibir el crecimiento y la viabilidad de los explantes (Ramos, 2012).

Según los resultados obtenidos por Silva Pupo y colaboradores (2020), se destaca que el uso de hipoclorito de sodio al 2% durante 20 minutos no generó grandes afectaciones en los explantes por necrosis, dado que los valores obtenidos fueron inferiores al 8%. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, contrastando con los hallazgos de nuestra investigación, se evidencia que tanto el tratamiento T1 como el T3 presentan diferencias significativas, como se observan en la Figura 14.

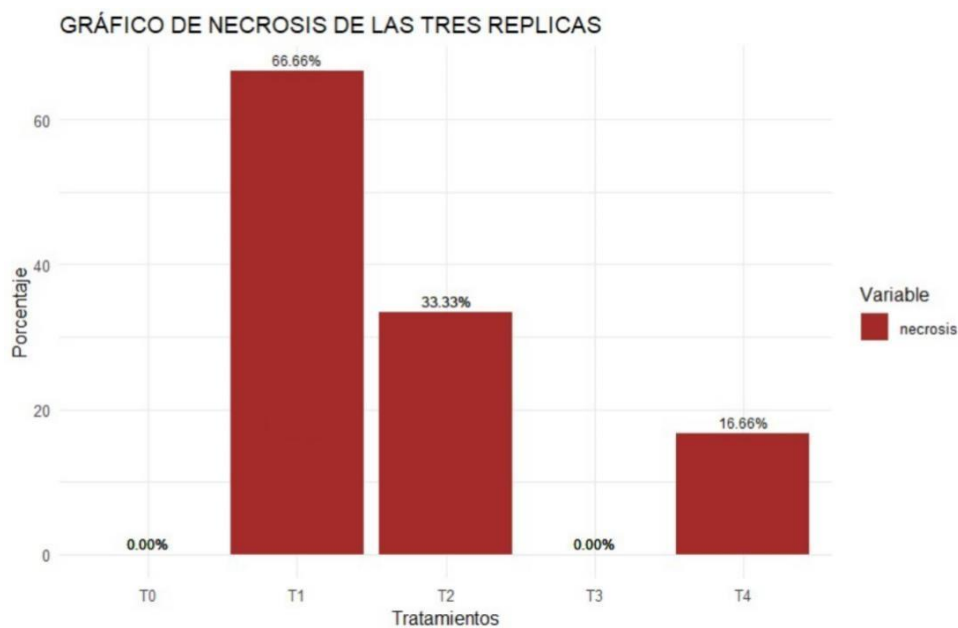
Estas disparidades podrían atribuirse a la concentración y tiempo de exposición al hipoclorito de sodio. En el T1, se aplicó una concentración del 8% durante 8 minutos, lo cual pudo haber

provocado un daño tisular o estrés en el explante, resultando en necrosis. En contraste, en el T3 se utilizó agua oxigenada al 20% durante 10 minutos, lo que condujo a un nivel de necrosis casi nulo al observado en los tratamientos T1 y T2.

En resumen, los resultados por Ramos Amaya y colaboradores (2012) y Silva Pupo y colaboradores (2020), sugieren que la concentración y el tiempo de exposición de los agentes desinfectantes tienen un impacto significativo en la viabilidad de los explantes, destacando la necesidad de evaluar cuidadosamente estas variables en futuros estudios y aplicaciones prácticas.

Figura 14

Diagrama de barras sobre necrosis presente en las tres replicas



Elaborado por: los autores

4.5 Porcentaje de viabilidad

Este estudio evaluó la eficacia de utilizar yemas axilares como material inicial para la micropropagación de *Salix humboldtiana*. Se encontró que las yemas axilares son altamente adecuadas para lograr una multiplicación rápida de las plantas, tal como destacó Ramos (2012). A diferencia de las yemas terminales, axilares y nudos, que se multiplican directamente, las

yemas axilares no requieren una fase intermedia de callo [masa de células indiferenciadas]. Este proceso directo conduce a la regeneración de plantas que son genéticamente estables.

Frente a esto, se debe tener en cuenta la importancia del tipo de explante a usar ya que se confiere de diferencias entre si como la asimilación de nutrientes o la capacidad de brotación, destacando estudios anteriores, se habla de la baja eficacia de micropropagación de *S. humboldtiana* (Paiva Neto et al., 1998). En la presente investigación se mejoró el proceso de micropropagación tomando en cuenta el medio MS teniendo en consideración trabajos relevantes como los obtenidos por Pereira (2012), donde habla sobre las sales MS que se usaron para el cultivo, dieron lugar a la brotación y a la inducción de raíces tanto de plantas adultas como de clones de *S. humboldtiana*.

