

## INFLUENCIA DE LA DESINFECCIÓN, MEDIOS DE CULTIVO Y FITOHORMONAS EN EL DESARROLLO MORFOGÉNICO IN VITRO DE GERMOPLASMA DE *Guazuma crinita* Mart

Antony Cristhian GONZALES-ALVARADO<sup>1</sup>, Jorge Arturo MORI-VASQUEZ<sup>1</sup>, Lady Laura TUISIMA-CORAL<sup>1</sup>, Jorge Manuel REVILLA-CHÁVEZ<sup>2,\*</sup>

1 Universidad Nacional de Ucayali, Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Escuela de Ingeniería Forestal; Carretera Federico Basadre Km. 6,200, Calleria, Coronel Portillo, Ucayali, Perú

2 Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana, Dirección Regional de Ucayali; Carretera Federico Basadre Km. 12,400. Yarinacocha, Coronel Portillo, Ucayali, Perú

\* Correo electrónico: jrevilla@iiap.gob.pe

### RESUMEN

El presente estudio, tuvo como objetivo determinar la influencia de procesos de desinfección, medio de cultivo y fitohormonas en el desarrollo morfológico *In vitro* de explantes obtenidas a partir de semilla biológica de la especie *Guazuma crinita* Mart (Bolaina), el mismo que se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos y meristemas, de la Universidad Nacional de Ucayali. Para ello se desinfectaron las semillas con hipoclorito de sodio al 2%, por un espacio de 0, 5, 10, 15 y 20 minutos (T1, T2, T3, T4, T5). Para promover la germinación se utilizaron medios de cultivo y combinaciones de Fitogel, Fitogel + Sacarosa, Fitogel + Sacarosa + Murashige and Skoog (MS) y Fitogel + Sacarosa + ½ MS (M1, M2, M3, M4); y para la morfológica se aplicaron cinco tratamientos de concentración de auxinas y citoquininas homogenizadas (AC1, AC2, AC3, AC4, AC5). Del estudio se obtuvo que el T5 (desinfección con hipoclorito de sodio al 2% con exposición de 20 minutos) tuvo un 95% de sobrevivencia; mientras que en la germinación, el medio M1 (Fitogel) presentó el más alto con un 72,55%; finalmente en la morfológica se determinó que el mejor tratamiento para inducir la formación de callos es el tratamiento AC4 (Kin 12 ppm + AIB 12 ppm), para primordios radicales el mejor tratamiento AC5 (Kin 4 ppm +

AIB 12 ppm) y se logró igual cantidad de brotes con todas las combinaciones de fitohormonas utilizadas.

PALABRAS CLAVE: Murashige and Skoog, fitogel, auxinas, citoquininas, callogénesis.

## **INFLUENCE OF DISINFECTION, GROWTH MEDIUM AND PHYTOHORMONAS IN THE IN VITRO MORPHOGENIC DEVELOPMENT OF GERMOPLASM OF *Guazuma crinita* Mart**

### **ABSTRACT**

The objective of this study was to determine the influence of disinfection processes, culture medium and phytohormones on the in vitro morphogenic development of explants obtained from biological seed of the species *Guazuma crinita* Mart (Bolaina), which was carried out in the tissue culture and meristems laboratory of the National University of Ucayali. The seeds were disinfected with 2% sodium hypochlorite for 0, 5, 10, 15 and 20 minutes (T1, T2, T3, T4, T5). To promote germination, culture media and combinations of Phytogel, Phytogel + Sucrose, Phytogel + Sucrose + Murashige and Skoog (MS) and Phytogel + Sucrose + ½ MS (M1, M2, M3, M4) were used; and for morphogenesis, five homogenized auxin and cytokinin concentration treatments were applied (AC1, AC2, AC3, AC4, AC5). From the study it was obtained that T5 (disinfection with 2% sodium hypochlorite with exposure of 20 minutes) had a 95% survival rate; while in germination, the M1 medium (Phytogel) presented the highest with 72.55%; Finally, in morphogenesis, it was determined that the best treatment for inducing callus formation was AC4 (Kin 12 ppm + AIB 12 ppm), for root primordia the best treatment was AC5 (Kin 4 ppm + AIB 12 ppm) and the same number of shoots was achieved with all the combinations of phytohormones used.

KEYWORDS: Murashige and Skoog, fitogel, auxins, cytokinins, callogenesis.

## INTRODUCCIÓN

La bolaina blanca (*Guazuma crinita* Mart), es una especie promisoriosa con demanda en el mercado y viene siendo utilizada en la Amazonía peruana para el desarrollo de plantaciones; sin embargo, se cuenta con insuficiente cantidad y calidad de semillas genéticamente deseadas que garanticen el éxito comercial de la plantación (Xavier *et al.*, 2013; Revilla-Chávez *et al.*, 2021). Sin embargo, esta carencia de semillas en calidad y cantidad, puede ser fácilmente superada mediante técnicas de micropropagación *In vitro*, como lo logrado a partir de la selección de semillas de *Raulinoa echinata*, *Eucalyptus grandis*, entre otras, la cual permitió una producción suficiente de plantas en calidad y cantidad adecuada (Alcântara *et al.*, 2011; Lencina *et al.*, 2014; Hoffmann *et al.*, 2022).

