

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI**

FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y AMBIENTALES

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA FORESTAL



**CULTIVO *IN VITRO* DE FOLIOS DE *Dipteryx ferrea* (DUCKE) DUCKE  
(SHIHUAHUACO): EFECTO DE FITOHORMONAS EN LA INDUCCIÓN  
DE LA FORMACIÓN DE CALLOS FRIABLES**

Tesis para optar el título profesional de  
INGENIERO FORESTAL

FRANK, RUBIO RIOS

Pucallpa, Perú  
2025



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y AMBIENTALES**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA FORESTAL**



**ACTA DE APROBACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**  
**N° 478/019-2025-UNU-FCFyA-CGT**

En la ciudad de Pucallpa, a horas 11:05 am del día 30 de abril del 2025 de acuerdo al reglamento de grados y títulos de la universidad nacional de Ucayali. Se reunieron los miembros del jurado evaluador en el auditorio de la facultad de ciencias forestales y ambientales designados con el memorando múltiple N° 019-2025-UNU-FCFyA-CGT, conformado por los siguientes docentes:

Dr. Fernando Velásquez de la Cruz  
Dr. Rubén Darío Manturano Pérez  
Dr. Gabriel Mercado Jáuregui

Presidente  
Miembro  
Miembro

Se procedió a evaluar la sustentación de tesis titulada **"CULTIVO IN VITRO DEFOLIOS DE DYPTERYX FERREA (DUCKE) DUCKE (SHIHUAHUACO): EFECTO DE FITOHORMONAS EN LA INDUCCIÓN DE LA FORMACIÓN DE CALLOS FRIABLES"**, presentado por el Bachiller **FRANK RUBIO RIOS**, asesorado por el Dr. **Jorge Arturo Mori Vásquez**, finalizando la sustentación se procedió a la formulación de preguntas por parte del jurado evaluador, siendo absueltas por el sustentante, en consecuencia la tesis fue **APROBADA POR UNANIMIDAD RECOMENDÁNDOSE LA PUBLICACIÓN**, levantando las observaciones que hubiera, quedando expedito para el otorgamiento del **TÍTULO DE INGENIERO FORESTAL**. Siendo las 12:00 m horas del mismo día, se dio por concluido este acto académico, firmando los miembros en señal de conformidad.

Dr. Fernando Velásquez de la Cruz  
Presidente

Dr. Rubén Darío Manturano Pérez  
Miembro

Dr. Gabriel Mercado Jáuregui  
Miembro

## ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

Esta tesis fue aprobada por los miembros del jurado Evaluador de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, de la Universidad Nacional de Ucayali, como requisito para obtener el Título Profesional de Ingeniero Forestal.

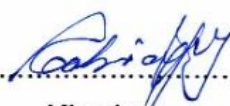
Dr. Fernando Velásquez de la Cruz

  
.....  
Presidente

Dr. Rubén Darío Manturano Pérez

  
.....  
Miembro

Dr. Gabriel Mercado Jáuregui

  
.....  
Miembro

Dr. Jorge Arturo Mori Vásquez

  
.....  
Asesor

Bach. Frank Rubio Rios

  
.....  
Tesisista



# CONSTANCIA

## ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Nº V/018-2025.

La Dirección de Producción Intelectual de la Universidad Nacional de Ucayali, hace constar por la presente, que el trabajo académico de investigación, titulado:

**"CULTIVO IN VITRO DE FOLIOS DE DIPTERYX FERREA (DUCKE) DUCKE (SHIHUAHUACO): EFECTO DE FITOHORMONAS EN LA INDUCCIÓN DE LA FORMACIÓN DE CALLOS FRIABLES"**

Autor(es) : RUBIO RIOS, FRANK  
Facultad : CIENCIAS FORESTALES Y AMBIENTALES  
Escuela : ING. FORESTAL  
Asesor(a) : Dr. MORI VÁSQUEZ, JORGE ARTURO

Presenta un **porcentaje de similitud de 1%**, verificado en el Sistema Antiplagio COMPILATIO, De acuerdo a los criterios de porcentaje establecidos en el artículo 9 de la DIRECTIVA DE USO DEL SISTEMA ANTIPLAGIO, el cual indica que todo trabajo de investigación no debe superar el 10%. **En tal sentido, se declara, que el presente trabajo de investigación: SI Contiene un porcentaje aceptable de similitud,** procediéndose a emitir la presente Constancia de Originalidad de Trabajo de Investigación (COTI) a solicitud del asesor.

En señal de conformidad se firma y sella el presente documento.

Fecha: 21/01/2025



Mg. JOSÉ MANUEL CÁRDENAS BERNAOLA  
Director de Producción Intelectual



UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI

DIRECCIÓN DE PRODUCCIÓN INTELECTUAL

## AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Repositorio de la Universidad Nacional de Ucayali

Yo, FRANK RUBIO RIOS

Autor de la tesis titulada : "CULTIVO IN VITRO DE FOLIOS DE DYPTERYX FERREA (DUCKE) DUCKE (SHIHUAHUACO) : EFECTO DE FITOHORMONAS EN LA INDUCCIÓN DE LA FORMACIÓN DE CALLOS ERTIBLES"

Sustentada el año 2025

Asesor(a): D.C. TORGE ARTURO MORT VÁSQUEZ

Facultad: CIENCIAS FORESTALES Y AMBIENTALES

Escuela Profesional: INGENIERIA FORESTAL

Autorizo la publicación:

PARCIAL

☐

TOTAL

☒

De mi trabajo de investigación en el Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de Ucayali ([www.repositorio.unu.edu.pe](http://www.repositorio.unu.edu.pe)), bajo los siguientes términos:

**Primero:** Otorgo a la Universidad Nacional de Ucayali licencia no exclusiva para reproducir, distribuir, comunicar, transformar (únicamente mediante su traducción a otros idiomas) y poner a disposición del público en general mi tesis (incluido el resumen) a través del Repositorio Institucional de la UNU, en formato digital sin modificar su contenido, en el Perú y en el extranjero; por el tiempo y las veces que considere necesario y libre de remuneraciones.

**Segundo:** Declaro que la tesis es una creación de mi autoría y exclusiva titularidad, por tanto me encuentro facultado a conceder la presente autorización, garantizando que la tesis no infringe derechos de autor de terceras personas, caso contrario, me hago único(a) responsable de investigaciones y observaciones futuras, de acuerdo a lo establecido en el estatuto de la Universidad Nacional de Ucayali, la Superintendencia Nacional de Educación Superior Universitaria y el Ministerio de Educación.

En señal de conformidad firmo la presente autorización.

Fecha: 30 / 04 / 2025

Email: rubloriosfrank8@gmail.com

Firma: 

Teléfono: 916160874

DNI: 74158186

[www.repositorio.unu.edu.pe](http://www.repositorio.unu.edu.pe)  
[repositorio@unu.edu.pe](mailto:repositorio@unu.edu.pe)

## **DEDICATORIA**

A Dios por darme la vida, sabiduría y perseverancia que me permitió llegar hasta este momento tan importante de mi formación profesional y por guiarme en cada paso que doy.

Así mismo, de manera muy especial dedico este trabajo a mamita Martha Ríos Vásquez a quién quiero mucho, la siempre estuvo apoyándome desde mi nacimiento, de utilizar todos sus recursos posibles para poder estudiar y ser un profesional, de igual manera se la dedico a mi papá Carlos Rubio Arévalo por su apoyo incondicional junto a mis hermanos y hermanas.

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, agradecer a Dios por este paso más en mi vida profesional, a mis padres: Martha Rios Vásquez y Carlos Rubio Arévalo, por animarme y apoyarme en obtener el título universitario, agradecer también a los docentes de la escuela profesional de ingeniería forestal de la Universidad Nacional de Ucayali por los conocimientos recibido de ellos. De igual manera a mi familia en general que siempre estuvo y estará ahí animándome deseándome lo mejor.

Agradezco a mi asesor; el Dr. Jorge Arturo Morí Vásquez por su apoyo y empatía en el desarrollo de la tesis, por animarme, orientarme y compartir sus conocimientos científicos, durante la revisión y culminación de este trabajo de investigación.

Del mismo modo, al ing. Anthony Cristian Gonzales Alvarado por su amistad e interés en apoyarme desde el inicio de la tesis.

También agradezco a la Bach. Felicitas Esperanza Maguiña Sánchez y al alumno Selim Bardalez Pérez quienes pertenecen al círculo de investigación de la facultad de ingeniería forestal y ambiental, por su apoyo en las distintas actividades dentro del laboratorio.

Por último, a todas las personas que me apoyaron directa o indirectamente en el desarrollo de la presente tesis; muchas gracias.

## ÍNDICE GENERAL

Pág.

|                                                   |       |
|---------------------------------------------------|-------|
| DEDICATORIA .....                                 | vi    |
| AGRADECIMIENTO .....                              | vii   |
| ÍNDICE GENERAL .....                              | viii  |
| ÍNDICE DE TABLAS .....                            | xiii  |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....                           | xv    |
| RESUMEN .....                                     | xviii |
| ABSTRACT .....                                    | xix   |
| INTRODUCCIÓN .....                                | xx    |
| CAPITULO I .....                                  | 1     |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....                  | 1     |
| 1.1. Formulación del Problema .....               | 1     |
| 1.1.1. Problema general .....                     | 1     |
| 1.1.2. Problemas específicos .....                | 1     |
| 1.2. Objetivos .....                              | 2     |
| 1.2.1. Objetivo general .....                     | 2     |
| 1.2.2. Objetivo específicos .....                 | 2     |
| CAPITULO II .....                                 | 3     |
| MARCO TEÓRICO .....                               | 3     |
| 2.1. Antecedentes .....                           | 3     |
| 2.1.1. Antecedentes internacionales .....         | 3     |
| 2.1.2. Antecedentes nacionales .....              | 5     |
| 2.1.3. Antecedentes locales .....                 | 5     |
| 2.1.4. Descripción de la especie de estudio ..... | 7     |

|            |                                                       |    |
|------------|-------------------------------------------------------|----|
| 2.1.4.1.   | Taxonomía.....                                        | 7  |
| 2.1.4.2.   | Descripción botánica .....                            | 7  |
| 2.1.4.3.   | Fenología.....                                        | 8  |
| 2.1.4.4.   | Distribución y hábitad. ....                          | 8  |
| 2.1.4.5.   | Características de la madera. ....                    | 8  |
| 2.1.4.6.   | Uso e importancia.....                                | 9  |
| 2.2.       | Base Teórica.....                                     | 9  |
| 2.2.1.     | Callogénesis. ....                                    | 9  |
| 2.2.1.1.   | Callo.....                                            | 9  |
| 2.2.1.2.   | Característica del callo .....                        | 10 |
| 2.2.1.3.   | Tipos de callos.....                                  | 10 |
| 2.2.2.     | Cultivo <i>in vitro</i> .....                         | 11 |
| 2.2.2.1.   | Medio de cultivo.....                                 | 12 |
| 2.2.2.2.   | Condiciones del cultivo <i>in vitro</i> .....         | 13 |
| a)         | Temperatura .....                                     | 14 |
| b)         | Luz .....                                             | 14 |
| c)         | Humedad.....                                          | 14 |
| d)         | pH.....                                               | 14 |
| e)         | Asepsia .....                                         | 15 |
| 2.2.2.3.   | Fitorreguladores o fitohormonas de crecimiento.....   | 15 |
| 2.2.2.3.1. | Clasificación de los reguladores de crecimiento ..... | 15 |
| a)         | Auxinas.....                                          | 16 |
| b)         | Citoquininas.....                                     | 17 |
| c)         | Giberelinas. ....                                     | 18 |

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| d) Ácido abscísico .....                                    | 19 |
| e) Ácido salicílico.....                                    | 19 |
| f) Brasinoesteroides .....                                  | 20 |
| g) Etileno .....                                            | 20 |
| 2.2.2.4. Morfogénesis .....                                 | 20 |
| 2.2.2.4.1. Organogénesis.....                               | 21 |
| Organogénesis directa: .....                                | 21 |
| Organogénesis indirecta .....                               | 21 |
| 2.2.2.4.2. Embriogénesis Somática .....                     | 22 |
| 2.3.Definición de Términos Básicos .....                    | 22 |
| CAPITULO III.....                                           | 26 |
| METODOLOGÍA.....                                            | 26 |
| 3.1.Método de investigación.....                            | 26 |
| 3.2.Población y muestra. ....                               | 26 |
| 3.2.1. Población .....                                      | 26 |
| 3.2.1. Muestra. ....                                        | 26 |
| 3.3. Procedimiento de recolección de datos. ....            | 26 |
| 3.3.1. Preparación del medio de cultivo .....               | 26 |
| 3.3.2. Recolección de material vegetal.....                 | 27 |
| 3.3.3. Protocolo de desinfección.....                       | 27 |
| 3.3.4. Inoculación .....                                    | 28 |
| 3.3.5. Análisis de pH y conductividad eléctrica .....       | 28 |
| 3.3.6. Diseño experimental y tratamientos aplicados.....    | 28 |
| 3.4.Técnicas e instrumentos para recolección de datos. .... | 29 |

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| 3.4.1. Técnicas.....                                       | 29 |
| 3.4.2. Instrumentos .....                                  | 29 |
| 3.5.Procesamiento para recolección de datos. ....          | 30 |
| Fase 1: Desdiferenciación o deformación del explante ..... | 31 |
| Fase 2: Callogénesis.....                                  | 33 |
| 3.6.Tratamiento de datos.....                              | 34 |
| CAPITULO IV .....                                          | 35 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....                                | 35 |
| 4.1.ASEPSIA Y CONTAMINACIÓN DE EXPLANTES.....              | 35 |
| 4.2.OXIDACIÓN DEL EXPLANTE.....                            | 38 |
| 4.3.NECROSIS DEL EXPLANTE .....                            | 41 |
| 4.4.COLOR DE EXPLANTE .....                                | 44 |
| 4.5.SUPERVIVENCIA Y MORTANDAD DEL EXPLANTE .....           | 45 |
| 4.6.DESDIFERENCIACIÓN O DEFORMACIÓN DEL EXPLANTE .....     | 47 |
| 4.6.1. Formas del explante .....                           | 48 |
| 4.7.CALLOGÉNESIS .....                                     | 52 |
| 4.7.1. Grado de encallamiento.....                         | 56 |
| 4.7.2. Área del callo .....                                | 59 |
| 4.7.3. Altura del callo .....                              | 62 |
| 4.7.4. Color del callo .....                               | 64 |
| 4.7.5. Oxidación del callo.....                            | 65 |
| 4.7.6. Necrosis del callo.....                             | 68 |
| 4.7.7. Masa fresca y seca del callo. ....                  | 71 |
| 4.8.Análisis de conductividad eléctrica y PH.....          | 75 |

|                                                  |    |
|--------------------------------------------------|----|
| Masa Fresca vs. C.E $\mu\text{s/cm}$ Final ..... | 76 |
| CAPITULO V .....                                 | 79 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....              | 79 |
| 5.1.Conclusiones .....                           | 79 |
| 5.2.Recomendaciones .....                        | 80 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                  | 81 |
| ANEXOS.....                                      | 95 |

## ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

|                  |                                                                                                                                                                                                                            |           |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabla 1.</b>  | <i>Clasificación de los principales reguladores de crecimiento.....</i>                                                                                                                                                    | <i>16</i> |
| <b>Tabla 2.</b>  | <i>Tratamientos definidos con diferentes combinaciones y concentraciones de fitohormonas.....</i>                                                                                                                          | <i>29</i> |
| <b>Tabla 3.</b>  | <i>Fases a evaluar con sus respectivas variables en la presente investigación. ....</i>                                                                                                                                    | <i>31</i> |
| <b>Tabla 4.</b>  | <i>Análisis de varianza de los resultados del porcentaje de asepsia en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke. ....</i>                                                                                | <i>38</i> |
| <b>Tabla 5.</b>  | <i>Análisis de varianza de los resultados del porcentaje de contaminación en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke. ....</i>                                                                          | <i>38</i> |
| <b>Tabla 6.</b>  | <i>Análisis de medias de Kruskal-Wallis al 5% del efecto de fitohormonas y su concentración en el porcentaje de desdiferenciación de explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke.....</i>                   | <i>51</i> |
| <b>Tabla 7.</b>  | <i>Análisis de medias de Kruskal-Wallis al 5% del efecto de fitohormonas y su concentración en el porcentaje de Callogénesis de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke. ....</i>                                             | <i>56</i> |
| <b>Tabla 8.</b>  | <i>Análisis de medias de Kruskal-Wallis al 5% del efecto de fitohormonas y su concentración en el porcentaje del grado de encallamiento de explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke.....</i>             | <i>59</i> |
| <b>Tabla 9.</b>  | <i>Análisis de medias de Kruskal-Wallis al 5% del efecto de fitohormonas y su concentración en el área de los callos friables de desdiferenciación de explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke. ....</i> | <i>62</i> |
| <b>Tabla 10</b>  | <i>Análisis de medias de Kruskal-Wallis al 5% del efecto de fitohormonas y su concentración en la altura de los callos friables de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke.....</i>                                           | <i>64</i> |
| <b>Tabla 11.</b> | <i>Porcentaje de los colores que adquirieron los callos friables de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke durante las 9 semanas de evaluación. ....</i>                                                                     | <i>65</i> |

|                  |                                                                                                                                                                                                                         |           |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabla 12.</b> | <i>Análisis de medias de Kruskal-Wallis al 5% del porcentaje del grado de oxidación de los callos friables de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke. ....</i>                                                            | <i>68</i> |
| <b>Tabla 13.</b> | <i>Análisis de medias de Kruskal-Wallis al 5% del porcentaje del grado de necrosis de los callos friables de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke .....</i>                                                             | <i>71</i> |
| <b>Tabla 14.</b> | <i>Análisis de varianza del efecto de fitohormonas y su concentración de la masa fresca de los callos friables de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke Análisis de varianza de la masa fresca de callo friable.....</i> | <i>73</i> |
| <b>Tabla 15.</b> | <i>Análisis de medias de LSD al 5% del efecto de fitohormonas y su concentración en la masa fresca de callos friables de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke.....</i>                                                  | <i>73</i> |
| <b>Tabla 16.</b> | <i>Análisis de varianza del efecto de fitohormonas y su concentración de la masa seca de los callos friables de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke Análisis de varianza de la masa seca de callo friable .....</i>    | <i>74</i> |
| <b>Tabla 17.</b> | <i>Análisis de medias de LSD al 5% del efecto de fitohormonas y su concentración en la masa seca de callos friables de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke.....</i>                                                    | <i>74</i> |
| <b>Tabla 18.</b> | <i>Datos de recolectados de pH y conductividad eléctrica (C.E) <math>\mu\text{s/cm}</math> iniciales y finales de los médios de cultivo de cada tratamiento.....</i>                                                    | <i>72</i> |
| <b>Tabla 19.</b> | <i>Análisis de correlación Spearman de masa fresca; C.E y PH en InfoStat. ....</i>                                                                                                                                      | <i>75</i> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                              | Pág. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Figura 1.</b> Tipos de callos.....                                                                                                                                                        | 11   |
| <b>Figura 2.</b> Evaluación del porcentaje de asepsia por semana en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke.....                                                          | 36   |
| <b>Figura 3.</b> Evaluación del porcentaje de contaminación por semana en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke.....                                                    | 37   |
| <b>Figura 4.</b> Comparación de los resultados totales del porcentaje de asepsia y contaminación en explantes foliares de <i>Dipteryx férrea</i> (Ducke) Ducke.....                          | 37   |
| <b>Figura 5.</b> Evaluación del porcentaje de oxidación por semana en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke.....                                                        | 39   |
| <b>Figura 6.</b> Porcentaje del grado de oxidación total en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke.....                                                                  | 40   |
| <b>Figura 7.</b> Evaluación del porcentaje del grado de necrosis por semana en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke.....                                               | 42   |
| <b>Figura 8.</b> Porcentaje del grado de necrosis total en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke.....                                                                   | 43   |
| <b>Figura 9.</b> Porcentaje del color total de los explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke.....                                                                           | 44   |
| <b>Figura 10.</b> Evaluación del porcentaje de supervivencia por semana de explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke.....                                                   | 45   |
| <b>Figura 11.</b> Comparación de los resultados finales del porcentaje de supervivencia y mortandad en los explantes provenientes de folíolos de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke. ....  | 46   |
| <b>Figura 12.</b> Efecto de fitohormonas y su concentración en la forma de la desdiferenciación o deformación en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke. ....            | 48   |
| <b>Figura 13.</b> Evaluación del efecto de fitohormonas y su concentración por semana del porcentaje de desdiferenciación en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke..... | 49   |

|                   |                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 14.</b> | <i>Efecto de fitohormonas y su concentración en el porcentaje de desdiferenciación o deformación total en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke. ....</i>            | 50 |
| <b>Figura 15.</b> | <i>Evaluación del efecto de fitohormonas y su concentración en el porcentaje de callogénesis por semana de explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke..</i>               | 52 |
| <b>Figura 16.</b> | <i>Efecto de fitohormonas y su concentración en el porcentaje de callogénesis en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke. ....</i>                                     | 54 |
| <b>Figura 17.</b> | <i>Evaluación del efecto de fitohormonas y su concentración en el porcentaje del grado de encallamiento por semana de explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke.....</i> | 57 |
| <b>Figura 18.</b> | <i>Efecto de fitohormonas y su concentración en el porcentaje del grado de encallamiento en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke. ....</i>                          | 57 |
| <b>Figura 19.</b> | <i>Evaluación del efecto de fitohormonas y su concentración en el área del callo friable por semana de explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke. ....</i>               | 60 |
| <b>Figura 20.</b> | <i>Efecto de fitohormonas y su concentración en el área de los callos friables formados en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke.....</i>                            | 61 |
| <b>Figura 21.</b> | <i>Evaluación del efecto de fitohormonas y su concentración en la altura de los callos friables por semana en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke.....</i>         | 62 |
| <b>Figura 22.</b> | <i>Efecto de fitohormonas y su concentración en la altura de los callos friables formados en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke. ....</i>                         | 63 |
| <b>Figura 23.</b> | <i>Evaluación del porcentaje en el grado de oxidación del callo friable por semana en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke. ....</i>                                | 66 |
| <b>Figura 24.</b> | <i>Efecto de fitohormonas y su concentración en porcentaje del grado de oxidación de los callos friables formados en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke. ....</i> | 67 |
| <b>Figura 25.</b> | <i>Evaluación del porcentaje en el grado de necrosis del callo friable por semana en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke. ....</i>                                 | 69 |

|                                                                                                                                                                                                         |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 26.</b> <i>Efecto de fitohormonas y su concentración en porcentaje del grado de necrosis de los callos friables formados en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke.</i>   | 70  |
| <b>Figura 27.</b> <i>Comparación del efecto de fitohormonas y su concentración en masa fresca y seca de los callos friables formados en explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke.</i> | 72  |
| <b>Figura 28.</b> <i>Correlación no lineal entre masa fresca obtenido de los callos friables de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke y la conductividad eléctrica de los medios de cultivo.</i>         | 76  |
| <b>Figura 29.</b> <i>Correlación no lineal entre masa fresca obtenido de los callos friables de explantes foliares de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke y pH de los medios de cultivos.</i>          | 77  |
| <b>Figura 30.</b> <i>Preparación de los medios de cultivo.</i>                                                                                                                                          | 99  |
| <b>Figura 31.</b> <i>Distribución de los medios de cultivo en los frascos.</i>                                                                                                                          | 99  |
| <b>Figura 32.</b> <i>Medios de cultivo preparados.</i>                                                                                                                                                  | 99  |
| <b>Figura 33.</b> <i>Selección de planta madre, procedencia Km 86, N°2</i>                                                                                                                              | 100 |
| <b>Figura 34.</b> <i>Recolección de las hojas.</i>                                                                                                                                                      | 100 |
| <b>Figura 35.</b> <i>Lavado de las hojas fuera de la cámara de flujo laminar.</i>                                                                                                                       | 101 |
| <b>Figura 36.</b> <i>Lavado dentro de la cámara de flujo laminar.</i>                                                                                                                                   | 101 |
| <b>Figura 37.</b> <i>Inoculación de explantes en el medio de cultivo: colocando folio (A), uso de filtro bacteriológico (B), corte (C), inoculación (D).</i>                                            | 102 |
| <b>Figura 38.</b> <i>Incubación.</i>                                                                                                                                                                    | 103 |
| <b>Figura 39.</b> <i>Primera aparición de callos.</i>                                                                                                                                                   | 103 |
| <b>Figura 40.</b> <i>Callos de distintos tratamientos.</i>                                                                                                                                              | 104 |
| <b>Figura 41.</b> <i>Explantes sin callos, pero con aparente signo de ello, visto desde estereoscopio.</i>                                                                                              | 105 |
| <b>Figura 42.</b> <i>Fotografía de tratamientos con callos bajo estereoscopio.</i>                                                                                                                      | 106 |
| <b>Figura 43.</b> <i>Tesista (Autor).</i>                                                                                                                                                               | 109 |

## RESUMEN

*Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke (shihuahuaco) fue incluido en el apéndice II de la CITES por su tala indiscriminada; siendo el manejo *in vitro* una opción viable para su producción y conservación. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de combinaciones de auxinas y citoquininas, así como diferentes concentraciones de las mismas en la inducción de la formación de callos friables *in vitro* en foliolos de shihuahuaco. Para ello se preparó el medio de cultivo compuesto de WPM (Woody Plant Medium) 2.41 g/l, suplementado con 3% de sacarosa, 6.5 g/l de Agar y 100 mg/l de Piridoxina; todo esto ajustado a un pH de 5.8. Los explantes foliares se desinfectaron con NaClO al 0.25%, alcohol 70° y agua destilada esterilizada con pH 5.3. La incubación se dio por 9 semanas en oscuridad permanente. Durante la fase desdiferenciación del explante los resultados fueron: Asepsia 51.01%, contaminación 48.99%, oxidación 27.5%, necrosis 57.8%, forma plana 54%, doblado 38%, doblado además de arrugado 8%; el Tratamiento 8 (T8) fue mejor en deformación del explante con 93%. Durante la fase de callogénesis los callos iniciales eran de color blanquecinos y amarillentos posterior a ello de color café; el análisis estadístico evidenció diferencia altamente significativa en la callogénesis donde el (T8) (3mg/l 2,4 D + 3mg/l Kin) fue el mejor de todos con una respuesta del 100%, seguido por el T5, T3, T4, T6, T7, T2 y T1 (56%; 55%; 33%; 30%; 29%; 0%; 0%), además de ello el T8 fue el mejor en todas las características del callo como: encallamiento 92%, área 2.4 cm<sup>2</sup>, altura 2.8 mm, masa fresca 67.4 mg, masa seca 20mg. La oxidación y necrosis de los callos totales fueron 10.3% y 12.3% respectivamente. Concluyendo que es posible producir callos con combinaciones y concentraciones de auxinas y citoquininas en explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke.

**Palabras claves:** Ácido ascórbico; callos, fitohormonas, *in vitro*, WPM (Woody Plant Medium).

## ABSTRACT

*Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke (shihuahuaco) was included in CITES Appendix II due to its indiscriminate logging; *in vitro* management is a viable option for its production and conservation. The objective of this research was to evaluate the effect of combinations of auxins and cytokinins, as well as different concentrations of these, on the induction of friable callus formation *in vitro* in shihuahuaco leaflets. For this purpose, a culture medium composed of WPM (Woody Plant Medium) 2.41 g/l, supplemented with 3% sucrose, 6.5 g/l agar and 100 mg/l pyridoxine was prepared; all of this adjusted to a pH of 5.8. The leaf explants were disinfected with 0.25% NaClO, 70° alcohol and sterilized distilled water with pH 5.3. Incubation was given for 9 weeks in permanent darkness. During the explant dedifferentiation phase the results were: Asepsis 51.01%, contamination 48.99%, oxidation 27.5%, necrosis 57.8%, flat shape 54%, bent 38% and wrinkled 8%; Treatment 8 (T8) was better in explant deformation with 93%. During the callogenesis phase the initial calluses were whitish and yellowish after that they were brown; Statistical analysis showed a highly significant difference in callogenesis where (T8) (3mg/l 2.4 D + 3mg/l Kin) was the best of all with a response of 100%, followed by T5, T3, T4, T6, T7, T2 and T1 (56%; 55%; 33%; 30%; 29%; 0%; 0%), in addition to that T8 was the best in all callus characteristics such as: callusing 92%, area 2.4 cm<sup>2</sup>, height 2.8 mm, fresh mass 67.4 mg, dry mass 20mg. The oxidation and necrosis of total calluses were 10.3% and 12.3% respectively. Concluding that it is possible to produce calluses with combinations and concentrations of auxins and cytokinins in leaf explants of *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke.

**Keywords:** Ascorbic acid; callus, phytohormones, *in vitro*, WPM (Woody Plant Medium).

## INTRODUCCIÓN

Actualmente la Amazonía peruana viene perdiendo su diversidad forestal debido a factores como el aprovechamiento no sostenible, tala ilegal, agricultura migratoria y ganadería. (García, 2024) sostiene que durante el período 2011-2020 la deforestación creció más de 50%, siendo este un problema alarmante. Una de las especies que se vio muy afectada fue *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke (Shihuahuaco), a tal punto que en Perú, recientemente, se le clasificó en forma provisional «en peligro crítico» (Romo et al., 2022). Además se explica que en noviembre del 2022, en la Decimonovena Reunión de la Conferencia de las Partes (CoP19), se incluyó, por votación, a las especies de los géneros *Dipteryx* (dentro de la cual esta *Dipteryx ferrea*) y *Handroanthus* en el Apéndice II de la citada Convención. En este contexto, el SERFOR, en calidad de Autoridad Administrativa CITES, ha elaborado y aprobado el presente Plan de Acción para generar condiciones técnicas y normativas a noviembre del 2024. La propuesta contó con el apoyo de Senegal, el Reino Unido, la ONG TRAFFIC, (UICN), (WWF) y organizaciones observadoras (SERFOR. 2023).

Los esfuerzos por producir la especie para su recuperación y conservación se ven interrumpidos por su periodo de fructificación y diseminación bastante irregular (Fernández, 2023); sumado a ello la falta de estudios de mejoramiento genéticos que faciliten la multiplicación a gran escala. Frente a esta realidad es importante desarrollar nuevos paquetes tecnológicos que no necesariamente requiera de semillas, sino de tejidos tan comunes de la planta como son las hojas. En este sentido el cultivo *in vitro* ofrece la posibilidad de producir plantas cultivados en laboratorio a partir una sola célula o tejido, “en este caso una hoja” (Pérez, 2017). Sin embargo para llegar hasta esa meta es primordial desarrollar metodología que nos permitan obtener callos (masa celular) ya que a partir de ello se pueden cultivar los mismos callos que posteriormente pueden formar embriones (embriogénesis) que germinen, como directamente raíces, tallos (organogénesis).

Cabe recalcar que actualmente no existen estudios sobre la obtención de callos de la especie *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke; solo hay investigaciones similares que sirven como antecedentes en otras especies del mismo género como por ejemplo en *Dipteryx alata* Vog (Silva, 2016; Rezende et al., 2018; Ingre et al., 2021; Silveira et al., 2022), sin embargo son escasas; siendo esta investigación la primera de su tipo en la especie, esto servirá como un antecedente en futuras continuaciones de estudios similares.

Por tal motivo la presente investigación tuvo como objetivo general determinar el efecto de diferentes combinaciones y concentraciones de auxinas y citoquininas en la producción de callos friables *in vitro* en foliolos de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke (shihuahuaco). Esto conllevó a ejecutar el experimento con una metodología de tipo aplicativa, enfoque cuantitativo y nivel experimental; de las cuales se obtuvo resultados alentadores en la producción de callos.

La presente tesis se organiza en cinco capítulos. El capítulo I plantea el problema mediante la formulación de preguntas que traten de cumplir los objetivos planteados. El capítulo II, presenta la revisión de la literatura en la que se recopilaron antecedentes de estudios similares con menos de 5 años de antigüedad a nivel internacional, nacional y local, a demás, se presenta la base teórica en la cual se explican conceptos del tema de estudio que sirven realizar un análisis previo sobre el tema. El capítulo III explica la metodología utilizada que este caso que fue experimental cuantitativo, se presenta la población y muestra, además de ellos los procedimientos que se siguió para realizar la investigación desde la preparación de los medios de cultivo con la adición de las combinaciones y concentraciones de auxinas y citoquininas, la recolección de las hojas, protocolo de desinfección, inculcación, las técnicas e instrumentos para la recolecciones y procesamiento de los datos, además se explica las pruebas estadísticas aplicadas a cada variable de estudio. El capítulo IV ilustra los resultados mediante tablas y figuras de cada variable discutiendo estos mismos. Y el capítulo V presenta la conclusiones y recomendaciones donde se observa la respuesta final que nos hicimos al inicio en la formulación del problema además que se recomienda algunas cosas para posteriores estudios.

## CAPITULO I

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 1.1. Formulación del Problema.

Uno de los problemas que ha venido enfrentando el shihuahuaco ha sido la tala a gran escala debido a que posee madera de alto valor comercial por sus excelentes propiedades físicas y mecánicas, así como por su alta durabilidad natural y resistencia (Pesce, 2009). Por otra parte, esta especie se caracteriza por tener periodos de fructificación y diseminación bastante irregular, presentándose años en los que la producción de frutos es escasa (Fernández, 2023). Lo expuesto ocasiona que la reproducción sexual de esta especie sea inadecuada para proyectos de reforestación.

Frente a esta situación, es necesario encontrar otros métodos de producción de plantas que garanticen el abastecimiento oportuno de plantas en cantidad y calidad requerida, siendo una de las alternativas la producción *in vitro* de plantas. Para ello primero necesitamos desarrollar una metodología para la obtención de callos en *D. ferrea* ya que la especie no tiene estudios de esta naturaleza, desconociéndose por lo tanto esta vía de reproducción. Dicho eso nos respondimos a las siguientes preguntas.

##### 1.1.1. Problema general

- ¿Cuál es el efecto de las combinaciones de auxinas y citoquininas, así como la mayor concentración de las mismas que inducen la formación de una mayor cantidad de callos friables *in vitro* en folíolos de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke (shihuahuaco)?

##### 1.1.2. Problemas específicos

- ¿Cuál es el efecto de las combinaciones de auxinas y citoquininas, así como la mayor concentración de las mismas en la inducción de la

desdiferenciación o deformación *in vitro* de tejido de folios de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke.