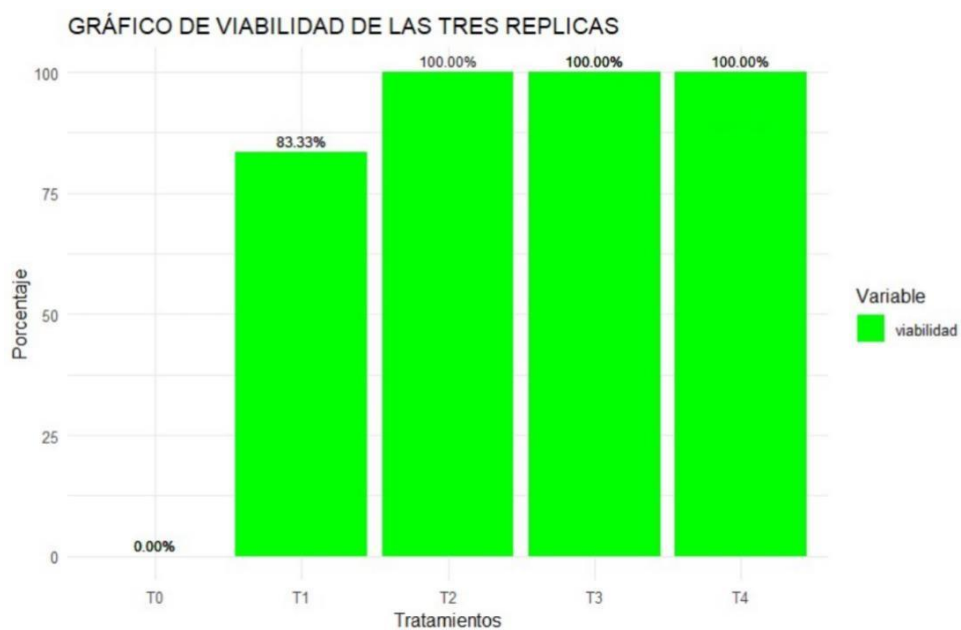
Uno de los factores que demostraron la viabilidad de los explantes fue la brotación de hojas a partir de las yemas, se obtuvieron unas medidas promedio de entre 7 – 10 mm a los 35 días de siembra siendo la formulación hormonal del tratamiento tres como se especifica en la Tabla 5, estudios preliminares demuestran el uso de 6-BAP y AG3, además del uso de AIA como el observado por Silva Pupo y colaboradores (2020), donde mediante el uso de segmentos nodales demostraron un crecimiento de entre 7.54 y 4.42 mm para todos los tratamientos, esto sugiere que la presencia de AG3 en una mayor proporción permite una mejora del crecimiento como lo sugiere el estudio de Chung Guin-po y Carrasco Gálvez (2020), donde se habla de que una concentración AG 3 { $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ } en presencia de $0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de 6-BAP, permite un desarrollo rápido y vigoroso en el 76% de los diferentes procedimientos de las especies estudiadas. Una característica más se vio reflejada, siendo esta la presencia de callos basales en el cultivo denotando viabilidad del mismo explante, la formación de callo se da a partir de la zona de corte de los explantes, que está en contacto directo con los reguladores del crecimiento que influyen en la acumulación de auxinas, estimulando una mitosis continua que

genera la formación de tejido calloso poco a poco hasta cubrir completamente el explante, (*Plant Tissue Culture - 3rd Edition*, s. f.).

La viabilidad que se obtuvo se refleja en la Figura 15, demostrando un 100% de viabilidad en los tratamientos dos, tres y cuatro y una disminución del mismo en el tratamiento uno, se destaca también que en los tratamientos dos y cuatro existieron explantes vivos pero con presencia de contaminación y en el tratamiento uno hubo la presencia de tejido necroso que limitó la viabilidad de los mismos, sugiriendo así que las concentraciones hormonales utilizadas para cada tratamiento no obtuvieron diferencias significativas frente a estudios previos (Xiaoxia et al., 2020).

Figura 15

Diagrama de barras sobre la viabilidad presente en las tres replicas.