En la micropropagación, existen diversas fases (Erig & Schuch, 2005; Frota *et al.*, 2006), como la selección y preparación de la planta madre, desinfección de las yemas de la planta y/o desinfección de semillas, introducción del material seleccionado *In vitro*, multiplicación de brotes, enraizamiento y aclimatación, las cuales pueden ser aplicadas en diferentes especies vegetales (Castillo, 2004).

Un problema serio en el establecimiento de un cultivo primario *In vitro*, es la contaminación de la semilla y el explante, el cual es determinante al momento de la multiplicación (Hernández & González, 2010; Monfort *et al.*, 2015); por lo que la asepsia del germoplasma es fundamental en la micropropagación, donde la aplicación de diferentes insumos desinfectantes es esencial (Xavier *et al.*, 2009). Los explantes que pueden ser segmentos nodales, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, entre otros, que se extraen con la debida desinfección para eliminar hongos y bacterias que habitan en forma natural en el

ambiente, la asepsia deben mantenerse hasta la siembra (Castillo, 2004).

Para este proceso, los segmentos nodales o semillas ya esterilizados por diferentes métodos, se inoculan en medio de cultivo estéril, pero a pesar de ello, luego de aproximadamente siete a quince días se podían observar contaminaciones por bacterias y hongos asociados, que sobreviven a los tratamientos de esterilización del material inoculado por patógenos endógenos latentes dentro del sistema vascular (Sharry *et al.*, 2020); Por lo que Maruyama *et al.* (1997), inició los estudios para la desinfección y asepsia de las semillas para la micropropagación *In vitro* de *G. crinita*, por lo que el mismo autor, utilizó alcohol etílico de 70° por 3 minutos, y luego de aplicar una solución de peróxido de hidrógeno al 5% por 10 minutos, hasta en tres ocasiones en agua destilada estéril, obtuvo una desinfección al 100% libre de patógenos; más en la actualidad, se sigue buscando mejorar los protocolos de desinfección hacia técnicas más sencillas y económicas, como el aplicado por Villegas (2008) en semillas de *G. crinita*, que mediante la exposición de semillas a hipoclorito de sodio (NaClO) al 2%, a distintos tiempos de exposición, logró eliminar la contaminación de semillas por completo de manera más sencilla, por lo que demuestra que estos protocolos aún pueden ser mejorados.

Así mismo, en la micropropagación de *G. crinita* Mart y otras especies, es usual utilizar medios de cultivo, como el Murashige Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con alguna fitohormona como el Acido Indol Acético (AIA) y Acido Naftalen Acético (ANA) (Ruiz, 2010); también se puede utilizar Woody Plant Medium (WPM) suplementado con trans-zeatina [trans-6- (4-Hydroxy- 3- metilbut-2-enilamino) purina] (ZEA), por lo que luego de 45 días se puede lograr plántulas con mayor número de brotes a

dosis de 10  $\mu$ M; mientras que para la fase multiplicación de brotes y enraizamiento utilizando como medio de cultivo WPM suplementado con la fitohormona kinetina [6-furfurilaminopurina] (KIN) con una dosificación de 1  $\mu$ M se puede obtener similares resultados; este tratamiento puede conseguir el crecimiento de brotes y altos porcentajes de enraizamiento en periodos de sesenta (60) días (Maruyama *et al.*, 1996). Por lo que los medios de cultivo son importantes para sostener el desarrollo del explante en la propagación, puesto que las sales inorgánicas y compuestos orgánicos presentes en estos medios son requeridos para la nutrición y manipulación de diversos cultivos (Pereira *et al.*, 2008).

Por lo mismo, la multiplicación de brotes en la fase final, espera explantes que sobrevivieron a fases anteriores; estos brotes se sub cultivan en nuevos medios de cultivo, mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados (Castillo, 2004), maximizando la cantidad de brotes para nuevos ciclos de multiplicación, la misma que se complementa con sustancias reguladoras, como auxinas (ANA, 2,4-D, AIA, AIB, NOA,) y/o citoquininas (6-Ba, KIN, ZEA, 2iP, Thidiazurón) (Moraes *et al.*, 2021), mientras que las giberelinas (especialmente GA3) también son requeridas en ocasiones para el cultivo de meristemas o para la elongación de brotes (Levitus, 1997), para que una vez logradas, estas pueden ser repicadas en sustratos adecuados para su crecimiento y puestas en los terrenos definitivos.

Por lo que el presente estudio, tuvo como objetivo determinar la influencia de procesos de desinfección, medio de cultivo y fitohormonas en el desarrollo morfogénico *In vitro* de explantes obtenidas a partir de semilla biológica de la especie *Guazuma crinita* Mart (Bolaina) en Ucayali.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### ÁREA DE ESTUDIO

Este estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos y meristemas, de la Universidad Nacional de Ucayali, ubicado en la Carretera Federico Basadre Km. 6,200, ciudad de Pucallpa, distrito de Calleria, provincia de Coronel Portillo, departamento de Ucayali, en Perú, en coordenadas UTM 18L 546674 Este; 9071610 Sur.