- ¿Cuál es el efecto de las combinaciones de auxinas y citoquininas, así como la mayor concentración de las mismas que inducen la formación de una mayor cantidad de callos friables *in vitro* en foliolos de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke (shihuahuaco)?

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo general**

- Evaluar el efecto de las combinaciones de auxinas y citoquininas, así como la mayor concentración de las mismas que inducen la formación de una mayor cantidad de callos friables *in vitro* en foliolos de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke (shihuahuaco).

### **1.2.2. Objetivo específicos**

- Evaluar el efecto de las combinaciones de auxinas y citoquininas, así como la mayor concentración de las mismas en la inducción de la desdiferenciación o deformación *in vitro* de tejido de foliolos de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke (shihuahuaco).
- Determinar el efecto de las combinaciones de auxinas y citoquininas, así como la mayor concentración de las mismas que inducen la formación de una mayor cantidad de callos friables *in vitro* en foliolos de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke (shihuahuaco).

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes

##### 2.1.1. Antecedentes internacionales

Con respecto a antecedentes no se reportan estudios sobre la callogénesis en *Dipteryx ferra* (Ducke) Ducke, sin embargo, existen estudios en diferentes especies del mismo género como es el caso de (Ingre et al., 2021) quienes en su estudio evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido naftaleno acético (ANA) sobre la callogénesis y regeneración de la hoja de (*Dipteryx alata* Vog.) y los segmentos del ápice. Donde determinaron que la concentración más eficiente en la formación de callo en hojas fue 3.0 mg/l BAP + 2.0 mg/l ANA (68.88%), en los ápices la concentración más eficiente fue 1.0 mg/l BAP sin ANA con 100% callogénesis.

Por otro lado (Silveira et al., 2022), observaron alta proliferación de brotes de *Dipteryx alata* Vogel en ventilación natural, con 1 mg/l de BAP (promedio de 4.03 brotes), un aumento de 101.50% respecto al control y 43.93% respecto al mejor sistema de tratamiento convencional.

Rocha et al., (2024) trabajando con *Dipteryx odorata* observaron que segmentos de hojas pueden dar formación de callos a concentraciones de 8 mg/l de 2,4-D, 4 y 8 mg/l de TDZ. En segmentos cotiledonarios, 2 mg/l de Picloram, 2 y 8 mg/l de TDZ. Para la especie, los explantes de cotiledonarios responden mejor a la callogénesis en presencia de los reguladores de crecimiento Picloram (4 y 8 mg/L) y TDZ (2 mg/l).

Generalmente, en especies parecidas se suele tener efectos similares tal como lo mencionan (Chakraborty et al., 2022) y (Jaiswal et al., 2022) quienes indican que para especies del género *Pterocarpus* (Fabaceae), se obtuvo 95 y 62% de

inducción de callos con segmentos de cotiledones utilizando diferentes concentraciones de 2,4-D como regulador crecimiento.

Mientras tanto en especies de diferentes géneros también se reportan estudios similares como lo expuesto por (Bisht et al., 2024) quienes trabajando con *Mahonia jaunsarensis Ahrendt*, descubrieron que los explantes de hojas en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; 0.2 mg/l) dan como resultado una inducción de 70% de callos compactos verdes.

Mientras tanto (Eras-Guamán et al., 2019) obtuvieron callos en *Cinchona officinalis* en dos tipos de explantes en medio de cultivo del MS, vitaminas, suplementado con 1.0 y 2.0 mg/l de Acido Naftaleno Acético (ANA) + 0.5 mg/l de 6-benzilaminopurina (BAP). Los resultados indican que es posible obtener callos a partir de ápices y segmentos nodales, en obtener estructuras de nuevo a partir de callos.

Por su parte, Charaborty et al., (2022) estudiando a *Pterocarpus santalinus* demostraron que la masa máxima de callo (1036.44 mg) se obtuvo cuando el medio Murashige y Skoog (MS) se complementó con 0,1 mg/l de BAP y 8 mg/l de NAA. Sin embargo, la frecuencia máxima de callos (95.37%) se obtuvo con 0.1 mg/l de BAP y 1 mg/L de 2,4-D.

De forma similar (Mosho et al., 2024) obtuvieron callo de *Gloriosa superba* (L.) específicamente, el medio de inducción de callos suplementado con 1.5 mg/L de NAA, 0.5 mg/l de KN y 10 mg/l de hidrolizado de caseína (CH) logró resultados notables, con una tasa de inducción de callos del 81.25 % y un peso fresco sustancial de biomasa de callo de 333 mg.

A parte de los reguladores de crecimiento la luz también juega un papel importante en la inducción callogénica como lo menciona (Ruíz-Rivas et al., 2022), en su estudio con explantes de tabaco y tomate descubrieron que en general, el tamaño del callo y la robustez de las plántulas fue proporcional a intensidad de la luz. De igual manera (Gándara-Ledezma et al., 2023) afirman que el fotoperiodo en *Adult pecan*

impidió la producción de callo, mientras que la incubación en la oscuridad permitió que más del 80% de los explantes produjeran callo.

### **2.1.2. Antecedentes nacionales**

A nivel nacional (Hernández-Villalobos & Chico-Ruíz, 2020) trabajando con *P. peruviana* L. lograron inducir la formación de callos en nueve combinaciones de 2,4-D (0.25; 0.5 y 1.0 mg/l) y BAP (0.1; 0.25 y 1.0 mg/l). El medio basal fue el de Murashige & Skoog (MS) complementado con sacarosa al 3%, fitogel (0.5%). Además, en los hipocótilos hubo inducción de raíces con la combinación 0.1 mg/l de 2,4-D + 1.0 mg/l de BAP y en los cotiledones se indujeron raíces con la combinación 0.5 mg/l de 2,4-D + 1.0 mg/l de BAP.

Mientras tanto en otra investigación se indujeron callos *in vitro* de durazno variedad Huayco rojo a partir de hojas, obteniendo 100% de inducción de callos empleando a partir de 1 mg/l de 2,4-D más 50 mg/l de agua de coco. Finalmente, los resultados de esta investigación permiten recomendar el uso de 2,4-D y agua de coco en la inducción del proceso de callogénesis en durazno variedad Huayco rojo (Hernández-Amasifuen et al., 2022).

De igual forma (Campos et al., 2020) con el objetivo de establecer un protocolo de desinfección y micropropagación *in vitro* *S. macrophylla* King "caoba" determino que los resultados mostraron que los segmentos nodales tratados con NaClO al 3% durante 15 minutos presentaron un mayor porcentaje de sobrevivientes (87%). En la etapa de crecimiento el mejor medio de cultivo fue el WPM permitiendo longitudes de brote en promedio de 7.20 mm.

### **2.1.3. Antecedentes locales**

A nivel local solo se reporta una investigación con especie forestal como las que estudiaron (González et al., 2022) donde establecieron un protocolo de

desinfección para semillas *Guazuma crinita* Mart (Bolaina) donde se estableció que el hipoclorito de sodio al 2% con exposición de 20 minutos da un 95% de sobrevivencia. De igual manera (González et al., 2022) obtuvieron resultados de porcentaje de Callogénesis obtenida por el efecto de los reguladores de crecimiento sobre los explantes de *G. crinita*, donde se registraron un 100% de callogénesis con la combinación de dos reguladores de crecimiento una Citoquinina que es la Kinetina (Kin) y una auxina que es el ácido Indol butírico (AIB) en una proporción de 12 mg/l para cada uno de ellos.

Mori-Vásquez et al (2024), en su estudio incluyeron tres estados de desarrollo foliar de *Simarouba amara* (joven, intermedio y maduro) y seis combinaciones de fitohormonas (BAP, TDZ, 2,4-D, BAP+TDZ, BAP+2,4-D y TDZ+2,4-D, todas a 1 mg/l), de las cuales los principales resultados demostraron que las combinaciones de BAP+2,4-D y TDZ+2,4-D promovieron una mayor formación de callos (100% y 100% tejido joven) (56% y 72% tejido intermedio) y ( 11% y 22% tejido maduro) además observaron un incremento del área del callo y una producción de materia fresca y seca, especialmente en segmentos del estado del desarrollo foliar intermedio

Por otro lado, se reportó callogénesis en especies agrícolas como las que utilizó (Villegas-Panduro et al., 2023) donde estableció un protocolo de desinfección para semillas de ají dulce y ají pucunucho con hipoclorito de sodio al 2 % por 30 minutos generó 100 % asepsia. A demás determino que la aplicación de BAP aumenta en longitud los tallos, número de raíces, número de hojas, nudos y formación de callos en plántulas de ají dulce. En cambio, para las plántulas de ají pucunucho el aumento del número de hojas, nudos y raíces se dio en ausencia de concentraciones de BAP, a excepción de la generación de tejido calloso.

## 2.1.4. Descripción de la especie de estudio.

### 2.1.4.1. Taxonomía

Según Honorio et al (2018), *Dipteryx*, deriva de las palabras del griego di, dos y *Dypteryx*, ala, en referencia a los dos sépalos largos y con forma de pétalo del cáliz. Se distingue por ser una madera pesada de bellos acabados, color marrón con jaspes claros y un lustre moderado que clasifican a la especie *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke. Su taxonomía es de la siguiente manera:

Orden: Fabales  
Familia: Fabáceae  
Sub familia: faboideae  
Tribu: Dipteryx  
Género: *Dipteryx*  
Especie: *ferrea*

Nombre científico: *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke

Nombre sinónimo: *Dipteryx micrantha* (Harms) Ducke y nombre común Shihuahuaco

### 2.1.4.2. Descripción botánica

*Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke, es un árbol grande de hasta 50 m de altura y 1.8 m de diámetro. Su fuste puede variar desde tortuoso a cilíndrico, con desprendimiento de pequeñas placas y lenticelas dispersas de color amarillo-ferruginoso. La base del tronco tiene aletas grandes, cóncavas y ramificadas; de ramificación irregular y copa grande. Presenta una corteza externa de color interior amarillento, con puntuaciones anaranjadas, casi formando anillos, con resina incolora escasa y poco pegajosa, algunas pueden ser de color rojo (Honorio et al., 2018).

Presenta hojas alternas compuestas en espiral y raquis alado con yema axilar. Foliolos sub opuestos, oblongos, asimétricos, con margen entero a

ondulado; cuenta con puntuaciones al trasluz, un solo color en ambas caras de 11.6 cm (6.3 – 22.4 cm) de largo y 5.4 cm (3.4 - 8 cm) de ancho; las venas secundarias que sobresalen, con inter secundarias y terciarias visibles; generalmente con 8 foliolos, raras veces puede llegar a 9 (Obermüller et al., 2011).

Las flores están dispuestas en panículas terminales con el eje de inflorescencia pulverulenta aromática con olor a rosas; las alas del cáliz membranáceo son rosadas y casi glabras, con glándulas convexas transparente; afuera con pelos escasamente estrellados en el margen, de 6 a 15 mm, pétalos de color rosado a fucsia. Los frutos son drupas ovoides y oblongas, de pericarpo carnoso, internamente leñoso. Las semillas son alargadas y sin olor cumarina, de 40 a 50 mm de largo, 15 a 20 mm de ancho y alto, (Ducke, 1934).

#### **2.1.4.3. Fenología**

La floración ocurre entre los meses de septiembre y abril, durante la época lluviosa. Los frutos drupas maduran en 3 o 4 meses y la caída de los frutos tiene lugar entre los meses de mayo y septiembre, pero es más frecuente en el mes de julio, durante la época seca (Bendezú, 2019).

#### **2.1.4.4. Distribución y habitat.**

Aldana et al (2016), mencionan que la especie *Dipteryx ferrea* crece naturalmente en Perú, Brasil y Bolivia. Ha sido reportado en zonas entre los 150 a 600 m.s.n.m. y con precipitaciones anuales promedio entre los 2 500 a 4 500 mm/año (Bendezú, 2019).

#### **2.1.4.5. Características de la madera.**

El shihuahuaco es una madera muy pesada, con una densidad que va de 0.87 a 0.95 g/cm<sup>3</sup>. Posee un olor distintivo y característico, así como un lustre o brillo de moderado a elevado; su grano es entrecruzado de textura media,

veteado, bien definido, con arcos superpuestos y bandas angostas, paralelas y satinadas (Bendezú, 2019).

#### **2.1.4.6. Uso e importancia.**

Su madera es comúnmente usada para durmientes, carrocerías, puentes, pisos, construcción pesada, carpintería exterior, machihembrados y parquet. Los restos de madera que no pueden ser utilizados en aserrío, se destinan a la fabricación de carbón (Pesce, 2009).

Berg (2010), menciona que otros usos de *Dipteryx ferrea* son para paisajismo por la belleza de su floración y en la recuperación de áreas degradadas.

## **2.2. Base Teórica.**

### **2.2.1. Callogénesis.**

Hernández & Díaz (2019), mencionan que la callogénesis es el proceso por el cual las células vegetales pasan por un proceso de indiferenciación en constante división celular, dependiendo principalmente del genotipo del explante, además de la concentración y combinación de reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo. Por otro lado (Rodríguez et al., 2014), afirman que la callogénesis se expresa como el porcentaje de explantes que forman callos. Además (Maldonado, 2022), indica que la callogénesis es una herramienta del cultivo *in vitro* que permite la propagación rápida y masiva de plantas y la obtención nuevas variedades.

#### **2.2.1.1. Callo**

En los inicios de la biología vegetal, el término callo era otorgado al crecimiento masivo celular y su acumulación callosa asociada con las heridas. Hoy en día esta palabra es utilizada más ampliamente y las masas celulares desorganizadas son llamadas callos de forma colectiva. Los callos pueden ser

generados a partir de una única célula diferenciada, varios tipos de callos son capaces de regenerar plantas completas (Ikeuchi et al., 2013). De acuerdo a sus características macroscópicas los callos se pueden clasificar en subgrupos; algunos tipos de callo no presentan regeneración de un órgano y típicamente son friable y compactos mientras que otros muestran cierto nivel de regeneración llamados callos radiculares, de brote o embrionales dependiendo del destino (Rueda, 2019).

La multiplicación de tejido indiferenciado, también conocido como callo, tiene una gran utilidad práctica en diversos campos, como en la investigación básica, para el establecimiento de suspensiones celulares, o para la producción y transformación de compuestos de interés (Roca & Mroginski, 1991). Este tejido, está influenciado tanto por el tipo de tejido utilizado como explante, así como por el tratamiento hormonal aplicado (Rodríguez-Beraud et al., 2014).

#### **2.2.1.2. Característica del callo**

Esta masa celular puede presentar diferentes tipos morfológicos, los cuales varían según la apariencia externa, textura y composición celular, pero por lo general son heterogéneos en su composición celular. La coloración de este tejido también varía, aun derivando de la misma especie (se pueden presentar callos que carecen de pigmentación, mientras otros pueden ser de diferentes tonos de verde, amarillo, café o rojo). El tipo y grado de pigmentación está influenciado por factores nutricionales y ambientales, y se manifiesta por la presencia de clorofila, carotenos, antocianinas, etc. (UNAD, 2009).

#### **2.2.1.3. Tipos de callos**

La masa de células puede exhibir diversos tipos morfológicos que difieren en su apariencia externa, textura y composición celular, y su coloración puede variar significativamente incluso si provienen de la misma especie, debido a factores nutricionales y ambientales que influyen en el tipo y grado de

pigmentación, como la presencia de clorofila, carotenos, antocianinas, entre otros (Cárdenas Ávila, 2001).

Los callos exhiben una amplia gama de características macroscópicas que les permiten ser clasificados en diferentes subgrupos (Ikeuchi et al., 2013). Aquellos que no muestran evidencia de regeneración de órganos suelen ser conocidos como callos “friables” o “compactos” (figura 1), por otro lado, los que fomentan cierto grado de regeneración de órganos se pueden clasificar como callos “embrionarios”, “rooty”, “shooty” según el tipo de órganos que produzcan (Sharan et al., 2014).

**Figura 1.**

*Tipos de callos*



*Fuente: (Ikeuchi et al., 2013).*

### **2.2.2. Cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro* de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, etc.) y el control de los factores que afectan el crecimiento (Castillo, 2018).

El cultivo *in vitro* se basa en el principio de la totipotencia, el cual establece que las células son autosuficientes y que en principio tienen la capacidad de regenerar una planta completa. Las células de las plantas que se encuentran ya diferenciadas están determinadas y normalmente no se dividen. La división y dediferenciación de estas células puede inducirse si se colocan porciones de tejido (explantes) en un medio de cultivo adecuado que contenga los nutrientes y los aditivos necesarios. Mediante el uso de citoquininas y auxinas se puede obtener respuesta en de los explantes y manipulando la proporción de estos dos reguladores de crecimiento, los explantes pueden desarrollar plantas directamente o bien callos que posteriormente se diferencian aleatoriamente en tejidos vasculares brotes y/o raíces (Estopá, 2005).

#### **2.2.2.1. Medio de cultivo**

El medio de cultivo es una combinación de sales inorgánicas tanto macro nutrientes como micronutrientes, compuestos orgánicos como carbohidratos, vitaminas, aminoácidos y reguladores del crecimiento disueltos en agua. El medio de cultivo se puede usar líquido, o con consistencia semisólida cuando se agrega alguna sustancia gelificante, con el propósito de soporte físico. La composición del medio de cultivo a usar depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación (Alcántara et al., 2017). Una de las características del medio de cultivo es el potencial osmótico (PO), su determinación se basa en el cambio de las propiedades físicas y químicas debido a la presencia de solutos que al aumentar su concentración en la solución la presión osmótica toma valores más negativos, (Martínez-Villegas et al., 2015).

Silva et al., (2016), mencionan que el medio de cultivo más utilizado es el MS (Murashige& Skoog), considerado uno de los más completos nutricionalmente. Así mismo, se debe tener en cuenta que el medio WPM

(Woody Plant Medium) está especialmente indicado para la propagación de especies leñosas (Silva et al., 2016).

#### **2.2.2.2. Condiciones del cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro* es considerado una tecnología muy útil para la producción masiva de plantas, y para la obtención de productos naturales derivados del metabolismo vegetal, de forma controlada (Soto-ros, 2023). Estas condiciones están específicamente diseñadas para fomentar un crecimiento y desarrollo óptimo de las plantas, tanto la temperatura de incubación como la calidad, intensidad, duración de la luz, pH del medio pueden afectar las respuestas morfogénicas de las plantas (Roca & Mroginski, 1991). Las principales ventajas de este conjunto de herramientas biotecnológicas son:

- Permite el cultivo de plantas con independencia del suelo, clima, problemas socio-políticos e incluso, distribución geográfica (Llorente, 2002).
- Tiene capacidad de establecer un sistema de producción definido, en función de las demandas del mercado en un momento dado, y la producción no está sujeta a la variabilidad estacional (Llorente, 2002).
- Facilita el cultivo de especies no domesticadas y/o difíciles de propagar o conservar mediante métodos convencionales (por ejemplo, especies con semillas recalcitrantes) (Llorente, 2002).
- Permite la producción de metabolitos secundarios, enzimas, entre otros, con interés aplicado (Llorente, 2002).
- La obtención de enzimas y sistemas de biotransformaciones para ser usados solos o combinados con síntesis química y la producción de plantas transgénicas resistentes a patógenos, herbicidas o a estrés abiótico que actúen como birreactores en la producción de proteínas, carbohidratos o lípidos, entre otros (Llorente, 2002).

#### **a) Temperatura**

La temperatura a la que está expuesto el explante cultivado *in vitro* afecta a la mayoría de procesos fisiológicos y por consiguiente es un factor fundamental a controlar, cada especie tiene un intervalo de temperaturas en el que se produce el crecimiento óptimo. La temperatura de incubación oscila entre los  $\pm 20$  y  $28^{\circ}$ , (Marín & Romero, 1989; Gautam et al., 2024). Aunque otros autores indican que puede ser de  $25^{\circ} - 30^{\circ}$  (Alcántara-Cortés et al., 2017).

#### **b) Luz**

Las plántulas que crecen *in vitro* también requieren una calidad optimizada de luz y fotoperiodo que sean idénticos a la irradiación o espectro de luz natural (Batista et al., 2018). Las cámaras de cultivo disponen de una serie de unidades productoras de luz situadas de tal forma que iluminan toda la superficie útil de la cámara (Marín & Romero, 1989). Aunque también reportes respuestas callogénica en completa oscuridad (Ávila-Treviño et al., 2013).

#### **c) Humedad**

Los cultivos vegetales *in vitro* necesitan una humedad relativa entre el 50% y el 80 % frente al ambiente, para que la planta pueda desarrollarse. Según el tipo de características que requiera la planta la humedad puede variar entre el 70% y el 80% (Osorio, 2014).

#### **d) pH**

Debe oscilar entre 5.6 y 5.8 para evitar estrés durante su cultivo (ONU, 2014). Por otro lado (Shi et al., 2107), afirma que el pH en el medio de cultivo se ajusta generalmente a 5.8 a 6.0 para el cultivo de tejidos vegetales esto se ajusta añadiendo NaOH y HCl.

#### **e) Asepsia**

El cultivo de las especies vegetales *in vitro* debe mantenerse altamente desinfectado y libre de agentes patógenos, por lo que regularmente debe realizarse una desinfección minuciosa dentro del laboratorio (Alcántara-Cortés et al., 2017). Ya que si no las probabilidades que exista una severa contaminación son altas por microorganismos (bacterias, hongos, algas), vectores y fuentes patogénicas indeseables, (Kubota & Tadokoro, 1999).

#### **2.2.2.3. Fitorreguladores o fitohormonas de crecimiento**

Una hormona vegetal o fitohormona es un compuesto producido internamente por una planta, que ejerce su función en muy bajas concentraciones y cuyo principal efecto se produce a nivel celular, cambiando los patrones de crecimiento de los vegetales y permitiendo su control. Los reguladores vegetales son compuestos sintetizados químicamente u obtenidos de otros organismos y son, en general, mucho más potentes que los análogos naturales. Es necesario tener en cuenta aspectos críticos como oportunidad de aplicación, dosis, sensibilidad de la variedad, condición de la planta, etc., ya que cada planta requerirá de unas condiciones específicas de crecimiento que pueden afectarse por la concentración de ellos en el medio (Alcántara et al., 2019).

Sharry et al., (2015), mencionan que las hormonas reguladoras del crecimiento son de los compuestos más importantes que se incluyen en un medio de cultivo. Del propósito del medio de cultivo que se está preparando depende el tipo y la dosis de hormona que se utilizará.

##### **2.2.2.3.1. Clasificación de los reguladores de crecimiento**

**Tabla 1.**

*Clasificación de los principales reguladores de crecimiento*

| <b>Fito hormona</b>      | <b>variedades encontradas</b>                                      | <b>Efecto a nivel vegetal</b>                                                                                           | <b>Efecto a nivel celular</b>                                                                                                           |
|--------------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Auxina</b>            | AIA<br>AIB<br>2,4 D<br>Ácido naftalenacético (NAA)                 | Formación y elongación de tallos.<br>Producción de diferentes raíces adventicias.                                       | División y elongación celular.<br>Diferenciación celular<br>Promoción de división celular.<br>Aumento de contenido osmótico celular.    |
| <b>Citoquininas</b>      | Kinetina<br>Zeatina<br>Benciladenina<br>4-hidroxifeniletíl alcohol | Induce la iniciación y elongación de raíces.<br>Activa la senescencia de las hojas.<br>Estimulan desarrollo fotomógeno. | Pueden sustentar e iniciar la proliferación de tejidos vegetales madres.<br>Permite producir una alta proliferación y división celular. |
| <b>Giberelinas</b>       | GA1<br>GA2<br>GA3                                                  | Aumentan el desarrollo de tejidos de manera constante.<br>Elongación de raíces, hojas jóvenes y floración.              | Estimula elongación celular en respuestas de condiciones de luz y oscuridad.<br>Promociona el crecimiento embrionario.                  |
| <b>Ácido abscísico</b>   | No presenta                                                        | Regula y mantiene la dormancia de la semilla.<br>Estimula la maduración de la semilla.                                  | Promociona la producción de tejidos Zigotos.<br>Tiene un fácil acceso a la membrana celular vegetal.                                    |
| <b>Ácido salicílico</b>  | No presenta                                                        | Potencializa el crecimiento de la floración.                                                                            | Rol inhibitorio de síntesis de etileno a nivel celular.                                                                                 |
| <b>Brasinoesteroides</b> | Brasinolida<br>25 HB<br>Catasterona<br>Ponasterona                 | Controla el crecimiento de raíces. Regula la fotomorfogénesis.                                                          | Regulación del metabolismo.                                                                                                             |
| <b>Etileno</b>           | No presenta                                                        | Regula maduración y senescencia vegetal.                                                                                | Potencializa la acción de auxinas, ácido abscísico y citoquininas.                                                                      |

*Fuente (Alcántara et al., 2019).*

#### **a) Auxinas**

Las auxinas estimulan el agrandamiento y alargamiento celular y promueven la división celular en cultivos de tejidos. Se adicionan combinadas con

Citoquininas durante la etapa de multiplicación o sin ellas, en la etapa de enraizamiento (Garay-Arroyo et al., 2014; Sharry et al., 2015). Para preparar soluciones stock de auxinas, se deben disolver en etanol con unas gotas de solución 1M de Hidróxido de Sodio (NaOH) o de Hidróxido de Potasio (KOH) (Pierik, 1990; Sharry et al., 2015).

La cantidad de auxina adicionada dependerá de los niveles endógenos (presentes naturalmente) del material vegetal y se conoce a través de una serie de experimentos dosis-respuesta. Para el cultivo de callos se usan de 0.1 a 5.0 mg/l de AIA mientras que para la diferenciación de órganos se ha señalado a menudo que es necesario reducir la concentración de la auxina.

El AIA o el ANA resultan mejores que el 2,4-D para la inducción de la organización celular. Si se usa 2,4-D en muchas especies de plantas tenderán a la formación de callos, por lo que, si se desea inducir la organogénesis, se necesita cambiar el 2,4-D por otra auxina como el AIA o bien bajar su concentración (Sharry et al., 2015).

El 2,4- Diclorofenoxiacético (2,4D), es uno de los fitorreguladores, con mayor reporte de actividad callogénica; actuando a nivel genético, al des reprimir o reprimir la expresión de los genes; ligándose a un receptor de naturaleza proteica, para luego formar un complejo receptor-hormona de carácter reversible, específico, con alta afinidad y saturable; encargado de activar un promotor que controla la expresión de los genes que codifican la síntesis de las enzimas catalizadoras de los compuestos de la pared, que conlleva a la formación de callos (Peterson et al., 2016).

## **b) Citoquininas**

Las citoquininas son un tipo de fitohormonas específicas derivadas de la Adenina que tuvieron su primera aparición entre los años de 1940 y 1950, cuando Caplin y Steward, (1948) empezaron a estudiar el efecto que podía tener el extracto de levadura y el jugo de tomate sobre el crecimiento vegetal (Gupta &

Chakrabarty, 2013). Las citoquininas tienen la capacidad de estimular e inducir una alta proliferación y división celular, suelen inducir la iniciación y elongación de las raíces al igual que pueden activar la senescencia de las hojas, permitiendo estimular el desarrollo fotomorfogénico vegetal y jugar un rol importante en el aumento y generación de la producción de brotes a nivel vegetal (Yong et al., 2009).

Son utilizadas para estimular la división celular, especialmente al combinarlas con auxinas. A altas concentraciones inducen la formación de brotes adventicios e inhiben la formación de raíces, promueven la multiplicación de tallos y proliferación de yemas laterales, a través de la disminución de la dominancia apical, (Sharry et al., 2015).

Las citoquininas más usadas son: BAP (bencilaminopurina), kinetina y 2-ip (isopentenil-adenina). Generalmente son diluidas con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, (Pierik, 1990). BAP (bencilaminopurina) es una citoquinina de primera generación encargada de provocar el crecimiento de las plantas y las respuestas de desarrollo, el establecimiento de flores y estimular la generación de frutos a través de la estimulación de la división celular. También es un inhibidor de la quinasa respiratoria en las plantas, por lo tanto, aumenta la vida después de la cosecha en vegetales verdes. La Kinetina Pertenece al grupo de las citoquininas, con una pequeña molécula que puede regular la división celular y el crecimiento en microalgas a través de la furfuriladenina. Es un producto de purina y su forma principal es la Zeatina, que tiene dos estructuras, trans y cis (Aguilar et al., 2010). Para preparar soluciones stock, se deben disolver con unas gotas de una solución 1M de ácido clorhídrico (HCl), (Sharry et al., 2015).

### **c) Giberelinas.**

Esta fitohormona puede ser producida por diversos microorganismos (*Pseudomonas spp*, *Bacillus spp*, *Lactobacillus spp*, *Penicillium spp*, *Trichoderma spp*, entre otros) cuando ocurren ciertas interacciones simbióticas

o parasitarias (bacterias y hongos) y también, por plantas de manera endógena en los tejidos jóvenes (Hussain et al 2012; Garay-Arroyo et al., 2014; Sharry et al., 2015). El ácido giberélico (GA3), por su parte, juega un rol importante en el alargamiento de los segmentos nodales ya que permite estimular la elongación celular en respuesta a las condiciones de luz y oscuridad. Adicionalmente, tiene una gran relevancia en los procesos de iniciación de la floración, por lo cual es sumamente vital para la fertilidad de las plantas masculinas y femeninas (George 2008; Grupta 2013).

#### **d) Ácido abscísico**

El ácido abscísico, también conocido como ABA, es una de las fitohormonas que tiene la capacidad de inhibir y controlar algunos procesos vegetales que normalmente ocurren de manera natural. Puede ser generado de manera indirecta por las plantas a partir de la producción de ciertos carotenoides. También es sintetizado de manera directa por algunos organismos de tipo fúngicos fitopatógenos a partir del farnesil pirofosfato (Colebrook et al., 2014).

#### **e) Ácido salicílico**

Tiene la capacidad de incrementar la longevidad floral y puede tomar un papel inhibitorio en la biosíntesis de etileno. Como ácido orgánico puede inducir la activación enzimática de sustancias como la amilasa y el nitrato reductasa (Werner et al., 2001). En algunos estudios se ha comprobado su rol en el control y protección de procesos de estrés ya que puede inducir una mejor tolerancia a la germinación en ambientes con bajas temperaturas (Murai2014).

#### **f) Brasinoesteroides**

Se sabe que la aplicación exógena de diferentes tipos de brasinoesteroides puede emplearse en el mejoramiento de la germinación de semillas e inducir la promoción del crecimiento de hipocotíleos, cotiledones, láminas de las hojas, elongación de raíz lateral y diferenciación del meristemo apical (todo ello depende de la concentración del metabolito dentro de la especie vegetal) (Huang et al., 2017; Schuman et al., 2018).

#### **g) Etileno**

Puede ser sintetizada de manera natural por diferentes especies de plantas y generalmente se produce en cualquier órgano vegetal (Kim et al., 2015). Como regulador vegetal esta sustancia se ha visto relacionada en procesos sinérgicos y antagónicos al combinarse con otras fitohormonas, ya que puede inducir y mejorar la aplicación de las auxinas, ácido abscísico y citoquininas en procesos de maduración y desarrollo foliar, mientras que otras hormonas como el ácido giberélico y el JA pueden verse inhibidos por la aplicación de dicho regulador de crecimiento (George et al., 2008; Habibiet al., 2009).

#### **2.2.2.4. Morfogénesis**

La morfogénesis (del griego morphê forma y génesis creación) es uno de los tres aspectos fundamentales de la biología del desarrollo, junto con el control del crecimiento celular y de la diferenciación celular. La morfogénesis incluye la forma de tejidos, órganos y de los organismos completos y las posiciones de varios tipos de células especializadas (Pérez, 2017). La morfogénesis es el proceso que ocurre en las células y tejidos vegetales cultivados in vitro para que a partir de una célula que se divide, se originan numerosas células que se organizarán en tejidos y órganos que formarán posteriormente una planta entera,

(Fehér, 2019). Dentro de la morfogénesis tenemos a la organogénesis y embriogénesis somática:

#### **2.2.2.4.1. Organogénesis**

Torrey (1996), menciona que la organogénesis consiste en la formación de nuevo de órganos (raíces y/o brotes adventicios) a partir de explantes cultivados *in vitro*. En la regeneración *in vitro* es de gran importancia el desarrollo de la organogénesis, la cual hace referencia a la capacidad de las células vegetales que se encuentran en el explante para reprogramar su desarrollo hacia la formación de tejidos y órganos nuevos que constituyen una planta (Smith, 2012). En la organogénesis la repuesta de los explantes depende del balance entre auxinas y citoquininas tanto en el medio de cultivo como las que existen en forma endógena en el explante (Cardoza, 2007). La organogénesis se divide en dos grupos:

**Organogénesis directa:** Las plantas *in vitro* se propagan clonalmente a partir de explantes sin fases intermedias de callo por organogénesis directa para mejorar los rangos de multiplicación, así como para obtener plantas transgénicas, si bien es más frecuente la descripción de protocolos de transformación genética vía organogénesis indirecta (Cardoza, 2007; George & Debergh, 2008).

**Organogénesis indirecta:** George & Debergh (2008), afirman que la organogénesis indirecta se da cuando la formación de brotes ocurre mediante una fase intermedia de la diferenciación del tejido calloso. Por otro lado (Adobkar et al., 2012) coincide al afirmar que la organogénesis indirecta, es el desarrollo de masas de células desorganizadas y en proceso de desdiferenciación y re diferenciación denominado callo.

#### 2.2.2.4.2. Embriogénesis Somática

Torrey (1996), afirma que la embriogénesis somática, en tanto, consiste en la formación de embriones a partir de células somáticas, las que al germinar dan origen a individuos completos. La embriogénesis somática (SE) sirve como un modelo biológico clave para estudiar la totipotencia celular y los procesos ontogénicos de la embriogénesis cigótica en plantas. El proceso de SE, en condiciones *in vitro*, puede ser inducido a partir de diferentes fuentes de explante cultivado en un medio de cultivo con reguladores del crecimiento vegetal (PGR) o sometiendo los tejidos a tratamientos de estrés abiótico (Spinoso-Castillo & Bello-Bello, 2022). Los embriones somáticos se pueden formar a partir de células del explante y previa formación de callo, estas dos vías diferentes se denominan embriogénesis somática directa e indirecta (Campos et al., 2017). La embriogénesis somática se divide en dos tipos:

**Embriogénesis somática indirecta:** Berthouly & Etienne (1999), mencionan que los embriones se forman a partir de callos mediante el uso de un primer medio de cultivo de inducción de callos embriogénicos y un segundo medio para la regeneración de embriones.

**Embriogénesis somática directa:** Se obtiene embriones a partir de una célula individual o un grupo de células del explante, sin la formación previa de un callo o por una escasa formación de callo en los bordes de los explantes (Berthouly & Etienne, 1999).