Elaborado por: los autores

4.6 Análisis global de los tratamientos en micropropagación

Además de los métodos estadísticos, se llevó a cabo un análisis de las variables mediante la representación gráfica de un diagrama de barras. Este diagrama se basó en el porcentaje global de las variables de estudio, con el propósito de ofrecer una visualización más clara y comprensible de que tratamiento fue más efectivo en el proceso de micropropagación del sauce criollo.

Tabla 13

Porcentaje global de contaminación, necrosis y viabilidad presente en las tres replicas

Tratamiento	% Contaminación	% Necrosis	% Viabilidad
T0	100	0.00	0.00
T1	5.55	27.79	66.66
T2	0.00	22.22	77.77
T3	0.00	0.00	100
T4	16.66	5.55	77.77

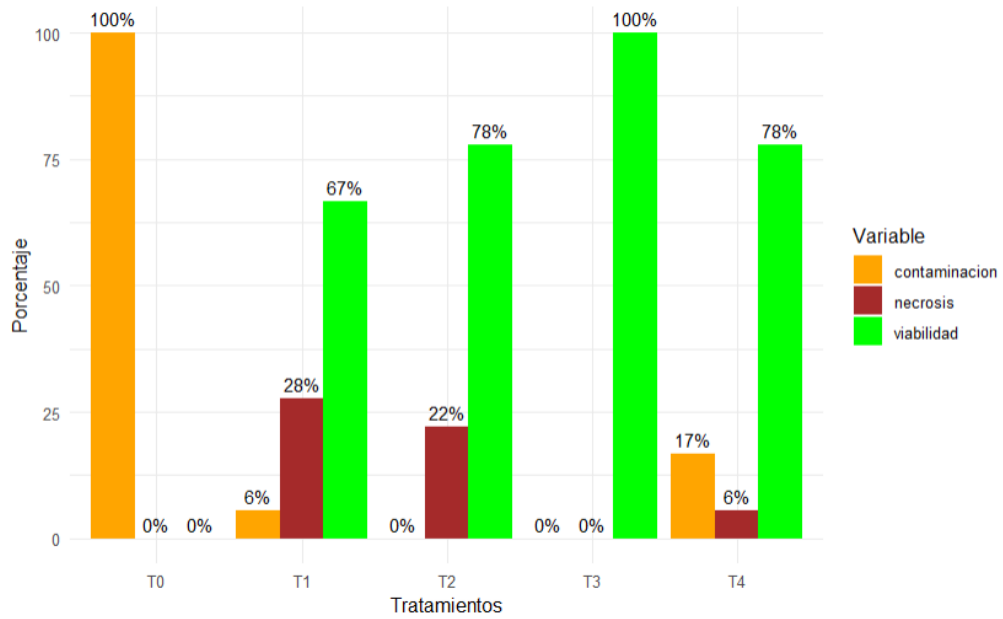
Elaborado por: los autores

Basándonos en los datos de la tabla 13 y el diagrama de la figura 16, se concluye que el tratamiento más eficaz para la micropropagación del sauce criollo es el tratamiento 3.

Este tratamiento se destaca por su ausencia de contaminación y necrosis, lo que lo convierte en el único con una viabilidad vegetal del 100%.

Figura 16

Diagrama de barras del porcentaje global de contaminación, necrosis y viabilidad
Gráfico de Barras Agrupadas por Tratamiento



Elaborado por: los autores

Capítulo 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

El estudio llevado a cabo proporcionó una perspectiva innovadora en relación con la micropropagación de *Salix humboldtiana*, centrándose en la determinación de diversos protocolos de desinfección y concentraciones hormonales con el fin de establecer una base para investigaciones posteriores. Entre los tratamientos evaluados, se identificó que el tratamiento tres, como se muestra en la Tabla 5, demostró ser el óptimo. Los análisis estadísticos de las tres repeticiones revelaron que, con respecto a la variable de viabilidad, el tratamiento T3 exhibió un valor de $p=0.0093^*$, significativamente menor que el nivel de significancia establecido de $p=0.025$. Esto indica una diferencia significativa entre el T3 y el T0, o tratamiento control.