### Germoplasma utilizado

Las semillas utilizadas provinieron de un lote de semillas biológicas viables obtenidas de los huertos semilleros de ensayos genéticos de bolaina blanca (*G. crinita* Mart) establecidos por el World Agroforestry (ICRAF) en la cuenca del río Aguaytia el año 2000.

### METODOLOGÍA

La presente investigación, se desarrolló en tres fases consecutivas.

#### **Fase 1, influencia del tiempo de desinfección con hipoclorito de sodio.**

Se lavó las semillas con agua destilada durante 30 minutos, luego fueron sumergidas por 30 minutos en 100 ml de agua destilada en la que se disolvió 3 g de Benlate®. Después, las semillas fueron lavadas tres veces con agua destilada, luego fueron llevadas a la cámara de flujo laminar donde se les sumergió en un frasco conteniendo Alcohol de 96° durante 1 minuto, en seguida fueron extraídas y colocadas en cinco 5 diferentes frascos para aplicar los tratamientos de diferentes tiempos de exposición de (NaClO) al 2%, luego que las semillas expuestas en NaClO, fueron enjuagadas cinco 5 veces con agua destilada estéril e

inmediatamente fueron introducidas 4 semillas en los frascos conteniendo 25ml de medio gelificante Fitogel. Luego de 15 días de sembradas las semillas, se evaluó la variable de porcentaje de desinfección en los frascos que contenían las semillas. Los tratamientos aplicados en esta fase se presentan en la Tabla 1a.

**Fase 2, influencia del medio de cultivo en la germinación.** Las semillas utilizadas en esta fase se desinfectaron siguiendo el mismo procedimiento descrito en la fase 1, pero se consideró el tiempo de 20 minutos de exposición a NaClO

al 2% (T5), tras obtener un mayor porcentaje de desinfección.

**Preparación de medios de cultivo**

En esta fase de utilizo cuatro diferentes tratamientos de medios de cultivos, siendo descrita en la Tabla 2. b, y cuya preparación se describen a continuación: Para la preparación del primer tratamiento (M1), se utilizó 7 g L<sup>-1</sup> de Fitogel disuelto en agua destilada, para los otros medios de cultivos se utilizó la misma cantidad de Fitogel, suplementado con otros compuestos; El tratamiento dos (M2), se suplementó con 30 g L<sup>-1</sup>

**Tabla 1.** Tratamientos aplicados y número de repeticiones en las fases 1, de influencia del proceso de desinfección (a), Fase 2, del medio de germinación (b) y fase 3, efecto de fitohormonas (c, d, e) en el desarrollo morfológico *In vitro* de *G. crinita* Mart.

**a. Fase 1: Desinfección de las semillas**

Tratamiento	Tiempo de desinfección al hipoclorito de sodio (minutos)	Nº repeticiones
T1	0	17
T2	5	20
T3	10	20
T4	15	20
T5	20	20

**b. Fase 2: Efecto de medios de cultivo en la germinación de semillas**

Tratamiento	Sustratos	Nº repeticiones
M1	Fitogel	17
M2	Fitogel + Sacarosa	20
M3	Fitogel + Sacarosa + Murashige and Skoog (MS)	20
M4	Fitogel + Sacarosa + ½ MS	20

**c. Fase 3: Influencia de fitohormonas en la morfogénesis de segmentos nodales provenientes de plantines producidos por propagación *in vitro***

Tratamiento	Concentración de hormonas	Nº repeticiones
AC1	Kin (0 ppm) + AIB (0 ppm)	11
AC2	Kin (4 ppm) + AIB (4 ppm)	11
AC3	Kin (12 ppm) + AIB (4 ppm)	11
AC4	Kin (12 ppm) + AIB (12 ppm)	11
AC5	Kin (4 ppm) + AIB (12 ppm)	11

**Tabla 2.** Evaluación del proceso de desinfección e influencia del sustrato en la germinación *In vitro* de semillas de *G. crinita* Mart.

a. Fase de desinfección		b. Fase de germinación	
Tratamiento	%	Tratamiento	%
Tempo de exposición de las semillas al NaClO en minutos	Desinfección de semillas	Medio de cultivo	Germinación
T5 =20	95 a	M1 = Fitogel	72,55 a
T4 =15	65 ab	M2 = Fitogel + sacarosa+ ½ MS	68.33 ab
T3 =10	65 ab	M3 = Fitogel + sacarosa	60 ab
T2 =05	60 b	M4 = Fitogel + sacarosa + Ms	46.67 b
T1 =00	0 c		

Letras iguales no presentan diferencias significativas. Tukey  $p \geq 0,05$

de sacarosa; El tratamiento tres (M3), se suplementó con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa más Murashige and Skoog (MS) y el cuarto tratamiento (M4), se suplementó con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa más ½ de Murashige and Skoog (½ MS); todos los tratamientos se ajustaron a un pH de 5,8.

Con el objeto de mantener la asepsia del proceso, se procedió a esterilizar los frascos que fueron utilizados, en una autoclave a 15 libras de presión y 131°C por 20 minutos, al culminar se extrajeron los frascos y se dejaron enfriar por 24 horas en un ambiente libre de patógenos, posteriormente se sembraron 3 semillas por frasco con diferente número de repeticiones esto se puede visualizar en la Tabla 1. b. Luego los frascos fueron expuestos en una cámara de crecimiento con el fotoperiodo de 12 horas y la temperatura de 25 °C ± 2 °C, 75% de humedad. 30 días después de la siembra, se evaluó la variable de número de semillas germinadas.