### 2.3. Definición de Términos Básicos

- **Ácido 2,4D-diclorofenoxiacético:** Es una potente auxina que se usa en el cultivo *in vitro* para la formación de callos y la inducción de embriones somáticos, Su composición química es  $C_8H_6Cl_2O_3$ , con un anillo bencénico (Rivero et al., 2008).

- **Agua destilada:** Agua purificada por el proceso de destilación (condensación del vapor de agua obtenido por la ebullición o la evaporación) de agua. Es utilizada en el CTV en la preparación de medios de cultivo y de soluciones stock de reactivos químicos (Carvalho et al., 2011).
- **Asepsia:** Ausencia de microorganismos (bacterias, virus, hongos) en el medio de cultivo (Castillo, 2008).
- **Autoclave:** Equipo utilizado para esterilizar vidrios, medios de cultivo e instrumentos absorción de agua de una semilla (Carvalho et al., 2011).
- **Auxina:** Fitohormona que estimulan el agrandamiento y alargamiento celular y promueven la división celular en cultivos de tejidos (Garay-Arroyo et al., 2014; Sharry et al., 2015).
- **BAP:** Es una Fitohormona que promueve la división celular y la formación de brotes, también conocido como bencilaminopurina, es una citoquinina cuya composición química deriva de la Adenina del grupo bencilo ( $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ) (Pierik, 1990; Cotelo, 2016).
- **Callogénesis:** Es el proceso por el cual las células vegetales pasan por un proceso de indiferenciación en constante división celular, dependiendo principalmente del genotipo del explante, además de la concentración y combinación de fitohormonas (Hernández & Díaz 2019).
- **Citoquinina:** Son un tipo de fitohormonas específicas derivadas de la Adenina, tienen la capacidad de estimular e inducir una alta proliferación y división celular (Yong et al., 2009).
- **Contaminación:** Introducción involuntaria de microorganismos infecciosos, como bacterias, hongos, levaduras, virus, priones o protozoos, en el cultivo de tejidos vegetales (Hernández & Gonzales).

- **Explante:** Son segmentos que pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. Que posteriormente se inoculan en el medio de (Castillo, 2006).
- **Desdiferenciación o deformación:** Pérdida de características previamente desarrolladas, es decir cambio morfológico de un cuerpo como un explante (Wilson, 1994).
- **Grado de encallamiento:** Es la relación al volumen del callo, es decir la masa de callo que ocupa cierto volumen en el explante, a este se le puede dar valores numéricos (Ávila-Treviño et al., 2013).
- **In vitro:** Es un término aplicado para designar el desarrollo de células, tejido u órganos vegetales en frascos de vidrio conteniendo medio de cultivo (Carvalho et al., 2011).
- **Inoculación:** Introducir parte de la planta (explante) o célula en medio nutritivo, para el establecimiento del cultivo in vitro (Carvalho et al., 2011).
- **Kinetina:** Es una citoquinina derivado de la Adenina, que induce la iniciación y elongación de raíces, especialmente en los tejidos meristemático (como los ápices de los brotes) y en los procesos de micropropagación de plantas con la fórmula molecular ( $C_{10}H_9N_5O$ ) (Alcántara et al., 2019).
- **Fitohormonas o regulador de crecimiento:** Son sustancias naturales o sintéticas las cuales ayudan a regular la respuesta a estímulos ambientales como luz, temperatura y humedad, ayudando así a coordinar procesos esenciales para el desarrollo normal de las plantas (Alcantara et al., 2019).
- **Foliolo:** Segmento individual de una hoja compuesta (Carretero, 2004).
- **Masa fresca:** Peso total del explante o callo recién cosechado, antes de que haya experimentado pérdida de agua por secado o deshidratación (Ávila-Treviño et al., 2013).

- **Masa seca:** Peso total del explante o callo cosechado, después que haya experimentado pérdida de agua por secado o deshidratación en horno (Ávila-Treviño et al., 2013).
- **Necrosis:** Es una condición y trastorno fisiológico que puede surgir en plántulas o brotes *in vitro* y que resulta en la muerte celular, esta condición puede propagarse por todo el explante, generalmente aparece posterior a la oxidación (Teixeira-da Silva et al., 2020).
- **Oxidación:** Es el proceso a través del cual un átomo, o grupo de átomos, pierde uno o más electrones (se oxida) y los cede a otro (el cual se considera reducido) lo que lleva al oscurecimiento del tejido (Karp, 1998).
- **pH:** Símbolo de cantidad fisicoquímica potencial hidrogenado. Esta cantidad indica la acidez, neutralidad o alcalinidad de una solución acuosa (Carvalho et al., 2011).
- **Supervivencia:** Capacidad de un explante (una porción de tejido vegetal, como una hoja, un tallo o una raíz) para mantenerse vivo, proliferar y desarrollarse adecuadamente en un ambiente controlado de cultivo *in vitro* (Borges-García, 2009).
- **Woody Plant Medium (WPM):** Es un medio de cultivo que se utiliza para propagar muchas especies de plantas leñosas. Se trata de una mezcla de nutrientes que contiene vitaminas, aminoácidos y sales inorgánicas (Silva et al., 2016).

## CAPITULO III

### METODOLOGÍA

#### 3.1. Método de investigación.

La metodología que se aplicó fue experimental cuantitativo, que consistió en evaluar el efecto de 8 tratamientos en distintas concentraciones y combinaciones en medio de cultivo *in vitro* para la inducción de la formación de callos friables a partir de folíolos de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke (shihuahuaco)

#### 3.2. Población y muestra.

##### 3.2.1. Población

La población fue conformada por hojas juveniles provenientes de brotes de un plantón de shihuahuaco del vivero forestal de la Universidad Nacional de Ucayali. Se percato que el plantón contará con un estado fitosanitario bueno.

##### 3.2.1. Muestra.

La muestra fue conformada por 3 explantes foliares de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente por cada frasco, es decir, y meristemas vegetales de la universidad nacional de Ucayali, que se encuentra a la altura del km 6.00 de la carretera Federico Basadre en la ciudad de Pucallpa- Perú.

#### 3.3. Procedimiento de recolección de datos.

##### 3.3.1. Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo estuvo conformado por Woody Plant Medium (WPM) a mitad de concentración, suplementado por sacarosa al 3% (30g/l), 0.2 g/l de ácido ascórbico para disminuir un posible necrosamiento u oxidación, 100 mg/l de Piridoxina como suplemento vitamínico, como medio gelificante se utilizó Agar 6.5 g/l; para todos los tratamientos el pH fue ajustado a 5.8 esto con ayuda de HCl (ácido clorhídrico para bajar el pH) y el

NaOH (hidróxido de sodio para subir el pH), cada frasco conto con 35 ml de medio de cultivo que posteriormente se esterilizaron en un autoclave a 15 libras de presión y 131°C por 20 minutos, al culminar los frascos y se dejaron enfriar por 24 horas.

### **3.3.2. Recolección de material vegetal**

La recolección del material vegetal se realizó a las 5 am en las instalaciones del vivero forestal de la universidad nacional de Ucayali. Las hojas fueron brotes juveniles de un plantón seleccionado previamente a las cuales se le sometió gradualmente a fumigación con fungicida (RIMODIL 2g/l) cada 3 días durante 2 semanas, además de ello se percató que el plantón tuviera un buen estado fitosanitario

La tijera de podar fue sometida a flameadas con alcohol 96°, una vez que se enfriara se procedió a cortar cuidadosamente la base de las hojas para inmediatamente colocarlas en una caja térmica de Tecnopor sobre una cama de hilo chancado y periódico, para posteriormente ser trasladada al laboratorio de tejidos y meristemas vegetales.

### **3.3.3. Protocolo de desinfección**

Para asegurar la mayor asepsia posible y la menor contaminación por hongos y bacterias se realizaron cuidadosamente dos lavados a las hojas.

#### **Fuera de la cámara de flujo laminar**

Las hojas recolectadas se colocaron cuidadosamente en un recipiente con agua destilada que contenía 8 gramos/L de ácido ascórbico, 10 ml de jabón líquido AVAL (25 gotas), y Tween 20; dejándolo reposar durante 30 minutos. Después se le dio otro enjuague en agua destilada con NaClO al 0.25% (unas gotas) y Tween 20 por 10 minutos.

#### **Dentro de la cámara de flujo laminar**

Para este paso se replicó el protocolo de desinfección de (Hernández-Villalobos & Chico-Ruíz, 2020; González-Alvarado et al. 2022), a excepción de concentración hipoclorito de sodio NaClO a la cual definí 0.25% para evitar daño al explante; previo a ello se almacenaron en unos frascos con tapa para posteriormente introducir los folios dentro por 10 minutos; luego se eliminó el NaClO y se introducen los foliolos en alcohol de 70° por 1 minuto, por último se enjuagaron los foliolos con agua destilada esterilizada 4 veces.

#### **3.3.4. Inoculación**

Se inocularon 3 explantes foliares de 1 cm<sup>2</sup> por frasco; cada uno de las unidades experimentales según el procedimiento descrito por (Hernández-Villalobos & Chico-Ruíz, 2020; González-Alvarado et al., 2022). Una vez concluido el proceso de siembra de explantes en los frascos, estos se dejaron en oscuridad permanente por 9 semanas replicando el procedimiento de (Ávila-Treviño et al., 2013), a una temperatura de 25 °C ± 2 °C, 75% de humedad.

#### **3.3.5. Análisis de pH y conductividad eléctrica**

Se separó un frasco para análisis de cada tratamiento las cuales se le midió el pH en un Peachimetro de mesa de marca ADWA y la conductividad eléctrica se midió en µs/cm en un conductímetro. Al finalizar la investigación de igual forma se procedió a medir pH y conductividad eléctrica de los medios de cultivos con explantes de cada tratamiento, con el fin de observa el consumo de nutrientes por parte de los explantes.

#### **3.3.6. Diseño experimental y tratamientos aplicados**

El diseño que se utilizó en la investigación fue un Diseño Completamente al Azar (DCA) que constó de 8 tratamientos con 11 repeticiones cada uno, cada frasco contó con tres explantes foliares inoculados, teniendo un total de 88 frascos, como se muestra en la (tabla 2).

**Tabla 2.**

*Tratamientos definidos con diferentes combinaciones y concentraciones de fitohormonas*

| Tratamiento | Descripción                      | Explante/Frasco | Frasco | Total |
|-------------|----------------------------------|-----------------|--------|-------|
| 1           | 2.5 mg/l 2,4 D                   | 3               | 11     | 33    |
| 2           | 3 mg/l 2,4 D                     | 3               | 11     | 33    |
| 3           | 2.5 mg/l 2,4 D + 1.5 mg/l BAP    | 3               | 11     | 33    |
| 4           | 3 mg/l 2,4 D + 3 mg/l BAP        | 3               | 11     | 33    |
| 5           | 3 mg/l 2,4 D + 3.5 mg/l BAP      | 3               | 11     | 33    |
| 6           | 3 mg/l 2,4 D + 4 mg/l BAP        | 3               | 11     | 33    |
| 7           | 3 mg/l 2,4 D + 2.5 mg/l Kinetina | 3               | 11     | 33    |
| 8           | 3 mg/l 2,4 D + 3mg/l Kinetina    | 3               | 11     | 33    |

### **3.4. Técnicas e instrumentos para recolección de datos.**

#### **3.4.1. Técnicas**

En la presente investigación la técnica utilizada fue la observación directa, en las cuales se evaluaron efecto que produjeron las fitohormonas en distintas combinaciones y concentraciones de cada una de las variables en estudio sobre el material experimental que en este caso fueron explantes provenientes de foliolos de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke (Shihuahuaco).

#### **3.4.2. Instrumentos**

Para la recolección de datos se utilizaron los formatos de elaboración propia tanto para la fase de desdiferenciación (deformación) del explante (anexo 2) y la fase callogénesis (anexo 3); además de ello se utilizó cámara fotográfica y una regla milimétrica para evaluar la altura y área aproximada de los callos. Balanza analítica para medir la masa fresca y seca.

### **3.5. Procesamiento para recolección de datos.**

La investigación se desarrolló en el laboratorio de cultivos de tejidos y Meristemas de la Universidad Nacional Ucayali, km 6.200 de la Carretera Federico Basadre.

La recolección de datos se dio gracias a la elaboración de dos formatos de evaluación; el primer formato (anexo 2) se consideró para la fase de desdiferenciación (deformación) del explante en la que se evaluó los cambios que sufrió el explante anterior a la aparición de callos. Para la segunda fase de callogénesis se utilizó el segundo formato (anexo 3) en la que se evaluó las siguientes variables posteriores a la aparición de los callos. Cada variable evaluada en las dos fases se analizó a base de porcentajes para ello se le asignó un valor a cada variable para facilitar la recolección de datos se muestra en la (tabla 3). La evaluación se realizó 1 vez a la semana durante 9 semanas.

La evaluación fue mediante observación directa durante las 9 semanas de instalado el experimento para recopilar información sobre la fecha de aparición de las diferentes variables analizar. Las variables evaluadas se presentan en la (tabla 3).

**Tabla 3.**

*Fases a evaluar con sus respectivas variables en la presente investigación*

| <b>FASE</b>                                         | <b>VARIABLE</b>        | <b>UNIDAD DE EVALUACIÓN</b>            |
|-----------------------------------------------------|------------------------|----------------------------------------|
| <b>Desdiferenciación o deformación del explante</b> | Asepsia                | %                                      |
|                                                     | Contaminación          | %                                      |
|                                                     | Color                  | Verde; marrón claro, marrón oscuro (%) |
|                                                     | Oxidación              | (1)<30% ; (2) >30%<60%, (3)>60%        |
|                                                     | Necrosis               | (1)<30% ; (2) >30%<60%, (3)>60%        |
|                                                     | Desdiferenciación      | %                                      |
|                                                     | Supervivencia          | %                                      |
|                                                     | Mortandad              | %                                      |
|                                                     | Forma                  | Plano, doblado, doblado y arrugado (%) |
| <b>Callogénesis</b>                                 | Callogénesis           | %                                      |
|                                                     | Grado de encallamiento | (1)<30% ; (2) >30%<60%, (3)>60%        |
|                                                     | color                  | Blanco, amarillo, café, otro (%)       |
|                                                     | Tamaño                 | mm                                     |
|                                                     | Área                   | cm <sup>2</sup>                        |
|                                                     | Oxidación              | (1)<30% ; (2) >30%<60%, (3)>60%        |
|                                                     | Necrosis               | (1)<30% ; (2) >30%<60%, (3)>60%        |
|                                                     | Masa fresca            | mg                                     |
|                                                     | Masa seca              | mg                                     |

### **Fase 1: Desdiferenciación o deformación del explante**

En esta fase se analizaron las variables que generaban cambio a nivel visual en el explante, estos cambios son antes de la aparición del callo, cabe recalcar que no en todos los tratamientos existieron callo por lo que la evaluación de esta fase se mantuvo hasta la evaluación final.

- **Contaminación:** A cada explante contaminado se le asignó un valor (1; 2; 3) que equivale al 33.3% de su área total que sumado los tres explantes inoculados es el 100%, si la contaminación se da fuera del explante le daremos el valor de 1 (33.3%), (López-Gómez et al., 2010).

- **Asepsia:** Fue la relación entre el número de explante sin contaminación, a cada explante limpio se le asignará un numero (1; 2; 3) que equivale al 33.3% de su área total que sumado a los tres explantes inoculados es el 100% (López-Gómez et al., 2010).
- **Color:** Se le dio un valor numérico de acuerdo al color que vayan mostrando. 1 (verde); 2 (MC); 3 (MO), luego al final se le analizo en base a porcentajes (López-Gómez et al., 2010).
- **Oxidación:** Se considero los 3 explantes como una sola área a la que se le dio un valor numérico según el área aproximado oxidado (1)<30% ; (2) >30%<60%, (3)>60% (Ávila-Treviño et al., 2013).
- **Necrosis:** Se considero los 3 explantes como una sola área a la que se le dio un valor numérico según el área aproximado con necrosis (1)<30% ; (2) >30%<60%, (3)>60% (Ávila-Treviño et al., 2013).
- **Desdiferenciación o deformación:** Se le asigno de acuerdo a la cantidad de explantes que sufrieron algún cambio en forma.
- **Supervivencia:** se contó el número de explantes vivos (de color verde u otra característica que demuestre vida celular. A la cual se le dará valores de (1; 2; 3).
- **Mortandad:** se contó en número de explantes muertos ya sea por necrosis u contaminación. A la cual se le dará valores numéricos de (1;2;3).
- **Forma:** Se le dio un valor numérico según la su forma 1 (plano); 2 (doblado); 3 (doblado e hinchado) (López-Gómez et al., 2010). En esta variable ya se vería la desdiferenciación o deformación del explante, por lo que se considero de los explantes que sobrevivieron, es decir el porcentaje se evaluó en función a los explantes que sobrevivieron a la mortandad.

## Fase 2: Callogénesis

Cabe recalcar que al igual que en análisis de la forma y desdiferenciación o deformación del explante, se consideraron los explantes que sobrevivieron. En esta fase se analizó el cambio que sufrieron los callos desde su aparición hasta la última evaluación y para ello se consideró las siguientes variables:

- **Callogénesis:** fue el porcentaje en función a la cantidad de explantes vivos con callos.
- **Grado de encallamiento:** Fue el volumen del callo expresado en los 3 explantes como el 100% del volumen a analizar; con la referencia visual le daremos un valor de acuerdo al volumen de callosidad: 1 (30%60%). (Ávila-Treviño et al., 2013).
- **Color:** Se le dio un valor según el color del callo: blanco (1), amarillo (2), café (3), otro (4) (Ávila-Treviño et al., 2013).
- **Tamaño:** Con una regla se midió la altura los callos promedio en mm.
- **Área:** Se medio todos los callos con y se consideró un promedio aproximado en mm<sup>2</sup>.
- **Oxidación:** Se considero los callos formados como una sola área a la que se le dio un valor numérico según el área aproximado con necrosis (1) <30% ; (2) >30%<60%, (3)>60% (Ávila-Treviño et al., 2013).
- **Necrosis:** Se considero los callos formados como una sola área a la que se le dio un valor numérico según el área aproximado con necrosis (1)<30% ; (2) >30%<60%, (3)>60% (Ávila-Treviño et al., 2013).
- **Masa fresca:** Una vez levantado el experimento se pesaron los callos en una balanza analítica en mg.
- **Masa seca:** Se secaron los callos en una estufa a 70° por 72 horas y se pesó en una balanza analítica en mg.

### **3.6. Tratamiento de datos.**

El análisis de los resultados fue posible gracias a la recopilación sistemática de datos que fue cuantificada, seguida de un análisis riguroso mediante técnicas estadísticas aplicada (Vizcaíno et al., 2023).

Los datos obtenidos durante la evaluación en cada una de las fases del experimento se ordenaron en un Excel donde se acomodaron por cada semana con la finalidad de generar tablas y figuras que permitan lograr los objetivos trazados. En programa InfoStat versión 2020e se corroboró si los datos recolectados en las evaluaciones de las distintas variables cumplieran con los supuestos (normalidad y homocedasticidad), para proceder con el análisis de varianza ANOVA y medias un LSD Fisher al 5%; para los casos que no cumplieran con al menos uno de los supuestos se realizó un análisis no paramétrico con el método Kruskal-Wallis con sus respectivos análisis de medias al 5%. Todas estas pruebas fueron aplicadas a cada una de las variables de cada fase por separado para su análisis e interpretación detallado.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. ASEPSIA Y CONTAMINACIÓN DE EXPLANTES

Durante el periodo de evaluación se obtuvo un total de 51.01 % de asepsia total (figura 4), indicando que la mitad de los explantes encubados quedaron libres de microorganismos contaminantes, eso indica que aún falta ajustar el protocolo de esterilización en la especie *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke hasta llegar al 100 % de asepsia, cabe destacar que no se encontró estudios de la especie relacionados a la desinfección de hojas para cultivo *in vitro*. A pesar de tener solo la mitad de explantes asépticos se pudo trabajar la fase de callogénica porque se dispuso de un número aceptable de explantes estériles que se pudo evaluar.

Se considera que ajustando la concentración del NaClO a un porcentaje mayor al que se utilizó (0.25%) o aumentando el tiempo de enjuague de los explantes foliares (10 minutos) se tendría mayor asepsia; así como lo hicieron (Hernández-Villalobos & Chico-Ruíz, 2020) que utilizaron NaClO al 2.5% por 20 minutos en hipocótilos y cotiledones de *P. peruviana*; (González-Alvarado et al. 2022) al 2% por 20 minutos en semillas de *G. crinita* Mart; (Guidi-Nissim et al., 2024) 3% durante 20 minutos explantes apicales y laterales de *S. miyabeana*; (Molina et al., 2022) 1% durante 25 minutos en explantes foliares de *P. mollissimay P. edulis*. Las cuales obtuvieron grados de contaminación casi nula. Sin embargo, mayores concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO), puede implicar un daño mayor al tejido foliar, por lo que es necesario hacer para cada especie, pruebas, modificando tiempos y concentraciones de los desinfectantes.

A demás otros factores a parte del protocolo de desinfección (fungicida, concentración de NaClO, tiempo de inmersión, mal autoclavado, tipo de explante), pueden alterar el porcentaje de contaminación como lo menciona (Ayala, 2020) quien recomienda utilizar con hojas jóvenes ya que estas están menos tiempo expuestas a

la infestación por microorganismos. A parte de ello, a veces una mala manipulación al momento de inocular, procedencia del plantón, la especie en particular pueden sumarse a ser más factores que alteren la cantidad de asepsia requerida.

Se pudo observar que la contaminación fúngica se dio a partir de la primera semana en algunos recipientes de todos los tratamientos llegando a su máximo entre las semanas 2 y 8 de acuerdo al tratamiento (figura 2). Como es lógico, se observó una relación en la que la asepsia de los explantes decrecía conforme crecía la contaminación (figura 3).

**Figura 2.**

*Evaluación del porcentaje de asepsia por semana en explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*

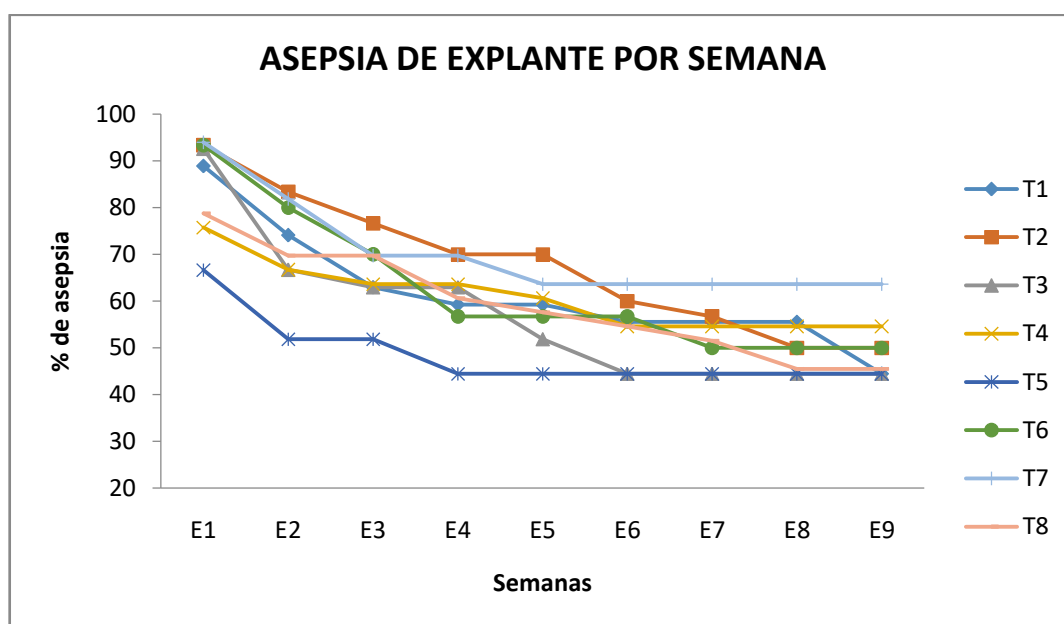


**Figura 3.**

*Evaluación del porcentaje de contaminación por semana en explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*

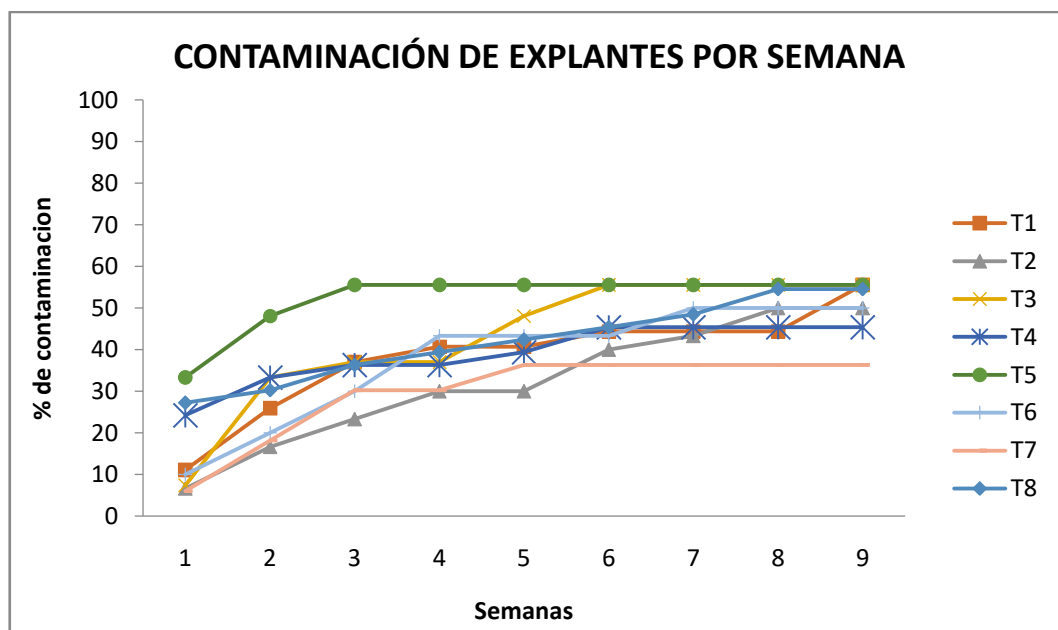
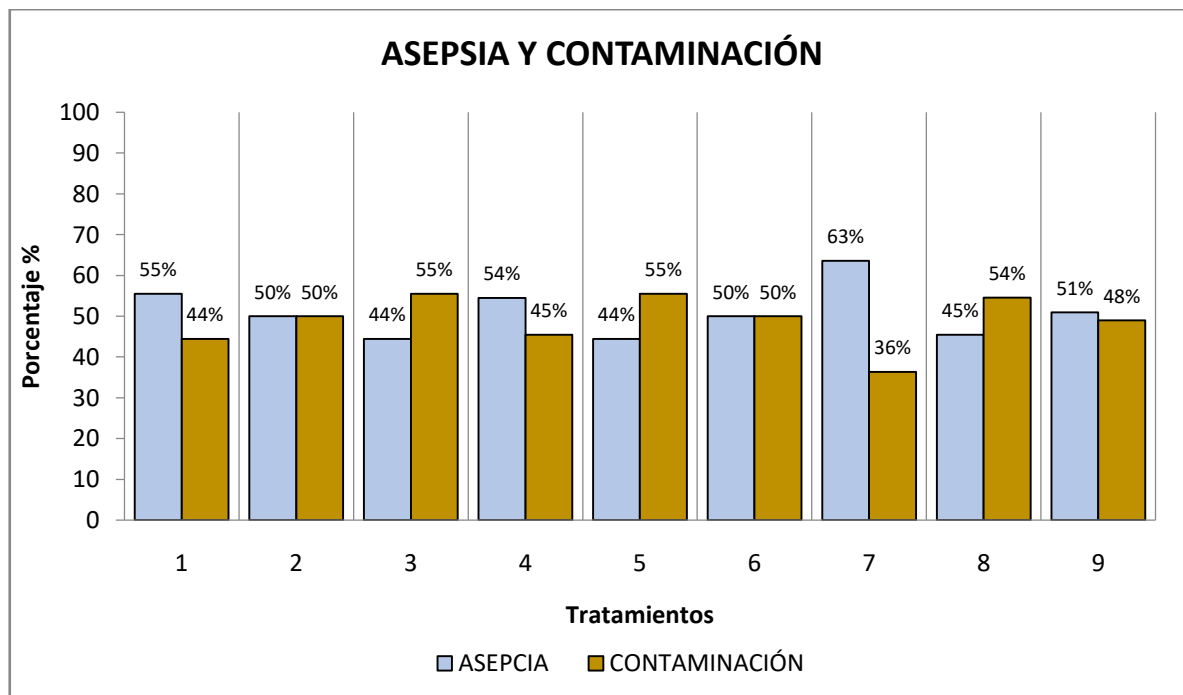


**Figura 4.**

*Comparación de los resultados totales del porcentaje de asepsia y contaminación en explantes foliares de *Dipteryx férrea* (Ducke) Ducke*



Utilizando el programa InfoStat se realizó un ANVA (tabla 4 y 5), cuyos datos indican que no existe diferencia significativa entre los porcentajes de asepsia y contaminación de los explantes foliares, esto indica que el comportamiento a la desinfección en todos los tratamientos fue estadísticamente similar ya que se utilizó una sola concentración de hipoclorito de sodio (NaClO) (un solo protocolo).

**Tabla 4.**

*Análisis de varianza de los resultados del porcentaje de asepsia en explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*

| F.V.        | SC        | GI | CM      | F    | p-valor |
|-------------|-----------|----|---------|------|---------|
| Modelo      | 3587.83   | 7  | 512.55  | 0.19 | 0.9857  |
| Tratamiento | 3587.83   | 7  | 512.55  | 0.19 | 0.9857  |
| Error       | 189731.27 | 72 | 2635.16 |      |         |
| Total       | 193319.1  | 79 |         |      |         |

**Tabla 5.**

*Análisis de varianza de los resultados del porcentaje de contaminación en explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*

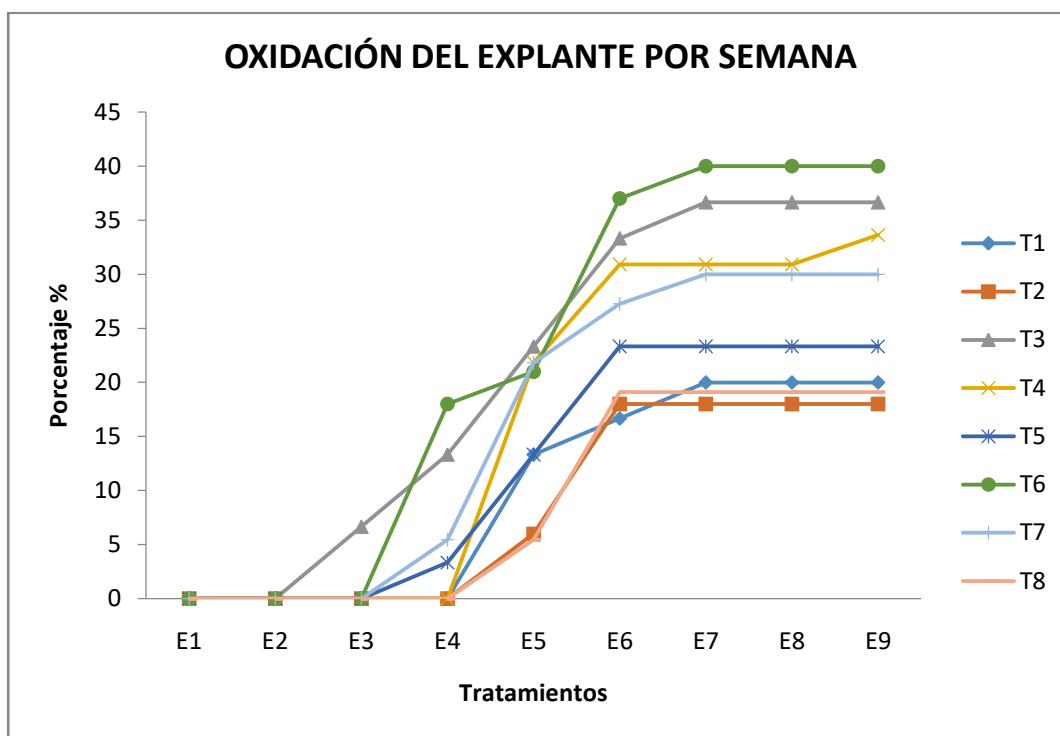
| F.V.        | SC        | GI | CM      | F   | p-valor |
|-------------|-----------|----|---------|-----|---------|
| Modelo      | 3601.62   | 7  | 514.52  | 0.2 | 0.9856  |
| Tratamiento | 3601.62   | 7  | 514.52  | 0.2 | 0.9856  |
| Error       | 189733.05 | 72 | 2635.18 |     |         |
| Total       | 193334.67 | 79 |         |     |         |

#### 4.2. OXIDACIÓN DEL EXPLANTE

La oxidación del explante se pudo apreciar de forma leve desde la semana 2; en la semana 6 casi todos los tratamientos se estabilizaron. Aunque aún se reportó un leve aumento de la oxidación hasta la última semana. El cambio del porcentaje en el grado de oxidación en el tiempo se presenta en la (figura 5). La oxidación máxima que se reportó en el T6 con valor de 40% del área de los explantes (figura 6).

**Figura 5.**

*Evaluación del porcentaje de oxidación por semana en explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*



Se pudo observar que la oxidación nació de los pequeños daños que se le causa al explante durante el corte en la inoculación, esto lo confirma (Bray et al. 2000), cuando afirma que la oxidación es causada por la liberación de compuestos fenólicos *in vitro*, por lesión tisular o por la senescencia de especies nativas tropicales que contienen altos niveles de estos compuestos.

