



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS PARA EL ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE
SAUCE SALIX HUMBOLDTIANA WILLD.

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

AUTORES: MARIUXI ESTEFANÍA CEDILLO ARIAS

VICTORIA STEFANIA SACOTO ORELLANA

TUTORA: DRA. INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, PhD.

Cuenca - Ecuador

2024

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotras, Mariuxi Estefanía Cedillo Arias con documento de identificación N° 0107425829 y Victoria Stefania Sacoto Orellana con documento de identificación N° 0302552658; manifestamos que:

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

Cuenca, 31 de julio del 2024

Atentamente,



Mariuxi Estefanía Cedillo Arias
0107425829



Victoria Stefania Sacoto Orellana
0302552658

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

Nosotras, Mariuxi Estefanía Cedillo Arias con documento de identificación N° 0107425829 y Victoria Stefania Sacoto Orellana con documento de identificación N° 0302552658, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del Trabajo experimental: "Establecimiento de protocolos para el enraizamiento in vitro de sauce *Salix humboldtiana Willd.*", el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera Biotecnóloga, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

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

Cuenca, 31 de julio del 2024

Atentamente,

Mariuxi Estefanía Cedillo Arias
0107425829

Victoria Stefania Sacoto Orellana
0302552658

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE 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 EL ENRAIZAMIENTO IN VITRO DE SAUCE *SALIX HUMBOLDTIANA WILLD.*, realizado por Mariuxi Estefanía Cedillo Arias con documento de identificación N° 0107425829 y por Victoria Stefania Sacoto Orellana con documento de identificación N° 0302552658, 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, 31 de julio del 2024

Atentamente,



Dra. Inés Patricia Malo Cevallos, PhD.

0102291044

Dedicatoria

A Dios, por guiarme, por darme la fuerza, la perseverancia para seguir adelante en cada paso de mi vida.

A mi madre, por su apoyo incondicional, ya que ha sido mi mayor fuente de fortaleza y apoyo.
A mi hermano, por su aliento constante, por estar siempre a mi lado apoyándome.

A la persona que es parte de mi vida, mi motivo de felicidad, por su comprensión, por su apoyo incondicional durante todo este duro caminar.

Por último y no menos importante a mi gato, quien ha sido mi compañía durante muchos años, y ha estado a mi lado durante largas veladas de estudio.

Agradecimientos

A Dios, por guiarme, darme fuerzas durante todo este desafiante trayecto académico.

A mi madre, quien ha sido mi pilar fundamental, brindándome apoyo incondicional además de su amor inagotable. Por su paciencia, comprensión, sacrificio que han sido esenciales para que pudiera avanzar en mi carrera.

A mi hermano, por su aliento constante, comprensión, sobre todo por su apoyo en cada paso de mi vida lo cual ayudado a superar los momentos más difíciles.

A la doctora Inés Malo, quien ha sido una guía excepcional a lo largo de este trayecto. Su motivación, apoyo constante, por su dedicación como docente y tutora de esta tesis han sido fundamentales para la finalización de este trabajo.

A mi abuelito, por su apoyo incondicional. Han sido una fuente de fortaleza, sabiduría a lo largo de toda mi vida.

A la persona que más amo, quien ha sido mi compañía todo este tiempo, gracias por su paciencia, por brindarme su apoyo cuando más lo necesito, por escuchar mis problemas, por hacerme feliz y motivarme a seguir adelante.

Agradezco profundamente a cada uno de ustedes por estar a mi lado.

- Mariuxi C

Dedicatoria

Primeramente, a Dios, por darme fortaleza y no abandonarme en este camino, por guiarme en los peores y mejores momentos, y permitirme dar un paso más en mi vida.

A mi padre, mi pilar, mi fuerza, mi héroe, quien, sobre viento y marea, me apoya y lucha por mí, quien nunca me deja sola y siempre tiene una solución. Es la bendición más grande que tengo. Así como él es un gran orgullo para mí, yo quiero serlo para él. Gracias por siempre creer en mí.

A mi abuelita, mi inspiración, por su bondad infinita y sabiduría maravillosa, por ser incondicional para cada uno de nosotros, por ser una lección de amor, cuidado y perseverancia.

A mis tías Mónica y Nancy, por ser mis segundas mamás, por enseñarme lucha y fortaleza, por velar por mi bienestar y darme un espacio en sus corazones.

A mi hermana, que entre buenas y malas, sé que siempre me cuida y quiere lo mejor para mí, quien me dio a mis ratoncitos Ethan y Edgar, por quienes doy mi vida.

A toda mi familia, quienes han aportado su granito de arena en apoyarme y aconsejarme, y por ayudarme a ser la persona que soy hoy.

A mis amigos, por entenderme y escucharme cuando más lo necesito.

Y, por último, a mi gato, que sin querer terminó siendo el mejor regalo, un compañero de vida con mal genio, pero siempre a mi lado.

-Victoria S.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Doctora Inés Malo, quien ha desempeñado un papel tanto como directora de carrera y tutora de nuestra tesis. Por su apoyo, su paciencia y orientación en todo este trabajo y también durante todo nuestro camino académico. Su compromiso y dedicación son pilar fundamental de esta carrera.

Quiero agradecer también todos los profesores de la carrera quienes con mucha entrega y paciencia ponen fe sobre cada uno de nosotros para poder llegar a ser excelentes profesionales.

Todo ellos usando una excelente frase "ODIAME AHORA POR EXIGIRTE COMO ESTUDIANTE, PARA QUE NO ME TENGAS QUE ODIAR DESPUÉS POR HACERTE UN PROFESIONAL MEDIOCRE"

Agradezco profundamente a todos aquellos que han estado en este proceso porque no ha sido fácil, pero espero no sea el ultimo.

-Victoria S

Resumen

La presente investigación se centró en el “Establecimiento de protocolos para el enraizamiento *in vitro* de sauce *Salix humboltiana Willd* “, especie de sauce originaria de América del Sur. Se realizó un diseño experimental donde se llevó a cabo esta técnica la cual consiste en cultivar explantes de plantas en condiciones de laboratorio, utilizando medios de cultivo que contienen nutrientes y hormonas vegetales.

Los resultados obtenidos mostraron que la viabilidad de los explantes fue en este caso nula en todos los tratamientos. Aunque el tratamiento de desinfección utilizado fue eficiente a la eliminación de patógenos resulto ser demasiado agresivo, causando necrosis en la mayoría de los explantes.

Las conclusiones sugieren que los protocolos de enraizamiento y desinfección deben ser revisados y ajustados para optimizar las condiciones de cultivo *in vitro*. Este documento contribuye al conocimiento en Biotecnología Vegetal y a la conservación de esta especie.

Palabras clave: Sauce, enraizamiento, hormonas vegetales, *in vitro*, cultivo, explantes.

Abstract

This research focused on the “Establishment of protocols for *in vitro* rooting of willow *Salix humboltiana Willd*”, a species of willow native to South America. An experimental design was carried out where this technique was carried out, which consists of cultivating plant explants in laboratory conditions, using culture media containing nutrients and plant hormones.

The results obtained showed that the viability of the explants was null in this case in all treatments. Although the disinfection treatment used was efficient in eliminating pathogens, it turned out to be too aggressive, causing necrosis in most of the explants.

The conclusions suggest that rooting and disinfection protocols should be reviewed and adjusted to optimize *in vitro* culture conditions.

This paper contributes to the knowledge in plant biotechnology and to the conservation of this species.

Keywords: Willow tree, rooting, plant hormones, *in vitro*, culture, explants.

ÍNDICE GENERAL DEL CONTENIDO

CAPÍTULO I.....	15
INTRODUCCIÓN.....	15
1.2 Pregunta de investigación.....	16
1.3 Limitación del problema.....	16
1.4 Justificación	17
1.5 Objetivos.....	18
1.5.1 General	18
1.5.2 Específicos	18
1.6 Hipótesis.....	18
CAPÍTULO 2.....	19
MARCO DE REFERENCIA	19
2.1 Antecedentes investigativos	20
2.2 Bases Teóricas	21
2.2.1 Formación y desarrollo de raíces (rizogénesis)	21
2.2.2 Fisiología del enraizamiento de plantas.....	21
2.2.3 Reguladores hormonales en el enraizamiento	22
2.2.4 Desinfección del material vegetal	23
2.2.5 Efecto de los carbohidratos en el enraizamiento in vitro.....	24
2.3 Marco conceptual: definición de términos básicos	28
2.3.1 Micropropagación	28
2.3.2 Ventajas de la micropropagación.....	29
2.3.3 Etapas de la micropropagación	29
Etapa 0. Preparación de material de siembra.....	29
2.3.4 Medio de cultivo.....	31
2.3.5 Cultivo de tejidos	31
2.3.6 Medio Murashige & Skoog (MS).....	31
2.3.7 Contaminación en los medios en los cultivos	32
2.3.8 Protocolos de desinfección.....	32
2.3.9 Fitohormonas.....	32
2.3.10 Auxinas.....	33
2.3.11 Giberelinas	33
2.3.12 Citoquininas.....	33
CAPÍTULO 3.....	34
MARCO METODOLÓGICO.....	34
3.1 Selección y preparación de materiales	34
3.2 Planteamiento de protocolos	34
3.2.1 Protocolo 0	34