**Fase 3, Influencia de las fitohormonas en la morfogénesis.** En esta fase se utilizó cuatro tratamientos de medios de cultivos, considerando los resultados de la fase anterior, se utilizó como medio de cultivo el tratamiento 5, para evitar la oxidación se suplemento con 1 g L<sup>-1</sup> de carbón activado con pH ajustado a 5,8 y diferentes dosis de Kinetina (Kin) y Ácido Indol Butírico (AIB), como está indicado en la Tabla 1. c.

Como explantes se utilizó segmentos nodales, provenientes de plántulas obtenidas de la fase de germinación del tratamiento M4, obteniendo como unidad experimental un tubo de ensayo con 20ml de medio de cultivo con un segmento nodal de aproximadamente 1,0-1,5 cm de longitud. A los 120 días, se evaluó diferentes variables.

#### POBLACIÓN Y MUESTRA

La población fue conformada por un lote de semillas de *G. crinita*, donde aproximadamente 0,5 g

de semillas colectadas de individuos con características fenotípicas superiores en altura, diámetro y un estado fitosanitario sano. De este lote, en la fase 1 se tomó una muestra de 388 semillas; para la fase 2, 192 semillas germinadas; en la fase 3, se utilizaron 55 segmentos nodales provenientes de las semillas germinadas *In vitro*.

### Diseño experimental, variables y procesamiento de la información

En las tres fases del experimento se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA), a cuyos resultados se aplicó el Análisis de Varianza (ANVA) y la prueba de comparación de medias de TUKEY y LSD con un 5% de significancia ( $\alpha= 0.05$ ).

La información obtenida fue procesada en OpenOffice y el programa computacional "Sistema para Análisis de Variancia" (SISVAR 5.6) (Ferreira, 2011).

En la fase 1, se aplicaron 5 tratamientos con el número de repeticiones que se mencionan en la tabla 1. Para esta fase, las variables evaluadas fueron porcentaje de semillas sin contaminación y semilla contaminada. La evaluación se realizó a los 15 días de instalado el experimento.

En la fase 2, se aplicaron 4 tratamientos con el número de repeticiones detalladas en la Tabla 1. En esta fase se evaluó el número de semillas germinadas y se expresó en %. La evaluación se realizó después de 30 días de instalado el experimento.

En la fase 3, de morfogénesis, se aplicaron 5 tratamientos, con repeticiones indicadas en la Tabla 1. Las variables evaluadas fueron presencia de callos, existencia de diferenciación radicular, número de primordios radiculares y número de brotes. La evaluación se realizó después de 120 días de la inoculación de los segmentos nodales.

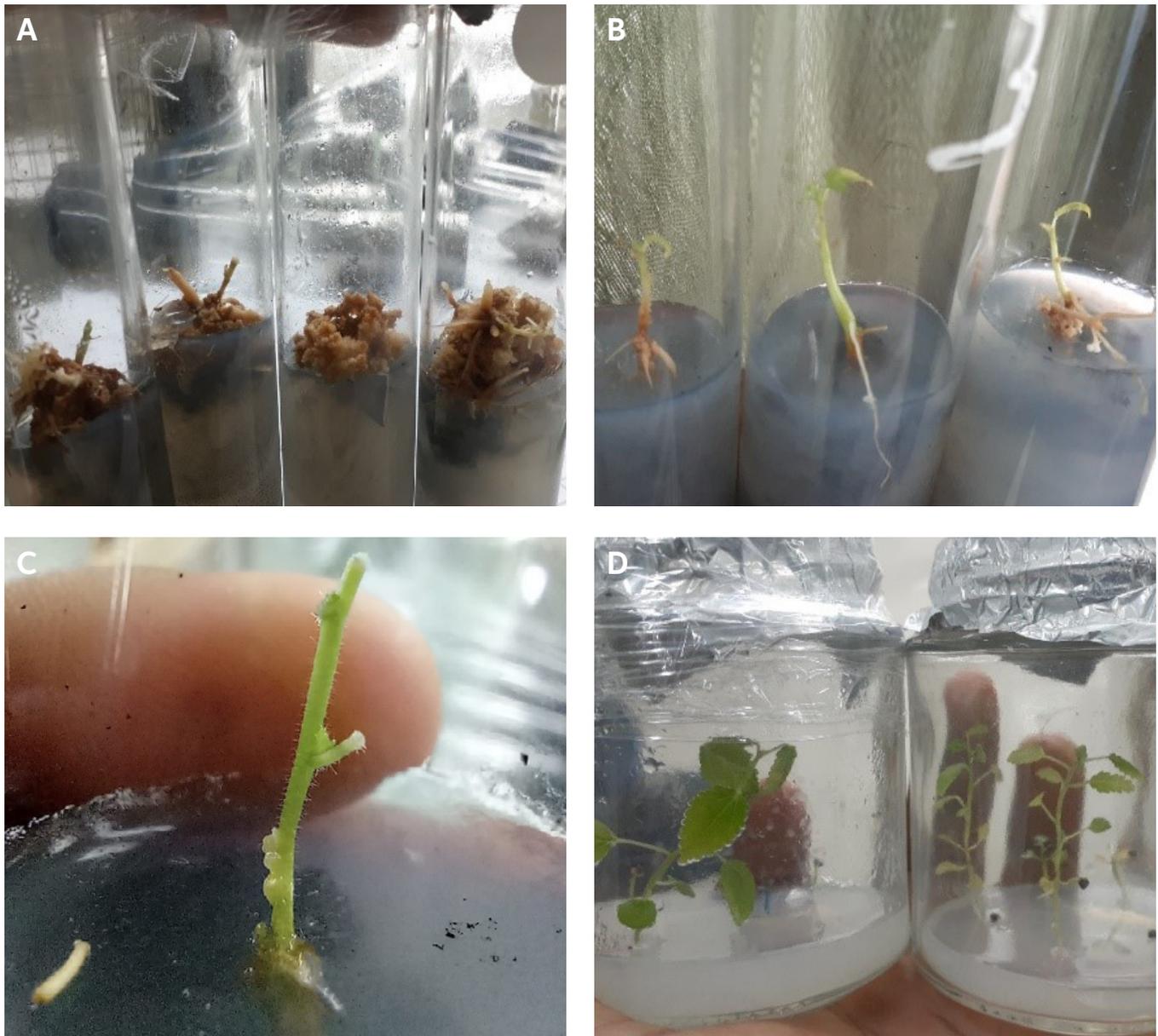
## RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la fase de desinfección de las semillas por efecto del tiempo de acción del hipoclorito de sodio al 2%, así como el efecto del medio de cultivo en la germinación de las semillas desinfectadas se presentan en la Tabla 2.