Es importante destacar que el tratamiento tres fue el único que logró una viabilidad del 100%, con un porcentaje de necrosis y contaminación igual a 0%, en contraste con otros tratamientos como T1 y T2, que presentaron un porcentaje de necrosis del 27.77%, 22.22% y una viabilidad del 66.66%, 77.77%, respectivamente. Estos resultados evidenciaron que desinfectantes como el hipoclorito de sodio al 8% pueden dañar el tejido, obstaculizando la asimilación de nutrientes. Por el contrario, el peróxido de hidrógeno o agua oxigenada al 20%, aunque generó una contaminación del 16.66% en tratamientos como el T4, y una baja necrosis del 5.55%, demostró la capacidad de preservar la viabilidad de los explantes contaminados siempre y cuando se realice un trasplante de medio. Esto resalta la eficacia del agua oxigenada para combatir bacterias y hongos sin perjudicar el tejido, facilitando así la absorción de nutrientes.

Finalmente, al observar los resultados presentados en la Tabla 13, donde se evidencia que el porcentaje de viabilidad supera el 60% en todos los tratamientos, excepto el T0, y al considerar también los datos de la Tabla 12, se infiere que no existe una diferencia significativa entre los

tratamientos T1, T2, T3 y T4 en términos de concentración hormonal. Esto sugiere que las concentraciones hormonales aplicadas en cada tratamiento podrían ser adecuadas para su futura aplicación en la micropropagación de esta especie.

5.2 Recomendaciones

Para futuras investigaciones, se recomienda ejercer un control minucioso sobre el acondicionamiento de la cámara de crecimiento vegetal. Esto implica establecer una temperatura y humedad constantes, así como un fotoperíodo adecuado a la especie vegetal objeto de estudio. Estas medidas son fundamentales para fomentar un crecimiento vegetal óptimo y prevenir el estrés, cuya influencia podría incidir negativamente en el desarrollo de las plantas.

Es fundamental contar con una adecuada distribución de zonas dentro del laboratorio, incluyendo cabinas de flujo laminar específicas para micropropagación. El propósito principal de esta disposición es prevenir la contaminación cruzada del material vegetal, ya sea por hongos, levaduras o bacterias. Además, es importante establecer una óptima distribución de zonas dentro de la cámara de crecimiento, diferenciando una zona limpia destinada para el material vegetal libre de contaminación, y una zona sucia destinada para el material vegetal contaminado. Esta organización garantiza la integridad y pureza del cultivo, promoviendo resultados exitosos en los procesos de micropropagación.

En cuanto a la elección de la planta madre, se recomienda optar por plantas jóvenes cultivadas en invernadero. Para la recolección de explantes, se aconseja el uso de instrumentos esterilizados para realizar los cortes. Posteriormente, se sugiere suspender los explantes en un frasco que contenga agua estéril y gotas de Tween 20 durante un periodo de 24 horas antes de

llevar a cabo el protocolo de desinfección. Este proceso tiene como objetivo reducir la carga microbiana presente en los explantes.

5.3 Referencias bibliográficas

ACUERDO-001-ANEXO-PAQUE-NACIONAL-CAJAS.pdf. (s. f.). Recuperado 18 de octubre de 2023, de <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/03/ACUERDO-001-ANEXO-PAQUE-NACIONAL-CAJAS.pdf>

ACTUALIZACIÓN DEL PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL DEL AZUAY. (s. f.).

Adema, M., Villarreal, B., Weber, C., Galarco, S., & Sharry, S. (2022). Propagación vegetativa (macro y micro) y evaluación de la capacidad de remoción de iones Cu^{+2} de *Salix humboldtiana* Willd (sauce criollo). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 121(Especial 2), Article Especial 2. <https://doi.org/10.24215/16699513e104>

Álvarez Acuña, J. A., & Pozo Cruz, M. V. (2021). *Desarrollo de un protocolo para el cultivo in vitro de Rosa chinensis* [bachelorThesis]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/19601>

Bello-Bello, J. J., Spinoso-Castillo, J. L., Bello-Bello, J. J., & Spinoso-Castillo, J. L. (2023). Utilización de nanopartículas de plata en la micropropagación de plantas. *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, 16(30). <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2023.30.69692>