3.2.2 Protocolo 1	34
3.2.3 Protocolo 2	35
3.2.4 Protocolo 3	35
3.2.5 Protocolo 4	35
3.3 Materiales	36
3.3.1 Ubicación	36
3.3.2 Materiales de laboratorio	36
3.4 Nivel de Investigación.....	38
3.5 Diseño de investigación.....	38
3.6 Unidad experimental.....	38
3.7 Variables.....	38
3.7.1 Variables independientes	38
3.7.2 Variable dependiente.....	39
3.8 Porcentaje de contaminación	39
3.9 Porcentaje de viabilidad.....	39
3.10 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	39
3.11 Técnicas de procesamiento y análisis de datos	40
3.12 Procedimientos experimentales.....	41
3.12.2 Protocolo de desinfección.....	43
3.12.3 Trasplante de explantes	44
3.12.4 Cámara de crecimiento.....	46
CAPÍTULO 4.....	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1 Análisis y discusión de resultados	49
4.2 Evaluación de la distribución normal de los datos	54
4.3 Prueba de Kruskal – Wallis.....	55
4.4 Prueba de Dunn con ajuste de Bonferroni.....	55
CAPÍTULO V	58
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	58
5.1 Conclusiones	58
5.2 Recomendaciones.....	59
6. REFERENCIAS	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Salix humboldtiana</i> Willd.	28
Tabla 2. Cantidades para preparar medio de cultivo.	42
Tabla 3. Concentración hormonal para cada tratamiento... ..	43
Tabla 4. Tratamientos asignados al estudio... ..	46
Tabla 5. Diseño del experimento para el establecimiento de protocolos de enraizamiento al azar.....	50
Tabla 6. Porcentaje obtenido en Contaminación y viabilidad... ..	53
Tabla.7 Porcentaje de Contaminación entre los diferentes tratamientos.....	54
Tabla 8. Tabla de Porcentaje de Necrosis.....	54
Tabla 9. Prueba Shapiro Wilk.	55
Tabla 10. Prueba de Kruskal-Wallis.....	56
Tabla 11. Prueba de Dunn con ajuste de Bonferroni – Contaminación.	57
Tabla 12. Prueba de Dunn con ajuste de Bonferroni - Necrosis	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sauce criollo - <i>Salix humboldtiana</i> Willd.	27
Figura 2. Preparación medios de cultivos con BAP y las auxinas este caso IAA Y NAA correspondientes a cada protocolo correctamente rotuladas.	43
Figura 3. Preparación del proceso de desinfección que se realizó utilizando Tween 80, alcohol y NaClO en diferentes concentraciones y tiempos específicos antes del trasplante.	44
Figura 4. Proceso de Trasplante al nuevo medio de cultivos preparado con las hormonas correspondientes a cada protocolo.	46
Figura 5. Planta ya trasplantada al nuevo medio con respectiva concentración hormonal Día 1.	47
Figura 6. Cambios en las plantas principalmente en las hojas las cuales se veían más marrones por el proceso de desinfección de trasplante se notaron en el Día 15.	48
Figura 7. Cambios que se notaron en las hojas necrosantes más que las raíces, no se vio en la formación de las plantas el Día 20.	48
Figura 8. Las plantas se vieron muy necrosadas, aunque no había presencia de callos ni de raíces en el Día 30.	49

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La propagación de plantas en especial de *Salix humboldtiana Willd.* mediante la técnica *in vitro*, es de gran importancia, ya que es una especie de sauce originaria de América del Sur, se encuentra ampliamente distribuida en Los Andes de Argentina, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile. Al respecto Ramírez Iglesias (2018) menciona que se asocia con suelos húmedos en climas fríos y templados, aunque se han adaptado a lugares secos, incluidas zonas montañosas y altas latitudes, más allá de estas características, *Salix humboldtiana Willd.* posee un gran potencial forestal y ornamental, siendo muy importante en zonas de recarga hídrica, por su aporte en la estabilidad de los ecosistemas ribereños, pudiendo aguantar o evitar la erosión del suelo.

La propagación tradicional de *Salix humboldtiana Willd.*, a través de semillas o esquejes tiene limitaciones. Las semillas tienen una baja tasa de germinación y los esquejes tardan mucho en enraizar. Por otra parte, en los últimos años se ha visto amenazada por especies invasoras, el cambio climático, la tala indiscriminada y la urbanización.

El uso de técnicas de Biotecnología Vegetal para el enraizamiento *in vitro* presenta una alternativa viable para la propagación de *Salix humboldtiana Willd.* Esta técnica consiste en cultivar explantes de plantas en condiciones de laboratorio, utilizando medios de cultivo que contienen nutrientes y hormonas vegetales. La aplicación de auxinas exógenas puede estimular el desarrollo de raíces en explantes. La micropropagación de

cultivos *in vitro* se asocia también con procesos de desinfección de explantes (Moreno Licea, 2016).

Por lo tanto, tiene como objetivo principal establecer protocolos para el enraizamiento de *Salix humboldtiana Willd.*, evaluando el efecto de diferentes tipos de auxinas en el número, longitud y calidad de las raíces. Se utilizará un diseño experimental completamente al azar para evaluar cinco tratamientos diferentes, cada uno con una combinación específica de desinfección y enraizamiento.

En la actualidad existen muchos factores que se consideran amenazantes para las especies de *Salix humboldtiana Willd.* nativas de las zonas de recarga hídricas. Los métodos de micropropagación permiten el rápido desarrollo de *ex vitro*, sin embargo, en la etapa de enraizamiento *in vitro* sigue siendo un reto para la micropropagación de esta especie. Viendo la problemática existente, surge la necesidad de desarrollar un protocolo eficaz, reproducible para el enraizamiento del sauce.

1.2 Pregunta de investigación

¿Qué protocolos de enraizamiento darán como resultado un mayor potencial en el desarrollo de raíces en explantes de sauce *Salix humboldtiana Willd.*?, en condiciones de cultivo *in vitro*?

1.3 Limitación del problema

- ✓ Las condiciones del laboratorio.
- ✓ Disponibilidad del laboratorio.

- ✓ El número de explantes inicial para el proceso de enraizamiento.

1.4 Justificación

El desarrollo de protocolos para el enraizamiento de *Salix humboldtiana Willd.*, es importante ya que contribuye a la disponibilidad de material vegetal, por tanto, en el futuro se puede implementar la reintroducción en hábitats naturales, fortaleciendo así la conservación y preservación de esta especie que se encuentran en zonas de recargas hídricas.

En los últimos años el Gobierno Provincial del Azuay en su Plan Forestal Productivo, ha recuperado zonas reforestadas para protección biológica de zonas de recarga hídrica, con la siembra de alrededor de 758.759 plantas, con un total de 689,78 hectáreas, es decir que se sembraron alrededor de 1.100 plantas por hectárea según datos del *PLAN DE DESARROLLO y ORDENAMIENTO TERRITORIAL DE LA PROVINCIA DEL AZUAY (2022)* esto se justifica por su relevancia en relación con la conservación de la diversidad biológica no solo en la provincia del Azuay, ya que esta especie *Salix humboldtiana Willd.*, una especie de sauce originaria de América del Sur se sabe que desempeña un papel fundamental en la estabilidad de los ecosistemas ribereños y ayudan a proteger ríos y arroyos e incluso a mantener la calidad del agua.

Por lo tanto, estas técnicas podrán ser transferibles a otras especies de plantas que se encuentren amenazadas, lo que ampliará su impacto en la conservación de la biodiversidad ya sea a nivel de la provincia o del país, asimismo, el desarrollo de protocolos para el enraizamiento de *Salix humboldtiana Willd.*, podría encontrar aplicación

en silvicultura y la restauración de ecosistemas degradados, agregando valor práctico para esta investigación.

1.5 Objetivos

1.5.1 General

Establecer un protocolo de enraizamiento en explantes de *Salix humboldtiana Willd.*, mediante técnicas de micropropagación facilitando la propagación de esta especie.

1.5.2 Específicos

- ✓ Utilizar protocolos de desinfección variando la concentración de un desinfectante en los explantes de *Salix humboldtiana Willd.* para la eliminación de contaminantes externos y patógenos.
- ✓ Desarrollar un sistema radicular funcional en los explantes de *Salix humboldtiana Willd.*, aplicando protocolos de enraizamiento que permitan la obtención de una vitroplanta completa.
- ✓ Realizar análisis estadístico de los datos obtenidos bajo distintas condiciones llevando a cabo técnicas apropiadas para la identificación de patrones significativos.

1.6 Hipótesis

La combinación de reguladores de crecimiento en protocolos de enraizamiento *in vitro* aumentará significativamente el rendimiento en la formación de raíces de *Salix humboldtiana Willd.*

CAPÍTULO 2

MARCO DE REFERENCIA

La Biotecnología ha dado paso a innumerables aplicaciones con gran potencial, siendo la micropropagación de cultivos *in vitro* una importante herramienta para la obtención de clones, es decir, plantas genotípicamente idénticas a la planta madre, además esta técnica es rentable para la producción masiva de la especie que sea de interés, en comparación con otros métodos de multiplicación, debido al tiempo que suele ser corto, además se pueden almacenar una mayor cantidad de plantas en espacios reducidos y estas crecen bajo estrictas condiciones de asepsia, esto gracias al establecimiento de protocolos para establecer un buen cultivo y la multiplicación del material vegetal existente.

En este sentido la micropropagación se puede realizar a partir de cualquier parte de la planta e incluso las semillas, hojas y yemas, sin embargo, se debe tomar en cuenta la calidad de la planta, este material vegetal debe estar libre de cualquier microorganismo, para llevar a cabo con éxito el cultivo *in vitro*.

En tal sentido la fase de enraizamiento se logra con relativa facilidad cuando se emplean procedimientos básicos como la descontaminación y trasplante, ya que la no aplicación de los procesos básicos tiene una gran destrucción en las raíces, es por ello necesario el desarrollo de técnicas alternativas del enraizamiento *in vitro*.

2.1 Antecedentes investigativos

A lo largo de los últimos años se han llevado a cabo varios estudios para aplicación de protocolos de micropropagación de plantas, que han dado paso al desarrollo de combinaciones específicas de desinfectantes y de reguladores de crecimiento con concentraciones adecuadas de acuerdo con cada medio de cultivo para mejorar la eficiencia y el rendimiento de la micropropagación (Gisbert Doménech & Picó Sirvent, 2015).

Para el caso específico de *Salix humboldtiana Willd.*, también conocido como sauce criollo, se ha investigado su enraizamiento *in vitro*, principalmente con fines de conservación de la especie, además los estudios previos han demostrado que la selección de genotipos adecuados, la optimización de medios de cultivo y la manipulación de reguladores de crecimiento como auxinas para mejorar el enraizamiento y por tanto la calidad de las plantas producidas.

Los sauces suelen tener una tasa de crecimiento rápido, una fácil propagación vegetativa, su tasa de transpiración es relativamente alta, resistencia a las inundaciones estacionales esto gracias a sus raíces, estas son ventajas adaptativas dentro de humedales donde el flujo freático es muy alto, también son importantes en sistemas agroforestales en zonas de recarga hídrica, brindan servicios ambientales, desempeñando un papel importante en la rehabilitación de ecosistemas frágiles. Por ello, es importante la investigación sobre su propagación esto con el objetivo de conservar, rescatar y lograr la reintroducción de esta especie de sauce (Cedrés Gazo et al., 2019).

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 Formación y desarrollo de raíces (rizogénesis)

La rizogénesis es un proceso utilizado en Biotecnología Vegetal para inducir el crecimiento de raíces en células o tejidos vegetales en un medio de cultivo *in vitro*, bajo condiciones controladas (Cedrés Gazo et al., 2019).