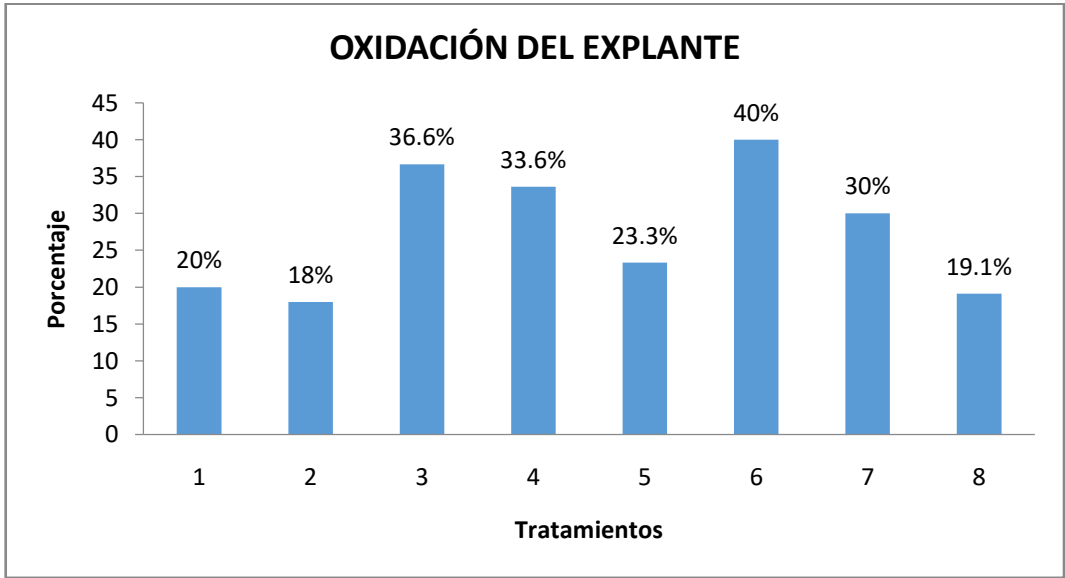
Por otro lado la adición de 0.2 g/l de ácido ascórbico en el medio de cultivo controló la oxidación total, llegando a tener un resultado del porcentaje de oxidación total entre todos los tratamientos de 27.59 %, siendo este porcentaje aceptable ya que permitió que el explante continuara con el proceso de calogénesis; este porcentaje se aproxima con los resultados de (Gutiérrez, 2021) ya que menciona que nivel de oxidación aceptable es del 25 %, aunque en ese caso el autor utilizó 0.5 g/l de ácido cítrico y 0.25 mg/l de ácido ascórbico en *Vaccinium corymbosum*, por lo que se entiende que es necesaria la adición y en mayor concentración otros compuestos antioxidantes.

Por otra parte (Santos et al., 2022) recomienda que el uso de explantes provenientes de invernadero reducen la tasa de oxidación *in vitro* en *Lippia gracilis*. A su vez (Mihai Et al., 2023), indica que esto se da sobre todo porque las especies leñosas, ya que estas presentan desafíos a la baja respuesta de los tejidos *in vitro* manipulación y alta tasa de fenolización.

Rezende (2019), encontró que entre todos sus tratamientos el que estaba conformado por 2.0 mg/l NAA con 7.5 mg/l o con 10.0 mg/l BAP presentaba la mayor tasa de oxidación de sus explantes asociando este hecho al efecto de fitohormonas; coincidiendo sus datos con esta investigación donde la mayor oxidación también fue en (T6= 3mg/l 2,4D + 4 mg/l BAP) por otro lado también podríamos asociar la oxidación a los mencionado por (Payghamzadeh & Kazemitabar, 2011), quienes indican que la presencia de auxinas (2,4-D) en el medio de cultivo promueve mayor oxidación.

En la (figura 6) se puede apreciar los grados de oxidación que alcanzaron al final los explantes en cada tratamiento.

**Figura 6.**  
*Porcentaje del grado de oxidación total en explantes foliares de Dipteryx ferrea (Ducke) Ducke*



Dado que los datos no cumplían con los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianzas, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en el programa InfoStat; de las cuales se observó un p valor de 0.48 indicando así que no existe diferencias significativas entre los grupos de oxidación del explante ( $p < 0.05$ ).

Es importante determinar el grado de oxidación de los explantes ya que esto nos permitirá ajustar la concentración y tipo de agentes antioxidantes en futuros experimentos, así garantizar mayor sobrevivencia y sanidad del explante para no ver interrumpido los objetivos trazados.

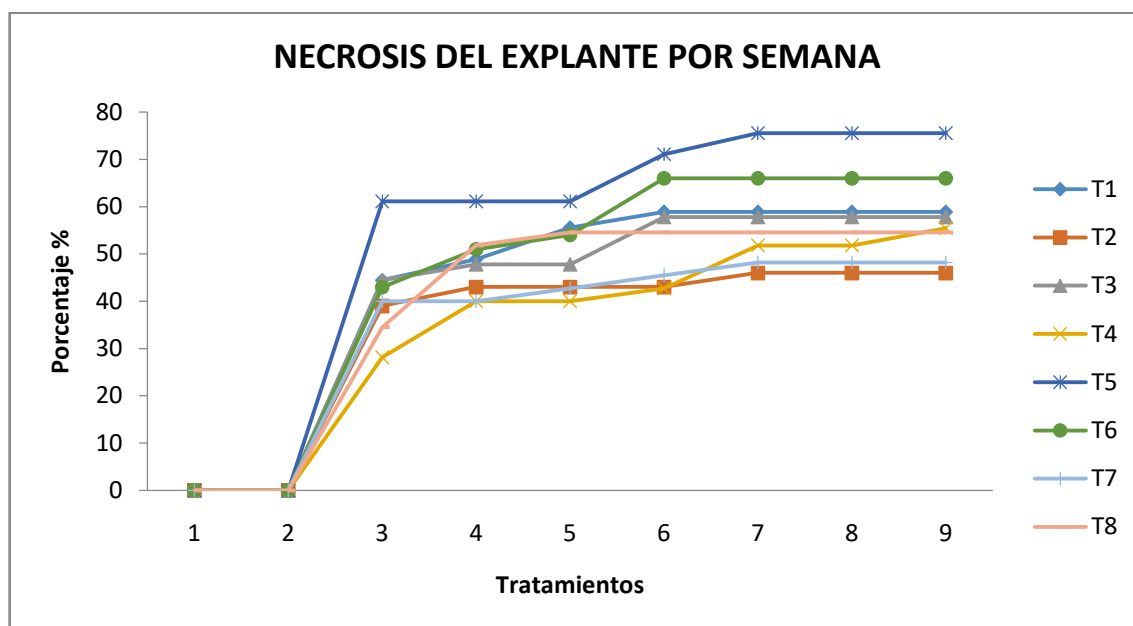
#### **4.3. NECROSIS DEL EXPLANTE**

Los resultados de necrosis fueron superiores al de la oxidación. A partir de la semana 3 la necrosis promedio para todos los tratamientos fue de 41.8 % del área del explante, se observó que la necrosis empezaba su aparición por los bordes de los explantes y en algunos puntos intermedios. Hasta la semana 6 básicamente la necrosis dejó de crecer y se estabilizó un poco alcanzando un 55%. Al final de las evaluaciones la necrosis alcanzó un promedio máximo entre todos los tratamientos de 58% siendo más del doble que la oxidación. El cambio del porcentaje de necrosis en el tiempo se presenta en la (figura 7).

El menor porcentaje de necrosis fue registrado en los tratamientos 2 y 7 con 46% y 48% y el mayor en el T5 con 75.6 %. El grado de necrosamiento final que alcanzó cada tratamiento del experimento se presenta en la (figura 8). La necrosis en algunos explantes individuales alcanzó el 100% de su área que llevó a la mortandad de algunos explantes.

**Figura 7.**

*Evaluación del porcentaje del grado de necrosis por semana en explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*

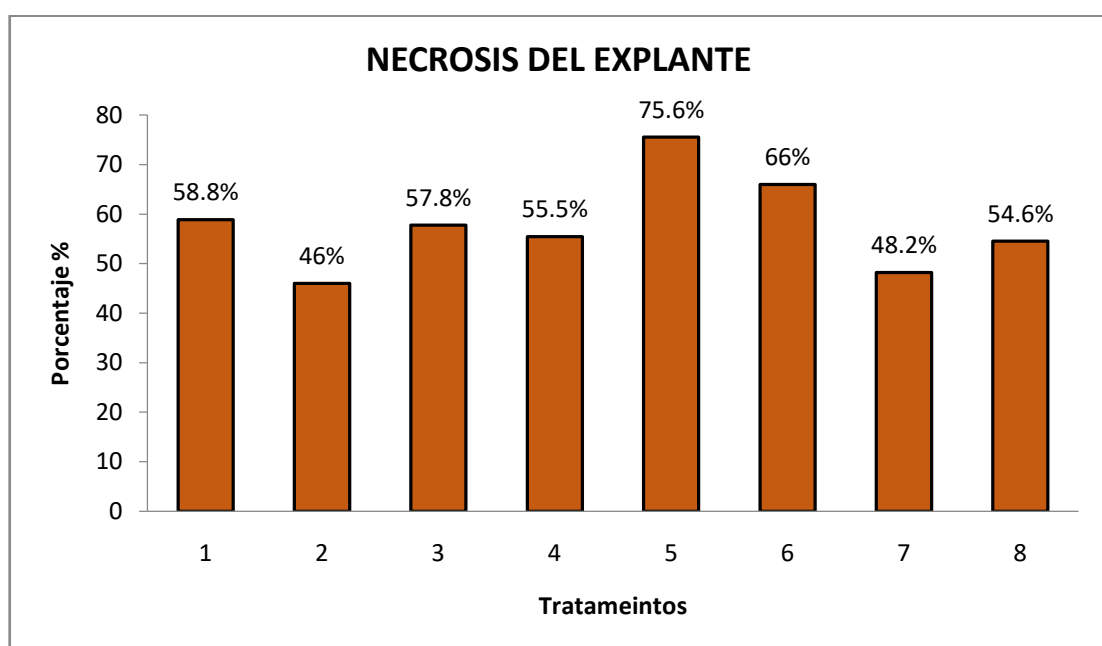


(Santos et al., 2022), mencionan que la necrosis también tiene que ver con el tipo de medio de cultivo que se relacionan con la intensa actividad celular proporcionada por el tipo de meristemo y el grado de estrés oxidativo causado por la sal; el autor en su investigación con *Lippia gracilis* determino que el medio  $\frac{1}{2}$  MS fue el más eficiente para reducir los niveles de necrosis, aunque en esta investigación se utilizó WPM al 50 % de concentración, la necrosis fue un poco más de la mitad (58%), este porcentaje aunque relativamente alta no que comprometió el objetivo del trabajo, aunque sería mucho mejor seguir realizando pruebas en la especie para disminuir la necrosis de los explantes. Por otro lado (Al-Aizari et al., 2024), en su investigación descubrió que la tasa más alta de necrosis (78.33%) se registró con *Bithier abiadh* en medio Murashige y Skoog (MS). Demostrando así lo dicho anteriormente, que el medio de cultivo es uno de los factores que influyen en la necrosis del explante. Además de ello cada especie reacciona de manera diferente a los medios de cultivo.

Para tratar de disminuir la oxidación y posterior necrosis del explante en *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke el ácido ascórbico añadido al medio de cultivo WPM ayudo mucho a evitar este inconveniente; lo mismo afirma (Rahma et al., 2023) quien preparó su medio de cultivo suplementado con ácido ascórbico y resultó en los niveles de necrosis más baja durante la iniciación del meristemo de los tres cultivares.

**Figura 8.**

*Porcentaje del grado de necrosis total en explantes foliares de Dipteryx ferrea (Ducke) Ducke*



Dado que los datos no cumplían con los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianzas, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en el programa InfoStat; de las cuales se observó un p valor de 0.41 indicando así que no existe diferencias significativas entre los grupos de necrosis del explante ( $p < 0.05$ ).

Es importante conocer el grado de necrosis de los explantes ya que de igual manera que la oxidación nos permite conocer la condición óptima que debe tener medio de cultivo para evitar la muerte celular en los explantes.

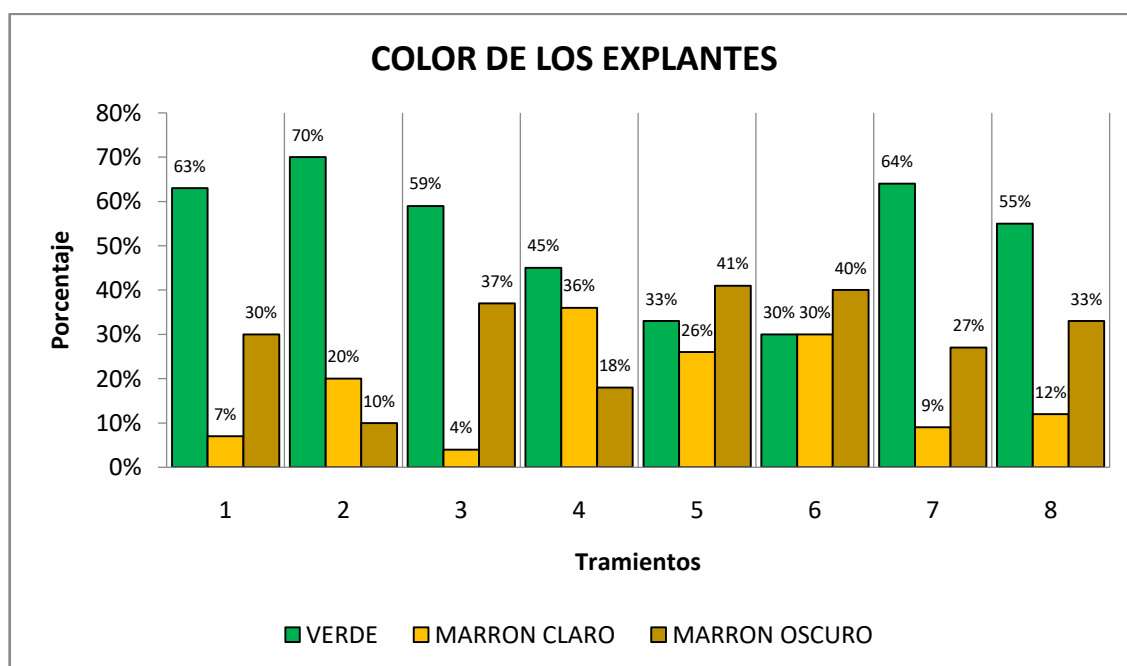
#### 4.4. COLOR DE EXPLANTE

El color va de la mano con la oxidación y necrosis ya que un explante verde significa que no tiene oxidación ni necrosis y uno de color marrón significa que la necrosis avanzó demasiado hasta el punto de matar al explante esto lo confirma (Canale, 2023) quien indica que el oscurecimiento del explante engloba de manera general la oxidación por radicales libres de diferentes componentes celulares, especies químicas muy reactivas, todo lo cual genera daño e incluso la muerte celular. En la presente investigación el mayor porcentaje de explante mantuvo su color verde (53%), de color marrón claro (18%) y marrón oscuro (29%) (Figura 9), estos colores nos ayudan a identificar la oxidación (oscurecimiento del explante puede ser un marrón claro) y necrosis (pérdida total del color original del explante tornándose marrón oscuro) además de ello la textura del explante.

Azofeifa-Delgado (2009) agrega que en la etapa de establecimiento *in vitro*, luego de ser cortados, muchos de los explantes empiezan a perder el color verde e inician un oscurecimiento, concordando con esta investigación ya que se observó lo mismo.

**Figura 9.**

*Porcentaje del color total de los explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*



#### 4.5. SUPERVIVENCIA Y MORTANDAD DEL EXPLANTE

La supervivencia y la mortandad van de la mano con la asepsia, contaminación, oxidación y necrosis ya que estos factores determinan si el explante logra sobrevivir por lo menos hasta llegar a la fase de callogénesis. La supervivencia de los explantes se mantuvo con 100% hasta la semana 2 (figura 10), la mortandad empezó a observarse en la semana 3. El cambio en el tiempo fue diferente en cada tratamiento como se puede apreciar en la (figura 10).

**Figura 10.**

*Evaluación del porcentaje de supervivencia por semana de explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*

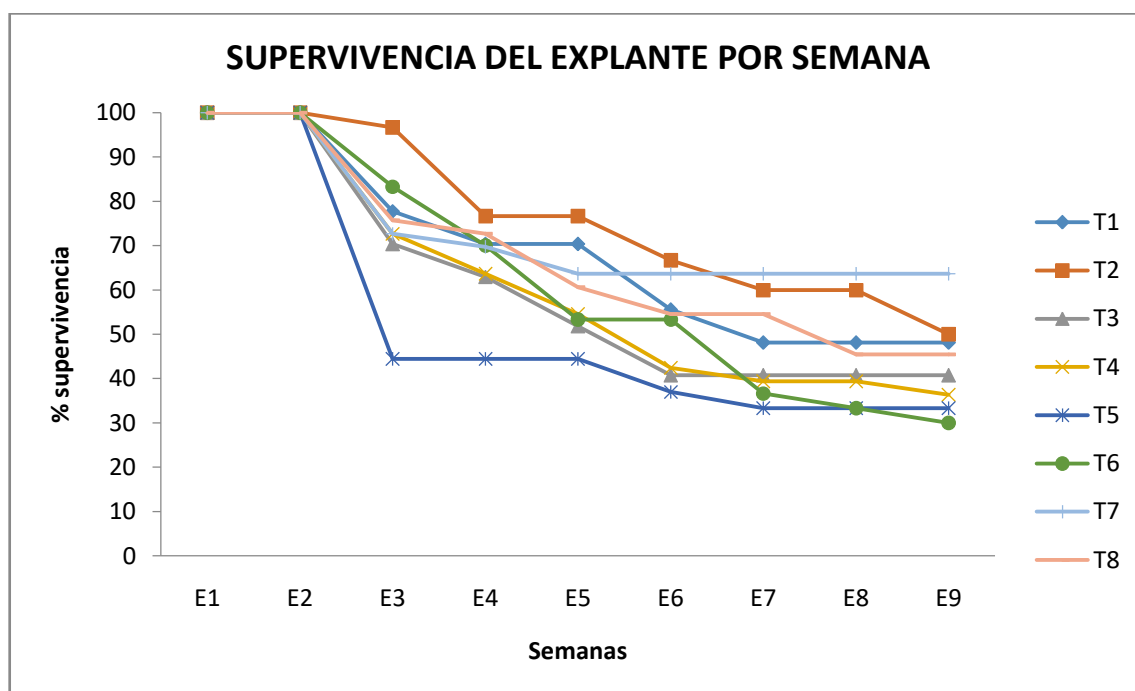
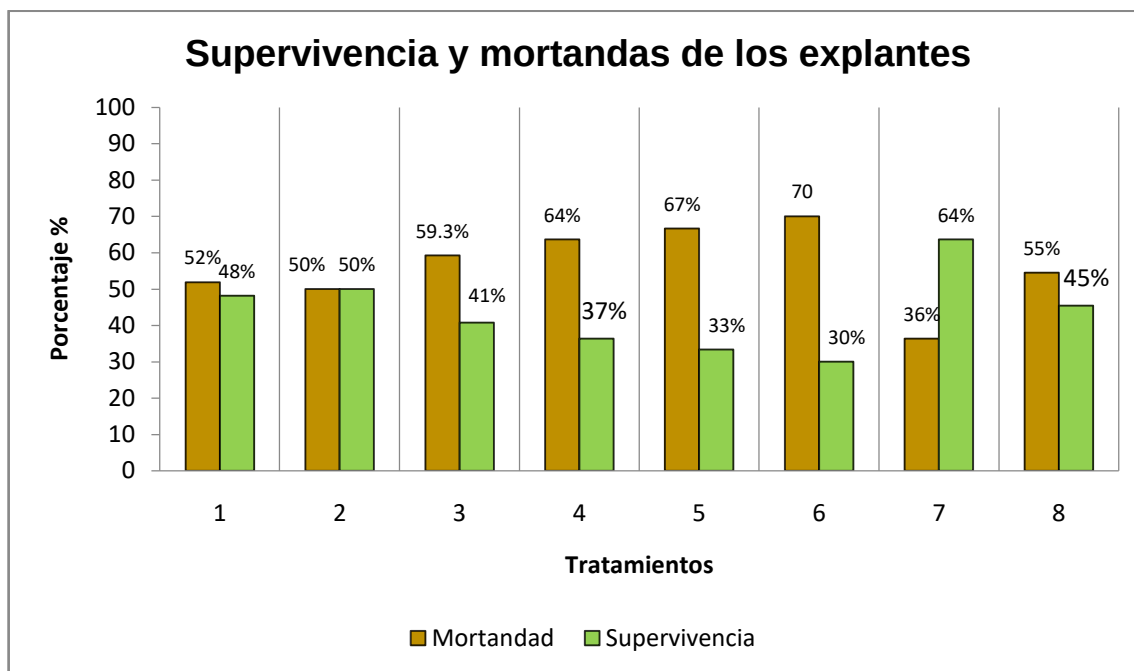


**Figura 11.**

*Comparación de los resultados finales del porcentaje de supervivencia y mortandad en los explantes provenientes de folíolos de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*



Hasta la última evaluación el porcentaje de supervivencia total fue de 43.46 % y la mortandad de 56.54%. Los tratamientos que mostraron mayor porcentaje de supervivencia fue el T7 (64%), por otro lado, los tratamientos con mayores porcentaje de mortandad fueron el T6 (70%), T5 (67%) y T4 (64%).

La mayor causa de mortandad fue la contaminación fúngica, por otro lado (Eliwa 2024), en su estudio demostró que al remojar los explantes en hipoclorito de sodio (NaClO) al 20% durante 15 minutos produjo la mayor supervivencia (96.61%), con la menor mortalidad (3.14%) y contaminación (0.24%). En este sentido el protocolo de desinfección aparente fue un factor que no permitió alcanzar un mayor porcentaje de asepsia que permitirá más sobrevivencia de explantes, aunque también otros factores pueden sumarse al aumento de contaminación como una mala manipulación del auto clavado y desinfección mala desinfección del ambiente de la cámara de flujo laminar.

Robinson et al. (2023), Asegura que la mortandad de explantes foliares disminuye a medida que la duración de la incubación es en oscuridad, esto coincide con lo estudiado ya que toda la incubación de los explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke se dio en oscuridad y no hubo más mortandad más que por parte de la contaminación, incluso algunos explantes que tenían regiones necrosadas aun tenía partes verdes, es decir explantes seguía vivo que perduro por las 9 semanas de duración del experimento. Mencionando esto es necesario realizar a más pruebas de asepsia en la especie para evitar altos porcentajes de mortandad por hongos.

Dado que los datos no cumplían con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en el programa InfoStat; de las cuales se observó un p valor 0.82 indicando así que no existe diferencias significativas entre los grupos de supervivencia del explante ( $p < 0.05$ ).

#### **4.6. DESDIFERENCIACIÓN O DEFORMACIÓN DEL EXPLANTE**

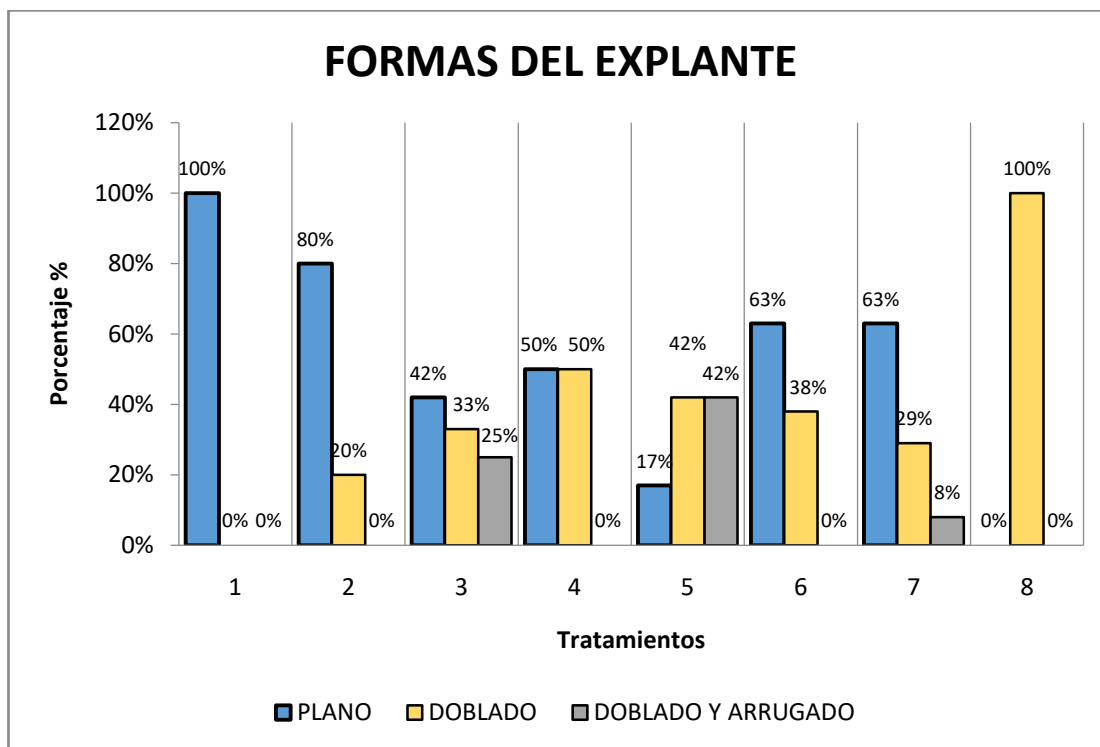
Tomando en cuenta el 43.46% de explantes sobrevivientes se analizaron las demás variables partiendo desde la deformación o desdiferenciación del explante.

Durante la inoculación, estos mismos tuvieron una forma plana, sin embargo en el proceso, los explantes sufrieron cambios en su forma, empezándose a doblar como también cambiar su textura, generalmente eso lo hace antes de la aparición de los callos como una respuesta a las fitohormonas o incluso al mismo medio de cultivo, aunque se observó en el presente estudio poco porcentaje en el cambio de la forma del explante.

#### 4.6.1. Formas del explante

**Figura 12.**

*Efecto de fitohormonas y su concentración en la forma de la desdiferenciación o deformación en explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*



En las 9 semanas de evaluación considerando los explantes vivos, se encontró que el 54% de los explantes mantuvieron su forma plana, el 38% se doblaron y el 8% a parte de doblarse también se arrugaron (figura 12). El tratamiento 8 fue el que tuvo el mayor porcentaje de explante doblados indicando que la cantidad y tipo de fitohormona (tabla 2) afectan al cambio de la forma del explante (desdiferenciación o deformación). (Leticia et al., 2009) trabajando con explantes foliares de *Tagetes erecta* obtuvo similares resultados en un medio MS con 2 mg/l de 2,4-D y 2 mg/l de BA observando que los bordes de los explantes comenzaron a redondearse en un periodo de 20 días, llamando a este el proceso desdiferenciación de los explantes durante la formación de callo.

#### **Evolución del proceso de desdiferenciación o deformación del explante.**

A partir de la primera semana solo los tratamientos 6 y 8 empezaron a mostrar cambios morfológicos en la forma del explante (desdiferenciación), en la

semana 5 ya todos los tratamientos mostraron desdiferenciación a excepción del tratamiento 1 que no mostro cambios.

En la (figura 14), se observa que el tratamiento 1 no mostro ningún cambio en la forma del explante, mientras que con los tratamientos 8; 5 y 3 fueron los mejores en desdiferenciación con 93%; 74% y 73% respectivamente.

**Figura 13.**

*Evaluación del efecto de fitohormonas y su concentración por semana del porcentaje de desdiferenciación en explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*

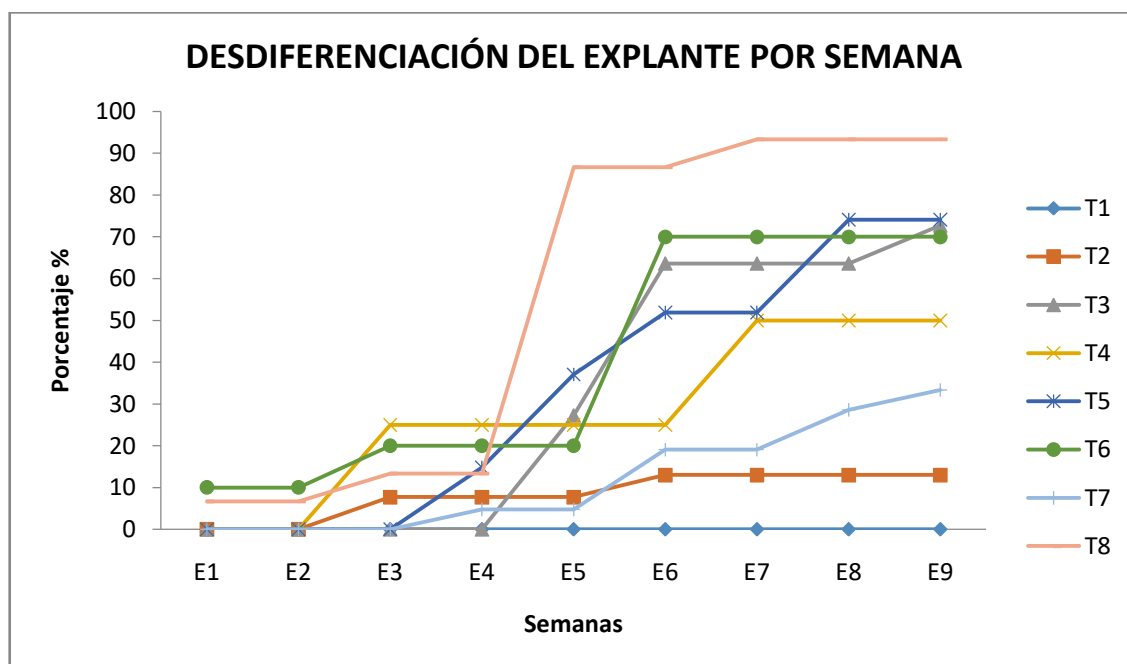
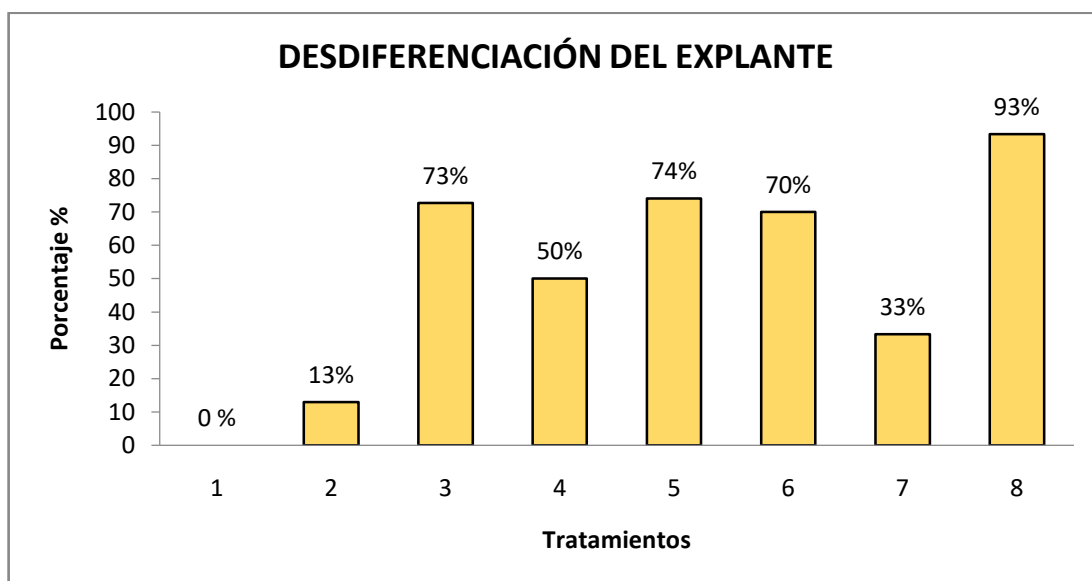


**Figura 14.**

*Efecto de fitohormonas y su concentración en el porcentaje de desdiferenciación o deformación total en explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*



Dado que los datos no cumplían con los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianzas, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en el programa InfoStat; de las cuales se observó un p valor de 0.0001 indicando así que existe diferencias altamente significativas entre los grupos de desdiferenciación del explante ( $p < 0.05$ ) lo que sugiere que al menos uno de los grupos difiere de los demás.

Posteriormente en el análisis de medias de Kruskal-Wallis al 5% de significancia ( $\alpha = 0.05$ ). Se observó que existe 4 grupos estadísticamente iguales o similares en la desdiferenciación del explante (Tabla 6), el primer grupo conformado por el T1, T2, T7; con porcentajes de 0% a 33%; el segundo por el T2, T7, T4; de 13% a 50%, el tercero por el T7, T4, T6, T5, T3; de 33% a 73% y el cuarto grupo por el T4, T6, T5, T3, T8 con valores de 50 a 93% mostrando el mejor rango entre estos porcentajes. Sin embargo, el T8 se destaca por ser el mejor numéricamente con un 93% de explantes desdiferenciados (explantes que sufrieron cambios antes la aparición de callos).

Según (Kumlay & Ercisli, 2015), el uso de citoquininas afecta directamente el proceso de desdiferenciación resultando en la disminución de la lignificación de la pared celular, facilitando el cambio morfológico (deformación) y el aumento del crecimiento celular (callo), coincidiendo con (Mori-Vásquez et al., 2024) quienes demostraron que la asociación fitohormonas, específicamente BAP+2,4-D y TDZ+2,4 D, promovieron la deformación de folíolos de edad joven e intermedio de *S. amara*, por lo que infieren que la asociación de las citoquininas potencia la deformación de los folíolos. Esto se comprobó en este estudio ya que el mejor tratamiento en presentar desdiferenciación del explante (deformación) fue una combinación auxina y citoquinina (T8 3mg/l 2,4 D + 3mg/l Kinetina) quienes tuvieron las dosis más altas aplicadas en este estudio, refiriendo así que por lo menos en la especie *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke a mayor concentración de fitohormonas en especial citoquinina hay mayor respuesta del explante.