De los tratamientos aplicados para la desinfección de semillas de *G. crinita* Mart por bacterias y hongos, mediante la prueba de medias de Tukey ( $p \geq 0,05$ ) se determinó que el tratamiento T5 fue el más eficiente; por el contrario, con el tratamiento control T1 se obtuvo total contaminación de las semillas en el medio de cultivo (Tabla 2, a). Mientras que los mayores porcentajes de germinación de las semillas *In vitro* (Tabla 2. b) se obtuvieron utilizando sólo Fitogel (tratamiento M1) y en el tratamiento M4 se obtuvo el menor porcentaje de germinación.

La Tabla 3, presenta los resultados de la morfogénesis en la fase 3, donde se observa que existe una mayor formación de callos mediante el tratamiento AC4 el cual es significativamente superior a los demás tratamientos mediante la prueba de medias de Tukey ( $p \geq 0,05$ ) y del mismo modo para primordios radiculares el tratamiento AC4 fue significativamente superior determinado por la prueba de medias LSD ( $p \geq 0,05$ ), más con el tratamiento AC1 no se formaron callos y tuvo también el menor número de primordios radiculares (Tabla 3. a, b). Mientras que mediante la prueba de medias LSD ( $p \geq 0,05$ ), se determinó que la mayor cantidad de brotes se obtuvo con el tratamiento AC5 y las más bajas se obtuvieron con los tratamientos AC1 y AC2 (Tabla 3. c).

La figura 1, presenta el desarrollo morfológico de los explantes, en el que podemos ver la proliferación de callos (Figura 1, a), formación de



**Figura 1.** Morfogénesis en explantes de *G. crinita* Mart; **a.** Proliferación de callos en explantes, por efecto de la combinación de auxinas y citoquininas en los medios de cultivo; **b.** Primordios radiculares; **c.** Producción de brotes; **d.** diferenciación entre el tratamiento T4 y tratamiento T1 luego de 4 meses.

**Tabla 3.** Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de kinetina (Kin) y Ácido Indol Butírico (AIB) en la fase de desarrollo morfogénico de explantes provenientes de semillas germinadas *In vitro* de *G. crinita* Mart.

Fase de desarrollo morfogénico					
a. Callogénesis		b. Primordios radiculares		c. Brotes	
Tratamiento	%	Tratamiento	N°	Tratamiento	N°
Fitohormonales	Callos	Fitohormonales	Primordios radiculares	Fitohormonales	Brotes
<b>AC4</b> = Kin (12 ppm) + AIB (12 ppm)	100 a	<b>AC4</b> = Kin (12 ppm) + AIB (12 ppm)	49 a	<b>AC5</b> = Kin (4 ppm) + AIB (12 ppm)	4 a
<b>AC3</b> = Kin (12 ppm) + AIB (4 ppm)	90,91 ab	<b>AC5</b> = Kin (4 ppm) + AIB (12 ppm)	23 ab	<b>AC4</b> = Kin (12 ppm) + AIB (4 ppm)	3 a
<b>AC2</b> = Kin (4 ppm) + AIB (4 ppm)	81,82 ab	<b>AC3</b> = Kin (12 ppm) + AIB (4 ppm)	13 b	<b>AC3</b> = Kin (12 ppm) + AIB (12 ppm)	3 a
<b>AC5</b> = Kin (4 ppm) + AIB (12 ppm)	72,73 b	<b>AC2</b> = Kin (4 ppm) + AIB (4 ppm)	7 b	<b>AC2</b> = Kin (4 ppm) + AIB (4 ppm)	1 a
<b>AC1</b> = Kin (0 ppm) + AIB (0 ppm)	00,00 c	<b>AC1</b> = Kin (0 ppm) + AIB (0 ppm)	2 b	<b>AC1</b> = Kin (0 ppm) + AIB (0 ppm)	1 a

Letras iguales no presentan diferencias significativas. Tukey ( $p \geq 0,05$ ) para primordios radiculares (b.) y LSD ( $p \geq 0,05$ ) para callogénesis (a.) y brotes (c.).

primordios radiculares (Figura 1, b), formación de brotes (Figura 1, c) y diferentes grados de formación de brotes (Figura 1, d).