- Borges García, M., Estrada Abeal, E., Pérez Rodríguez, I., & Meneses Rodríguez, S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 127-135.
- Bussmann, R. W. (2005). Bosques andinos del sur de Ecuador, clasificación, regeneración y uso. *Revista Peruana de Biología*, 12(2), 203-216.
- Camacho, V. R., Rentería, A. A., & Jiménez, H. C. (2006). Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de dos especies de pinos. *Foresta Veracruzana*, 8(2), 27-32.
- Chavarria Castillo, D., & López Montenegro, G. J. (2010). *Micropropagación de apices caulinares en platano (Musa spp. AAB) cultivar Cuerno Gigante* [Engineer, Universidad Nacional Agraria, UNA]. <https://repositorio.una.edu.ni/2138/>
- Chung Guin-po, P., & Carrasco Gálvez, B. A. (2020). *Micropropagación de Salix spp. A través de meristemas foliares*. <http://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/3153276>
- Contreras Cruz, L. (2023). *Libro Diseños Experimentales 2023*.
- Coronado, N., González Rosas, H., & Fernández Pavía, Y. L. (2021). Micropropagación de *Calibanus hookeri* (lem.) trel (1911). Una especie amenazada. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 23(1), 46-54. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.80873>
- Cúriel Yuste, J., Hereş, A.-M., Ojeda, G., Paz, A., Pizano, C., García-Angulo, D., & Lasso, E. (2017). Soil heterotrophic CO₂ emissions from tropical high-elevation ecosystems (Páramos) and their sensitivity to temperature and moisture fluctuations. *Soil Biology and Biochemistry*, 110, 8-11. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.02.016>
- Díaz Lezcano, M. I., Flor Benítez, B. A., Enciso Garay, C. R., & González Segnana, L. R. (2016). El carbón activado y las condiciones de oscuridad en la micropropagación de banana

- variedad Nanição. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 140-146.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.55618>
- Eras-Guamán, V. H., Moreno-Serrano, J., Méndez-Montaña, K., Yaguana-Arévalo, M., & Angamarca, R. A. P. (2019). Procesos biotecnológicos para la formación de callos y estructuras de novo de *Cinchona officinalis* L. provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja. *Bosques Latitud Cero*, 9(2), Article 2.
- Fisiología Vegetal* (F.A. Squeo & L. Cardemil, eds.). (s. f.). studylib.es. Recuperado 5 de febrero de 2024, de <https://studylib.es/doc/2436861/fisiología-vegetal--f.a.-squeo-andamp;-l.-cardemil--eds.->
- Flores Alcántara, M. P. (2016). *MICROPROPAGACIÓN DE Hymenocallis harrisiana* (Herb.) TESIS. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/65262>
- García, N., & García, N., y C. Ormazábal. (2008). *Árboles Nativos de Chile* (p. 196). Enersis S.A. <http://www.chilebosque.cl/libroarbolesnativos.html>
- Garzón Vergara, E. E., & Campoverde Molina, M. A. (2020). Análisis espacial de incendios forestales en la provincia del Azuay. *Polo del Conocimiento: Revista científico - profesional*, 5(1), 337-361.
- Guamán Carrasco, D. J. (2018). *Desarrollo de un protocolo de establecimiento in vitro de mora de castilla (Rubus glaucus Benth) a partir de meristemos axilares* [bachelorThesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica]. <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/27506>
- Guin-po, P. C., & Gálvez, B. A. C. (1998). Micropropagación de *Salix* spp. A través de meristemas foliares. *Ciencia & Investigación Forestal*, 12(1), Article 1.
<https://doi.org/10.52904/0718-4646.1998.264>

Hernández Amador, E. (2017). *Establecimiento de cultivos in vitro de Lavandula dentata*.
<https://riull.ull.es/xmlui/handle/915/5758>

Hernández, Y., & González, M. E. (2010a). EFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA Y OXIDACIÓN FENÓLICA EN EL ESTABLECIMIENTO In Vitro DE FRUTALES PERENNES. *Cultivos Tropicales*, 31(4), 00-00.

Janhäll, S. (2015). Review on urban vegetation and particle air pollution – Deposition and dispersion. *Atmospheric Environment*, 105, 130-137.
<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.01.052>

Jones-Castro, F. (2006). *Establecimiento in vitro y Micropropagación de frambuesa (Rubus idaeus L.) utilizando medio semisólido y medio líquido en RITA®*.
<https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/444>

Karrenberg, S., Kollmann, J., & Edwards, P. J. (2002). Pollen vectors and inflorescence morphology in four species of Salix. *Plant Systematics and Evolution*, 235(1), 181-188.
<https://doi.org/10.1007/s00606-002-0231-z>