**Tabla 6.**

*Análisis de medias de Kruskal-Wallis al 5% del efecto de fitohormonas y su concentración en el porcentaje de desdiferenciación de explantes foliares de Dipteryx ferrea (Ducke) Ducke*

| Tratamientos | Medias | Grupos |
|--------------|--------|--------|
| 1            | 0      | A      |
| 2            | 13     | A B    |
| 7            | 33     | A B C  |
| 4            | 50     | B C D  |
| 6            | 70     | C D    |
| 5            | 74     | C D    |
| 3            | 73     | C D    |
| 8            | 93     | D      |

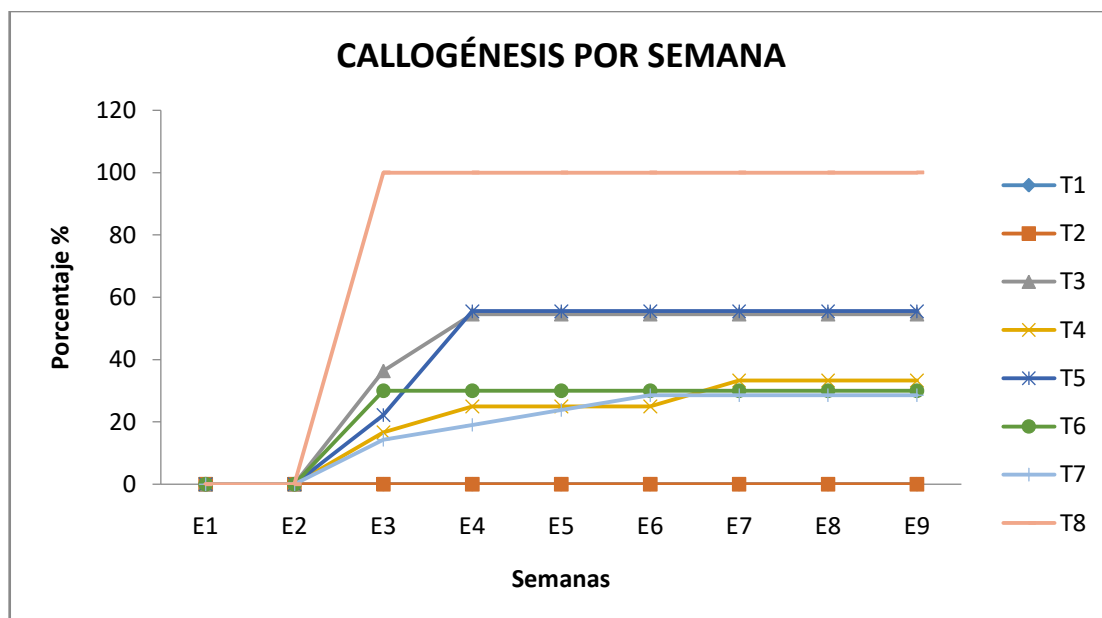
*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).*

#### 4.7. CALLOGÉNESIS

Los primeros callos aparecieron a partir de la semana 3 en los tratamientos: T3 (36%); T4 (17%), T5 (22.2%); T6 (30%); T7 (14%) y T8 (100%), a excepción del T1 y T2 que no mostraron resultados hasta la última evaluación, se puede evidenciar que el T8 desde la primera aparición de callos fue el único en presentarlos en todos los explantes, aunque en ese tiempo los callos aun eran pequeños. El tiempo de la primera aparición de callos va a depender de muchos factores como sostiene (Eras-Guamán et al., 2019) quien en su estudio obtuvo callos de *Cinchona officinalis* Lapareció a partir del décimo día de establecido el ensayo, mucho más rápido que en este estudio. Por otro lado (Purohit et al., 2019) logró callogénesis en medio de cultivo WPM aumentado con 1.08 mg/l de TDZ y 0.5 mg/l de NAA después de 8 semanas de incubación de *Zanthoxylum armatum*, tardando más que en esta investigación. El Proceso de aparición de callos se puede observar en la (figura 15).

**Figura 15.**

*Evaluación del efecto de fitohormonas y su concentración en el porcentaje de callogénesis por semana de explantes foliares de Dipteryx ferrea (Ducke) Ducke*



La aparición de los primeros callos se dio a los alrededores del explante en forma que pequeñas bolitas blanquecinas que posteriormente se extendieron por

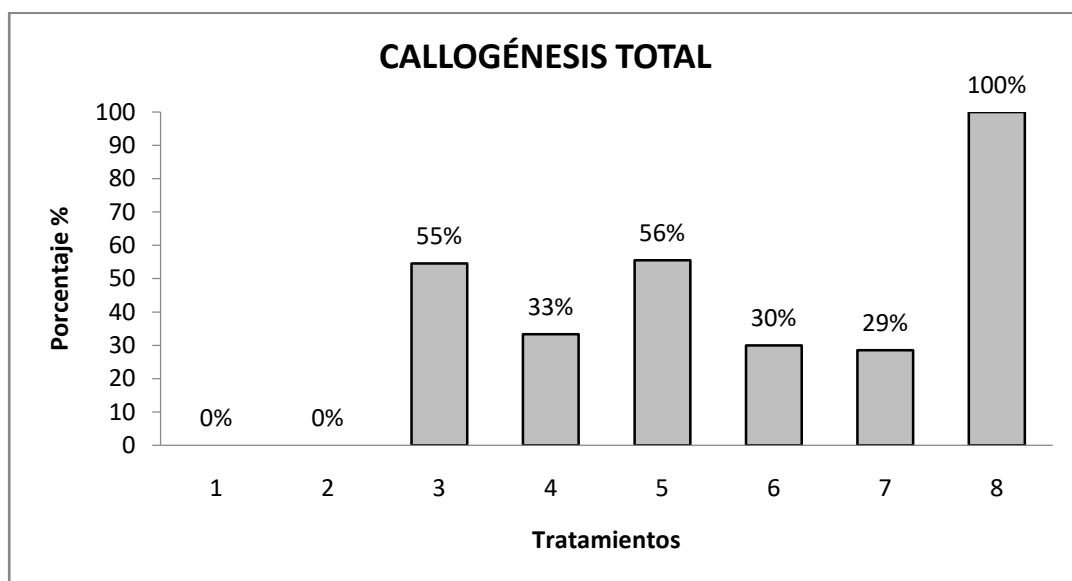
toda el área del explante, sobre todo en la parte del envés, el T8 (3 mg/l 2,4 D + 3 mg/l Kinetina) fue el tratamiento que desde un principio mostro mejores resultados en porcentaje (figura 15). (Mosoh et al., 2024) confirma lo encontrado en este estudio al mencionar que el crecimiento del callo comienza principalmente en el sitio de incisión de los explantes (alrededor), extendiéndose luego para cubrir toda la superficie.

El tratamiento 8 (3mg/l 2,4 D + 3 mg/l Kin) fue el mejor resultado en callogénesis con un 100%, sin embargo se esperaba que el T7 (3 mg/l 2,4 D + 2.5 mg/l Kinetina) fuera también uno de los mejores resultados, puesto que su composición era muy similar a la del T8, variando únicamente en 0.5 mg/l de diferencia de Kinetina, esto puede indicar que la especie estudiada en la combinación exacta puede tener resultados significativamente diferentes a otras aunque estas parezcan casi nulas a simple vista, ya que otros tratamientos de diferentes composiciones superaban en callogénesis al T7. Los resultados del porcentaje total de callogénesis que se alcanzó en cada tratamiento se presentan en la (figura 16).

La combinación y concentración entre distintas fitohormonas resultan con dar diferentes resultados algunos favorables y otro desfavorables tal y como se observa en la (figura 16). (Mosoh et al., 2024) en su estudio con la especie *Gloriosa superba* L observó que el tipo y la concentración del regulador generan efectos diferentes en los explantes, donde la combinación de NAA y KN resultó ser la más eficaz para la inducción de callos. Asemejándose al tratamiento 8 del estudio ya que también estaba conformado por KN (T8 = 3mg/l 2,4 D + 3 mg/l Kin).

**Figura 16.**

*Efecto de fitohormonas y su concentración en el porcentaje de callogénesis en explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*



Los tratamientos 1 (2.5mg/l 2,4 D) y 2 (3 mg/l 2,4 D) fueron los únicos que no presentaron respuestas callogénica a simple vista (0%), sin embargo al finalizar el estudio, con el estereoscopio se observó pequeñas protuberancia blanquecinas como signo de aparición de callos sobre todo en el T1 (figura 41), esto lleva a sospechar que se necesita de mayores concentraciones de 2,4D que las empleadas en el presente experimento, cuando no se combina con otras fitohormonas, aunque algunos autores con poca concentración también obtienen callos como lo hicieron (Bisht et al., 2024) quienes trabajando con explantes de hojas de *Mahonia Jaunsarensis* con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; 0.2 mg/l) obtuvieron como resultado una inducción de callo del 70% con callo compacto verde, esto indica que aún queda por seguir explorando mas concentraciones aunque según lo observado en este experimento serian mayores a las utilizadas en el T1 y T2..

Por otro lado, se registraron estudios en diferentes especies de la familia (fabáceas) y específicamente en el género *Dipteryx* que es al que pertenece la especie de este estudio, en las cuales diferentes autores encontraron respuestas callogénica diferentes como es el caso de (Ingre et al., 2021) en su estudio con la

especie *Dipteryx alata*, quien descubrió que la concentración más eficiente en la formación de callo en hojas fue 3.0 mg/l BAP + 2.0 mg/l ANA (68.88%) en medio MS. Esto fue inferior al mejor tratamiento de este estudio (T8), sin embargo, las fitohormonas son diferentes demostrando que posiblemente tendría un efecto similar o quizás mejor en la especie que se estudió en la presente investigación.

De igual manera (Sampaio et al., 2018) demostró en la especie *Dipteryx odorata* en concentraciones de 8 mg/l de TDZ combinados con 1.5 mg/L de ANA en medio MS generan promedios más altos de callos en los explantes. (Rocha et al., 2024) también con *Dipteryx odorata* en segmentos de hojas observó formación de callos a concentraciones de 8 mg/l de 2,4-D, y 4 y 8 mg/l de TDZ. En segmentos cotiledonarios 2 y 8 mg/l de TDZ. Ambos autores obtuvieron resultados similares sin embargo en este estudio no se utilizó esas fitohormonas abriendo así una amplia posibilidad de realizar experimentos son estas.

Generalmente especies parecidas suelen tener efectos similares tal como lo mencionan (Chakraborty et al., 2022) y (Jaiswal et al., 2022) que indican que para especies del género *Pterocarpus* (Fabaceae), obtuvieron 95 y 62% de inducción de callo con segmentos de cotiledones utilizando diferentes concentraciones de 2,4-D como regulador de crecimiento, corroborando el uso de estos explantes en regeneración de especies familiares.

Dado que los datos no cumplían con los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianzas, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en el programa InfoStat; de las cuales se observó un p valor de 0.0001 indicando así que existe diferencias altamente significativas entre los grupos de callogénesis ( $p < 0.05$ ) lo que sugiere que al menos uno de los grupos difiere de los demás.

Posteriormente, en el análisis de medias del Kruskal-Wallis al 5% de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), demostró la existencia de 3 grupos similares o iguales estadísticamente de las cuales el primer grupo de conformado por el T2, T1, T7, T6, T4, de las cuales todos tuvieron porcentajes de callogénesis bajos de 0% a 33%; el

segundo grupo conformado por T7, T6, T4, T3, T5 con 28.5% a 55.5% de callogénesis y el último grupo conformado únicamente por el T5 y T8 quienes tuvieron los mejores resultados con 55.5% y 100% respectivamente, de las cuales el T8 es el mejor numéricamente de todo los tratamientos indicando que a mayor cantidad de Kinetina la callogénesis es mayor en explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke.

Según los resultados obtenidos, el mayor porcentaje de callos a partir de segmentos foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke se obtiene con los tratamientos 3, 5 y 8, cuya formulación es (2.5 mg/l 2,4D + 1.5 mg/l BAP; 3 mg/l 2,4 D + 3.5 mg/l BAP; 3 mg/l 2,4 D + 3 mg/l Kin) respectivamente. Pudiéndose concluir, que utilizando estos compuestos a esas concentraciones se obtendrían iguales resultados.

**Tabla 7.**

*Análisis de medias de Kruskal-Wallis al 5% del efecto de fitohormonas y su concentración en el porcentaje de Callogénesis de Dipteryx ferrea (Ducke) Ducke*

| Tratamientos | Fitohormonas                     | Medias | Grupos |
|--------------|----------------------------------|--------|--------|
| 2            | 3mg/l 2,4 D                      | 0      | A      |
| 1            | 2.5mg/l 2,4 D                    | 0      | A      |
| 7            | 3 mg/l 2,4 D + 2.5 mg/l Kinetina | 29     | A B    |
| 6            | 3mg/l 2,4 D + 4 mg/l BAP         | 30     | A B    |
| 4            | 3 mg/l 2,4 D + 3 mg/l BAP        | 33     | A B    |
| 3            | 2.5 mg/l 2,4 D + 1.5 mg/l BAP    | 55     | B      |
| 5            | 3 mg/l 2,4 D + 3.5 mg/l BAP      | 56     | B C    |
| 8            | 3mg/l 2,4 D + 3mg/l Kinetina     | 100    | C      |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).*

#### **4.7.1. Grado de encallamiento**

A partir de la tercera semana se pudo observar que el grado de encallamiento promedio total fue de 8.2% del área del explante, ya que durante este tiempo recién empezó a aparecer los callos en forma de bolitas blanquecinas a los bordes y en diferentes partes del explante. Hasta la última evaluación el grado de encallamiento total para todos los tratamientos fue de 19% del área del explante.

**Figura 17.**

*Evaluación del efecto de fitohormonas y su concentración en el porcentaje del grado de encallamiento por semana de explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*

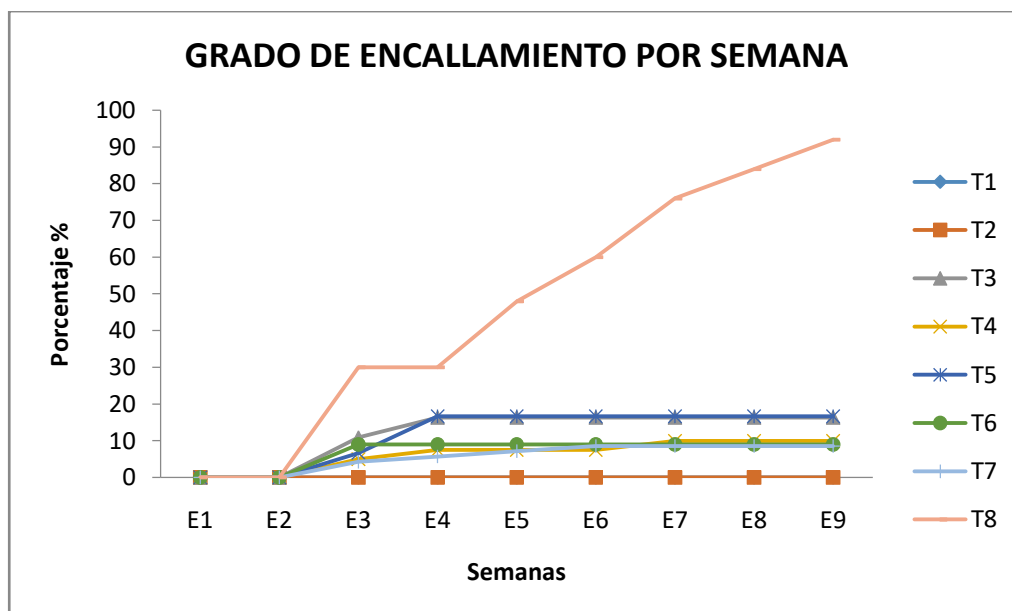
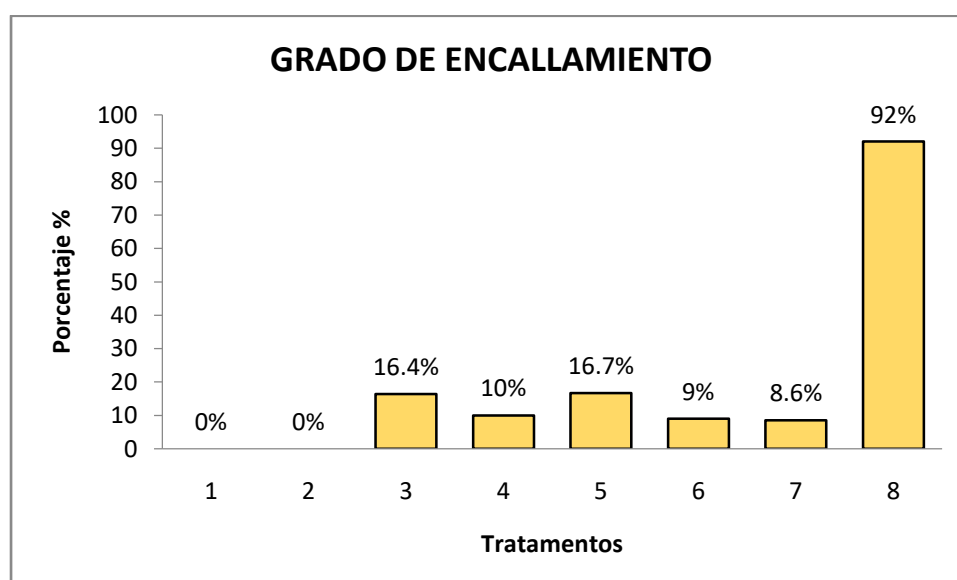


**Figura 18.**

*Efecto de fitohormonas y su concentración en el porcentaje del grado de encallamiento en explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*



La mayoría de los tratamientos con callos no tuvieron un buen volumen a excepción del T8, por lo que el porcentaje del grado de

encallamiento (volumen calloso) total en promedio fue muy bajo (19%), aunque individualmente por tratamiento se observaron resultados regulares y bajos, solo el T8 fue significativamente mejor a los demás con un 92% (figura 18) quien guarda relación los resultados del porcentaje de callogénesis (100%). Con respecto a los demás tratamientos los callos se presentaban de manera regada o simplemente no cubrían mucha área del explante, aunque se observo que algunos si cubrían un poco más de la mitad o el 100% del área del explante como fue en el caso del T8. Esto indicaría que la combinación y concentración del T8 (3mg/l 2,4 D + 3mg/l Kinetina) es la más adecuada para la producción de callos desarrollados (mayor volumen) en *D. ferrea* a partir de explantes foliares.

Mientras que el uso solamente de 2,4 D a concentraciones menores de 3 mg/l no tiene efecto. En la (figura 18) se observa el grado de encallamiento final de cada tratamiento.

Otros autores también reportaron actividad callogénica como (Ingre et al., 2021) en *Dipteryx alata* con 3.0 mg/l BAP + 2.0 mg/l ANA (68.88%). (Sampaio et al., 2018) en *Dipteryx odorata* de 8,0 mg/l de TDZ combinados con 1,5 mg/l de ANA. (Rocha et al., 2024) también con *Dipteryx odorata* 8 mg/l de 2,4-D, y 4 y 8 mg/l de TDZ, aunque no especifican el grado de encallamiento algunos coinciden con la fitohormona utilizada en este estudio.

Dado que los datos no cumplían con los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianzas, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en el programa InfoStat; de las cuales se observó un p valor de 0.0001 indicando así que existe diferencia altamente significativas entre los grupos de grado de encallamiento ( $p < 0.05$ ) lo que sugiere que al menos uno de los grupos difiere de los demás.

Posteriormente, en el análisis de medias del Kruskal-Wallis al 5% de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), se observó que existe igualdad estadística en 2 grupos

de las cuales el primero conformado por T2, T1, T7, T6, T4, T3, T5 los cuales tienen porcentajes del grado de encallamiento desde 0% a 16.7% y el segundo grupo conformado únicamente por el T8 con un 92% es el mejor tanto estadísticamente como numéricamente.

Según los resultados obtenidos para generar callos en la especie *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke la combinación adecuada de fitohormonas es de 3mg/l 2,4 D + 3mg/l Kinetina. Pudiéndose concluir, que utilizando estos compuestos a esas concentraciones se obtiene mayor grado de encallamiento.

**Tabla 8.**

*Análisis de medias de Kruskal-Wallis al 5% del efecto de fitohormonas y su concentración en el porcentaje del grado de encallamiento de explantes foliares de Dipteryx ferrea (Ducke) Ducke*

| Tratamientos | Medias | Grupos |
|--------------|--------|--------|
| 2            | 0      | A      |
| 1            | 0      | A      |
| 7            | 8.5    | A      |
| 6            | 9      | A      |
| 4            | 10     | A      |
| 3            | 16.3   | A      |
| 5            | 16.6   | A      |
| 8            | 93     | B      |

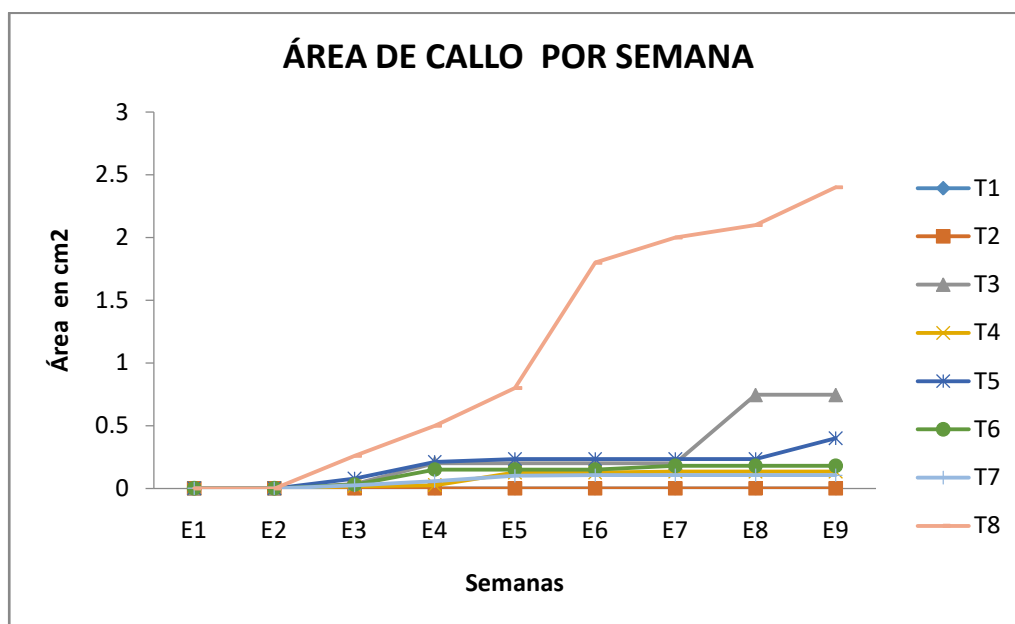
*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

#### **4.7.2. Área del callo**

A partir de la tercera semana se pudo medir el área de los callos en  $\text{cm}^2$ , hasta esa fecha el área promedio entre todos los tratamientos era de,  $0.05 \text{ cm}^2$ , en la última semana el área promedio total era de  $0.49 \text{ cm}^2$  (figura 19). Los callos generalmente crecían en volumen en forma ascendente, pero a diferentes tamaños según el tratamiento.

**Figura 19.**

*Evaluación del efecto de fitohormonas y su concentración en el área del callo friable por semana de explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*

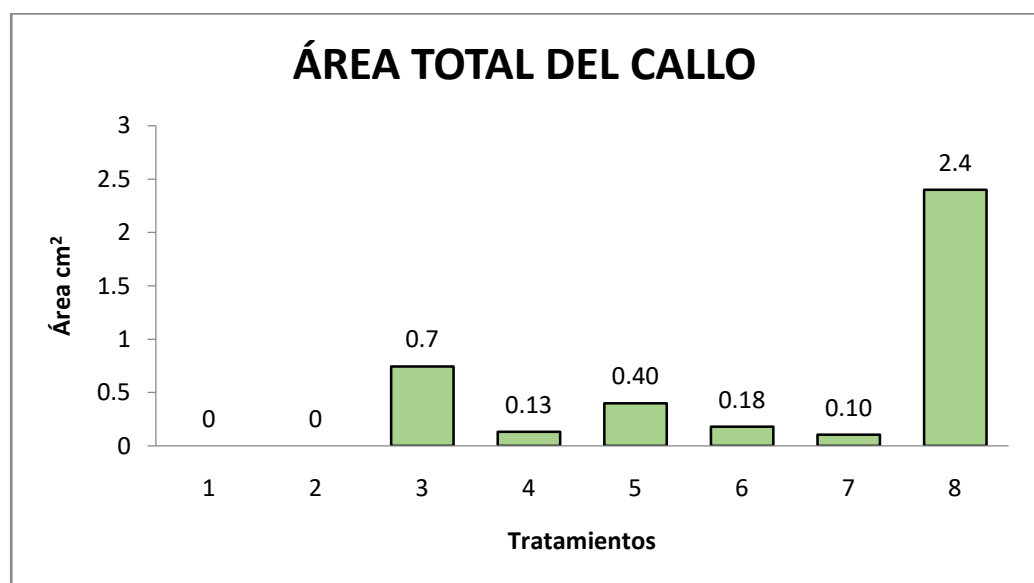


El tratamiento 8 fue quien mejores resultados tuvo con respecto al área del callo, llegando a cubrir el 100% del área de la mayoría de los explantes, el promedio total de área que alcanzo el T8 en 3 explantes por frasco (3 cm<sup>2</sup>) fue de 2 cm<sup>2</sup> (figura 20), si consideramos en área individual por explante sería de 0.6 cm<sup>2</sup>. Mientras que los demás tratamientos cubrían a ¼ de los explantes en promedio. (Eras-Guamán et al., 2019), en su investigación con la especie *Cinchona officinalis* L. obtuvo datos inferiores, alcanzando su mejor tratamiento que cubrió 2/3 del área de los explante, mientras que sus menores resultados solo 1/3 de los explantes. En algunos tratamientos con un grado de encallamiento bajo era algo difícil medir el área puesto que los callos eran pequeños y se distribuían por diferentes partes del explante. Por otro lado (Mori-Vásquez et al., 2024) observaron que explantes foliares de *S. amara* en tejido joven en combinaciones de BAP+2,4D y TDZ+2,4D promovieron una mayor formación de callos y con ello un incremento del área (0.4 cm<sup>2</sup>) y (0.68 cm<sup>2</sup>) respectivamente y en tejidos

intermedios ( $0.89 \text{ cm}^2$ ) y ( $1 \text{ cm}^2$ ), obteniendo valores similares al tratamiento 8 de la presente investigación con respecto al tejido joven puesto que se utilizaron tejidos iguales, aunque se observa que en tejidos intermedios el área es mayor, indicando así que probablemente ocurra lo mismo con la especie *D. ferrea*.

**Figura 20.**

*Efecto de fitohormonas y su concentración en el área de los callos friables formados en explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*



Dado que los datos no cumplían con los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianzas, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en el programa InfoStat; de las cuales se observó un p valor de 0.0001 indicando así que existe diferencias altamente significativas entre los grupos de área del callo ( $p < 0.05$ ) lo que sugiere que al menos uno de los grupos difiere de los demás.

Posteriormente en el análisis de medias del Kruskal-Wallis al 5% de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), se observó la existencia de 3 grupos con igualdad estadística, el primer grupo conformado por el T2, T1, T7, T6, T4, quienes tuvieron valores promedio desde  $0 \text{ cm}^2$  hasta  $0.13 \text{ cm}^2$ ; mientras que el

segundo grupo conformado únicamente por el T7, T6, T4, T5, T3 con un área de callo de 0.1 cm<sup>2</sup> a 0.75 cm<sup>2</sup> en promedio, y el tercer grupo conformado únicamente por el T8 con un área de 2.4 cm<sup>2</sup> siendo el mejor estadística y numéricamente.

**Tabla 9.**

*Análisis de medias de Kruskal-Wallis al 5% del efecto de fitohormonas y su concentración en el área de los callos friables de explantes foliares de Dipteryx ferrea (Ducke) Ducke*

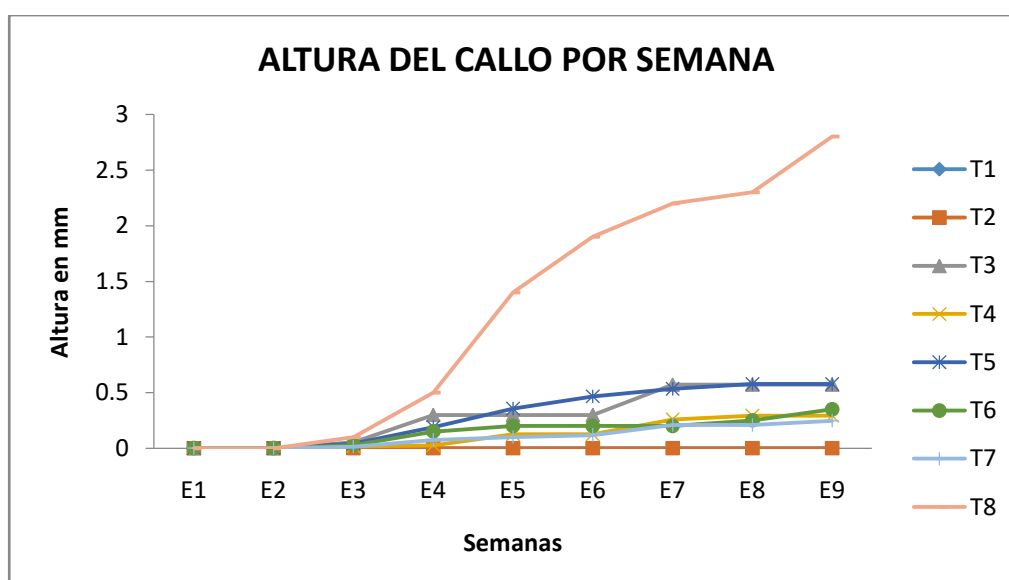
| Tratamientos | Medias | Grupos |
|--------------|--------|--------|
| 2            | 0      | A      |
| 1            | 0      | A      |
| 7            | 0.10   | A B    |
| 6            | 0.18   | A B    |
| 4            | 0.13   | A B    |
| 5            | 0.40   | B      |
| 3            | 0.75   | B      |
| 8            | 2.40   | C      |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).*

#### 4.7.3. Altura del callo

**Figura 21.**

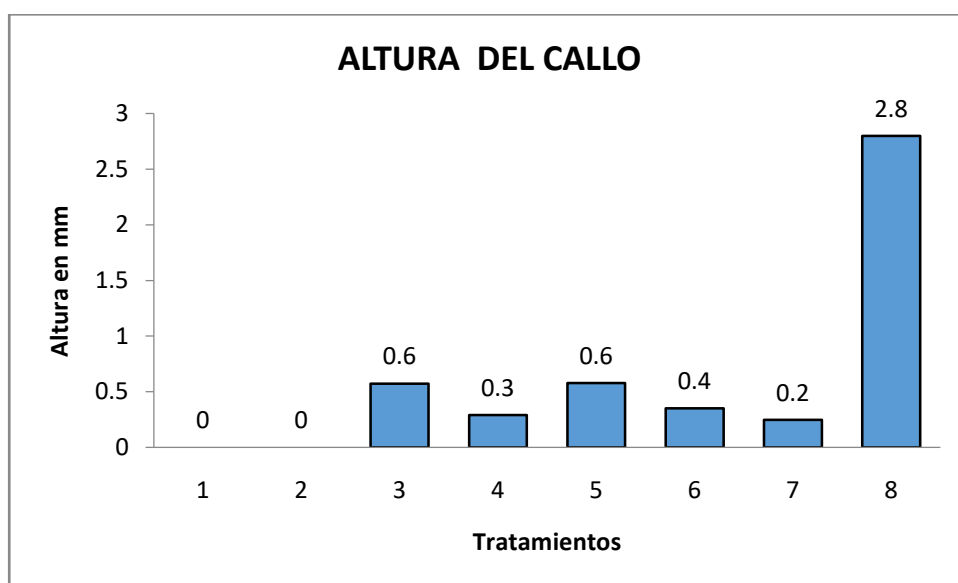
*Evaluación del efecto de fitohormonas y su concentración en la altura de los callos friables por semana en explantes foliares de Dipteryx ferrea (Ducke) Ducke*



Durante la aparición de los callos se observó que los callos primero crecían en altura y después en área aumentando así su volumen, esto se dio a partir de la semana 3 teniendo una altura promedio total de 0.03 mm y en la última semana 0.60 mm (Figura 21).

**Figura 22.**

*Efecto de fitohormonas y su concentración en la altura de los callos friables formados en explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*



De igual manera existe una relación entre la combinación y concentración de fitohormonas con la altura del callo ya que el T8 fue el tratamiento que alcanzo mayor altura con respecto a los demás llegando a tener en promedio 2.8 mm, el tratamiento con menor altura fue el T4 con 0.3 mm.

Dado que los datos no cumplían con los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianzas, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en el programa InfoStat; de las cuales se observó un p valor de 0.0001 indicando así que existe diferencias altamente significativas entre los grupos de altura del callo ( $p < 0.05$ ) lo que sugiere que al menos uno de los grupos difiere de los demás.

Posteriormente en el análisis de medias del Kruskal-Wallis al 5% de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), (tabla 10), se observó que existen 4 grupos con igualdad estadística, el primer grupo compuesto por el T2, T1, T7, T4, T6, con alturas desde 0mm a 0.35 mm; el segundo grupo conformado por el T7, T4, T6, T5, desde 0.25 mm a 0.58 mm; el tercer grupo conformado de T4, T6, T5, T3, T8 desde 0.29 mm a 1.57 mm y el ultimo conformado únicamente por el T8 con 2.80 mm de las cuales este último es mejor estadística y numéricamente.

**Tabla 10.**

*Análisis de medias de Kruskal-Wallis al 5% del efecto de fitohormonas y su concentración en la altura de los callos friables de *Dipteryx ferrea* (Ducke)*

| Tratamientos | Medias | Grupos |
|--------------|--------|--------|
| 2            | 0      | A      |
| 1            | 0      | A      |
| 7            | 0.25   | A B    |
| 4            | 0.29   | A B C  |
| 6            | 0.35   | A B C  |
| 5            | 0.58   | B C    |
| 3            | 0.57   | C      |
| 8            | 2.80   | D      |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

#### 4.7.4. Color del callo

Durante la primera aparición de los callos estos fueron de color blanquecinos y algunos amarillentos, mientras el volumen del callo iba aumentando, este cambiaba de color a marrón claro casi café indicando que el callo empezaba a oxidarse, después se tornaba de un color más oscuro indicando necrosis, a pesar de ellos volvían a salir más callitos de color blanquecino como rebrotando. (Eras-Guamán et al 2019) estudio callos de *Cinchona officinalis* L donde confirma que el callo cambia de color producto la oxidación fenólica.

Por otro lado (Mosoh et al., 2024) en su estudio observo que los callos de *Gloriosa superba* (L.) al principio mostraban una gama de colores desde transparente a amarillento, que luego cambió a un tono verde pálido. Después el tono de algunos callos experimentó una transición de verde pálido a marrón y posteriormente a verde oscuro, dependiendo de los tipos y concentraciones exactos de reguladores de crecimiento de plantas utilizados. Lo que difiere un poco con el presente estudio ya que sin importar el tipo de regulador los callos tenían los mismos colores desde el principio al final.

Los callos, en esta investigación, en un principio fueron de color blanco y amarillento, para (Rocha et al., 2024) los colores amarillo claro o blanquecino, son característico de callos no embriogénicos. Aunque el callo fue heterogéneo en sus colores se puede asociar a uno friable como compacto también.