Finalmente, realizando el análisis de varianza de los resultados de las tres fases del experimento se determinó que en todas las fases del experimento existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos aplicados

## DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta los resultados presentados en la Tabla 2. a, la misma demuestra que existe una relación inversamente proporcional entre el tiempo de exposición al (NaClO) al 2% y la contaminación de las semillas, resultado

que es corroborado con lo manifestado por Chudzikiewicz (2019), que menciona que la exposición de los explantes a un tiempo mayor y un conjunto de fungicidas, resulta en un porcentaje menor de contaminación, por su parte Arbeláez *et al.* (2016) menciona que el hipoclorito de sodio es uno de los mejores desinfectantes utilizados en técnicas de cultivo *In vitro*, evitando contaminaciones por diversos patógenos. Así mismo, los resultados obtenidos en la fase 1, de desinfección (Tabla 1) son similares a los obtenidos por Villegas (2008). Así mismo Ramírez, *et al.* (2014) y Ticona & Triguero (2019), lograron controlar la contaminación con tratamientos similares.

Respecto a los resultados obtenidos, en la segunda fase (Tabla 2. b.) los resultados difieren

a lo afirmado por Ali-Rachedi *et al.* (2004), que menciona que las semillas de *P. nitida* y *P. ledifolia*, obtienen una mayor proporción germinación, se adiciona al medio de cultivo una fitohormona GA3; sin embargo, Flores-Hernandez *et al.* (2017), menciona que los medios de cultivo (MS) al 50%, tiene una mayor eficiencia en el desarrollo vegetal; por lo que Devlin (1980) menciona, que el desarrollo de los vegetales en el crecimiento y diferenciación de órganos, es regulado por la acción de la fitohormona; los mismos que Diaz-Pillasca *et al.* (2022), indican que estos activan o inhiben determinados procesos fisiológicos interactuando entre sí; más las altas concentraciones de azúcares, son agentes promotores del crecimiento (Tacoronte *et al.*, 2017), lo que justificaría el hecho de que, la combinación de Fitogel y sacarosa (M4), es el mejor tratamiento que se visualizó en un periodo de incubación (4 meses), en tanto que estadísticamente el mejor tratamiento fue el M1, evaluado en un mes.

En base al ANVA, se determinó que existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados en todas las fases del estudio tal como se presenta en la Tabla 2 y 3, el cual se presenta que los tratamientos que poseen la misma letra forman grupos con resultados estadísticamente iguales.

Es importante destacar que en todos los resultados obtuvieron más de un grupo de tratamientos estadísticamente iguales, a excepción de la formación de brotes, donde todos los tratamientos dieron resultados estadísticamente iguales, pudiéndose suponer que se necesita incrementar la concentración de fitohormonas que incrementan la producción de brotes.

En la fase tres, se logró la formación de callo en todos los tratamientos a excepción del tratamiento AC1 que no tenía ninguna fitohormona,

demostrándose que todas las concentraciones tanto de kinetina y de AIB son suficientes para incentivar la formación de callos en esta especie; por lo que para Gordon *et al.* (2009), la formación de callos responden al uso de fitohormonas pudiendo incluso llegar a generar dificultades por su aplicación excesiva; por lo que las auxinas como el AIB, son utilizados para promover la división celular y proliferación de raíces (George *et al.*, 2008), que en conjunto con las citoquininas como la kinetina, son capaces de inducir el crecimiento del callo (Vageeshbabu & Boopal, 2016) y como también del desarrollo de embriones androgénicos (Olszewska *et al.*, 2014).

En relación a la formación de primordios radiculares, Ruiz (2010) y Garay-Arroyo *et al.* (2014), afirman que las auxinas, son los únicos fitohormonas que propician la formación de primordios radiculares, esto guarda relación con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde los tratamientos AC4 y AC5, que tienen la mayor concentración de AIB (12ppm), presentaron la mayor formación de primordios radiculares, sin embargo un inadecuado control puede afectar la calidad de las raíces y el desarrollo de obtención de estas (Uribe *et al.*, 2012).

Se debe tener en cuenta que, en la fase de desarrollo o formación de primordios radiculares, las células se diferencian, de acuerdo a las concentraciones de auxinas (AIB) y citoquininas (Kin) en los medios de cultivo, por lo que, si este tiene mayor cantidad de auxina, se obtiene primordios radiculares, y si este tiene concentración de citoquininas la diferenciación se encamina hacia la proliferación de brotes o en la obtención de yemas apicales.