Las hormonas vegetales como las auxinas se usan para estimular la formación de nuevas raíces a partir de células vegetales. Además, la concentración de auxina en relación con otras fitohormonas como las citoquininas es importante para determinar si las células se convierten en raíces u otros  rganos. El equilibrio endógeno entre los tipos de reguladores de las plantas influye en la liberación adventicia de raíces, pero las concentraciones exógenas pueden variar según las condiciones de manejo de los cultivos y las características de cada material genético.

2.2.2 Fisiología del enraizamiento de plantas

La formación de raíces adventicias depende de una serie de factores ya sean factores internos o endógenos que interactúan de manera compleja para producir diversos efectos sobre el metabolismo, el crecimiento y la diferenciación.

La teoría de la rizocalina de Bouillene de 1955, estableció que un determinado compuesto fen lico, actúa como cofactor en el enraizamiento, de esta manera se produce en las hojas y brotes de la planta. Este cofactor es producido en las hojas y yemas, luego es trasladado a la región de enraizamiento, donde en presencia de un factor no específico que se encuentra a bajas concentraciones en los tejidos (auxina), y otras enzimas específicas, ubicadas en las células de algunos otros tejidos (polifenol oxidasa), completan un complejo llamado rizocalina, que es un estimulante de la rizogénesis (Gutiérrez, 1995).

Estos factores componen el complejo de rizocalina, y varios otros factores son determinantes para el enraizamiento, la ausencia de uno de estos factores no garantizará el proceso de rizogénesis. Otros factores que influyen en la propagación de raíces son: el factor genético, este tiene la capacidad rizogénica según sea la especie o la variedad, ya que algunas plantas más que otras tiene la capacidad más fácilmente de enraizar; influencia fisiológica: básicamente es la capacidad de la planta para establecer un sistema de raíces funcional y saludable; la influencia del medio: la composición que tenga el sustrato es importante porque influye en la retención de agua, la aireación, la disponibilidad de nutrientes, todo lo cual puede influir en la formación de raíces en cultivos *in vitro*.

2.2.3 Reguladores hormonales en el enraizamiento

Son fundamentales en el proceso de enraizamiento, entre las hormonas vegetales más importantes implicadas en el enraizamiento está la auxina, especialmente el ácido indolacético, AIA, promueven la formación y el desarrollo de raíces en las plantas.

Durante el proceso de enraizamiento, las auxinas regulan la iniciación de las raíces al promover la división celular en los tejidos vegetales, lo que resulta en la formación de raíces primarias y, en algunos casos, raíces adventicias. Según Brondani y colaboradores (2010) la aplicación exógena de auxinas, como el ácido indolbutírico, AIB, se usa comúnmente en métodos de propagación de plantas para estimular el enraizamiento y otros tejidos vegetales.

Además de las auxinas, otras hormonas vegetales como las citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y brasinoesteroides pueden influir en el enraizamiento.

2.2.4 Desinfección del material vegetal

La desinfección del material vegetal es importante en el proceso de micropropagación, la desinfección pretende eliminar contaminantes externos, como bacterias, hongos y microorganismos con la capacidad de afectar el crecimiento de raíces (Cedrés Gazo et al., 2019).

En el cultivo *in vitro* se utilizan varios métodos de desinfección y su elección depende mucho del tipo de planta y material vegetal que se está utilizando.

Entre los compuestos químicos se utiliza etanol, hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno, hipoclorito de calcio, y, cloruro de mercurio que es altamente tóxico, de igual forma se utilizan agentes denominados tensioactivos al reducir la tensión superficial del líquido al que se añade, como el Tween 20. Cada uno de estos compuestos se utiliza de acuerdo al protocolo seleccionado, en concentración y tiempo, según Cedrés Gazo y colaboradores (2019) se pueden utilizar diferentes tratamientos, en concentraciones y tiempos distintos, además se pueden combinar los compuestos desinfectantes para un mayor éxito en la desinfección del material vegetal.

Al final todos estos compuestos que se utilizan en la desinfección serán removidos, con agua destilada estéril, dependiendo de cada protocolo, pero por lo general se hacen alrededor de tres enjuagues de forma sucesiva. Además, la desinfección debe llevarse a cabo en condiciones estériles, siguiendo protocolos específicos para minimizar lo más que se pueda la contaminación y garantizar el éxito del cultivo *in vitro* (Cedrés Gazo et al., 2019).

2.2.5 Efecto de los carbohidratos en el enraizamiento *in vitro*

Los carbohidratos juegan un papel importante en el enraizamiento *in vitro* de las plantas, ya que actúan como una fuente vital de energía y ayudan a regular la presión osmótica del medio de cultivo, lo que es esencial para el crecimiento celular. La sacarosa, se utiliza comúnmente, ya que, proporciona los nutrientes necesarios y ayuda a mantener el equilibrio hídrico, promoviendo así la rizogénesis.

Los carbohidratos y compuestos nitrogenados intervienen en diversos grados en el proceso de enraizamiento y pueden modificar e incluso controlar la formación de raíces. En un estudio realizado con portainjertos de cítricos, se evaluaron diferentes fuentes de carbohidratos, como xilosa, fructosa y una combinación de xilosa y fructosa, junto con vermiculita como sustrato inerte, a la final los resultados mostraron que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en términos de enraizamiento *in vitro* (De Jesús Martínez-Hernández et al., s. f.).

2.2.6 *Salix humboldtiana* Willd.

Salix humboldtiana Willd., ha sido utilizada desde los pueblos originarios para hacer mangos de herramientas, leña, estacas, postes, vallas e incluso construcciones según lo menciona la Plataforma Geoespacial de datos forestales (2023) el género *Salix* comprende un aproximado de 450 especies que se extienden a lo largo de todo el mundo, por otra parte, se dice que los sauces tienen propiedades pioneras, esto debido a su carácter heliófilo, es decir, que son capaces de colonizar ambientes grandes y de espacios abiertos, esto debido a su biología reproductiva, una de sus características es su facilidad para enraizar a partir de segmentos de plantas, ya sea *ex vitro* o *in vitro*, esto favorece la expansión.

Salix humboldtiana Willd., igualmente conocida como sauce colorado, sauce criollo, el único sauce originario de Argentina, es una de las especies arbóreas con mayor distribución natural en el mundo. Se encuentra principalmente a lo largo de Los Andes y zonas adyacentes, siguiendo el flujo de agua en zonas subhúmedas y semiáridas, desde el nivel del mar hasta altitudes superiores a los 3900 metros sobre el nivel del mar (Gallo et al., 2022).

2.2.7 Morfología del sauce *Salix humboldtiana Willd.*

Los sauces son árboles medianos, que crecen hasta 25 m de altura y 1 m de diámetro, este género presenta dificultades por su variación morfológica intraespecífica, por lo que hay que diferenciarlas en subespecies, por otro lado, las especies de sauce suelen tener hojas delgadas y de forma alargada. Se dice que las flores del sauce son pequeñas y suelen aparecer en forma de amentos, que son estructuras colgantes alargadas que contienen muchas flores apretadas entre sí, dependiendo de cuál sea la especie, el color de los amentos puede variar, como amarillo, verde o plateado (Prada et al., 2013).

En cuanto al sistema radicular, los sauces tienden a desarrollar raíces fibrosas y extensas, que les permite prosperar en suelos húmedos y pantanosos. La corteza es generalmente fina y lisa, aunque puede volverse más rugosa con la edad (Gallo et al., 2022).

En general la morfología del sauce depende de cada una de las diferentes especies y variedades, pero estas características son representativas del género *Salix*.

Figura 1. Sauce criollo - Salix humboldtiana Willd.



Fuente: iNaturalist Ecuador (2020).

Recuperado de: <https://ecuador.inaturalist.org/taxa/209991-Salix-humboldtiana>

El fruto del sauce es una cápsula de aproximadamente 2 a 4 mm, contiene pequeñas semillas, estas se dispersan por acción del viento y el agua, pero pierden muy rápido su capacidad de germinar como se observa en la figura 1. Por otra parte, estas especies de sauce tienen una propagación mediante estacas o esquejes cortadas de ramas maduras plantadas en un sustrato adecuado para enraizar (Gallo et al., 2022).

2.2.8 Taxonomía de *Salix humboldtiana* Willd.

Su nombre científico es *Salix humboldtiana* Willd. Es una especie que pertenece al reino *Plantae*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida* y orden *Malpighiales* (Pena, 2019), como se verá en la tabla 1:

Tabla 1. Taxonomía de *Salix humboldtiana* Willd. (Pena, 2019).

Nivel Taxonómico	Categoría
Reino	Plantae
División	Magnoliofita
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malpighiales
Familia	Salicáceas
Género	<i>Salix</i>
Especie	<i>Salix humboldtiana</i>

Fuente: Las Autoras (2024).

2.2.9 Distribución y usos de *Salix humboldtiana* Willd.

El sauce es originario de regiones tropicales húmedas y subhúmedas de América, se distribuye desde México, Centroamérica, Chile y Argentina. Esta especie de sauce posee ramas flexibles y largas raíces, teniendo un importante papel en la reducción de velocidad de las corrientes del agua en las orillas de los ríos, por ende, tienen la capacidad de aguantar o evitar la erosión (Prada et al., 2013).

Se conoce que la corteza del sauce se usa con fines farmacéuticos principalmente por sus salicilatos, pero estos efectos se atribuyen a la interacción de estos con otros compuestos. Con la ayuda de cruces de diferentes genotipos de sauce se generaron nuevos quimio tipos que mostrarían combinaciones de metabolitos secundarios con efectos mejorados en la salud humana. Para el tratamiento de dolores de cabeza, fiebre, enfermedades reumáticas, artritis y dolor lumbar (Förster et al., 2021).

2.2.10 Las principales amenazas para la conservación de *Salix humboldtiana* Willd.

Las principales amenazas para la conservación para este tipo de sauces incluyen la pérdida de hábitat por la constante deforestación en zonas de recarga hídrica, la fragmentación del hábitat, también la urbanización ha sido una amenaza (Hermida Palacios et al., 2021), (Orellana et al., 2022).

Además, la introducción de especies invasoras como en el caso de la flor de ojo de poeta *Thunbergia alata* en la provincia del Azuay, la contaminación del agua y la sobreexplotación de los recursos naturales han llegado a ser amenazas significativas para la conservación de esta especie.

El cambio climático, que no solo está afectando a esta especie de sauce sino a ecosistemas completos, las sequías, también han afectado negativamente a los hábitats naturales. Con la implementación de medidas de conservación, gracias al uso de técnicas de Biotecnología Vegetal, se podrá aportar a la restauración de las zonas de recarga hídrica.