**Tabla 11.**

*Porcentaje de los colores que adquirieron los callos friables de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke durante las 9 semanas de evaluación*

| COLORES DE LOS CALLOS EN EL TRANCURSO DE LAS SEMANAS |              |           |           |                       |           |                     |                 |
|------------------------------------------------------|--------------|-----------|-----------|-----------------------|-----------|---------------------|-----------------|
| Tratamientos                                         | SEMANA 3 Y 4 |           |           | SEMANA 5; 6; 7; 8 Y 9 |           |                     |                 |
|                                                      | Blanco       | Amarillo  | Blanco    | Amarillo              | Café      | Blanco con amarillo | Blanco con café |
| 1                                                    | 0%           | 0%        | 0%        | 0%                    | 0%        | 0%                  | 0%              |
| 2                                                    | 0%           | 0%        | 0%        | 0%                    | 0%        | 0%                  | 0%              |
| 3                                                    | 23%          | 0%        | 10%       | 0%                    | 10%       | 10%                 | 10%             |
| 4                                                    | 9%           | 0%        | 3%        | 0%                    | 0%        | 12%                 | 12%             |
| 5                                                    | 19%          | 0%        | 4%        | 0%                    | 4%        | 4%                  | 15%             |
| 6                                                    | 13%          | 0%        | 7%        | 7%                    | 3%        | 3%                  | 7%              |
| 7                                                    | 12%          | 0%        | 3%        | 3%                    | 6%        | 0%                  | 12%             |
| 8                                                    | 67%          | 0%        | 9%        | 0%                    | 9%        | 42%                 | 46%             |
| <b>Promedio</b>                                      | <b>18%</b>   | <b>0%</b> | <b>4%</b> | <b>1%</b>             | <b>4%</b> | <b>9%</b>           | <b>13%</b>      |

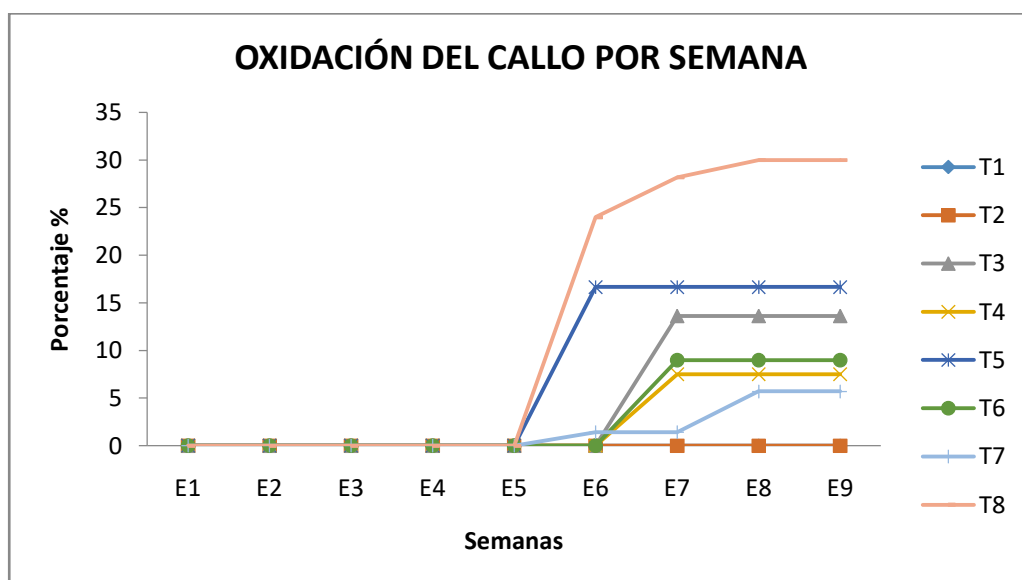
#### 4.7.5. Oxidación del callo

La oxidación en los callos apareció con 5.26% del área del callo a partir 3 semanas que de la formación a los callos (semana 6), es ahí donde se

observa el cambio u oscurecimiento del color blanquecino a marrón claro, esto fue aumentando gradualmente como se muestra en la (figura 23).

**Figura 23.**

*Evaluación del porcentaje en el grado de oxidación del callo friable por semana en explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*

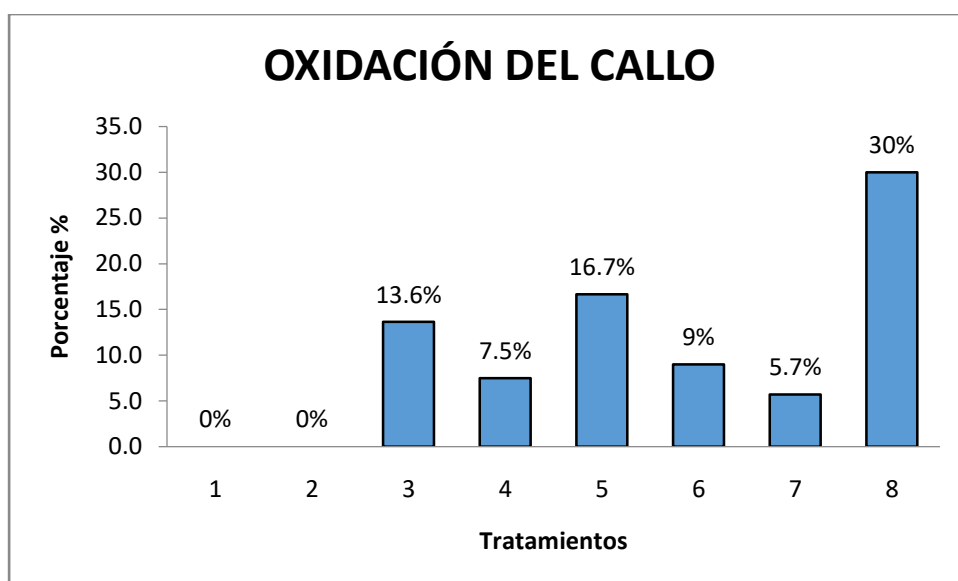


En la (figura 24) se observa el porcentaje del grado de oxidación final del callo que tuvieron todos los tratamientos, en donde todos tuvieron un promedio de 10.3% del área del callo, el ácido ascórbico ayudo a disminuir la oxidación ya que en la presente investigación la oxidación fue baja. Sin embargo existen otros tipos de antioxidantes como lo menciona (Guerrero et al., 2005) donde afirma que combinación del baño antioxidante del explante de *Aristolochia elegans* con ácido cítrico y el tratamiento ANA: Kin en concentración 5:5 mg/L adicionado de PG en concentración 1 mg /L, indujo la formación de callo con menor grado de oxidación, por otra parte (López-Santos et al., 2024), recomienda utilizar L-Cisteína en concentraciones de 100 a 200 mg/l en el medio de cultivo ya que de esa manera logró evitar la oxidación y pardeamiento en los callos de *Sideroxy loncapiri*; de igual manera (Vásquez-Hernández et al., 2021) recomienda también el uso de antioxidantes como la

L-Cisteína adicionada al medio de cultivo, la cual representa una alternativa para el control de los procesos oxidativo en los explantes. Esto generalmente se recomienda cuando se realiza trasplante de los callos a otros medios de cultivo para posteriores fases.

**Figura 24.**

*Efecto de fitohormonas y su concentración en porcentaje del grado de oxidación de los callos friables formados en explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*



Dado que los datos no cumplían con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en el programa InfoStat; de las cuales se observó un p valor de 0.0001 indicando así que existe diferencias significativas entre los grupos de oxidación del callo ( $p < 0.05$ ) lo que sugiere que al menos uno de los grupos difiere de los demás.

Posteriormente en análisis de medias al 5% de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), (tabla 12), se observó tres grupos iguales estadísticamente donde el primer grupo compuesto por el T2, T1, T7, T4, T6, con valores desde 0% a 9 % es decir un grado de oxidación inferior al 30% del área de los callos, en el segundo grupo conformado por T7, T4, T6, T3, T5 con 5.7% a 16.6% y el

tercero conformado por el T5 y T8 con valores desde 16.6 % a 30%, esta diferencia de grupos se debe a que existen 2 tratamientos sin callos y por ende obtienen valores de 0% y los tratamientos con mas callos son también quienes presentaron mayor oxidación.

**Tabla 12.**

*Análisis de medias de Kruskal-Wallis al 5% del porcentaje del grado de oxidación de los callos friables de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke.*

| Tratamientos | Medias | Grupos |
|--------------|--------|--------|
| 2            | 0      | A      |
| 1            | 0      | A      |
| 7            | 5.7    | A B    |
| 4            | 7.5    | A B    |
| 6            | 9      | A B    |
| 3            | 13.6   | B      |
| 5            | 16.6   | B C    |
| 8            | 30     | C      |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

#### 4.7.6. Necrosis del callo

La necrosis se pudo apreciar desde la semana 6 para todos los tratamientos con 3.4% del área del callo, donde se observó que las partes oxidadas pasaban de un color marrón claro a uno marrón oscuro, incluso con pequeñas regiones de color negro. Según (Mosoh et al., 2024) los callos que muestran exudados hiperhídricos muestran una necrosis en etapa temprana. Eso es algo que no sucedió en esta investigación ya que la necrosis se vio cuando en las últimas etapas de la evaluación (figura 25).

Gandonou et al. (2005) presento necrosis en callos de *Saccharum sp* como efecto del NaCl, los callos en crecimiento derivados demostrando así el estrés salino por causa de la sal. Por otro (Zia et al., 2010) comenta que a dos semanas después de la transferencia de los callos de *Thymus vulgaris* al medio salado, mostraron signos de necrosis este porcentaje iba aumentado

significativamente por NaCl aumentando durante el crecimiento de los callos. Algunos investigadores encontraron respuesta similar al estrés salino en productos frescos y secos pesos (Makhlouf et al., 2002; Abebe et al., 2003). (Bohnert & Jensen 1996) informaron que el NaCl disminuye la división celular y restringe las actividades de crecimiento. En la investigación no se añadió NaCl al medio de cultivo, siendo eso una causa probable del bajo porcentaje de necrosis en los callos, aunque se sospecha que la necrosis hubiera aumentado más si se seguía conservando el experimento o en caso que se hiciera un cambio de medio de cultivo (sub cultivo).

**Figura 25.**

*Evaluación del porcentaje en el grado de necrosis del callo friable por semana en explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*

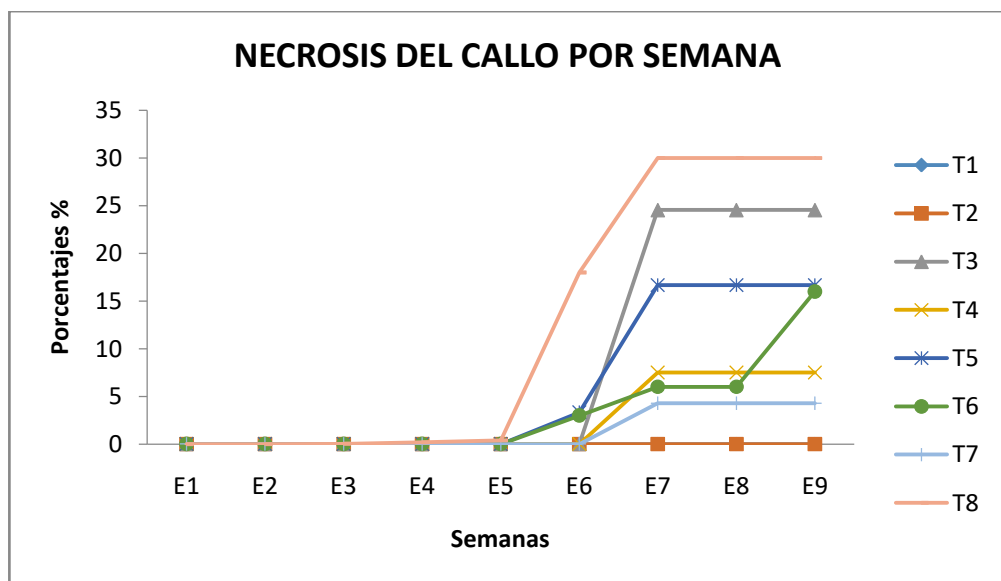
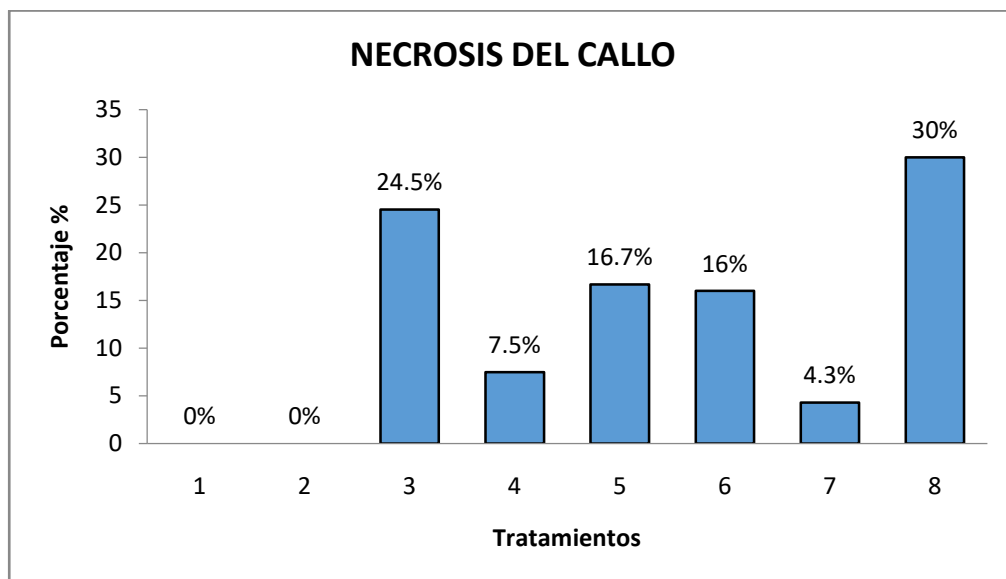


**Figura 26.**

*Efecto de fitohormonas y su concentración en porcentaje del grado de necrosis de los callos friables formados en explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke.*



La necrosis vario según el tratamiento como en el caso del tratamiento 8 fue donde se observó mayor grado de necrosis debido a que este mismo tratamiento fue quien mostró mayor porcentaje de callo, en altura, volumen, área, indicando que el callo al desarrollarse más que en los demás tratamientos ya requería un cambio de medio de cultivo indicando así que consumió más los nutrientes del medio de cultivo.

Dado que los datos no cumplían con los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianzas, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en el programa InfoStat; de las cuales se observó un p valor de 0.0001 indicando así que existe diferencias significativas entre los grupos de necrosis del callo ( $p < 0.05$ ) lo que sugiere que al menos uno de los grupos difiere de los demás.

Posteriormente en el análisis de medias del Kruskal-Wallis al 5% de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), (tabla 13), se observó que estadísticamente hay 3 grupos iguales o similares con respecto al porcentaje de grado de necrosis

de los callos cultivados. El primer grupo conformado por el T2, T1, T7, T4, T6, T5, con valores de 0% a 16.6% del área del callo; el segundo grupo conformado por T6, T5, T3, con 16% a 24.5% y el tercer grupo por el T3 y T8 con 24.5% y 30%.

**Tabla 13.**

*Análisis de medias de Kruskal-Wallis al 5% del porcentaje del grado de necrosis de los callos friables de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke*

| Tratamientos | Medias | Grupos |
|--------------|--------|--------|
| 2            | 0      | A      |
| 1            | 0      | A      |
| 7            | 4.2    | A      |
| 4            | 7.5    | A      |
| 6            | 16     | A B    |
| 5            | 16.6   | A B    |
| 3            | 24.5   | B C    |
| 8            | 30     | C      |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).*

#### 4.7.7. Masa fresca y seca del callo.

La masa fresca promedio de los callos en todos los tratamientos fue de 28.57 mg, de las cuales T8 con 3mg/l 2,4 D +3mg/l de Kinetina se destacó por ser el tratamiento con mayor masa fresca promedio (67.4 mg). La masa seca promedio total fue de 8.10 mg de las cuales el T8 con 3mg/l 2,4 D +3 mg/l de Kinetina fue el mayor con un promedio 20.45 mg. El descenso de la masa fresca total a la masa seca total fue de 20.47 mg.

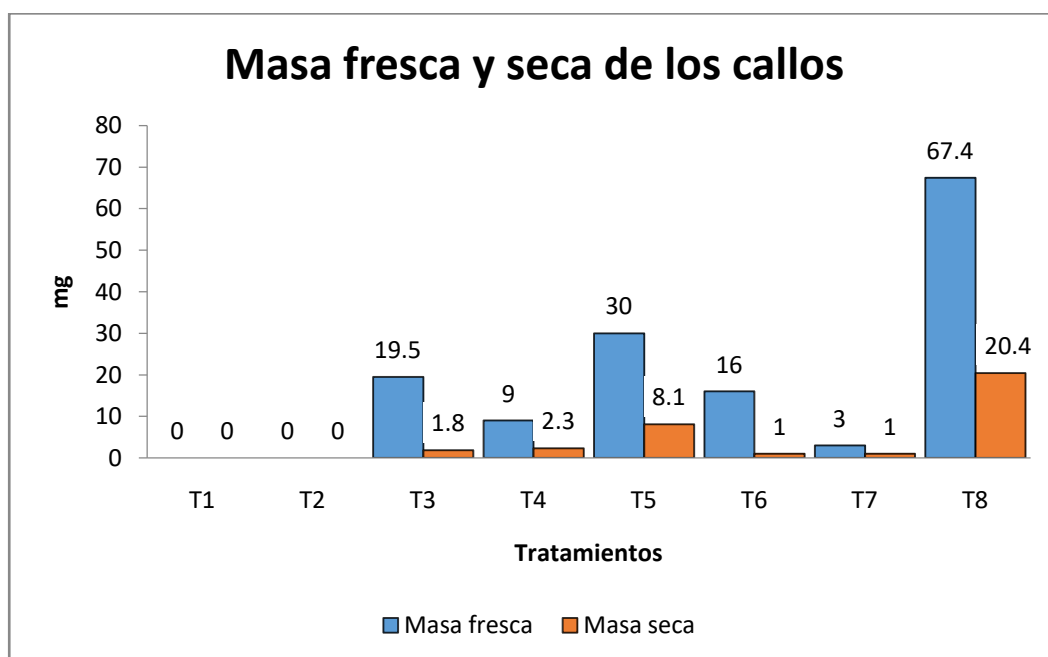
Mosho et al., (2024) midiendo la masa de callos de *Gloriosa superba* (L.) encontró resultados similares en el sentido que su tratamiento con Kinetina fue el que obtuvo mayor peso seguido por otro de BAP, Respecto al peso del callo, el tratamiento con 1.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l Kinetina presentó el mayor peso fresco promedio (333 mg), seguido por 1.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP (293 mg). De igual forma, el mayor peso seco promedio (31.6 mg) se

observó en el tratamiento 1.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l Kinetina, seguido por 1.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP (29.9 mg).

Por otro lado (Mousa, 2023), registro el mayor peso fresco y seco (4.88 g y 0.117 g) por raíz explante callos en medio MS suplementado con 2 mg/l BA + 0.5 mg/l 2,4-D, seguido por los callos de explantes de hojas registrado (4.22 g 0.113 g) en medio MS suplementado con 0.25 mg/l de BA solo y finalmente, se registraron segmentos de tallo y explantes de callos (3.97 g y 0.08 g) respectivamente. (Rawat et al 2023), mientras tanto en *polyphylla Smith* el medio que contenía TDZ 0.5mg/L representó la biomasa máxima de callo (2.98 g de peso fresco).

**Figura 27.**

*Comparación del efecto de fitohormonas y su concentración en masa fresca y seca de los callos friables formados en explantes foliares de Dipteryx ferrea (Ducke) Ducke*



#### 4.1.1.1. ANVA de masa fresca

Utilizando el programa InfoStat se realizó el ANVA (tabla 14), cuyos datos indican que existe diferencia altamente significativa entre los

porcentajes masa fresca de los callos, esto indica que al menos uno de los tratamientos de la masa fresca de los callos estudiados es diferente.

**Tabla 14.**

*Análisis de varianza del efecto de fitohormonas y su concentración de la masa fresca de los callos friables de Dipteryx ferrea (Ducke) Ducke* *Análisis de varianza de la masa fresca de callo friable*

| F.V.         | SC       | GI | CM      | F    | p-valor |
|--------------|----------|----|---------|------|---------|
| Modelo       | 22693.62 | 7  | 3241.95 | 3.85 | 0.0099  |
| Tratamientos | 22693.62 | 7  | 3241.95 | 3.85 | 0.0099  |
| Error        | 15170.72 | 18 | 842.82  |      |         |
| Total        | 37864.35 | 25 |         |      |         |

Para el análisis de comparación de las medias se aplicó la prueba de LSD al 5% de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), en la cual se observa que existe 2 grupos iguales o similares estadísticamente de las que el primer grupo se conforma por T2, T1, T7, T4, T6, T3, T5 con valores desde 0mg a 30mg el segundo grupo conformado por el T6,T3,T5,T8 con valores desde 16mg a 67,44de las cuales este último fue el mejor de todos numéricamente.

**Tabla 15.**

*Análisis de medias de LSD al 5% del efecto de fitohormonas y su concentración en la masa fresca de callos friables de Dipteryx ferrea (Ducke) Ducke*

| Tratamientos | Medias | LSD |
|--------------|--------|-----|
| 1            | 0      | A   |
| 2            | 0      | A   |
| 7            | 3      | A   |
| 4            | 9      | A   |
| 6            | 16     | A B |
| 3            | 19.5   | A B |
| 5            | 30     | A B |
| 8            | 67.44  | B   |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).*

#### 4.1.1.2. ANVA de masa seca

Utilizando el programa InfoStat se realizó el ANVA (tabla 16), cuyos datos indican que existe diferencia altamente significativa entre los porcentajes masa seca de los callos, esto indica que al menos uno de los tratamientos de la masa seca de los callos estudiados es diferente.

**Tabla 16.**

*Análisis de varianza del efecto de fitohormonas y su concentración de la masa seca de los callos friables de Dipteryx ferrea (Ducke) Ducke* *Análisis de varianza de la masa seca de callo friable*

| F.V.                      | SC      | GI | CM     | F    | p-valor |
|---------------------------|---------|----|--------|------|---------|
| Model <sup>B</sup>        | 2209.5  | 7  | 315.64 | 4.82 | 0.0033  |
| Tratamientos <sup>a</sup> | 2209.5  | 7  | 315.64 | 4.82 | 0.0033  |
| Error <sup>r</sup>        | 1178.89 | 18 | 65.49  |      |         |
| Total                     | 3388.39 | 25 |        |      |         |

El análisis de las medias se aplicó la prueba de LSD al 5% de significancia ( $\alpha = 0.05$ ) (tabla 17), en la cual se observa que existe 2 iguales o similares estadísticamente donde el grupo 1 está conformado por T2, T1 (valores nulos), T7, T6, T3, T4, T5 con valores desde 0 mg a 8.1 mg, el segundo grupo conformado por el T5 y T8 con 8.1 mg a 20.46 mg de las cuales este último es el mejor numéricamente.

**Tabla 17.**

*Análisis de medias de LSD al 5% del efecto de fitohormonas y su concentración en la masa seca de callos friables de Dipteryx ferrea (Ducke) Ducke*

| Tratamientos | Medias | LSD |
|--------------|--------|-----|
| 2            | 0      | A   |
| 1            | 0      | A   |
| 7            | 1      | A   |
| 6            | 1      | A   |
| 3            | 1.8    | A   |
| 4            | 2.3    | A   |
| 5            | 8.1    | A B |
| 8            | 20.4   | B   |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).*

#### 4.8. Análisis de conductividad eléctrica y PH

Con el fin de conocer el consumo de nutrientes de los explantes a los medios de cultivo se realizó este análisis en la que se obtuvo los resultados que se presentan en la (Tabla 18).

**Tabla 18.**

*pH y conductividad eléctrica (C.E)  $\mu\text{s/cm}$  iniciales y finales de los medios de cultivo de cada tratamiento*

| Tratamientos | PH ajustado | PH inicial | C.E $\mu\text{s/cm}$ inicial | PH final | C.E $\mu\text{s/cm}$ final | Masa fresca mg |
|--------------|-------------|------------|------------------------------|----------|----------------------------|----------------|
| 1            | 5.8         | 4.67       | 2904                         | 3.73     | 2938.9                     | 10.1           |
| 2            | 5.8         | 4.98       | 2611                         | 4.3      | 2879.2                     | 9.6            |
| 3            | 5.8         | 4.73       | 2840                         | 3.43     | 2715                       | 25.5           |
| 4            | 5.8         | 4.66       | 3005                         | 4.37     | 2576.8                     | 14.2           |
| 5            | 5.8         | 4.72       | 2486                         | 4.59     | 2386                       | 15.2           |
| 6            | 5.8         | 4.78       | 2655                         | 3.91     | 2786                       | 11.2           |
| 7            | 5.8         | 4.64       | 2434                         | 3.99     | 2528.5                     | 15.6           |
| 8            | 5.8         | 4.8        | 2302                         | 3.89     | 2292                       | 64.4           |

Se puede observar que durante el primer análisis de pH (posterior al autoclavado) el pH disminuyó en promedio 1, empezando con un pH inicial de 4.7 en promedio de todos los tratamientos. (Zambelaetr al., 2024), también reportaron que después de 48 horas de auto clavado, el pH del medio de cultivo disminuía de 5.11 a pH 4.99 y si tenía material vegetal disminuía a pH 4.55. Indicando así que es normal que suceda esto.

Se realizó un análisis de correlación de Spearman en el programa Infostat para observar si existe alguna relación entre la masa fresca de los explantes (con callos o sin esos) de todos los tratamientos, con el pH y conductividad eléctrica  $\mu\text{s/cm}$  cuyos resultados se presentan en la Tabla 19.

**Tabla 19.**

*Análisis de correlación Spearman de masa fresca; C.E y PH en InfoStat*

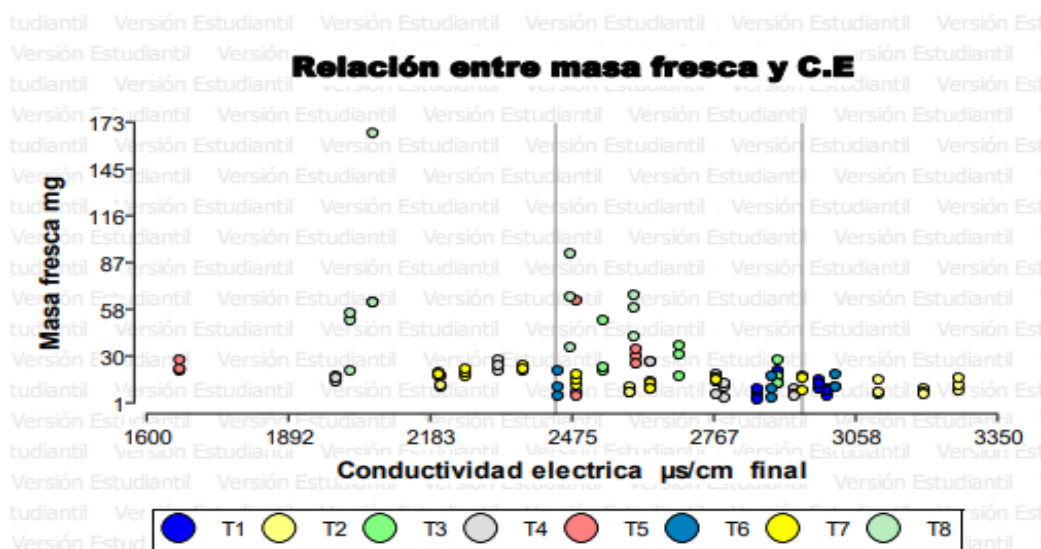
| Masa fresca mg             | C.E $\mu\text{s/cm}$ final | PH final |          |
|----------------------------|----------------------------|----------|----------|
| Masa fresca mg             | 1                          | 8.70E-09 | 0.09     |
| C.E $\mu\text{s/cm}$ final | -0.53                      | 1        | 1.10E-04 |
| PH final                   | 0.17                       | -0.37    | 1        |

### Masa Fresca vs. C.E $\mu\text{s/cm}$ Final

La prueba de correlación muestra un coeficiente de -0.53, indicando una correlación negativa moderada entre la masa fresca y la conductividad eléctrica (figura 28). Donde el aumento de masa fresca no disminuye la C.E sino lo incrementa, esto puede deberse a que los explantes estarían excretando compuestos que elevan la concentración de iones en el medio, ya que (Hydroenv 2019), comenta que la concentración de sales disueltas en el agua del medio de cultivo es un estimador que altera la conductividad eléctrica (CE).

#### Figura 28.

*Correlación no lineal entre masa fresca obtenido de los callos fiables de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke y la conductividad eléctrica de los medios de cultivo*



En la (figura 28) se observa que T1 y T2 presentaron los valores más bajos en masa fresca ya que fueron los únicos en no tener callos, sin embargo, presentan los valores más altos de C.E (2938.95  $\mu\text{s/cm}$  y 2879  $\mu\text{s/cm}$ ). Valores similares reporta (Grandez-Sangama 2019) trabajando con *Ananas comosus* L. obtuvo un aumento promedio de 3990  $\mu\text{s/cm}$ . Por otra parte (Sangoquiza-Caiza et al., 2021) demostró que

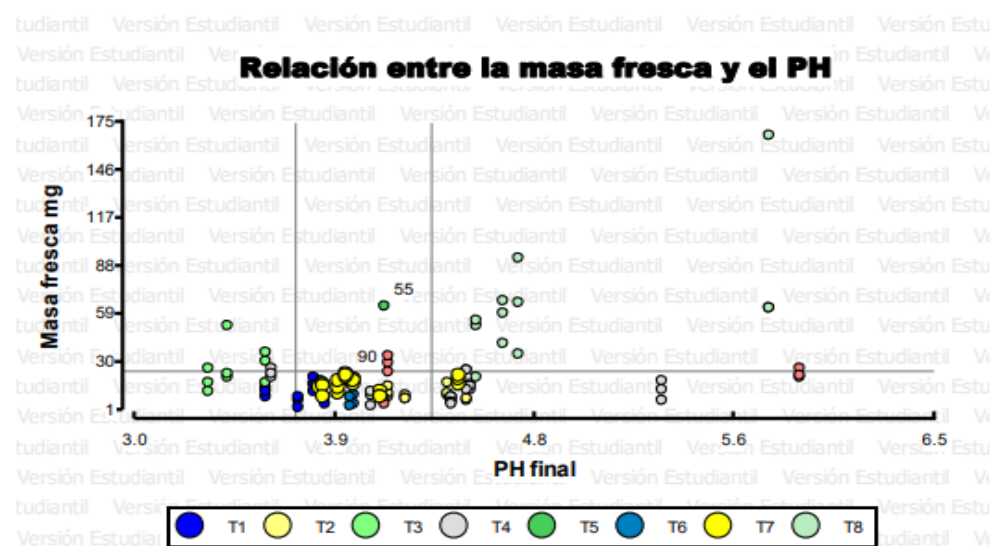
las plantas de *Zea mays* L son tolerantes a la salinidad hasta 2000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  sin embargo existe menor crecimiento a mayor C. E.

### Masa Fresca VS pH Final

La prueba de correlación muestra un coeficiente de correlación de 0.09 (Figura 29), esto indica una correlación muy débil y positiva entre la masa fresca y el pH final es decir, no hay una relación clara entre estas dos variables. A pesar de no existir una correlación fuerte se observa que el pH para todos los tratamientos disminuyo indicando que los explantes con o sin callos afectaron el medio de cultivo.

**Figura 29.**

*Correlación no lineal entre masa fresca obtenido de los callos friables de explantes foliares de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke y pH de los medios de cultivos*



Hydroenv (2019), en su estudio también observó disminución del pH de sus medios de cultivo, en las cuales determino que los rangos requeridos para el cultivo se encuentran entre 4.5 – 5.5 de pH a pesar de que eso significa ligera a fuerte acidez. Algo similar se vio en el presente estudio ya que al auto clavar el pH disminuyó de 5.8 a 4.8 en promedio y eso no generó daño en los explantes ya que sobrevivieron por más de 2 meses.

Por otro lado (Gómez 2015) afirma que la disminución del pH está relacionada al mayor crecimiento celular y con el comienzo de la disminución rápida

en las sales del medio, medida como conductividad eléctrica. Así mismo (Domínguez et al., 2024) concluyen que el estrés salino inducido con cloruro de sodio afecta el tejido foliar de morera; la mayor afectación ocurre en niveles de salinidad con pH 5.8.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- De acuerdo al objetivo general se concluye que la combinación de auxinas y citoquininas así como la mayor concentración de las mismas inducen la formación de callos friables *in vitro* en folíolos de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke (shihuahuaco), siendo el mayor porcentaje de formación de callos en el tratamiento 8 con un 100%, donde la combinación y concentración de auxinas y citoquininas fueron de 3mg/l 2,4D + 3mg/l Kin.
- Respecto al primer objetivo específico, la combinación de auxinas y citoquininas así como la mayor concentración de las mismas generan desdiferenciación o deformación del tejido foliar, donde el Tratamiento 8 (3 mg/l 2,4D + 3 mg/l Kin) fue el mejor con un 93%, seguido de los tratamientos 5; 3 y 6 (3 mg/l 2,4 D + 3.5 mg/l BAP; 2.5 mg/l 2,4 D + 1.5 mg/l BAP; 3mg/l 2,4 D + 4 mg/l BAP) con 74%, 73% y 70% respectivamente.
- Respecto al segundo objetivo específico, la combinación de auxinas y citoquininas así como la mayor concentración de las mismas inducen a la formación de callos friables en el tejido foliar donde el Tratamiento 8 (3mg/l 2,4 D + 3mg/l Kin) reporto el mejor resultado con 100%, seguido de los tratamientos 5 y 3 (3 mg/l 2,4 D + 3.5 mg/l BAP; 2.5 mg/l 2,4 D + 1.5 mg/l BAP) con 56% y 55% respectivamente. Pudiéndose concluir, que utilizando estos compuestos a esas concentraciones se obtendrían iguales resultados.