Kuhn, R. (2011). *No todo lo que brilla es oro: Conflictos socio ambientales alrededor de dos proyectos de minería a gran escala en el Ecuador* [masterThesis, Universidad Andina Simón Bolívar, Sede Ecuador]. <http://repositorio.uasb.edu.ec/handle/10644/2259>

Loberant, B., & Altman, A. (2010). Micropropagation of Plants. En *Encyclopedia of Industrial Biotechnology* (pp. 1-17). John Wiley & Sons, Ltd.
<https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib442>

Loya Navarrete, D. I. (2014). *Evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de yalomán (Delostoma integrifolium D. Don)*. Quito, Pichincha.
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/2564>

Martinez, P. S. (s. f.). *YEMAS AXILARES MÚLTIPLES, MORFOLOGÍA Y TIPOLOGÍA DE LA INFLORESCENCIA EN DURANTA (VERBENACEAE-CITHAREXYLEAE)*.

MBG: Research: Ecuador: Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. (s. f.). Recuperado 6 de diciembre de 2023, de <https://www.mobot.org/mobot/research/ecuador/vegetationsp.shtml>

Medina, M. A., Medina, C. L., & Medina, L. K. (2015). Propagación *in vitro* de *Musa acuminata* (Simmunds) plátano bocadillo del Chocó, Colombia, a partir del cultivo de meristemas apicales. *Revista Biodiversidad Neotropical*, 5(1), 47-53.

Méndez, E. (2012). Revisión del género *Salix* (Salicaceae) en la Provincia de Mendoza, Argentina. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo*, 44(2), Article 2.

Mercado, S. A. S., & Cancino, G. O. (2012). Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación *in vitro* de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), Article 1.

Micropropagación in vitro de rosa rosa sp. A partir de yemas axilares y respuesta callogénica / REVISTA DE LA ASOCIACION COLOMBIANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. (2022). <https://revistaaccb.org/r/index.php/accb/article/view/176>

Minga Ochoa, D. A., & Verdugo Navas, A. (2016). *Árboles y arbustos de los ríos de Cuenca*. Universidad del Azuay. <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/8784>

MonoclonalAntibodies, N. R. C. (US) C. on M. of P. (1999). Summary of Advantages and Disadvantages of *In Vitro* and *In Vivo* Methods. En *Monoclonal Antibody Production*. National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK100200/>

Morocho, C. C., & Chuncho, G. (2019). Páramos del Ecuador, importancia y afectaciones: Una revisión. *Bosques Latitud Cero*, 9(2), Article 2.

- Muñoz, J. (2017). Regeneración Natural: Una revisión de los aspectos ecológicos en el bosque tropical de montaña del sur del Ecuador. *Bosques Latitud Cero*, 7(2), Article 2. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/326>
- Muñoz Tello, M. E., & Vásquez Córdova, E. G. (2020). *Estimaciones del potencial de captura de carbono en los parques urbanos y emisiones de CO2 vehicular en Cuenca, Ecuador* [bachelorThesis]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18390>
- Neyra Velazco, I. M. (2015). Propagación in vitro del sauce (*Salix alba*), para uso en defensa ribereña. *Universidad Nacional Agraria de la Selva*. <http://repositorio.unas.edu.pe/handle/20.500.14292/1044>
- Norouzi, O., Hesami, M., Pepe, M., Dutta, A., & Jones, A. M. P. (2022). *In vitro* plant tissue culture as the fifth generation of bioenergy. *Scientific Reports*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09066-3>
- Orozco, P. W. (2012). *Establecimiento del protocolo de micro propagación de hortensia (hydrangea macrophylla) a partir de segmentos nodales, como una estrategia de producción a gran escala, para su utilización ornamental en los espacios públicos del distrito metropolitano de Q.* Escuela Politécnica del Ejército.
- Paiva Neto, V. B. de, Paiva, R., & Furtado, D. E. (1998). In vitro induction of adventitious roots in salix (*salix humboldtiana willdenow*) explants. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 41, 82-87. <https://doi.org/10.1590/S1516-89131998000100009>
- Pérez G., J. M., & Demetrio R., S. (2012). *Establecimiento in vitro de Abies guatemalensis (Pinabete) a partir de embriones cigóticos* [Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2012.]. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/1100>