2.3 Marco conceptual: definición de términos básicos

2.3.1 Micropropagación

La micropropagación es el conjunto de técnicas y métodos del cultivo de tejidos utilizados para obtener plantas asexualmente en forma rápida, eficiente, libre de enfermedades y en grandes cantidades. El sistema de propagación se da partir de un segmento de una planta madre, que da como resultado plantas genéticamente idénticas, debido a la totipotencialidad (Jorge Eliécer, 2012).

Del latín *totuspotens*: *totus* (todo) y *potens* (poder o habilidad), el término célula totipotencial, es utilizado en biología para referirse a células que poseen la capacidad de dar origen a diferentes tipos celulares, incluso pudiendo una sola de estas células dar origen a millones de células, tejidos, órganos e incluso embriones (Tobar, 2011).

La micropropagación de tejidos vegetales debe contar con las instalaciones, el equipo y los reactivos necesarios y de esta forma se podrán aplicar los protocolos necesarios para el enraizamiento *in vitro* libre de patógenos.

2.3.2 Ventajas de la micropropagación

La micropropagación como técnica de propagación de plantas ofrece ciertas ventajas comparativas sobre las técnicas de propagación convencionales a nivel macro, que incluyen: aumento de la tasa de reproducción en periodos y espacios más eficientes, obtención de plantas sanas ya sea partir de material contaminado con patógenos, dando como resultado plantas con un alto grado de homogeneidad genética y fenotípica (Suárez Padrón, 2020).

2.3.3 Etapas de la micropropagación

Etapa 0. Preparación de material de siembra

Los factores que influyen en la calidad del explante son:

- Tipos de órganos que sirven de explantes.
- Su edad ontogenética y fisiológica.
- Estación de recogida de materiales.
- Tamaño.
- Salud general de la planta donante.

Etapa 1. Establecimiento del cultivo

El objetivo de esta etapa es establecer un cultivo estéril viable. El éxito depende de:

- Edad de la planta donante
- Edad fisiológica
- Nivel de desarrollo
- Tamaño del explante.

Éstos, al igual que el cambium, determinan el espesor del crecimiento de las plantas leñosas (Olmos et al., 2016).

Etapas 2. Multiplicación

La finalidad de esta etapa es mantener e incrementar el número de brotes para nuevos ciclos reproductivos sucesivos, permitiendo destinar una parte de ellos a la siguiente etapa productiva (enraizamiento, formación de bulbos, etc.), (Olmos et al., 2016).

Etapas 3. Formación de raíces y aclimatación

En esta etapa, la formación de raíces adventicias ocurre más fácilmente en las plantas herbáceas que en las leñosas debido a su limitada capacidad de formación de raíces. La formación de raíces puede ocurrir tanto *in vitro* como *ex vitro*. Las auxinas: favorecen la formación de raíces en altas concentraciones.

Los tipos de auxinas más utilizados debido a su costo y fácil adquisición son AIB, 2,4- D, AIA, ANA, picloram; y las citocinas son BA, CIN, ZEA, 2ip y TDZ (Salinas et al., 2022).

El rango de concentración utilizado depende del tipo de regulador de crecimiento. Por ejemplo, el 2,4-D se utiliza en concentraciones entre 4 y 35 μM , mientras que otras auxinas como AIB oscilan entre 0,1 y 2 μM según señala Olmos y colaboradores (2016).

Sus combinaciones y rangos de concentración deben optimizarse para cada especie, genotipo y etapa reproductiva (Eras Guamán et al., 2021).

2.3.4 Medio de cultivo

El medio de cultivo es el conjunto de componentes que crea un ambiente artificial con las condiciones necesarias para el crecimiento de células, tejidos y órganos bajo condiciones controladas fuera de su entorno natural. Se compone de macronutrientes, micronutrientes o elementos traza y factores de crecimiento (Domenech, 2011).

Según, Suárez Padrón (2020) los medios de cultivo en la Biotecnología Vegetal se han utilizado durante muchas décadas para la propagación de especies de manera más rápida y eficiente, bajo condiciones de asepsia. Por tanto, un medio de cultivo debe contener las sustancias necesarias para que pueda seguir desarrollando los tejidos vegetales, variando las proporciones de cada componente según el tipo de tejido que se desea obtener.

2.3.5 Cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos vegetales se basa específicamente en la capacidad que poseen las células vegetales para generar un nuevo organismo idéntico al que le dio origen, se la conoce también como totipotencialidad celular. Esta técnica es más comúnmente conocida como micropropagación, es una herramienta importante en la investigación y la agricultura, que ha permitido al largo de varias décadas obtención de plantas de calidad a gran escala de forma rápida y eficiente.

2.3.6 Medio Murashige & Skoog (MS)

El medio Murashige y Skoog (MS) fue desarrollado por los científicos Toshio Murashige y Folke K. Skoog en el año 1962. Este medio de cultivo de tejidos es el más adecuado y comúnmente utilizado para la propagación de plantas por cultivo de tejidos y en la investigación en Fisiología Vegetal.

Este medio se utilizó para el desarrollo de las plantas de tabaco. Es un medio "rico en sal", ya que contiene sales de K y N (Universidad Abierta y a Distancia de México, 2022).

2.3.7 Contaminación en los medios en los cultivos

La contaminación biológica es un problema grave en los medios de cultivo tejidos vegetales, estos contaminantes pueden liberar metabolitos y proteínas que afectan los tejidos de las plantas y cambian la composición y el pH del medio (Gammoudi et al., 2022). Los microorganismos contaminantes más comúnmente asociados con el cultivo *in vitro* incluyen bacterias como: *Acinbacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, etc., hongos: *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Penicillium* (Suárez Padrón, 2020)

2.3.8 Protocolos de desinfección

No existe un protocolo de descontaminación estándar. En casi todos los casos, se establecen protocolos de desinfección de acuerdo con cada necesidad para mejorar el material biológico que se está estudiando, es decir, sin afectar a su viabilidad ni a su capacidad regenerativa (Gammoudi et al., 2022).

2.3.9 Fitohormonas

Las hormonas que incluyen son: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno. Aunque en ocasiones también incluyen brasinoesteroides, ácido salicílico,

jasmonatos, sistemina, poliaminas, óxido nítrico y péptidos señal (Reguladores del Crecimiento Vegetal | CANNA España, 2016). Según, Alcantara y colaboradores (2019) las fitohormonas se pueden clasificar según la estructura molecular, su actividad a nivel vegetal, su acción inhibidora o estimulante y otras características.

2.3.10 Auxinas

Las auxinas son un grupo de hormonas vegetales que regulan muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de plantas. En general las auxinas se encargan del alargamiento celular y la expansión del tejido, su división celular y la formación de raíces adventicias según menciona Di Benedetto y colaboradores, (2015). Además, juegan un papel en la respuesta de la planta a factores ambientales como la luz, la gravedad y el estrés.

2.3.11 Giberelinas

La giberelina (AG) es una hormona del crecimiento, son un gran grupo de ácidos carboxílicos diterpenoides que se encuentran en las plantas superiores, participan en muchos aspectos del desarrollo del ciclo de vida de las plantas según menciona Mauriat y colaboradores (2011), se sabe, además, que estimula el crecimiento de órganos y mejora el alargamiento y la división celular (Hedden & Thomas, 2012).

2.3.12 Citoquininas

Las citoquininas son conocidas por su importante papel en el crecimiento de las plantas Kieber y Schaller, (2018), así como por su papel en la prevención de la senescencia y la regulación de la tolerancia al estrés biótico y abiótico (Albrecht & Argüeso, 2016).

CAPÍTULO 3

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Selección y preparación de materiales

En el transcurso del desarrollo de la presente investigación, se realizó la selección de plántulas de *Salix humboldtiana Willd.*, que se encuentran a tamaño y estado de salud uniforme para garantizar la consistencia en los resultados. Los explantes serán preparados mediante la esterilización y segmentación de los tejidos vegetales para su posterior cultivo *in vitro*. En la cual se llevó a cabo bajo anotaciones y seguimiento, tomando en consideración todos los pasos y fases envueltos en dicho proceso.

3.2 Planteamiento de protocolos

3.2.1 Protocolo 0

En la fase experimental, el protocolo 0 consiste en un tratamiento de control, el cual no se encuentra sometido a ningún protocolo de desinfección y se sembrará en medio Murashige Skoog sin hormona el cual contiene sacarosa y agar.

3.2.2 Protocolo 1

Adicionalmente se llevará a cabo una desinfección utilizando Tween 80 durante 5 minutos, seguido de una inmersión en alcohol al 70% durante 1 minuto y, finalmente, en NaClO al 5% v/v durante 5 minutos. Posteriormente, se aplicarán reguladores hormonales, específicamente BAP a una concentración de 2 mg/L y AIA a una concentración de 3 mg/L. Este tratamiento tiene como objetivo promover el enraizamiento *in vitro* de *Salix humboldtiana Willd.*, mediante la estimulación hormonal precisa después de una adecuada desinfección.

3.2.3 Protocolo 2

Siguiendo las pautas del protocolo 1, este también implicará una desinfección con Tween 80, alcohol al 70% y NaClO al 5% v/v. Luego, se aplicarán reguladores hormonales, pero en este caso, la combinación será de BAP a 2 mg/L y ANA a 3 mg/L. Se espera que este tratamiento también propicie el enraizamiento *in vitro* de *Salix humboldtiana Willd.*, utilizando una combinación hormonal diferente para explorar su efecto en comparación con el protocolo 1.

3.2.4 Protocolo 3

Se realizará una desinfección utilizando Tween 80 durante 5 minutos, seguido de una inmersión en alcohol al 70% durante 1 minuto y, finalmente, en NaClO al 10% v/v durante 5 minutos. Después de la desinfección, se aplicarán reguladores hormonales, BAP a una concentración de 2 mg/L y AIA a una concentración de 3 mg/L. Este tratamiento se enfocará en el enraizamiento *in vitro* de *Salix humboldtiana Willd.* bajo condiciones de desinfección más rigurosas, explorando el efecto de una concentración más alta de NaClO y una combinación hormonal específica.