## 5.2. Recomendaciones

- Realizar más pruebas y definir un buen protocolo de asepsia para los explantes de shihuahuaco ya que aun falta mejorar esa parte, puesto que la contaminación fue quien genero la mayor mortandad de explantes y por consiguiente tener menos muestras experimentales durante la obtención de callos.
- Durante la inoculación tomar todas las medidas de asepsias posibles para evitar cualquier tipo de contaminación.
- Tener cuidado con los cortes que se realiza durante la inoculación ya que a veces generar daño al explante generar que exista con más facilidad oxidación y necrosis.
- Seguir probando mas combinaciones y concentraciones de auxinas y citoquininas para la formación de callos ya que probablemente existan resultados mejores a los obtenidos en esta investigación.
- Probar los mejores resultados con otros tipos de explantes de shihuahuaco como puede ser segmentos nodales, cotiledones, flores, raíz, corteza entre otro, ya que existe una posibilidad de tener resultados mejores o peores.
- Realizar estudios histológicos a los callos obtenidos para así conocer mejor la composición de lo que producimos.
- Una vez obtenidos callos tratar de pasar a la siguiente fase de embriogénesis u organogénesis y así posiblemente desarrollar un paquete tecnológico que nos permita producir plantines *in vitro* de shihuahuaco en laboratorio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abebe, T., Guenzi A. C., Martin B., Cushman J. C. (2003) Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiology* 13: 1748-55.
- Adobkar, I., Saad, A., & Elshahed. (2012). Plant tissue culture media. Annarita Leyva and Laura M.R. Rinaldi (ed) In: Recent advances in plant *in vitro* culture. ISBN 978-953-51-0787-3.
- Ávila-Treviño, J. A., Arreola-Ávila, J. G., Rodríguez-de la O, José. L., Trejo-Calzada, R., Valdez-Cepeda, D., & Borja-de la Rosa, A. (2013). Respuestas morfogénicas en la propagación *in vitro* de *Nogal pecanero* (*Carya illinoensis* K. Koch). *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 19 (3), 469-481.  
<https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2013.09.037>
- Aldana, D., García-Dávila, C., Hidalgo, C., Flores, G., Del Castillo, D., Reynel, C., y otros. (2016). Análisis morfométrico de las especies de *Dipteryx* en la Amazonía peruana. (IIAP, Ed.) 101-118.
- Alcántara-Cortés, J. S., Castilla-Pérez, M. G., & Sánchez-Mora, R. M. (2017). Importancia de los cultivos vegetales *In vitro* para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *Biociencias* (UNAD), 1(1).  
<https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/Biociencias/article/view/2222>
- Alcántara, C. J., Acero, G. J., Alcántara, C. J., & Sánchez, M. R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*, 17(32), 109129.
- Al-Aizari, A. A., Dewir, Y. H., Al-Obeed, R. S., Al-Saif, A. M., Almutairi, K. F., Murthy, H. N., & Hakiman, M. (2024). Study of Shoot Tip Necrosis Problems of Fegra Fig (*Ficus palmate* Forssk.) *In Vitro* in Saudi Arabia. *HortScience*, 59(8), 1127-1132. Retrieved Sep 21, 2024, from <https://doi.org/10.21273/HORTSCI17765-24>

- Ayala, Miranda, G. G. (2020). Evaluación del uso de dos biocidas en el establecimiento de explantes foliares de café (*Coffea dewevrei*) (Doctoral dissertation).
- Azofeifa-Delgado, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153–175.  
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43711514016>
- Batista, D.S., Felipe, S. H., Silva, T. D., de Castro, K.M., Mamedes, R. T.C., Miranda, N.A., et al. (2018). Light quality in plant tissue culture: does it matter? *Vitro Cell Dev Biol.* 54:195–215.
- Berthouly, M & Etienne, H. (1999). Somatic embryogenesis in *coffee*. In: Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Gupta, P. and Newton, R.J. (Eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands (In Press).
- Berg, M. E. (2010). Plantas medicinales na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático. *Museu Paraense Emílio Goeldi*.
- Bendezú, Y.F. (2019). Ecología, silvicultura y productividad de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke.
- Bisht, A., Singh, L., Singh, B., et al. (2024). *In vitro* Propagation of Endemic Species *Mahonia Jaunsarensis* Ahrendt Through Callus Culture. *Appl Biochem Biotechnol* 196, 113–128  
<https://doi.org/10.1007/s12010-023-04524-8>
- Bohnert H. J & Jensen R. G. (1996). Metabolic engineering for increased salt tolerance the next step. *Australian Journal of Plant Physiology* 59: 661-667.
- 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.
- Bray E, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000). Responses to abiotic stresses. In: Buchanan B, Gruissem W, Jones R (Eds). Biochemistry and molecular biology of plants. *American Society of Plant Physiologists, Maryland* pp 1158-1203.

- Cardenas, Ávila. M. L. (2001). Cultivo de callo *in vitro* como una alternativa para evaluar resistencia a salinidad y sequía en “frijol” *Phaseolus vulgaris* L. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Campos, N., Panis, B., Carpentier, S. (2017). Somatic embryogenesis in coffee: The evolution of biotechnology and the integration of omics technologies offer great opportunities. *Frontiers in Plant Science* 8: 1460.
- Canales, Ochoa., Y. (2023). Cambios fisiológicos y bioquímicos asociados con el oscurecimiento de explantes nodales *in vitro* de *Bambusa lako*.
- Carretero, J.L. (2004). Flora arvense española. Las malas hierbas de los cultivos españoles. Phytoma. Valencia.
- Carvalho, A. C., Torres, A. C., Braga, E. J. B., Lemos, E. E., Souza, F. V. D., Peters, J. A., Câmara, T. R. (2011). Glossário de cultura de tecidos de plantas. *Plant Cell Culture and Micropropagation*, 7(1), 30–60.
- Cardoza, V. (2007). Tissue culture: the manipulation of plant development. Chapter 5. Book Plant biotechnology and genetics. Principles, techniques and applications. ed. Stewart, C.N.
- Castillo. (2006). Propagación de plantas por cultivo *in vitro* una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Lima: *Instituto Nacional Innovación Agraria (Inia)*.
- Castillo, A. (2018). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: Una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo.
- Castillo, A. (2008). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*. Una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Las brujas, Uruguay: AR-VITRO, INIA, 8p.
- Colebrook, E.H., Thomas, S.G., Phillips, A.L., Hedden, P. (2014). The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *J Exp Biol.* 217(1):67-75. Available from: <http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.089938>
- Cotelo, M. (2016). Propiedades de la bencilaminopurina para el control de *Botrytis cinerea* en judía: actividad fungicida e inducción de resistencia. Tesis pregrado. Universidade da Coruña. 24 pp.

- Chakraborty, T. et al. (2022). *In vitro* morphogenetic responses from cotyledonary explants of immature zygotic embryos of *Pterocarpus santalinus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.150, n.3, p.669-681.
- Domínguez, J. L. P., Padrón, E. G., & Pérez, J. L. P. (2024). Efecto del cloruro de sodio en plantas *in vitro* de *Morus alba* (Original). *REDEL. Revista Granmense de Desarrollo Local*, 8 (3), 294-308.
- Ducke, A. (1934). Les genres *Coumarouma* Aubl. et *Taralea* Aubl. *Revue de botaniqueappliqué et dagriculturacoloniae* , 154 :400-407.
- Eliwa, G.I., El-Dengawy, E.R.F., Gawish, M.S., et al. (2024). Comprehensive study on *in vitro* propagation of some imported peach rootstocks: *in vitro* explant surface sterilization and bud proliferation. *SciRep* 14, 5586. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55685-3>
- Estopá, B. M. (2005). El cultivo *in vitro* en la reproducción vegetativa en plantas de vivero. Invernaderos IMA.
- Eras-Guamán, V. H., Moreno-Serrano, J., Méndez-Montaña, K., Yaguana-Arévalo, M., & Poma-Angamarca, R. A. (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), 20–28. Recuperado a partir de <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/682>
- Ferreira, D. (2011). A computer statisticalanalysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(6), 1039–1042.
- Fehér, A. (2019) Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? *Front. PlantSci.* 10:536. Doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Fernández, Ângulo, M. C. (2023). Efecto del AIB y sustratos en la propagación vegetativa de *Dipteryx ferrea* (Ducke) Ducke (Shihuahuaco) en cámara de sub-irrigación. (Tesis).
- Gautam, N., Faroda, P., Agarwal, T. et al. (2024). Effect of microclimatic physical factors on *in vitro* morphogenesis of plants: a systematic review. *Discov Agric* 2, 13. <https://doi.org/10.1007/s44279-024-00022-5>

- Gándara-Ledezma, V., Tineo-García, L., Rodríguez-de la O, J.L., Castro-Espinoza, L., Ruiz-Cru, S., Márquez-Cervantes, A., & Gutiérrez-Coronado, M.A. (2023). Disinfection of adult pecan leaflets, and *in vitro* callogénesis induction. *Polibotánica*, (55), 121-144. Epub 26 de mayo de 2023. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.55.9>
- Gandonou, C. H., Abrini, J., & Senhaji, N. S. (2005). Response of sugarcane (*Saccharum* sp.) varieties to embryogenic callus induction and *in vitro* salt stress. *African Journal of Biotechnology*, 4(4), 350-354.
- Garay-Arroyo, A., de la Paz, S. M., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E.R., Gutiérrez, C. (2014). La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia en el Desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *REB Rev Educ bioquímica*. 33(1):13-22. Available. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-19952014000100003](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952014000100003)
- George, E. F., Debergh, P.C. (2008). Micropropagation: Uses and Methods. En: George, EF, Hall M A, De Klerk GJ (Eds) *Plant propagation by tissue culture 3 rd Edition*, pp. 29-64. Springer. Dordrecht.
- George, E.F., Hall, M.A., Klerk, G.J De. (2008). Plant Growth Regulators II: Cytokinins , their Analogues and Antagonists, *Plant propagation by tissue culture*. In: *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. p. 205-26.
- George, E. F., Hall, M. A., Klerk, G.J De. *Plant Growth Regultors I*. (2008). Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitoors. In: *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. p. 1-501.
- Gonzales-Alvarado, A. C., Mori-Vasquez, J. A., Tuisima-Coral, L. L & Revilla-Chávez, J. M. (2022). Influencia de la desinfección, medios de cultivo y fitohormonas en el desarrollo morfogénico *in vitro* del germoplasma de *Guazuma crinita* Mart. *Folia Amazónica*, 31 (1), 57-70. Publicación electrónica del 00 de diciembre de 2022. <https://dx.doi.org/10.24841/fa.v31i1.572>
- Gómez Torres, L. M. (2015). Obtención de biomasa lignocelulósica mediante el cultivo de células foto autotróficas *in vitro* de *boutelouagracilis* (Doctoral dissertation).

- Guidi-Nissim, W., Corte-Fadel, G., & Labrecque, M. (2024). Assessment of different procedures for *in vitro* propagation of *Salix miyabeana*. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology, 158(1), 147–154. <https://doi.org/10.1080/11263504.2023.2293035>
- Gupta, R & Chakrabarty, S.K. (2013). Gibberellic acid in plant: Still a mystery unresolved. Plant SignalBehav.
- Gutiérrez, C, M. D. (2021). Control de contaminantes microbianos en el establecimiento *in vitro* por segmentos nodales de *Vaccinium corymbosum* (arándano).
- Grandez-Sangama, R. A. (2019). Determinación del rango de conductividad eléctrica, para aclimatación de plántulas de piña (*Ananas comosus* L. Merr) cvgolden MD-2 obtenidas mediante cultivo *in vitro* (tesis).
- Guerrero, A. L., Aparicio, A. J., Zapata, E. V., & Torres, L. O (2005). Inducción de callo y control de la oxidación en *Aristolochia elegans* mast.; planta medicinal utilizada contra el veneno de alacrán.
- Habibi, N., Suthar, R. K., Purohit, S. D. (2009). Role of pgrs and inhibitors in induction and control of Somatic embryogenesis in *Themeda quadrivalvis*. Indian J Exp Biol. 47(3):198-203.
- Hernandez, Yuniel & Gonzales, María (2010). Efecto de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de *Frutales perennes*. Cultrop. vol.31, n.4 [citado 2024-11-15], pp. 00-00.
- Hernández-Villalobos, K & Chico-Ruíz, J. (2020). Inducción de brotes y raíces en hipocotilos y cotiledones de *physalis peruviana*. Usando 6-bencilaminopurina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Revista de Investigaciones Alto andinas, 22 (1). Facultad de ciencias biológicas. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2313-295720200001000087&script=sci\\_arttext&lng=pt](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2313-295720200001000087&script=sci_arttext&lng=pt)
- Hernández-Amasifuen, A. D., Cortez-Lázaro, A. A., Argüelles-Curaca, A., & Díaz-Pillasca, H. B. (2022). Callogénesis *in vitro* de durazno (*Prunus persica* L.)var. Huayco rojo a partir de explantes foliares. Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 23(1).

- Hernández, A. D., & Díaz, H. B. (2019). *In vitro* induction of embryogenic callus from anther culture in "yellow potato" *Solanum goniocalyx* Juz. & Bukasov (Solanaceae).
- Huang, H., Liu, B., Liu, L. & Song, S. (2017). Jasmonate action in plant growth and development. *J Exp Bot.* 68(6):1349-59.
- Hussain, A., Ahmed, Q. I., Nazir, H., Ullah, I. (2012). Recent Advances in Plant *in vitro* Culture. Vol. 1, Intech. 221 p.
- Honorio, E., Aldana, D., Flore, G., Hidalgo, G., Mejia, E., Del Castillo, D., y otros. (2018). Ficha de identificación de las especies de *Dipteryx* de la amazonia peruana. (M. d. Ambiente, Ed.) 1-20.
- Hydroenv. (2019). ¿Qué es la electro conductividad? [www.hydroenv.com.mx](http://www.hydroenv.com.mx). Report. Visitado el 25 de diciembre de 2019.
- Ingre, T.V., Araújo, C. F., Nolasco, R. J., & Campos, O. W. (2021). Callogenesis and *in vitro* Regeneration of Baru (*Dipteryx alata* Vog.) Esprouts. Published by Canadian Center of Science and Education, Vol. 13, No. 4. <https://ccsenet.org/journal/index.php/jas/article/view/0/44939>
- Jaiswal, S., Arya, S., Kant, T. (2022). Studies on *in vitro* callus induction from a medicinal plant: *Pterocarpus marsupium*. *Pharma Innov. J.*, v.11, n.5, p.1621-1624.
- Kazan, K & Manners, J.M. (2008). Jasmonate Signaling: Toward an Integrated View. *Plant Physiol* 146(4):1459-68. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2287326/>
- Karp, G. (1998). Biología celular y molecular. Traducido por Dr. J. Pérez. UNAM. McGraw-Hill Interamericana. México D.F. México. 746 p.
- Kim, J. C. C., Tucker, M. L. (2015). To grow old: regulatory role of ethylene and jasmonic acid in senescence. *Front Plant Sci.* 6 (January):1-7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00020/abstract>
- Kubota, C & Tadokoro, N. (1999). Workshop on bioreactor technology: Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic Micropropagation. 35: 296- 298.

- Kumlay, A. M., & Ercisli, S. (2015). Callus induction, shoot proliferation and root regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) stem node and leaf explants under long-day conditions. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(6), 1075-1084. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1077685>
- Martínez-Villegas, Y. M., Andrade-Rodríguez, M, Colinas-León, M. Villegas-Torres, Óscar G., Castillo-Gutiérrez, A & Alia-Tejacal, I. (2015). Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuíta (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). *Revista fitotecnia mexicana*. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-73802015000400004&script=sci\\_abstract&tlng=es](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-73802015000400004&script=sci_abstract&tlng=es)
- Marín, D., & Romero, R. (1989). El combate de la Sigatoka negra In: Divulgación científica al servicio del productor bananero nacional. p 104-129.
- Makhlouf A., Mabrouk Y., El-Saied M. and Mahdy M. (2002). *In vitro* selection for drought tolerance in Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) and regeneration evaluation of selected genotypes. *Alexandra Journal of Agricultural Research* 47: 77-88
- Mihai, R. A., E. J. Melo H., E. A. Pinto V., I. A. Espinoza C & L, I. F. (2023). Somatic embryogenesis of representative medicinal trees in South America Current status. *Forests* 14(10):2066.
- Mosoh, D. A., Khandel, A. K., Verma, S. K., & Vendrame, W. A. (2024). Optimizing callus induction and indirect organogenesis in non-dormant corm explants of *Gloriosa superba* (L.) via media priming. *Frontiers in Horticulture*, 3, 1378098.
- Mousa, A.M. (2023). Inducción de callos *in vitro* y estimación de algunos componentes activos en tres plantas medicinales diferentes. *Al-Azhar Journal of Agricultural Research* , 48 (1), 266-281.
- Molina, S. X. C., Ospina, G. M., & Hernández, E. H. M. (2022). Micropropagación de maracuyá y curuba a partir de segmentos nodales y foliares. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 18(2), 17-27.
- Mori-Vásquez, J. A., Panduro Tenazoa, N. M., Muñoz Fernandez, V. J., Herrera-Saavedra, M. A., de Setta, N., de Oliveira Ferreira, G., Avalos-Díaz, A. G., & Gonzales-

- Alvarado, A. C. (2024). Efecto de la desinfección, el desarrollo foliar y las fitohormonas en la inducción de callos de *Simarouba amara* Aubl. *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 25(3). [https://doi.org/10.21930/rcta.vol25\\_num3\\_art:3662](https://doi.org/10.21930/rcta.vol25_num3_art:3662)
- Murai, N. R. (2014). Plant Growth Hormone Cytokinins Control the Crop Seed Yield. *Am J Plant Sci*. 05(14):2178-87. Available from: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/ajps.2014.514231>
- Leticia, B. Ríos-Salomé, Alma A. Del Villar-Martínez, Antonio, R. Jiménez-Aparicio, Pablo E. Vanegas-Espinoza, Cruz-Hernández. (2009). Análisis morfológico de explantes foliares de cempaxúchil (*tagetes erecta*) durante el proceso de dediferenciación mediante adi. *Laboratorio de Biología Molecular, Depto. de Biotecnología, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-IPN*
- López-Santos, V. R., Gutiérrez-Miceli, F. A., Silverio Gómez, M. del C., & Lecona Guzmán, C. A. (2024). Disminución de la oxidación e inducción de estructuras proembriogénicas en *Sideroxyloncapiri* (A. DC.) Pittier. *Revista Mexicana De Ciencias Forestales*, 15(84). <https://doi.org/10.29298/rmcf.v15i84.1454>
- Llorente, B. E. (2002). Cultivo *in vitro* 4.1. Cultivo de células y tejidos vegetales: Generalidades.
- Obermüller, F., Daly, C., Oliveira, E., Souza, E., de Oliveira, H., Souza, L., y otros. (2011). Guía ilustrado e manual de arquitetura foliar para espécies madeireiras da Amazônia Ocidental.
- ONU. (2014). "Organización de las Naciones unidas para la Alimentación y la agricultura". Normas para bancos de germoplasma de recursos fotogénicos para la alimentación y la agricultura. Comisión De Recursos genéticos Para La Alimentación y La Agricultura, editor. Roma.
- Osorio, J. R. (2014) Establecimiento de cultivos *in vitro* de albahaca (*ocimumbasilicum*) para la producción de aceite esencial. Universidad Autonoma Del Esta-do De Mexico.

- Payghamzadeh, K. Kazemitabar, S. K. (2011). *In vitro* Propagation of Walnut – A review. African Journal of Biotechnology, 10(3), 290-311. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/92211>
- Pesce, C. (2009). Oleaginosas da Amazônia. Museo Paraense Emilio Goeld. 2: 334.
- Peterson, M.A., McMaster, S.A., Riechers, D.E., Skelton, J., y Stahlman, P.W. (2016). 2, 4-D past, present, and future: a review. Weed Technology, v:30(2), 303-345.
- Peréz, F. (2017). Morfogénesis, crecimiento y desarrollo, reguladores del crecimiento aplicaciones agronómicas de los reguladores del crecimiento.
- Pierik, R. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi-Prensa. Bibliotecadigital. Instituto forestal.
- Rahma, L., Chokri, B., Afifa, M. M., Lopez-Corrales & Messaoud, M. (2023). *In vitro* propagation of caprifig and figs (*Ficus carica* L.) through various explants. Journal of Applied Horticulture, 25(3): 263-268, 2023. DOI: <https://doi.org/10.37855/jah>
- Purohit, S., Joshi, K., Rawat, V., Bhatt, I. D & Nandi, S. K. (2019). Regeneración eficiente de plantas a través de callos en *Zanthoxylum armatum* DC: una planta medicinal en peligro de extinción de la región del Himalaya indio. *Plant Biosystems - Una revista internacional que trata todos los aspectos de la biología vegetal* , 154 (3), 288–294. <https://doi.org/10.1080/11263504.2019.1610107>
- Rezende, R. K. S., Scoton, A. M. N., Jesus, M. V., Perreira, Z. V & Pinto, F. (2019). Callus Induction in Baru (*Dipteryx alata* Vog.) Explants. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(2), 538–543. <https://doi.org/10.15835/nbha47111366>
- Rawat, JM., Pandey, S., Rawat, B., Purohit, S., Anand, J., Negi, AS & El-Saber Batiha, G. (2023). Producción *in vitro* de Saponina esteroidea, fenoles totales y actividad antioxidante en cultivos de suspensión de callos de Paris polyphylla Smith: una importante planta medicinal del Himalaya. *Frontiers in PlantScience* , 14 , 1225612.
- Rivero, N. et al. (2008). Embriogénesis somática en *Anthurium draeanum* Lind variedad Lambada. *Ra Ximhai*. 4 (1):135.

- Roca, W. M & Mroginski, L. A. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Recuperado el 3 de abril de 2023. [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos/Ciat/biblioteca/Cultivo de tejidos en la agricultura.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos/Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf)
- Rocha, T., Paiva, R., Souza, A. R., Silva, B. T. S., Rodrigues., Hairón, A. F., Brito, L. I. C., Silva, G. A. S & Herrera, R. C. (2024). Diferentes explantes y reguladores del crecimiento en la inducción de callos en *Dipteryx Odorata* (Aubl.) Forsyth F. Ensayos y ciencia: ciencias biológicas, agrícolas y de la salud, v. 28, núm. 1, pág. 12–16, 2024.
- Robinson, J., Yang, G., & Lu, Z. (2023). *In vitro* callus and shoot initiation of black cohosh (*Actaea racemosa*. L) pre-incubated in darkness treatments. Australian Journal of Crop Science, 17(1), 83–89. <https://search.informit.org/doi/10.3316/informit.950704424477795>
- Rodriguez, B. M. M., Latsague, V.M. I., Chacón, F. M. A., & Astorga, B. P. K. (2014). *In vitro* induction of callogenesis and indirect organogenesis from explants of cotyledon, hypocotyl and leaf in *Ugnimolinae*. Bosque, 35 (1), 111-118.
- Romo, M., Vasquez, R., Nun, E., y Vargas, P. (2022). Ficha de especie clasificada: Evaluación de la amenaza de *Dipteryx ferrea*. Forest Trends.
- Ruíz-Rivas, M., Téllez-Valerio, Catarino. E., Martínez-Núñez, M., Vera-Hernández, P. F., Martínez-Romero, E & Rosas-Cárdenas, F. (2022). Influencia de la luz en la generación de callos y el cultivo *in vitro* de plantas. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 13 (spe27), 11-21. Epub 31 de octubre de 2022. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i27.3156>
- Santos. L, L., Fernanda., V P, F., Carvalho S A., Duarte C. A., Suzan Vilela B. S., Pereira Pinto. J. (2022). Establishment and growth of *lippie graciliss* chauercultivated under different *in vitro* conditions. Scientia Agraria Paranaensis –Sci. Agrar. Parana. ISSN: 1983-1471 –Online. Doi: <http://doi.org./10.18188/sap.v21i4.30208>

- Sampaio, P. T. B., Jardim, L. S., Blind, A. D & Bruno, F. M. S. (2018). Induction of callus and adventitious shoots on epicotyl and hypocotyl segments of cumaru (*Dipteryx odorata*). *Comunicata Scientiae*, 9(3), 475–480.  
<https://doi.org/10.14295/cs.v9i3.1618>
- Sangoquiza-Caiza, Carlos Alberto, Viera Tamayo, Yosvel, Yáñez Guzmán, Carlos Fernando, & Zambrano Mendoza, José Luis. (2021). Efecto del estrés salino sobre el crecimiento de plántulas de maíz variedad “Tayuyo” en condiciones *in vitro*. *Centro Agrícola*, 48(2), 14-23. Epub 01 de abril de 2021. Recuperado en 01 de octubre de 2024  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-57852021000200014](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852021000200014)
- SERFOR. (2023). Plan de acción para la adecuada implementación de la inclusión del shihuahuaco (género *Dipteryx*) y tahuarí (género *Handroanthus*) en el Apéndice II de la CITES, años 2023 y 2024. Lima. 44 pp.
- Silveira, A, A, C., Silva, L, C & Sibov, S. T. (2022). Germinação *in vitro* de *Dipteryx alata* Vogel (Fabaceae) e proliferação de brotos sob sistema de ventilação convencional e natural. *Ciência Florestal*, 32(2), 996–1010.  
<https://doi.org/10.5902/1980509841400>
- Soto-Ros, I. (2023). Optimización del crecimiento vegetal y biosíntesis de terpenos en *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) mediante cultivo *in vitro* (Bachelor 'sthesis).
- Smith, R. (2012). Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments. USA 3rd edition.book.
- Schuman, M.C., Meldau, S., Gaquerel, E., Diezel, C., McGale E., Greenfield S, et al. (2018). The Active Jasmonate JA-Ile Regulates a Specific Subset of Plant Jasmonate-Mediated Resistance to Herbivores in Nature. *Front Plant Sci*. 9 (June). Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.00787/full>
- Sharan, A. K., Dubey, S. R., Singh, B. P., Kumar, G., & Kumari, S. (2014). Diversity in callus organisation in *Eclipta Alba* Hassak. *International Journal of Advanced Research*, 2(7), 465–473.

- Sharry, S., Adema, M. & Abedini, W. (2015). Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Universidad Nacional de la Plata.
- Shi, X., Yang, L., Yan, G., & Du, G. (2017). Medium pH between 5.5 and 7.5 has Minimal Effects on Tissue Culture of Apple. *Hort Science*, 52(3), 475-478. Retrieved Sep 5, 2024, from <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11443-16>
- Spinoso-Castillo, J. L. & Bello-Bello J. J. (2022). *In Vitro* Stress-Mediated Somatic Embryogenesis in Plants. *Methods Mol Biol.* 2527:223-235. PMID: 35951194.
- Teixeira-da Silva, J. A., Nezami-Alanagh, E., Barreal, M. E., Kher, M. M., Wicaksono, A., Gulyás, A & Dobránszki, J. (2020). Shoot tip necrosis of *in vitro* plant cultures: a reappraisal of possible causes and solutions. *Planta*, 252, 1-35.
- Torrey, J. G. (1996). The Initiation of Organized Development in Plants. En M. Abercrombie & J. Brachet (Eds.), *Advances in Morphogenesis*. Vol. 5, pp. 39-91.
- Vásquez-Hernández, S., C. A. Cruz-Cruz, M. Santiago-Santiago and J. J. Bello-Bello. (2021). Evaluation of different antioxidants during *in vitro* establishment of allspice (*Pimenta dioica* L. Merrill): a recalcitrant species. *Agro Productividad* 14(11):149-157.
- Villegas-Panduro, P. P., Alarcón-Castillo, T & Rodríguez-Oré, M. E. (2021). Efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina en la micropropagación de dos variedades de ajíes nativos (*Capsicum chinense* Jacq.) EN Pucallpa. *Folia Amazónica*, 30(1), 15-25.
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., Schmulling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc Natl Acad Sci.* 98 (18): 10487-92. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.171304098>
- Wilson, P. J. (1994). Contributions of the leaves and axillary shoots to rooting in *Eucalyptus grandis* Hillex Maid stem cutting. *Journal of Horticultural Science (Inglaterra)* 69 (6): 999-1007.

- Yong, J. W. H., Ge, L. N. Y. F & Tan, S, N. (2009). The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water. *Molecules* [Internet]. 14 (12):5144-64. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/14/12/5144/>
- Zambela, A. J., Reyes, Á. L. E., & Pérez, J. L. P. (2024). Contenido de nutrientes minerales y metabolitos durante la multiplicación en biorreactores de *Dioscorea alata* (Original). *REDEL. Revista Granmense de Desarrollo Local*, 8(1), 197-216.
- Zia, A., Rezanejad, F., & Safarnejad, A. (2010). In vitro selection for NaCl tolerance in *Thymus vulgaris* L. *Journal of Cell and Molecular Research*, 2 (2), 86-92.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1.

| MATRÍZ DE CONSISTENCIA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                             |                                                                                                                                                                                               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE FOLIOS DE <i>DIPTERYX FERREA</i> (DUCKE) DUCKE (SHIHUAHUACO): EFECTO DE FITOHORMONAS EN LA INDUCCIÓN DE LA FORMACIÓN DE CALLOS FRIABLE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                             |                                                                                                                                                                                               |
| PROBLEMA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | OBJETIVO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | HIPOTESIS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | VARIABLE                                                                                                                                                                                                                                                                          | DIMENSIONES                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | INDICADOR                                   | POBLACIÓN/<br>MUESTRA                                                                                                                                                                         |
| <p><b>General</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>¿Cuál es el efecto de las combinaciones de auxinas y citoquininas, así como la mayor concentración de las mismas que inducen la formación de una mayor cantidad de callos friables <i>in vitro</i> en folios de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke (shihuahuaco)?</li> </ul> <p><b>Específicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>¿Cuál es el efecto de las combinaciones de auxinas y citoquininas, así como la mayor concentración de las mismas en la inducción de la desdiferenciación o deformación <i>in vitro</i> de tejido de foliolos de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke (shihuahuaco)?</li> <li>¿Cuál es el efecto de las combinaciones de auxinas y citoquininas, así como la mayor concentración de las mismas que inducen la formación de una mayor cantidad de callos friables <i>in vitro</i> en folios de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke (shihuahuaco)?</li> </ul> | <p><b>General</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Evaluar el efecto de las combinaciones de auxinas y citoquininas, así como la mayor concentración de las mismas que inducen la formación de una mayor cantidad de callos friables <i>in vitro</i> en foliolos de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke (shihuahuaco).</li> </ul> <p><b>Específicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Evaluar el efecto de las combinaciones de auxinas y citoquininas, así como la mayor concentración de las mismas en la inducción de la desdiferenciación o deformación <i>in vitro</i> de tejido de foliolos de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke (shihuahuaco).</li> <li>Determinar el efecto de las combinaciones de auxinas y citoquininas, así como la mayor concentración de las mismas que inducen la formación de una mayor cantidad de callos friables <i>in vitro</i> en foliolos de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke (shihuahuaco).</li> </ul> | <p><b>General</b></p> <p><b>Alternativa Ha</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Las combinaciones de auxinas y citoquininas, así como la mayor concentración de las mismas inducen la formación de una mayor cantidad de callos friables <i>in vitro</i> en foliolos de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke (shihuahuaco).</li> </ul> <p><b>Nula</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Ninguna de las combinaciones de auxinas y citoquininas, así como la mayor concentración de las mismas inducen la formación de una mayor cantidad de callos friables <i>in vitro</i> en foliolos de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke (shihuahuaco).</li> </ul> <p><b>Específicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Las combinaciones de auxinas y citoquininas, así como la mayor concentración de las mismas inducen a un mayor grado de desdiferenciación o deformación <i>in vitro</i> en foliolos de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke (shihuahuaco).</li> <li>Las combinaciones de auxinas y citoquininas, así como la mayor concentración de las mismas inducen a un mayor formación de callos friables <i>in vitro</i> en foliolos de <i>Dipteryx ferrea</i> (Ducke) Ducke (shihuahuaco).</li> </ul> | <p><b>Independiente</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Fitohormonas (Auxinas, Citoquininas).</li> </ul> <p><b>Dependientes</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Desdiferenciación o deformación de los explantes foliares.</li> <li>callogénesis</li> </ul> | <p>T1: 2.5(2,4-D)<br/>T2: 3(2,4-D)<br/>T3: 2.5(2,4-D) + 1.5(BAP)<br/>T4: 3(2,4-D) + 3(BAP)<br/>T5: 3(2,4-D) + 3.5(BAP)<br/>T6: 3 (2,4-D) + 4 (KIN)<br/>T7: 3(2,4-D) + 2.5 (KIN)<br/>T8: 3( 2,4-D) + 3(KIN )</p> <p>Contaminación:<br/>• Asepsia<br/>• Fenolización.<br/>• Oxidación.<br/>• Necrosis.<br/>• Mortandad.<br/>• Supervivencia.<br/>• Desdiferenciación deformación<br/>-Forma<br/>-color</p> <p>Callogénesis<br/>-encallamiento.<br/>-Forma.<br/>-oxidación.<br/>-necrosis.<br/>-color.<br/>-Área.<br/>-masa fresca.<br/>-masa seca.<br/>-Área.</p> | <p>-mg/l</p> <p>%<br/>mm<br/>Gr<br/>mm2</p> | <p><b>Población</b></p> <p>Hojas de brotes de un plantón de shihuahuaco del vivero forestal de la UNU.</p> <p><b>Muestra</b></p> <p>Explantos de 1 cm<sup>2</sup> foliolos de shihuahuaco</p> |

## ANEXO 2.

### Formato de evaluación para la desdiferenciación de los explantes foliares de *D. ferrea*.

[illegible]

## ANEXO 3.

### Formato de evaluación para callos formados de *D. ferrea*.

[illegible]