Pinilla Suárez, J. C., Chung Guin-po, P., & Navarrete T., M. (2015). *El Sauce chileno (Salix humboldtiana Willd) en la región del BioBio y su uso potencial en bosques plantados*. INFOR. <https://doi.org/10.52904/20.500.12220/20998>

Plant Tissue Culture—3rd Edition. (s. f.). Recuperado 15 de febrero de 2024, de <https://shop.elsevier.com/books/plant-tissue-culture/smith/978-0-12-415920-4>

Quinteros Astudillo, P. A. (2012). *Comparación físico-química de suelos en distintas coberturas vegetales del PNC mediante métodos tradicionales y por espectroscopía infrarroja* [bachelorThesis, Universidad del Azuay]. <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/1633>

Ramos Amaya, J. E. (2012). *Avances de la micropropagación in vitro de plantas leñosas*. *instname:Universidad Nacional Abierta y a Distancia*. <http://repository.unad.edu.co/handle/10596/2515>

Remache Yumi, L. M. (2012). *Desarrollo de una Técnica de Micropropagacion In Vitro de Cedro (Cedrela montana) a partir de ápices, hojas y entrenudos* [bachelorThesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/1823>

Rodríguez García, E., Juez, L., Guerra Burton, B., & Bravo Oviedo, F. (2007). Análisis de la regeneración natural de «Pinus pinaster» Ait. En los arenales de Almazán-Bayubas (Soria, España). *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales*, 16(1), 25-38.

Saavedra-Romero, L. de L., Hernández-de la Rosa, P., Alvarado-Rosales, D., Martínez-Trinidad, T., Villa-Castillo, J., Saavedra-Romero, L. de L., Hernández-de la Rosa, P., Alvarado-Rosales, D., Martínez-Trinidad, T., & Villa-Castillo, J. (2019). Diversidad, estructura arbórea e índice de valor de importancia en un bosque urbano de la Ciudad de México. *Polibotánica*, 47, 25-37. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.47.3>

Sabogal, C., Besacier, C., & McGuire, D. (2015). Restauración de bosques y paisajes: Conceptos, enfoques y desafíos que plantea su ejecución. *Unasyva: revista internacional de silvicultura e industrias forestales*, 66(245), 3-10.

Sauce Criollo (*Salix humboldtiana*). (s. f.). Recuperado 15 de febrero de 2024, de <http://www.ecoregistros.org/ficha/Salix-humboldtiana>

Sierra, Á., Andrea, Y., & asesora. (2015). *Protocolo de uso y aprovechamiento del sauce en la actividad artesanal*. [WorkingPaper]. [Mocoa] : Artesanías de Colombia, 2015. <https://repositorio.artesaniadescolombia.com.co/handle/001/3398>

Sigarroa-Rieche, A. K., & García-Delgado, C. L. (2011). Establecimiento y multiplicación *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.) variedad sin espinas, mediante ápices meristemáticos. *Acta Agronómica*, 60(4), 347-354.

Silva Pupo, J. J., Pérez Alarcón, R., Fonseca Carrasco, Y., Rodríguez Rodríguez, S., Silva Pupo, J. J., Pérez Alarcón, R., Fonseca Carrasco, Y., & Rodríguez Rodríguez, S. (2020). Propagación *in vitro* de *Salix babylonica* L. a partir de segmentos nodales. *Revista Cubana de Ciencias Forestales*, 8(3), 410-424.

Soltero, R., Portillo, L., & Santacruz-Ruvalcaba, F. (2013). *Manual de Biotecnología Vegetal*.

Tonato Muzo, L. A. (2021). *Estandarización del protocolo de micropropagación in vitro de Eryngium (eryngium maritimum) a partir de meristemos axilares en la empresa LePlant* [bachelorThesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Carrera de Ingeniería Bioquímica]. <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/32127>

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana.

Ureta Ponce, A. (2016). *Desarrollo de un protocolo para el establecimiento in vitro de la flor de verano delphinium elatum "black velvet"* [bachelorThesis, Quito: Universidad de las Américas, 2016]. <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/6215>

Viteri G., I. D. (2022). *Estimación de costos de producción de micropropagación a partir de meristemas de la orquídea Rhyncholaelia digbyana (Lindl.) Schltr.* [Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2022]. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/7374>

Xiaoxia, L., Jinkai, S., Jianguo, Z., Ying, L., & Rao, G. (2020). Adventitious shoot regeneration from leaf and stem explants of *Salix matsudana* Koidz. *Bangladesh Journal of Botany*, 49, 395-400. <https://doi.org/10.3329/bjb.v49i2.49321>