3.2.5 Protocolo 4

Similar al Protocolo 3 en cuanto a la desinfección, este también implicará una desinfección con Tween 80, alcohol al 70% y NaClO al 10% v/v. Luego, se aplicarán reguladores hormonales, pero en este caso, la combinación será de BAP a 2mg/L y ANA a 3mg/L. Se anticipa que este tratamiento también contribuirá al enraizamiento *in vitro* de *Salix humboldtiana Willd.*, proporcionando información adicional sobre los efectos de diferentes combinaciones de desinfección y regulación hormonal en el proceso de enraizamiento.

3.3 Materiales

3.3.1 Ubicación

Este estudio se realizó dentro de la Universidad Politécnica Salesiana, específicamente en los laboratorios de Biotecnología Vegetal, en la provincia del Azuay en el cantón Cuenca.

3.3.2 Materiales de laboratorio

- Matraces Erlenmeyer
- Tubos de ensayo
- Placas de Petri
- Probetas
- Pinzas
- Vasos de precipitación
- Lunas de reloj
- Espátula
- Parafilm
- Papel aluminio
- Guantes
- Mandil de laboratorio
- Cofia
- Mascarilla

3.3.3 Equipos

- Mechero Bunsen
- Autoclave
- Centrifuga
- Medidor de pH
- Refrigerador
- Balanza
- Cámara de flujo laminar

3.3.4 Reactivos

- Agua destilada
- Medio Murashige & Skoog
- Phytigel
- Bencilamino purina (BAP)
- Alcohol al 70%
- NaClO al 5%, y 10% v/v
- Ácido indol acético (AIA)
- Ácido 1-naftalenacético (ANA)

3.4 Nivel de Investigación

Se plantea el uso de un nivel explicativo en la investigación sobre el enraizamiento *in vitro* de *Salix humboldtiana Willd.*, esto implica investigar cómo interactúan factores como las hormonas de enraizamiento, las condiciones ambientales y las interacciones microbianas para afectar el desarrollo de raíces en cultivos *in vitro*. Al comprender estos aspectos, se pueden desarrollar protocolos más efectivos y adaptados a las necesidades de la planta, con posibles aplicaciones en la Biotecnología Vegetal y la conservación de especies.

3.5 Diseño de investigación

Este estudio utiliza un diseño experimental verdadero para investigar los efectos de los estímulos aplicados a las variables independientes sobre la variable dependiente.

3.6 Unidad experimental

En la unidad experimental recibe y se aplican los tratamientos. En este estudio, la unidad experimental para mejorar el proceso de enraizamiento y erradicar infecciones constará de tres recipientes de vidrio cada uno con un explante incrustado en un medio de cultivo de composición química precisa.

3.7 Variables

3.7.1 Variables independientes

Citoquininas:

- 6-bencilaminopurina (BAP)

Auxinas:

- Ácido Indolacético (AIA)

- Ácido Naftalenacético (ANA)

Desinfectantes:

- Hipoclorito de sodio 5% v/v (5 min)
- Hipoclorito de sodio 10% v/v (5 min)

3.7.2 Variable dependiente

- Número y longitud de raíces por vitroplanta en la fase de enraizamiento *in vitro* por cada protocolo empleado.
- Número de explantes contaminados por hongos y bacterias luego de aplicar los protocolos de enraizamiento.

3.8 Porcentaje de contaminación

El porcentaje de contaminación se calculará mediante observaciones frecuentes de los tratamientos desde el día de cultivo hasta 20 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:

$$\% \text{ Contaminación} = \left(\frac{\text{explantes contaminados}}{\text{explantes totales}} \right) \times 100$$

3.9 Porcentaje de viabilidad

El porcentaje de viabilidad se determinará contando los explantes establecidos con éxito desde el día de la siembra hasta 30 días después y se calculará mediante la fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \left(\frac{\text{explantes viables}}{\text{explantes totales}} \right) \times 100$$

3.10 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La técnica será la observación directa para recopilar datos que se utilizarán en análisis estadísticos para identificar patrones y tendencias relacionados con la

contaminación y el crecimiento *in vitro* de las raíces. Los instrumentos para la recolección de datos son: reglas (para medir la longitud de las raíces), cámaras fotográficas, cuadernos o libretas y *software* RStudio.

3.11 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Se realizará mediante *software* estadístico RStudio las pruebas de normalidad Shapiro-Wilk, y analizará el crecimiento de las raíces y su relación con diferentes protocolos de enraizamiento.

Prueba de Shapiro-Wilk, para obtener un valor p que indica si los datos se distribuyen normalmente. Si el valor p es menor que 0.05, podemos rechazar la hipótesis nula de que los datos siguen una distribución normal. En caso de que esto ocurra, se tomarán en cuenta pruebas no paramétricas como es el caso de la:

Prueba de Kruskal-Wallis, es prueba estadística no paramétrica, esta se utiliza para determinar si existen diferencias significativas en las distribuciones de una variable continua entre tres o más grupos independientes. Es una alternativa a la prueba de ANOVA cuando no se cumplen los supuestos de normalidad o homogeneidad de varianzas requeridos.

Prueba de Dunn, esta es una prueba post-hoc que se utiliza para la comparación detallada entre los pares de grupos, ya que, ayuda a controlar el riesgo de cometer un error tipo I, se utiliza normalmente luego de realizar una prueba de Kruskal-Wallis que halla tenido una diferencia significativa.

3.12 Procedimientos experimentales

Los explantes fueron transportados cuidadosamente en condiciones controladas para el tratamiento preliminar de desinfección y la introducción de cada explante en su respectivo tratamiento, por último, asegurando una investigación precisa y sistemática se utiliza la técnica de observación directa para recopilar datos que se utilizarán en análisis estadísticos para identificar patrones y tendencias relacionados con la contaminación y el crecimiento *in vitro* de las raíces por 30 días.

3.12.1 Preparación de medio de cultivo

Se elaboraron los medios de cultivo usando la referencia que consta en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Cantidades para preparar medio de cultivo.

Componentes	g/L
Medio MS	4,43
Phytigel	2

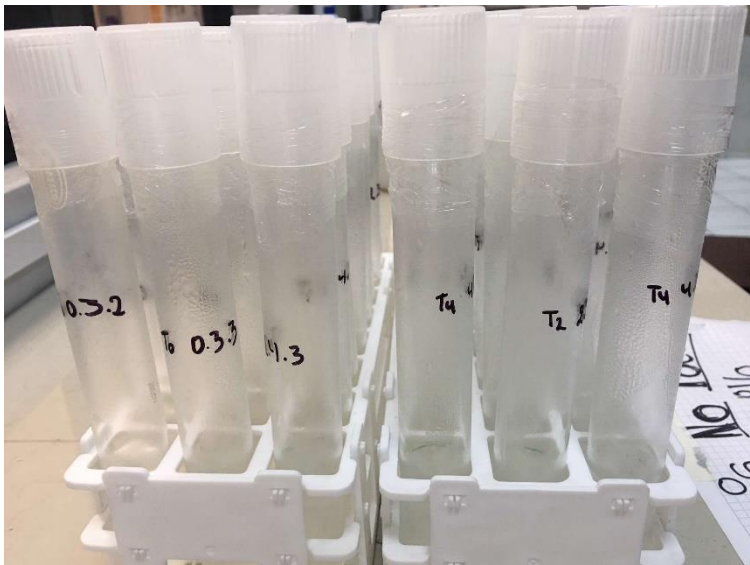
Fuente: Las autoras (2024).

Se llevaron a cabo las mediciones de los componentes detallados, según el volumen deseado para la preparación. Posteriormente, se vertieron las sales MS con vitaminas Gamborg en un matraz Erlenmeyer, ajustando al volumen medio necesario. Se disolvieron de manera homogénea y se midió el pH el cual se ajustó en un rango de 5.8 a 6. Una vez ajustado el pH se incorporó el Phytigel.

Para el tratamiento de control no fue necesario aplicar ninguna concentración hormonal.

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

Figura 2. Preparación medios de cultivos con BAP y las auxinas este caso AIA Y ANA correspondientes a cada protocolo correctamente rotulados.



Fuente: Las autoras (2024).

Tabla 3. Concentración hormonal para cada tratamiento.

Fuente: (2024). El	Hormona	Tratamiento 0	T1 y T3	T4 y T5	Las autoras envasado
	BAP	-	2 mg/L	2mg/L	
	AIA	-	3 mg/L	-	
	ANA	-	-	3 mg/L	

del medio se realizó en la cámara de flujo laminar, en tubos de ensayo estériles, cada uno equipado con tapa correspondiente. En cada tubo se vertieron 30 mL de medio. Posteriormente se cerraron herméticamente con cinta *film* alrededor de la tapa para

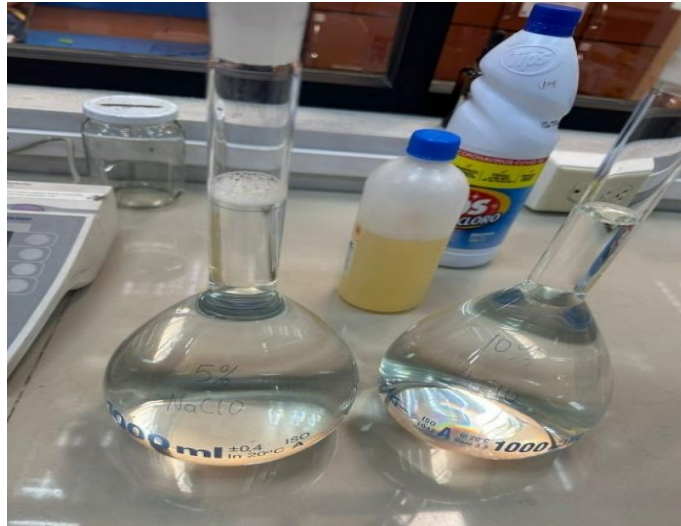
asegurar el sellado. Luego se dejó enfriar a los tubos hasta que el medio solidifique. Este proceso se realizó bajo condiciones controladas para mantener la esterilidad del medio.

Finalmente, se colocaron los tubos en gradillas almacenadas en el refrigerador. Cabe mencionar que se tuvo alto cuidado con todas las superficies que estuviesen en contacto con los tubos, siendo estas debidamente desinfectadas con anterioridad para mantener así la integridad de estos.

3.12.2 Protocolo de desinfección

En los protocolos de desinfección primero se llevó a cabo la dilución de los agentes desinfectantes contenidos en el sistema. Estas se aplicaron mediante diversos lavados utilizando una solución de Tween 80 durante 5 minutos, lo que ayuda a eliminar partículas de suciedad y mejora la penetración de los desinfectantes. Luego, se trata con alcohol al 70% durante 1 minuto para una desinfección rápida y efectiva que reduce significativamente la carga microbiana. Finalmente, se sumerge en hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% y 10% v/v durante 10 minutos para una desinfección profunda y exhaustiva. Es importante señalar que, como parte integral de cada fase de lavado, se efectuaron tres enjuagues con agua estéril consecutivos de 1 minuto.