#### ANEXO 4.

#### Fotografías de los procedimientos y resultados de la investigación.

**Figura 30.**

*Preparación de los medios de cultivo*



**Figura 31.**

*Distribución de los medios de cultivo en los frascos*



**Figura 32.**

*Medios de cultivo preparados*

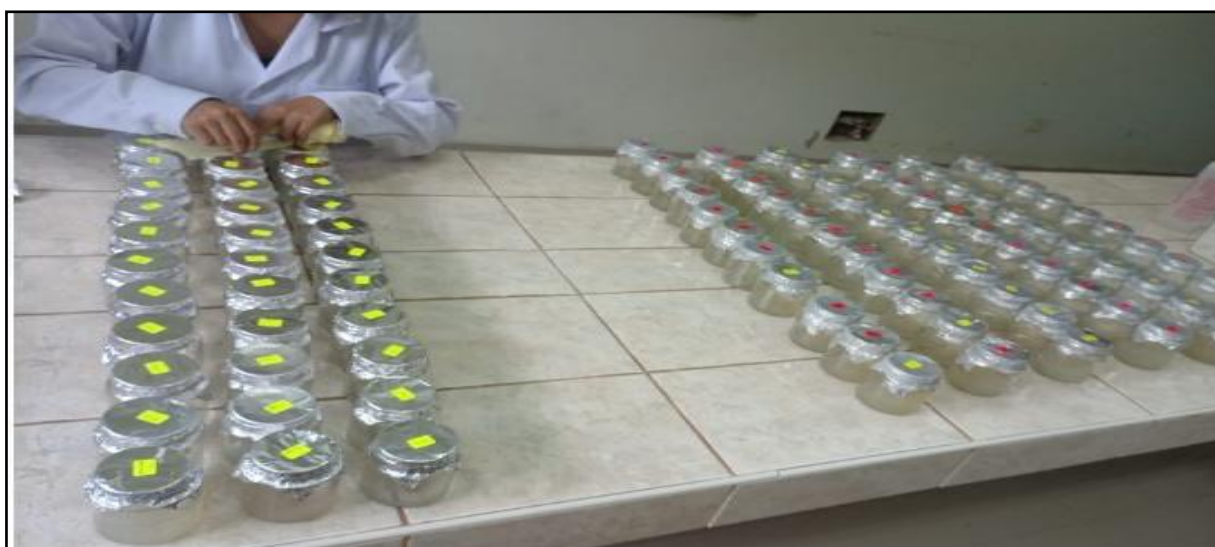


**Figura 33.**

*Selección de planta madre, procedencia Km 86, N°2*



**Figura 34.**

*Recolección de las hojas*



**Figura 35.**

*Lavado de las hojas fuera de la cámara de flujo laminar*



**Figura 36.**

*Lavado dentro de la cámara de flujo laminar*



**Figura 37.**

*Inoculación de explantes en el medio de cultivo: colocando folio (A), uso de filtro bacteriológico (B), corte (C), inoculación (D)*

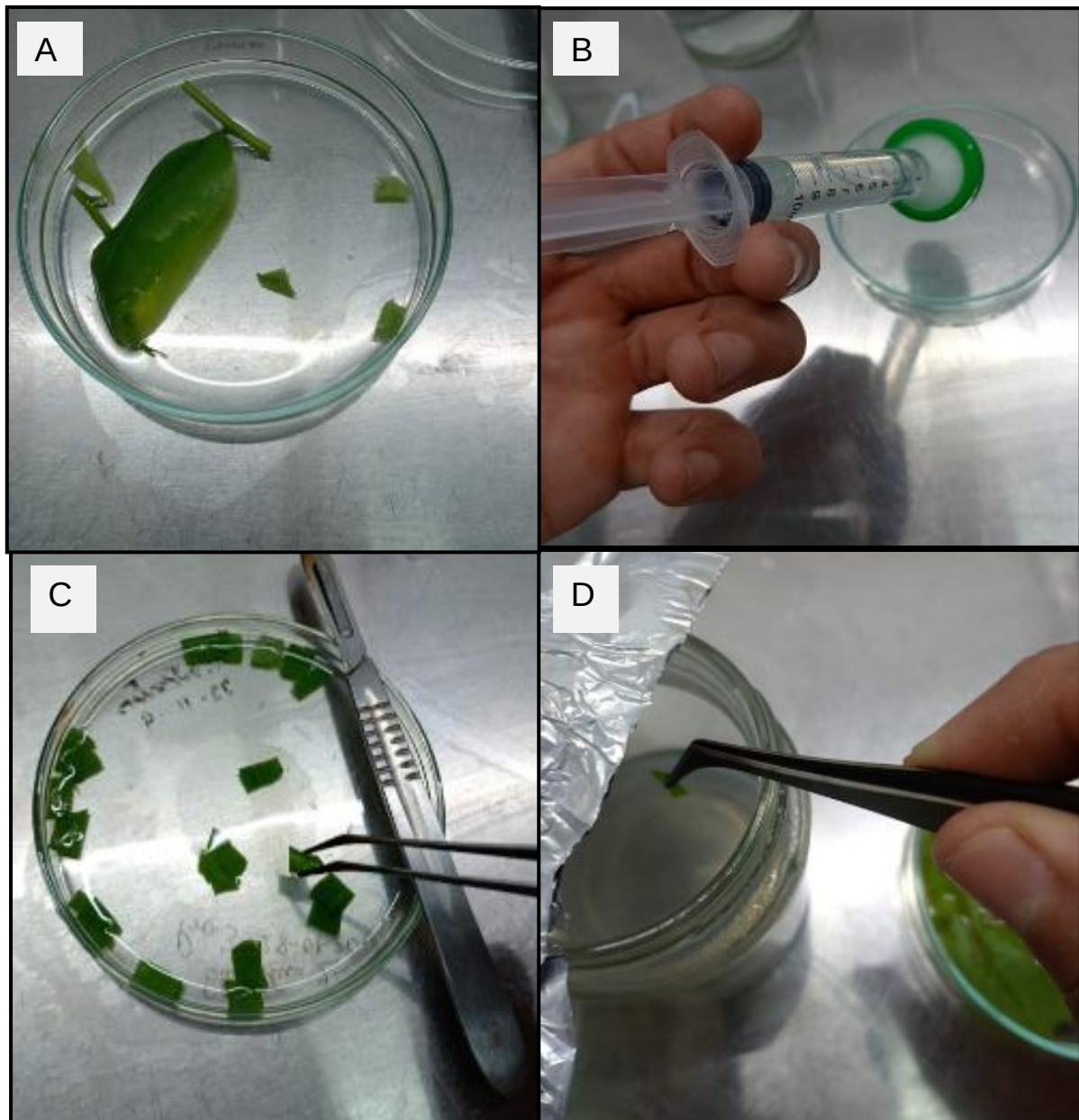


**Figura 38.**

*Incubación*



**Figura 39.**

*Primera aparición de callos*

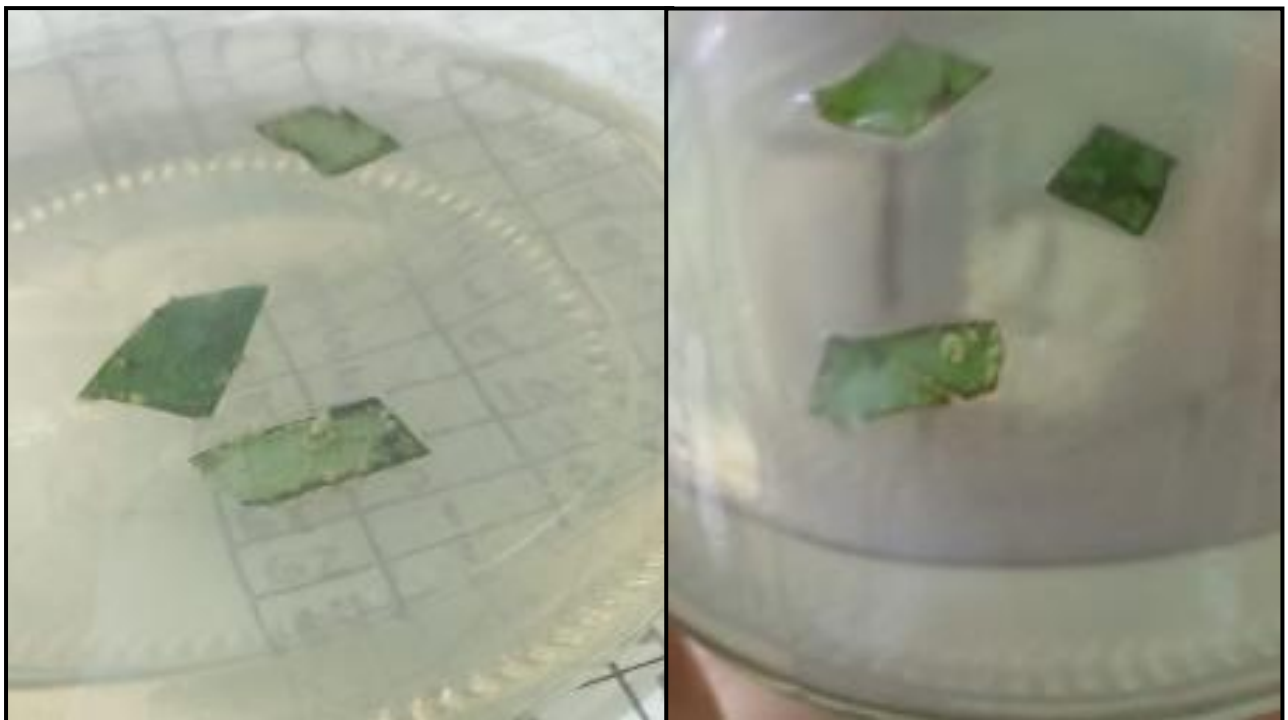
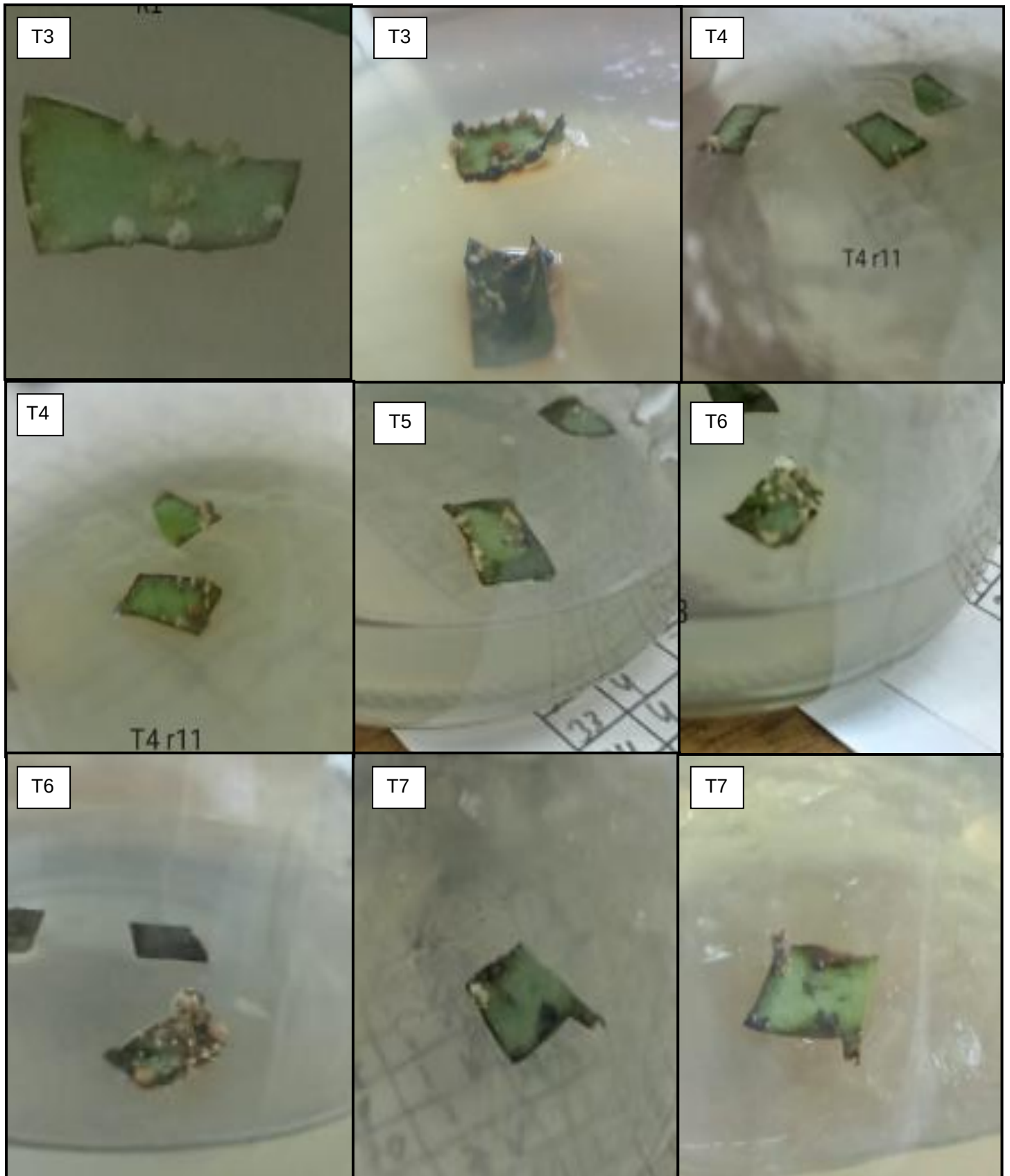


**Figura 40.**

*Callos de distintos tratamientos*



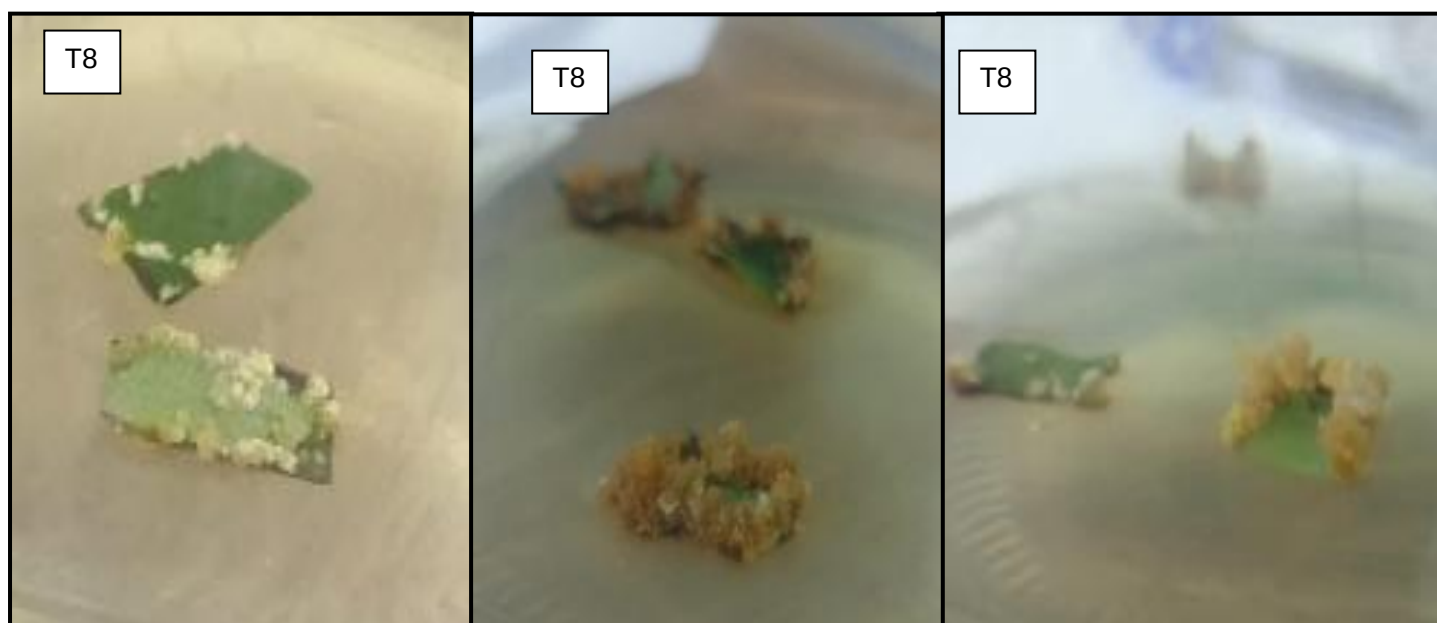


**Figura 41.**

*Explantos sin callos, pero con aparente signo de ello, visto desde estereoscopio*

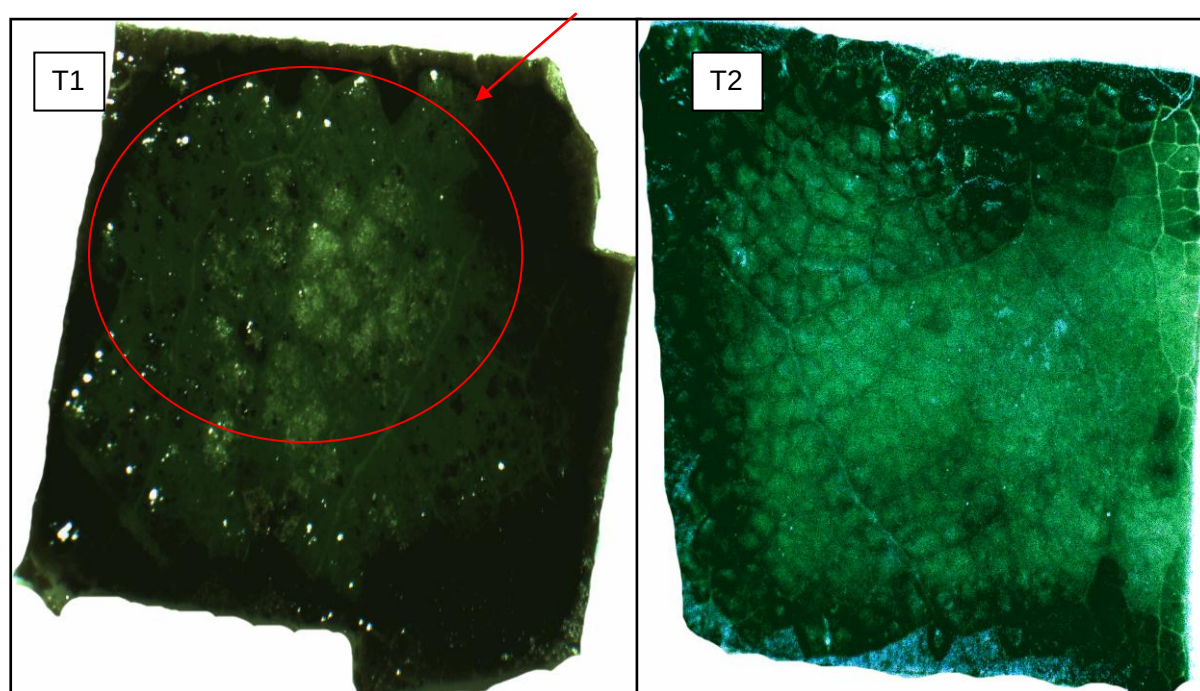
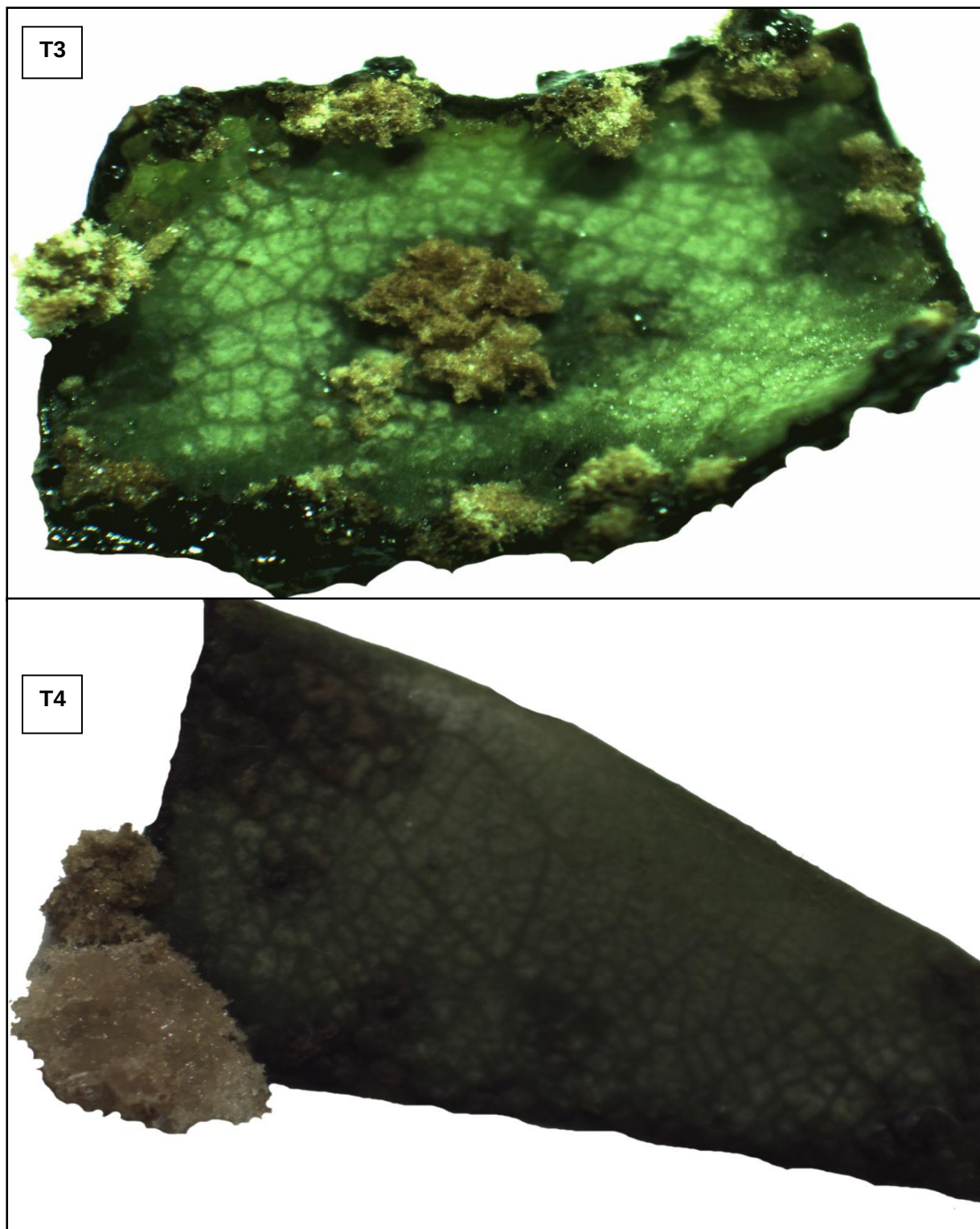
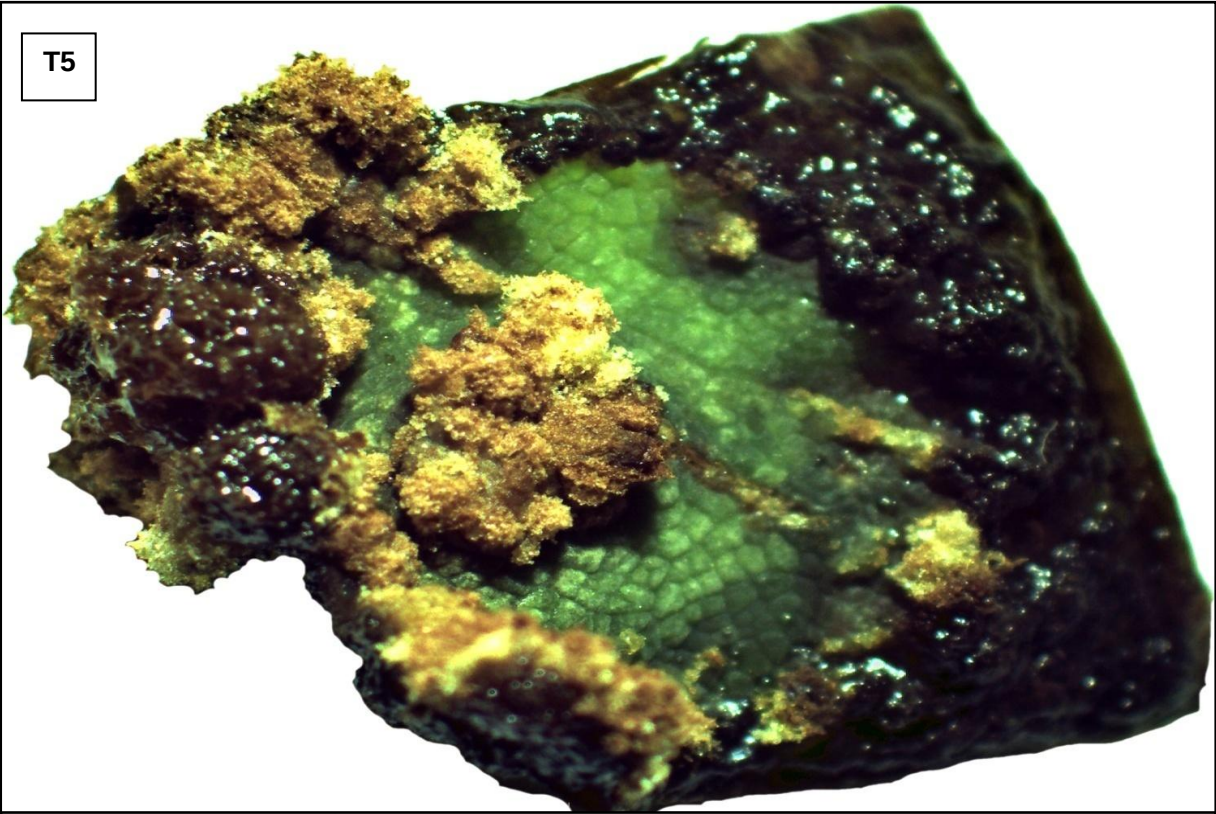


**Figura 42.**

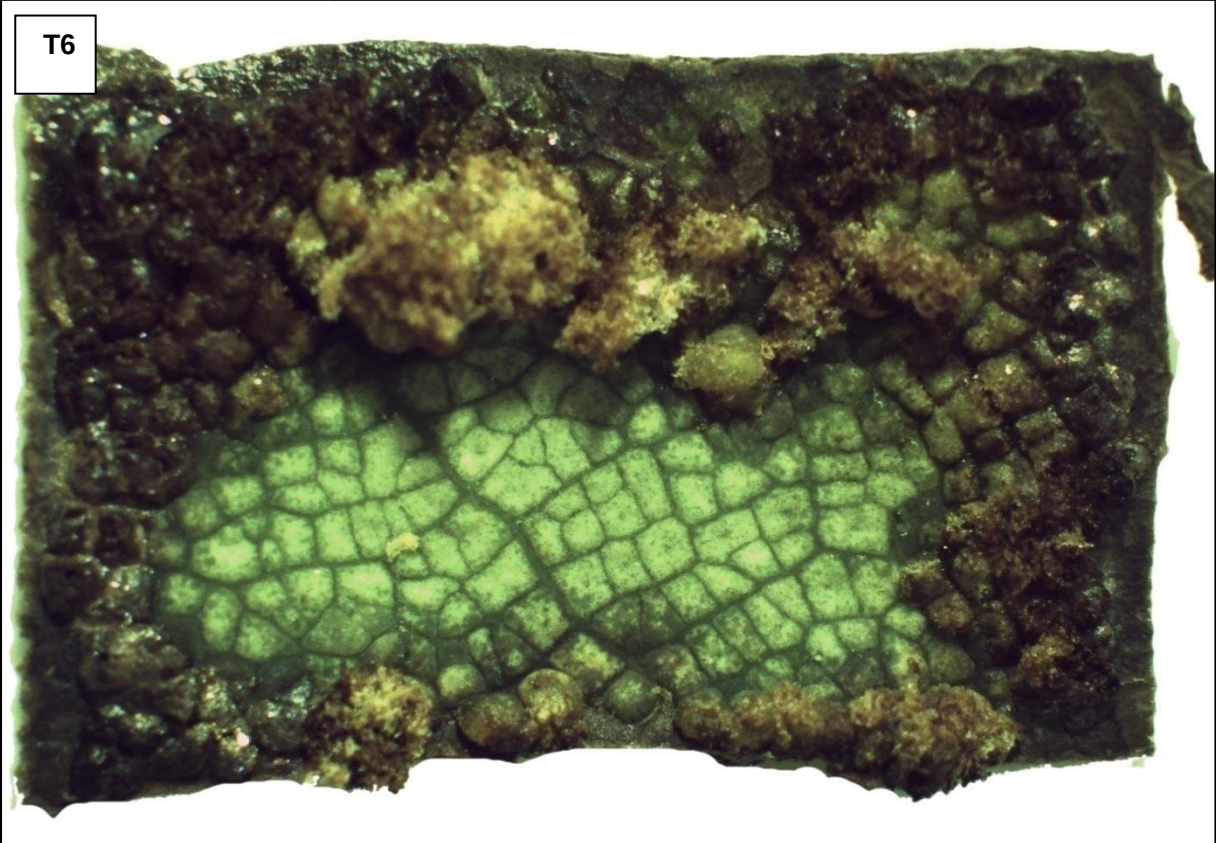
Fotografía de tratamientos con callos bajo estereoscopio



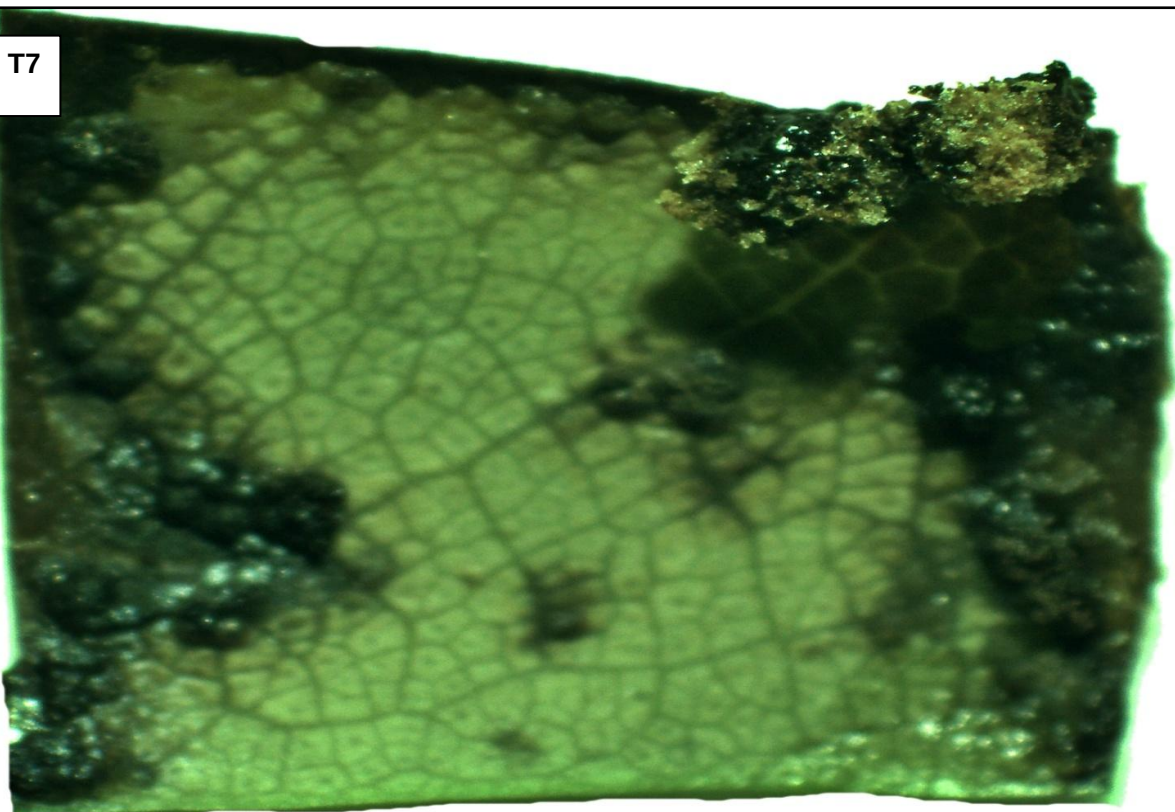
T5



T6



T7



T8

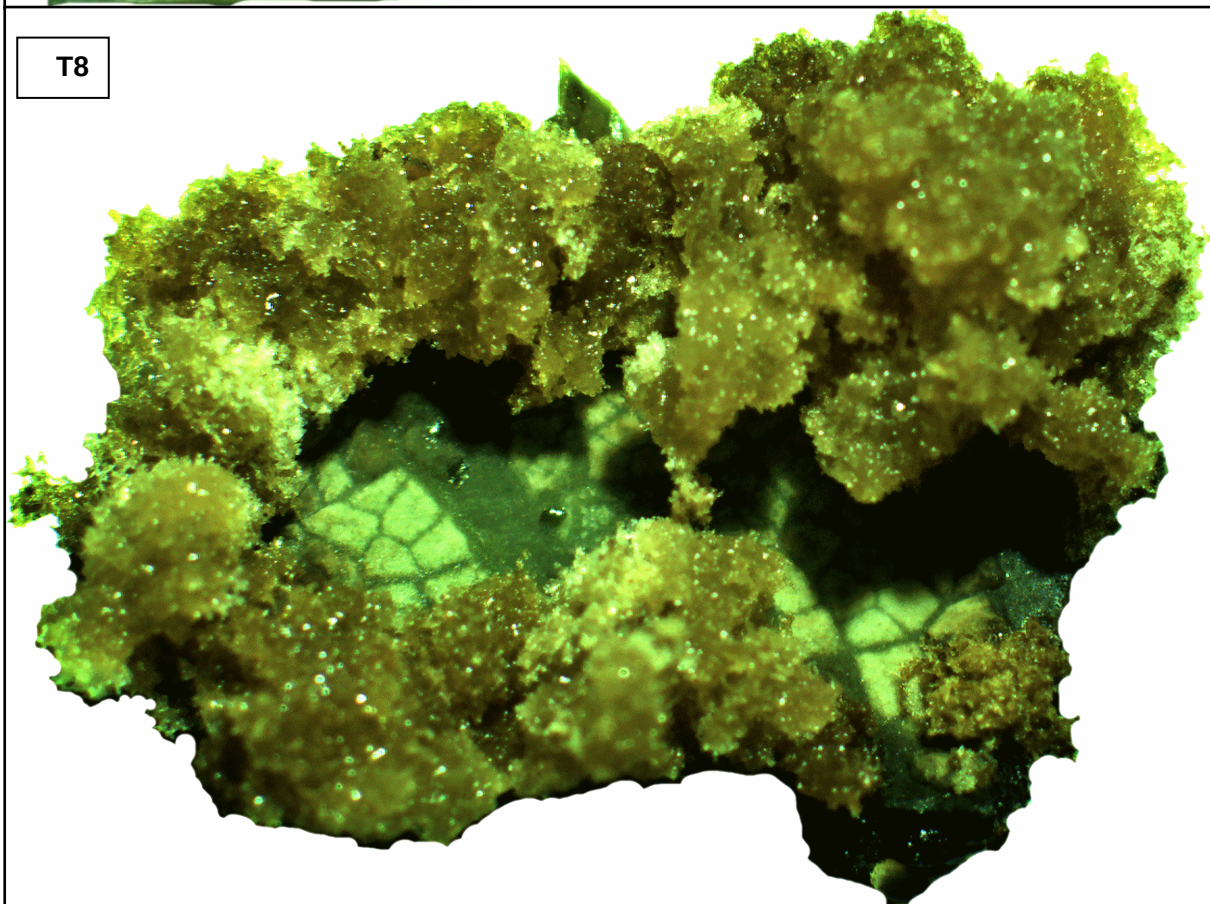


**Figura 43.**

*Tesista (Autor)*