Así mismo Couto *et al.* (2021), refiere que la utilización de citoquininas con determinadas auxinas, son óptimas inductoras de brotes en los

explantes, y determinan que la mejor relación de ácido indol butírico (AIB) y citoquininas (KIN) en la propagación de yemas axilares de sauce es de 1/1 en el medio Murashige and Skoog (1962), esto podría explicar el hecho que en el presente experimento, se obtuvo la mayor proliferación de primordios radiculares en el tratamiento AC4, donde la relación entre auxinas y citoquininas es de 1:1.

## CONCLUSIONES

- El control de la contaminación de semillas de *G. crinita* Mart, con soluciones de Hipoclorito de sodio (NaClO) al 2%, es inversamente proporcional al tiempo de exposición, siendo que los tiempos entre 10 y 20 minutos presentaron una eficiencia en su aplicación.
- El porcentaje de germinación de las semillas de *G. crinita* Mart. *In vitro* depende del tipo de sustrato y el tiempo a la exposición a estas, cuando los nutrientes disminuyen por el consumo de las plantas, estas utilizan sus reservas llegando a auto consumirse y posteriormente mueren si es que el sustrato no tiene nutrientes adicionales.
- Las concentraciones de auxinas y citoquininas utilizadas promovieron una abundante formación de callos.
- Las concentraciones de auxinas (AIB) y citoquininas (Kin) utilizadas permitieron la formación de primordios radiculares.
- Las concentraciones de auxinas y citoquininas utilizadas, permitieron la formación de igual número de brotes, siendo necesario probar el efecto de diferentes dosis de citoquininas para formar una mayor cantidad de brotes.

## AGRADECIMIENTOS

Al M. Sc. Pablo Pedro Villegas Panduro, por sus acertadas recomendaciones.

A la Universidad Nacional de Ucayali (UNU) por brindar el apoyo financiero con el Fondo FOCAM.

Al instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana y su equipo de investigadores por la asesoría científica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcântara, B.K.; Brondani, G.E.; Gonçalves, A.N.; Almeida, M.; Azevedo, R.A. 2011. Methods of asepsis for in vitro establishment and germination of *Eucalyptus grandis*. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 2(3): 7-13. DOI: <https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v2n3.alcantara>
- Ali-Rachedi, S.; Bouinot, D.; Wagner, M.; Bonnet, M.; Sotta, B.; Grappin, P.; Jullien, M. 2004. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Plant*, 219: 479-488. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1251-4>
- Arbeláez, L.M.; Montoya, J.L.; Saavedra, S.A.R. 2016. Evaluación de protocolos para el establecimiento y desinfección in vitro de meristemas de platano *Musa Spp*. *Vitae*, 23: 391-395.
- Castillo, A. 2004. *Propagación de plantas por cultivo in vitro una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Uruguay.

- Chudzikiewicz, A. 2019. Establecimiento in vitro de *Bambusa oldhamii* Munro e multiplicação in vitro de *Guadua chacoensis* (Rojas) londoño. Tesis de pre-grado, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciencias Rurais, Curitibanos, Brasil. 40pp.
- Couto, T.R.; Araujo, J.S.; Aguilar, J.P. 2021. Balanço hormonal auxina/citocinica para multiplicação in vitro de genótipos de *Gérbera*. *Revista Agrária Acadêmica*, 4(1): 119-143. DOI: <https://doi.org/10.32406/v4n12021/119-134/agrariacad>
- Devlin, R.M. 1980. *Fisiología vegetal*. Edit. Omega, S.A. Barcelona, España. 517 pp.
- Diaz-Pillasca, H.B; Gozalo, A.C.; Domínguez, G. 2022. Efecto de tres medios de cultivo en la propagación in vitro de *Solanum chaucha* Juz. & Bukasov. *Revista de investigacion Aporte Santiaguino*, 15(1): 9-21. DOI:
- Erig, A.C.; Schuch, M.W. 2005. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. *Ciência Rural*, 35(4):961-965. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000400039>
- Ferreira, D. 2011. A computer statistic alanalysis system. *Ciência e agrotecnologia*, 35:6 1039-1042. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>
- Flores-Hernandez, L.A.; Robledo-Paz, A.; Jimarez-Montiel, M.J. 2017. Medio de cultivo y sustitutos del agar en el crecimiento in vitro de orquídeas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(6): 1315-1328.
- Frota, J.M.; Medeiros, M. Lancerda, M.J. 2006. Fatores inerentes à micropropagação, Embrapa, Campinas Grandes, PB. 28pp.
- Garay-Arroyo, A.; Sánchez, M.; Garcia-Ponce, B.; Álvarez-Buylla, E.R.; Gutiérrez, C. 2014. La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia en el Desarrollo de Arabidopsis Thaliana. *Revista de Educacion Bioquimica*, 33(1): 13-22.
- George, E.F.; Hall, M.A.; De Klerk, G.J. 2008. The components of plant tissue culture media ii: Organic Additions, Osmotic and pH effects, and Support Systems. In: George, E.F.; Hall, M.A.; De Klerk, G.J. Eds. Plant propagation by Tissue Culture. *Springer Berlin*, 115-173.
- Gordon, S.P.; Chickarmane, V.S.; Ohno, C.; Meyerowitz, E.M. 2009. Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem. *Natl Acad Sci USA*, 106(38): 16529-16534. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0908122106>
- Hernández, Y.; González, M.E. 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales Perennes. *Cultivos Tropicales*, 31: 4.
- Hoffmann, L.T.; Bittencourt, R.; Sperlich, C.L.; Grott, I.T. 2022. Germinação in vitro e *Raulinoa echinata* r. s. cowan (rutaceae): sementes e embriões zigóticos. *Ciência Florestal, Santa Maria*, 32(3): 1187-1204. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509837874>.
- Lencina, K.H.; Bisognin, D.A; Kielse, P; Pimentel, N.; Fleig, F.D. 2014. Establecimiento e crescimento in vitro de plantas de Grápia. *Ciência Rural*, 44(6): 1025-1030. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-8478201400060012>
- Levitus. 1997. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. (G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, & L. Mroginski, Eds.), ArgenBio. Buenos Aires, Argentina.
- Maruyama, E.; Ishii, K.; Kinoshita, I.; Ohba, K.; Saito, A. 1996. Micropropagation of Bolaina Blanca (*Guazuma crinita* Mart.), a Fast-Growing