Figura 3. Preparación del proceso de desinfección que se realizó utilizando Tween 80, alcohol y NaClO en diferentes concentraciones y tiempos específicos antes del trasplante.



Fuente: Las autoras (2024).

3.12.3 Trasplante de explantes

El trasplante se llevó a cabo al finalizar el proceso de desinfección, en conformidad con las buenas prácticas de laboratorio. Todo el proceso se realizó dentro de la cámara de flujo laminar, para este proceso se emplearon pinzas largas correctamente esterilizadas para cada contacto con el explante para luego ubicarlo en los tubos de nuevo medio con su concentración hormonal respectiva.

Figura 4. Proceso de trasplante al nuevo medio de cultivo preparado con las hormonas correspondientes a cada protocolo.



Fuente: Las autoras (2024).

Cabe destacar que el proceso de siembra se rigió en base a distintos tratamientos que permitirán determinar el más favorable para una mayor viabilidad de crecimiento de raíces considerando que se realizó cuatro réplicas de cada tratamiento.

Tabla 4. Tratamientos asignados al estudio.

Tratamientos			Descripción	
		Desinfectantes		Reguladores Hormonales
T0				
T1	A	Tween 80 (5 min), alcohol al 70% (1 min) y NaClO al 5% v/v (10 min).	X	BAP 2mg/L+IAA 3mg/L
T2	A	Tween 80 (5 min), alcohol al 70% (1 min) y NaClO al 5% v/v (10 min).	Y	BAP 2mg/L+ NAA 3mg/L
T3	B	Tween 80 (5 min), alcohol al 70% (1 min) y NaClO al 10% v/v (10 min).	X	BAP 2mg/L+IAA 3mg/L
T4	B	Tween 80 (5 min), alcohol al 70% (1 min) y NaClO al 10% v/v (10 min).	Y	BAP 2mg/L+NAA 3mg/L

Fuente: Las autoras (2024).

3.12.4 Cámara de crecimiento

En la cámara de crecimiento se llevó a cabo la fase de aclimatación y crecimiento vegetal, manteniendo una temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa del 60% y un ciclo de iluminación de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de oscuridad.

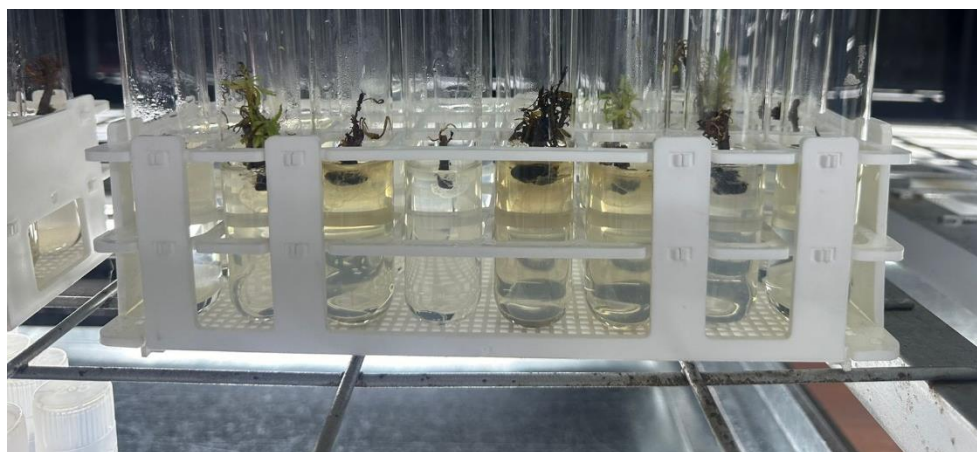
En las siguientes imágenes se muestra el proceso diario que tuvieron las plantas, y su comportamiento frente a los diferentes tratamientos.

*Figura 5. Planta ya trasplantada al nuevo medio con la respectiva concentración hormonal
Día 1.*



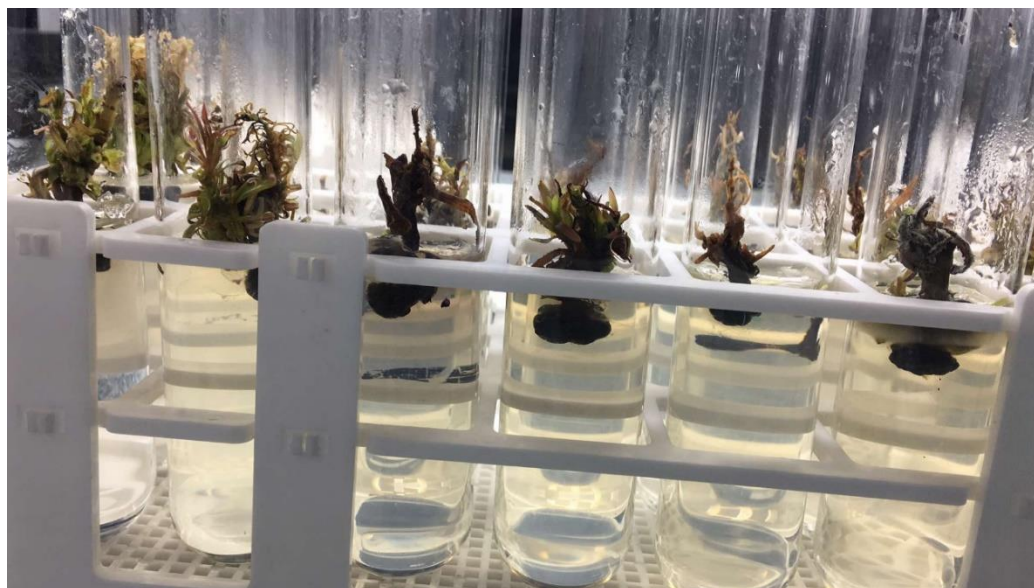
Fuente: Las autoras (2024)

Figura 6. Cambios en las plantas principalmente en las hojas las cuales se veían más marrones por el proceso de desinfección de trasplante se notaron en el Día 15.



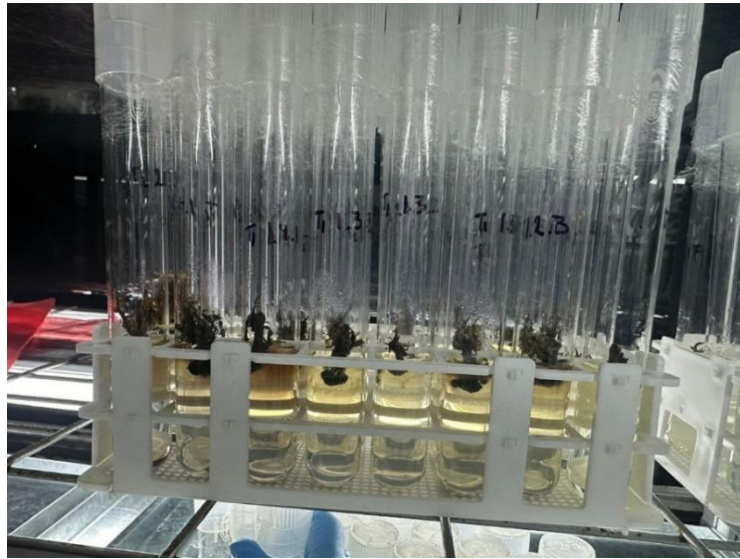
Fuente: Las autoras (2024).

Figura 7. Cambios que se notaron en las hojas que presentaron necrosis el Día 20.



Fuente: Las autoras (2024).

Figura 8. Las plantas se vieron muy necrosadas, aunque no había presencia de callos ni de raíces en el Día 30.



Fuente: Las autoras (2024).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis y discusión de resultados

Los resultados de la presente investigación revelaron una variabilidad en las respuestas ya que el efecto producido en el nivel de contaminación y la viabilidad de los explantes, mediante un diseño completamente al azar (DCA) con cuatro replicas.

Tabla 5. Diseño completamente al azar para el establecimiento de protocolos de enraizamiento.

EXPERIMENTOS	TRATAMIENTOS			REPLICAS	UE	% CONTAMINACION			% VIABILIDAD		
	T	D	H								
1	T0	-	-	-	3	0,3	0,2	0,1	-	-	-
2	T1	A	X	1	3	1,3	1,1	1,2	-	-	-
3	T2	A	Y	1	3	2,3	2,2	2,1	-	-	-
4	T3	B	X	1	3	3,3	3,2	3,1	-	-	-
5	T4	B	Y	1	3	4,2	4,1	4,3	-	-	-
6	T0	-	-	-	3	0,4	0,3	0,2	-	-	-
7	T1	A	X	2	3	1,1	1,2	1,3	-	-	-
8	T2	A	Y	2	3	2,2	2,1	2,3	-	-	-
9	T3	B	X	2	3	3,4	3,2	3,3	-	-	-
10	T4	B	Y	2	3	4,1	4,2	4,3	-	-	-
11	T0	-	-	-	3	0,2	0,1	0,3	-	-	-
12	T1	A	X	3	3	1,4	1,3	1,2	-	-	-
13	T2	A	Y	3	3	2,4	2,2	2,3	-	-	-
14	T3	B	X	3	3	3,2	3,1	3,3	-	-	-
15	T4	B	Y	3	3	4,3	4,2	4,1	-	-	-
16	T0	-	-	-	3	0,1	0,2	0,3	-	-	-
17	T1	A	X	4	3	1,2	1,1	1,3	-	-	-
18	T2	A	Y	4	3	2,1	2,2	2,3	-	-	-
19	T3	B	X	4	3	3,1	3,4	3,3	-	-	-
20	T4	B	Y	4	3	4,4	4,1	4,2	-	-	-

Fuente: Las autoras (2024)

Los resultados de este trabajo se exponen en la tabla 2. La variable “D” denota el desinfectante utilizado en cada tratamiento, donde “A”, se refiere al hipoclorito de sodio al 5% v/v, y, “B” corresponde al hipoclorito de sodio al 10% v/v.

La variable “H” representa la concentración hormonal empleada en la micropropagación.

Para los reguladores de crecimiento, “X” se asocia con la combinación de BAP a 2mg/L y AIA 3mg/L, mientras que “Y” corresponde a la combinación BAP a 2mg/L y ANA 3mg/L.