Rivera, A., Rivera, A., & Rivera, A. (1999, June 22). Necrosis de las plantas para defenderse de los patógenos. *El País*.
https://elpais.com/diario/1999/06/23/sociedad/930088829_850215.html

5.4 Anexos

Figura 17
Extracción de explantes



Elaborado por: los autores

Figura 18
Esterilización de material



Elaborado por: los autores

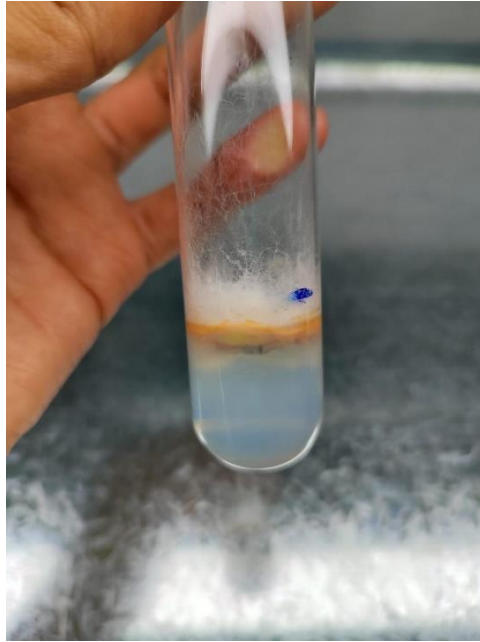
Figura 19
Siembra de explantes



Elaborado por: los autores

Figura 20

Explante obtenido del tratamiento de control



Elaborado por: los autores

Figura 21

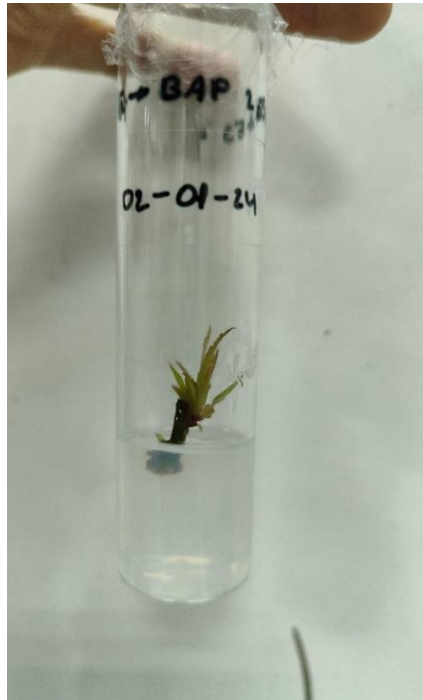
Explante obtenido del tratamiento uno replica dos



Elaborado por: los autores

Figura 22

Explante obtenido del tratamiento dos replica dos



Elaborado por: los autores

Figura 23

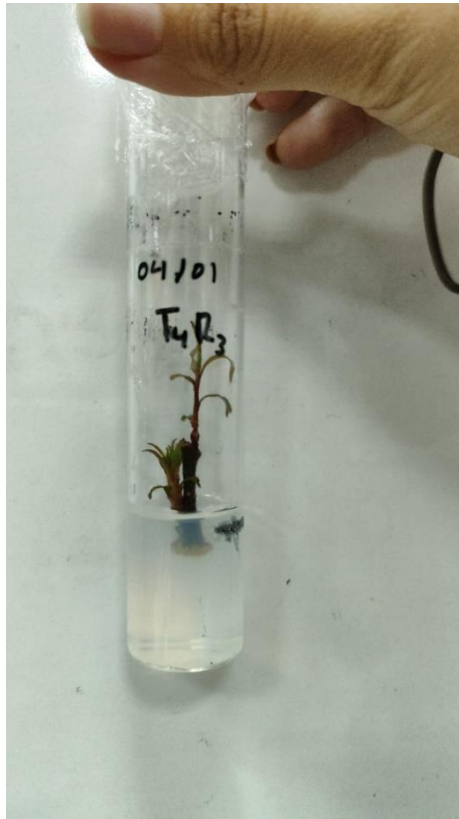
Explante obtenido del tratamiento tres replica dos



Elaborado por: los autores

Figura 24

Explante obtenido del tratamiento cuatro replica tres



Elaborado por: los autores