- Tree in the Amazon Region. *Journal of Forest Research*, 1(4): 211–217. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02348327>
- Maruyama, E.; Ishii, K.; Kinoshita, I.; Ohba, K.; Saito, A. 1997. Micropropagation of *Guazuma crinita* Mart. by root and petiole culture. in vitro cellular and developmental biology – *Plant*, 33(2): 131–135. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-997-0011-0>
- Monfort, L.; Pinto, J.; Bertolucci, S.; Rossi, Z.; Silva, A.; SILVA, G. 2015. Micropropagação e germinação de sementes in vitro de atroveran. *Rev. Ceres, Viçosa*, 62(2): 215–223. DOI: <https://doi.org/10.1590/0034-737X201562020012>
- Moraes, R.M.; Cerdeira, A.L.; Lourenço, M.V. 2021. Using micropropagation to develop medicinal plants into crops. *Molecules*, 26(6):1752. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26061752>
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473–497. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Olszewska, D.; Kisiala, A.; Niklas-Nowak, A.; Nowaczyk, P. 2014. Study of in vitro anther culture in selected genotypes of genus *Capsicum*. *Turkish Journal of Biology*, 38:118-124. DOI: <https://doi:10.3906/biy-1307-50>
- Pereira, J.N.; Bon, E.P.S; Ferrara, M.A. 2008. Series em Biotecnologia v.1 e v.2 Rio de Janeiro: Escola de Química UFRJ. Tecnologia de bioprocessos. Séries em Biotecnologia (Vol. I).
- Ramírez, L.A.; Granados, J.E.; Carreño, N.E. 2014. Evaluación del efecto de tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio sobre segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth para el establecimiento del cultivo in vitro. *Funadacion Dialnet*, 5(1): 155-169.
- Revilla-Chávez, J.; Abanto-Rodríguez, C.; Guerra, W.; García, D.; Guerra, H.; Domínguez, G.; Carmo, I.L.G. 2021. Modelos alométricos para estimar el volumen de madera de *Guazuma crinita* en plantaciones forestales. *Scientia Agropecuaria*, 12(1): 25-31. DOI: <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.003>
- Ruiz, J. 2010. Determinación de la mejor concentración de ácido indolacético y ácido naftalenacético en la micropropagación de *Guazuma crinita*, Mart (*bolaina blanca*). Tesis de pre-grado, Universidad Nacional de Ucayali, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Pucallpa, Perú. 125pp.
- Sharry, S.; Adema, M.; Abedini, W. 2020. Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro. Editorial de la Universidad de la Plata.
- Tacoronte, M.; Vielma, M.; Olivo, A.; Chacin, N. 2017. Efectos de nitratos y sacarosa en la propagación in vitro de tres variedades de papa nativa. *Revista Colombiana Biotecnológica*, 19(2): 63-73. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.70160>
- Ticona, J.; Triguero, M.L. 2019. Evaluación de tres métodos de desinfección para el establecimiento in vitro de papaya (*Carica papaya* L.). *Estación experimental Sapecho*, 6(1): 24-29.
- Vageeshbabu, S.H.; Boopal, K. 2016. In-vitro organogenesis in tomato (*Solanum Lycopersicum*) using kinetin. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 4(6): 397-401.
- Uribe, M.E.; Ulloa, J.; Delaveau, C.; Sáez, K.; Muñoz, F.; Cartes, P. 2012. Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento in vitro de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Guayana Botanica*, 69(1): 105-112. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-66432012000100010>

- Villegas, P.P. 2008. Efecto del tiempo de exposición del hipoclorito de sodio sobre la germinación de semillas de bolaina (*Guazuma crinita*) en Condiciones de In Vitro. *Investigación Universitaria*, 4(1): 22-25. DOI: <https://doi.org/10.15406/apar.2016.04.00158>
- Xavier, A.; Wendling, I.; Silva, R. 2009. Silvicultura clonal: principios e técnicas. Viçosa, 57: 272p
- Xavier, A.; Wendling, I.; Silva, R. 2013. Silvicultura clonal: principios e técnicas. 2. ed. Viçosa: Editora UFV. 279 p.

**Recibido:** 15 de marzo de 2022 **Aceptado para publicación:** 30 de mayo de 2022