Las variables analizadas fueron la contaminación y viabilidad, donde se plantearon cuatro tratamientos en los que se incluyó el T0 control. Los datos se obtuvieron a los 15, 20 y 30 días después del día del cultivo. En el análisis, la contaminación muestra un grado de 5%, lo que expone elementos patógenos, mientras que la viabilidad obtuvo un 0% donde no hubo crecimiento observable.

A continuación, se expone el resultado de las ecuaciones del porcentaje de contaminación, porcentaje de necrosis y porcentaje de viabilidad en los diferentes tratamientos:

$$\text{Porcentaje de contaminación} = \left(\frac{3}{60} \right) \times 100 = 5\%$$

$$\text{Porcentaje de necrosis} = \left(\frac{\text{Número de plantas con necrosis}}{\text{Número total de plantas}} \right) \times 100$$

$$\text{Porcentaje de necrosis} = \left(\frac{\text{Número de plantas con necrosis}}{12} \right) \times 100$$

T2

$$\text{Porcentaje de necrosis} = \left(\frac{2}{12} \right) \times 100 \approx 16.67\%$$

T3

$$\text{Porcentaje de necrosis} = \left(\frac{3}{12} \right) \times 100 \approx 25\%$$

T1, T4 y T0

$$\text{Porcentaje de necrosis} = \left(\frac{0}{12} \right) \times 100 = 0\%$$

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{0}{20} * 100 = 0\%$$

En este caso, el tratamiento de desinfección fue eficiente, sin embargo, fue agresivo para las vitroplantas iniciales, en algunos de los tratamientos que recibieron desinfección se observó necrosis después de 20 días; mientras que las plantas del testigo que no recibieron desinfección no mostraron síntomas de necrosis.

El hipoclorito de sodio en altas concentraciones o combinaciones específicas con hormonas puede ser demasiado agresivo para las plantas, lo que conduce a la necrosis en lugar de promover un crecimiento saludable (Miller y Zhang, 2023).

Aunque se ha utilizado una concentración más baja de hipoclorito de sodio, combinado con una combinación hormonal, se ha observado necrosis, lo que indica que la desinfección, aunque es menos fuerte, puede influir en la viabilidad de los explantes si no se ajusta adecuadamente (Brown et al., 2018).

Tabla 6. Porcentaje obtenido en contaminación y viabilidad.

Tratamientos	%Contaminación	%Viabilidad	Total
T0	0%	0%	100%
T1	25%	0%	95%
T2	0%	0%	100%
T3	0%	0%	100%
T4	0%	0%	100%

Fuente: Las autoras (2024).

En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos para cada variable tras llevar a cabo la desinfección. Se puede observar que existe un mayor porcentaje de contaminación asociado con una menor viabilidad de las plantas. En particular, el tratamiento 1 (T1) presentó el mayor porcentaje de contaminación, con un 25% de explantes contaminados por hongos y bacterias, en comparación con los tratamientos T2, T3 y T4, que mostraron un 0% de contaminación. Esto sugiere que el tratamiento de desinfección aplicado en T1 fue menos efectivo en la reducción de la contaminación en comparación con los otros protocolos. Se atribuye que la aplicación de hipoclorito de sodio al 5% v/v, indicando que este protocolo fue menos eficaz en la reducción de patógenos en comparación con otros tratamientos.

Tabla.7 Porcentaje de Contaminación entre los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Total de Explantes	Ex. Contaminados	%Contaminación
T0	12	0	0
T1	12	3	25
T2	12	0	0
T3	12	0	0
T4	12	0	0

Fuente: Las autoras (2024).

En relación con el porcentaje de viabilidad, se observó que no hubo viabilidad en ninguno de los tratamientos, ya que ningún explante mostró crecimiento debido al protocolo de desinfección.

Tabla 8. Tabla de Porcentaje de Necrosis.

Tratamiento	% Necrosis
T0	0%
T1	100%
T2	83,33%
T3	75%
T4	100%

Fuente: Las autoras (2024).

La tabla 8 muestra que el tratamiento T0 no causó necrosis en las plantas, mientras que los tratamientos T1 y T4 causaron necrosis en el 100%, indicando que el protocolo de desinfección es extremadamente dañino. Los tratamientos T2 y T3 también causaron necrosis en un alto porcentaje de plantas (83.33% y 75%, respectivamente), pero no tan severamente como T1 y T4. Esto sugiere que T1 y T4 son los tratamientos de desinfección son más perjudiciales, mientras que T2 y T3 tienen efectos significativos, pero menos agresivos.

4.2 Evaluación de la distribución normal de los datos

Para la evaluación de la normalidad se procedió con la prueba de Shapiro Wilk para las variables contaminación y viabilidad, con una significancia de α de 0.05, bajo las siguientes hipótesis

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

El valor p de la prueba indica si los datos proceden o no de una distribución normal si es mayor al indicio de significación, para rechazar la hipótesis nula hay que confirmar mediante la prueba de Shapiro Wilk.

Tabla 9. Prueba Shapiro-Wilk.

Description: df [2 × 4]			
Variable <chr>	W <dbl>	p_value <dbl>	Normalidad <chr>
Contaminación	0.5521817	0.0001309782	No
Necrosis	0.7629690	0.0390709815	No

2 rows

Fuente: Las autoras (2024).

En la tabla 9 podemos observar que, las variables de contaminación y necrosis, no siguen una distribución normal, ya que, los valores de p muestran ser menores al nivel de significancia de 0.05.

4.3 Prueba de Kruskal – Wallis

Dado que en la prueba de Shapiro-Wilk los datos no siguen una distribución normal, se optó por el uso de pruebas no paramétricas para analizar los datos de los tratamientos. Por lo tanto, la prueba de Kruskal-Wallis es una alternativa no paramétrica al ANOVA.

Tabla10. Prueba de Kruskal-Wallis.

Description: df [2 x 4]

Variable<chr>	Chi_cuadrado<dbl>	p_value<dbl>	Conclusion<chr>
Contaminacion	19	0.0007859442	Hay diferencias significativas entre tratamientos
Necrosis	19	0.0007859442	Hay diferencias significativas entre tratamientos

2 rows

Fuente: Las autoras (2024).

La tabla 10 nos muestra:

- Contaminación: El valor de chi-cuadrado es 19 y el p-valor es 0.0007859. Dado que el p-valor es menor a 0.05, por lo tanto, hay diferencias significativas entre los tratamientos en términos de contaminación.
- Necrosis: El valor de chi-cuadrado es 19 y el p-valor es 0.0007859. Dado que el p-valor es menor a 0.05, hay diferencias significativas entre los tratamientos en términos de necrosis.

4.4 Prueba de Dunn con ajuste de Bonferroni

La prueba de Dunn es una prueba post-hoc no paramétrica se utiliza para realizar comparaciones múltiples entre pares de grupos, luego de haber encontrado diferencias significativas con la prueba de Kruskal-Wallis. Esto nos permite entender específicamente

dónde se encuentran cada una de las diferencias que existen entre tratamientos tanto para la contaminación y necrosis.

Tabla 11. Prueba de Dunn con ajuste de Bonferroni - Contaminación

data: x and group
Kruskal-wallis chi-squared = 19, df = 4, p-value = 0

		Comparison of x by group (Bonferroni)			
Col	Mean-	T0	T1	T2	T3
Row	Mean				
	T1	-3.446012 0.0028*			
	T2	0.000000 1.0000	3.446012 0.0028*		
	T3	0.000000 1.0000	3.446012 0.0028*	0.000000 1.0000	
	T4	0.000000 1.0000	3.446012 0.0028*	0.000000 1.0000	0.000000 1.0000

alpha = 0.05
Reject Ho if p <= alpha/2
Kruskal-wallis rank sum test

Fuente: Las autoras (2024).

En la Tabla 10 se muestran las comparaciones entre los tratamientos, revelando diferencias significativas. Destacan particularmente los tratamientos T0 y T1 en comparación con los demás. Esto indica que los tratamientos T2, T3 y T4 no presentaron diferencias significativas en relación con T0 y T1.

Tabla 12. Prueba de Dunn con ajuste de Bonferroni - Necrosis

data: x and group
Kruskal-Wallis chi-squared = 19, df = 4, p-value = 0

		Comparison of x by group (Bonferroni)			
Col	Mean-				
Row	Mean	T0	T1	T2	T3
	T1	-3.500000 0.0023*			
	T2	-2.000000 0.2275	1.500000 0.6681		
	T3	-1.000000 1.0000	2.500000 0.0621	1.000000 1.0000	
	T4	-3.500000 0.0023*	0.000000 1.0000	-1.500000 0.6681	-2.500000 0.0621

alpha = 0.05
Reject Ho if p <= alpha/2
\$chi2
[1] 19

Fuente: Las autoras (2024).

En la tabla 12 se encontraron diferencias significativas en las comparaciones entre los tratamientos y sugiere que los tratamientos T1 y T4 tienen los mejores resultados a comparación del resto de los tratamientos, ya que, estos tienen sus valores p mayores que el umbral de significancia 0.05 indicando que las diferencias no son estadísticamente significativas.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Los resultados obtenidos en la presente investigación evidencian que, la viabilidad de los explantes de *Salix humboldtiana Willd.* fue nula en todos los tratamientos evaluados, a pesar de la aplicación de diversos protocolos de desinfección y enraizamiento. Por lo tanto, los protocolos utilizados no lo suficientemente eficaces y deberán ser replanteados, a fin de contribuir a mejorar la formación de raíces y marcadamente disminuir la necrosis del explante.

El tratamiento de desinfección aplicado fue eficiente en términos de eliminación de patógenos. Sin embargo, resulto ser demasiado agresivo para los explantes. La mayoría de las plantas que fueron sometidas a estos tratamientos mostraron signos de necrosis durante y hasta los 20 días. En contraste, las plantas del grupo de control, que no recibieron desinfección, no presentaron estos síntomas y conservaron hojas verdes y sanas.

La presencia de necrosis en los tratamientos con hipoclorito de sodio al 5% y 10% fueron demasiado intensos, afectando adversamente la viabilidad de los explantes, por lo tanto, es importante ajustar las concentraciones y tiempos de exposición en los protocolos de desinfección para evitar daños a los explantes, mientras aún se mantiene la eficacia en la eliminación de patógenos. Por lo tanto, no se observó crecimiento rizogénico.

Las pruebas estadísticas realizadas, incluyendo la prueba de Shapiro-Wilk, la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba post-hoc de Dunn, nos indican que existen diferencias significativas en los niveles de contaminación y necrosis entre los diferentes tratamientos.

La prueba de Shapiro-Wilk confirmó que los datos no siguen una distribución normal, por lo tanto, se utilizaron pruebas no paramétricas.

La prueba de Kruskal-Wallis nos dio como resultado p-valor es 0.0007859 para la contaminación y la necrosis, por lo tanto, se concluye que diferencias significativas en los tratamientos implementados en el enraizamiento.

Finalmente, la prueba de Dunn dio como resultado diferencias significativas entre pares específicos de tratamientos. En relación con la contaminación, los tratamientos T0 y T1 demostraron los mejores resultados, mientras que, para la necrosis, los tratamientos T1 y T4 destacaron por sus resultados más favorables.

5.2 Recomendaciones

Es muy importante reevaluar los protocolos de desinfección y enraizamiento, ya que se observaron bajas tasas de viabilidad en todos los tratamientos. Las concentraciones de hormonas vegetales en medios de cultivo también necesitan ser ajustadas y otros factores dentro del laboratorio previamente tienen que ser tomados en cuenta, como la temperatura, la luz, etc. Es fundamental identificar y corregir estos factores ya que repercuten en la efectividad del enraizamiento *in vitro*.

Los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial en donde se recomienda una luz indirecta dentro de la cámara de crecimiento, se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23°C.

Para futuras investigaciones o trabajos experimentales se recomienda ajustar la intensidad y la duración del tratamiento de desinfección para encontrar un equilibrio que elimine patógenos sin dañar la vitroplanta. Implementar también un seguimiento más a largo plazo para evaluar el desarrollo de la salud general de las plantas.

6. REFERENCIAS

1. Albrecht, T., & Argueso, C. T. (2016). Should I fight or should I grow now? The role of cytokinins in plant growth and immunity and in the growth–defence trade-off. *Annals Of Botany*, mcw211. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw211>.
2. Alcantara Cortes, J. S., Jovanna, A. G., & Alcántara Cortés, J. D. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-109.pdf>.
3. Brondani, G. E., Grossi, F., Wendling, I., & Alessandra, M. (2010). Aplicação de IBA para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus*. ResearchGate. https://www.researchgate.net/publication/49592487_Aplicacao_d_e_IBA_para_o_enraizamento_de_miniestacas_de_Eucalyptus_benthamii_Maide_n_Cambage_x_Eucalyptus_dunnii_Maiden_IBA_application_for_rooting_of_Eucalyptus_benthamii_Maiden_and_Cambage_x_Eucalyptu.
4. Brown, A., Johnson, R., & Smith, L. (2018). *Effect of disinfectants on plant tissue culture*. Journal of Plant Research, 131(4), 542-556.
5. Cedrés Gazo, M., Vocos, M., Dalzotto, D., Boeri, P. A., & Sharry, S. (2019). Ajuste de la desinfección de explantes de *Salix humboldtiana* Willd (Sauce Nativo) para su introducción *in vitro*. <https://rid.unrn.edu.ar/handle/20.500.12049/5016>.
6. De Jesús Martínez-Hernández, M., Alejandro, A. L., Osorio-Acosta, F., Felipe, G. L., Héctor, L. M., & Martín, M. R. (s. f.). *Evaluación de diferentes fuentes de carbohidratos y medios de soporte, para la multiplicación in vitro de portainjertos de cítricos tolerantes a la tristeza*. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2009000300011.

7. Di Benedetto, A., Galmarini, C. R., & Tognetti, J. A. (2015). Effects of combined or single exogenous auxin and/or cytokinin applications on growth and leaf area development in *Epipremnum aureum*. *The Journal Of Horticultural Science & Biotechnology*, 90(6), 643-654. <https://doi.org/10.1080/14620316.2015.11668727>.
8. Domenech, A. (2011). *Medio de Cultivo*. <https://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/seminarios/1%20Medios%20de%20cultivo.pdf>.
9. Eras Guamán, V. H., Moreno Serrano, J. A., Yaguana Arévalo, M., Poma Angamarca, R. A., & Cueva Coronel, C. M. (2021). *Inducción in vitro de raíces de Cinchona officinalis L., a partir de vitroplantas*. *Bosques Latitud Cero*, 11(2), 43–52. Recuperado a partir de <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/1006>.
10. Gallo, L., Amico, I., Bozz, J., Cedres, N., Cerrillo, T., Datri, L., Hansen, M., & Leyer, I. (2022). *Salix humboldtiana: a very ancient willow and the only native to Argentina*. https://www.researchgate.net/profile/Leonardo-Datri/publication/342961445_Chapter_8B_Salix_humboldtiana_Reiwe_Waik_Yvir_Puku_Wayaw/links/624587a47931cc7ccf07f1e3/Chapter-8B-Salixhumboldtiana-Reiwe-Waik-Yvir-Puku-Wayaw.pdf.
11. Gammoudi, N., Nagaz, K., & Ferchichi, A. (2022). Establishment of optimized *in vitro* disinfection protocol of *Pistacia vera* L. explants mediated a computational approach: multilayer perceptron–multi-objective genetic algorithm. *BMC Plant Biology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03674-x>.

12. García, M. B., Araluce, C. R., Rubio, Y. C., Rodríguez, S. M., & Feria, R. V. (2004, 16 octubre). *Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento in vitro de Guadua angustifolia Kunth*. Borges García | Biotecnología Vegetal. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/434/html>.
13. Gisbert Doménech, C., & Picó Sirvent, M. B. (2015). *Micropropagación*. https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/51895/Gisbert%20and%20Pico_2015%20micropropagaci%C3%B3n.pdf.
14. Gutiérrez, B. (1995). Consideraciones sobre la fisiología y el estado de madurez en el enraizamiento de estacas de especies forestales. *Ciencia E Investigación Forestal*, 9(2), 261-277. <https://doi.org/10.52904/0718-4646.1995.228>.
15. Hedden, P., & Thomas, S. G. (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochemical Journal*, 444(1), 11-25. <https://doi.org/10.1042/bj20120245>
16. Hermida Palacios, M. A., León González, P. A., & Cobo Torres, A. D. (2021). *TRANSFORMACIÓN DEL PAISAJE URBANO DEBIDO a LA INCORPORACIÓN DE NUEVAS INFRAESTRUCTURAS EN LA PRIMERA MITAD DEL SIGLO XX EN CUENCA (ECUADOR)*. <https://estudiosgeograficos.revistas.csic.es/index.php/estudiosgeograficos/article/download/1056/1271?inline=1#id0xce56d00>
17. Jorge Eliécer, R. A. (2012). *Avances de la micropropagación in vitro de plantas leñosas*. <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/2515>.
18. Kieber, J. J., & Schaller, G. (2018). Cytokinin signaling in plant development. *Development*, 145(4). <https://doi.org/10.1242/dev.149344>.

19. Mauriat, M., Sandberg, L., & Moritz, T. (2011). *Proper gibberellin localization in vascular tissue is required to control auxin-dependent leaf development and bud outgrowth in hybrid aspen*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Proper-gibberellinlocalization-in-vascular-tissue-MauriatSandberg/09f7dcaa8addb84c34b31fc3ec8239fcaa43d732>
20. Miller, J., & Zhang, Y. (2023). *Optimization of plant tissue culture media and disinfectants*. Plant Biotechnology Journal, 21(1), 45-58.
21. Moreno Licea (2016). Biotecnología forestal aplicada a la producción de madera de nogal centro de biotecnología revista Madrid España.
22. Ramirez Iglesias (2018). Selección de genotipos de vainilla planifolia Jacks .ex Andrews resistentes a fusarium oxysporum f. sp. Vainilla mediante biotecnología Revista científica .ventro tepetitlan Jalisco Mexico.
23. Olmos, S., Luciani, G., & Galdeano, E. (2016). *IV. Capítulo 1 Micropropagación*.
https://www.researchgate.net/publication/304459382_IV_Capitulo_1_Micropropagacion.
24. Orellana, I., Vincon, S., Williams, A., & Acuña, L. (2022). Situación de las poblaciones de Salix humboldtiana en el río Chubut, Argentina. Bosque, 43(3), 253-266. <https://doi.org/10.4067/s0717-92002022000300253>.
25. Pena, J. D. (2019). *SalixHumboldtiana*. Scribd.
<https://www.scribd.com/document/430243501/SalixHumboldtiana> PLAN DE DESARROLLO y ORDENAMIENTO TERRITORIAL DE LA PROVINCIA DEL AZUAY. (2022). https://www.azuay.gob.ec/wp-content/uploads/2022/02/PDOT-AZUAY-ALINEADO-PND-2021-025_compressed.pdf.
26. Plataforma geoespacial de datos forestales. (2023). *Salix humboldtiana Willd. /Sauce colorado*. <https://idefor.cnf.gob.mx/documents/1512/download>.
27. Prada, M., Rueda, J., Magdaleno, F., & Martínez, R. (2013). *Salix Spp. Sauces y mimbreras de riberas*.

https://www.miteco.gob.es/content/dam/mites/es/parquesnacionalesoapn/publicaciones/Semillas%20-%20Fichas%20de%20especies%20S-V_tcm30-100342.pdf.

28. *Reguladores del crecimiento vegetal* | CANNA España. (2016).

<https://www.canna.es/articles/reguladores-del-crecimiento-vegetal>.

29. Salinas, M., Hakim, G., Gandolfo, E., De Lojo, J., & Giardina, E. (2022). Involvement of auxins in *Impatiens walleriana* plants grown in different plug tray systems during nursery. *Ornamental Horticulture*, 28(3). <https://doi.org/10.1590/2447-536x.v28i3.2511>.

30. *Sauce colorado* (*Salix humboldtiana*). (2020). iNaturalist Ecuador. <https://ecuador.inaturalist.org/taxa/209991-Salix-humboldtiana>.

31. Suárez Padrón, I. (2020). Cultivo de tejidos Vegetales. <https://repositorio.unicordoba.edu.co/server/api/core/bitstreams/5eacebea-f261-4e7b-8ca8-67f37ba9d7fb/content>.

32. Tobar, C. (2011). Totipotencialidad. Buenas Tareas. <https://www.buenastareas.com/ensayos/Totipotencialidad/1499061.html>.

33. Universidad Abierta y a Distancia de México. (2022). *Cultivo de tejidos vegetales* /. https://dmd.unadmexico.mx/contenidos/DCSBA/BLOQUE2/BI/06/BCTV1/unidad_02/descargables/BCTV1_U2_Contenido.pdf.