

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA
DEPARTAMENTO CIENCIAS DE LA TIERRA
ESCUELA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO PREVIO
A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA
AGROPECUARIA

TEMA:

**EVALUACIÓN DE LA FASE DE GERMINACIÓN *In vitro* EN
BALSA *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb.**

AUTOR:

VIERA CAMPAÑA LORENA PAOLA

DIRECTORA DEL PROYECTO:

ING. SANDRA LUISA SORIA RE MSc.

PUYO- PASTAZA- ECUADOR

2019-2020

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Viera Campaña Lorena Paola, con cédula de identidad 1850091024, declaro ante las autoridades educativas de la Universidad Estatal Amazónica, que el contenido del Proyecto de Investigación bajo el tema: “**Evaluación de la fase de germinación *In vitro* en balsa *Ochoroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb.**”, es absolutamente original, autentico y personal.

.....
Viera Campaña Lorena Paola

C.I: 1850091024

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Por medio del presente, Yo, Ing, Sandra Luisa Soria Re MsC. con C.I: 1800988212 Certifico que la egresada, Viera Campaña Lorena Paola, realizó el Proyecto de Investigación titulado: **“Evaluación de la fase de germinación *In vitro* en balsa *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb.”** previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria bajo mi supervisión.

.....
Ing, Sandra Luisa Soria Re MSc

C.I: 1800988212

DIRECTOR DE PROYECTO

**CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE
PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO
ACADÉMICO**

CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

El proyecto de investigación titulado: “**Evaluación de la fase de germinación *In vitro* en balsa *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb.**”, fue aprobado por los siguientes miembros del tribunal.

.....

Ing. Bélgica Dolores Yaguache Camacho, MSc.

PRESIDENTA DEL TRIBUNAL

.....

Ing. Ana Irene Olalla Valencia MSc

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....

Ing. Patricio Fabián Naranjo Delgado MSc

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO

Dios es la esencia para crear una vida en el mundo, a la cual le otorgó dones para juntar a dos seres humanos maravillosos que merecen mi agradecimiento por ser quienes comenzaron la historia de mi vida, mis padres por luchar contra las adversidades que ha tenido el tiempo y las pruebas que Dios ha colocado en sus vidas, para que yo esté en este momento en el lugar hasta donde he llegado; también velaron por mi educación y me enseñaron lo importante de la vida, para ser quien soy ahora y junto a ellos dos hermosos angelitos que hoy me siguen cuidando desde el cielo mis abuelitos.

También es muy grato el recorrer de la vida cuando conoces a personas tan bonitas a los que llamamos la “familia que uno escoge” como son mis amigos, por estar siempre apoyándome en cada momento que me veían decaída o triste por situaciones que hoy en día me han hecho crecer, gracias por estar siempre animándome a llegar a una de las metas de la vida y recordarme historias que nos marcaron y frases de “Cada día ser mejor”, porque son historias que guardan secretos de alegría, aventuras y tristeza.

El llegar a otro lugar donde no conoces es complicado pero es una de las aventuras que uno vive para crecer y demostrar que lo puede lograr todo, por ellos se merece mi mayor agradecimiento, mi nuevo hogar la Universidad Estatal Amazónica, en donde he tenido un sin número de experiencias buenas como el conocer a mi tutora Sandra Soria quien me ayudó a corregir y a mejorar en mi calidad de estudiante, también por estar presente y apoyarme en un momento complicado de mi vida. También a la Dra. Alina Ramírez quien me enseñó que hay que ser divertido en la vida y también a ser responsable, el guiar mis pasos en cada clase que me otorgo y agradecer también a la Dra. María Isabel Viamonte quien me entretuvo leyendo documentos para mi formación académica y que eso me ayudó a mejorar mi forma de hablar, por estirarme una mano cuando mi salud se vio afectada y permitirme compartir sueños en mi carrera en la gira; al Ing. Jorge Alba por estar al pendiente de que mis conocimientos sean asimilados y ayudarme en situaciones que me colocó mi vida, al ser como un soporte en situaciones que muchas veces me hacían decaer, como no olvidarme de la Dra. Rosaura Gutiérrez quien fue mi apoyo con sus ruedas vinculantes para no desmayar, ni olvidar mis sueños y a cada uno de los docentes que me enseñaron que soy capaz de transformar mis sueños y metas, en este proceso tan bonito que Dios me ha permitido vivir. Infinitas gracias a cada persona que aportó y sigue aportando en mi desempeño y educación, en cada momento de mi vida Dios les llene de muchas bendiciones.

DEDICATORIA

Este proyecto está dedicado:

A Dios por ser el autor primordial en cada momento de mi vida.

A las personas que han visto mi crecimiento y desarrollo a lo largo de ella, que lucharon día a día con cada una de las situaciones que el destino nos puso como familia y a pesar de cada adversidad hemos luchado por seguir adelante.

Les dedico este trabajo por ayudarme a cumplir con mis sueños poco a poco y han estado conmigo en momentos complicados de mi vida, también a mis dos angelitos mis abuelitos que desde el cielo me enviaron fuerzas, me dejaron consejos para seguir adelante y hacer que esta experiencia sea una parte de mi vida, la cual me deja llena de enseñanzas y con ganas de seguir aprendiendo en esta historia llamada vida.

Gracias
♥

RESUMEN

La germinación de semillas de balsa (*Ochroma pyramidale*) *in vitro* es una herramienta útil para la conservación y multiplicación de especies forestales de importancia económica, mediante la utilización de técnicas de cultivo *in vitro*. El principal objetivo fue: evaluar la germinación de la semilla y sus parámetros morfológicos en plántulas de balsa en condiciones *in vitro* con cuatro medios de cultivo. En el que se utilizó material de árboles semilleros certificados, las cuales se las sometió a la desinfección que se realizó con un medio estándar mediante inmersión de las semillas en alcohol por 1 minuto, y en una solución de cloro comercial al 20% por 20 minutos, luego se realizó cuatro enjuagues con agua destilada estéril; técnica que mostró un alto índice de contaminación después de 6 días; por esa razón, se modificó el procedimiento de desinfección de semillas mediante la adición de dos tipos de fungicidas Evito T y Thachigaren 36% LS a razón de $0,3 \text{ g.L}^{-1}$, cuatro minutos antes de concluir el proceso de desinfección con la solución de cloro comercial. Lográndose un medio de cultivo axénico hasta los 30 días de observación. Se probó cuatro tratamientos, con MS a dosis ($4,43 \text{ g.L}^{-1}$) y diluida ($2,215 \text{ g.L}^{-1}$), como medio líquidos y semisólidos con agar para la germinación de semillas, destacándose que el mejor tratamiento fue MS líquido con una dosis ($4,43 \text{ g.L}^{-1}$), con plántulas de mejor área foliar, con mayor desarrollo del tallo y raíces que fueron producidas con la finalidad de llevarlas a procesos de micropropagación *in vitro* para continuar con investigaciones biotecnológicas.

Palabras claves: Germinación, cultivo, *in vitro*, semillas, contaminación, tratamientos.

ABSTRACT

The germination of balsa seeds (*Ochroma pyramidale*) *in vitro* is a useful tool for the conservation and multiplication of forest species of economic importance, through the use of *in vitro* culture techniques. The main objective was: to evaluate the germination of the seeds and its morphological parameters in balsa seedlings under *in vitro* conditions with four culture media. The disinfection was performed with a standard medium by immersing the seeds in alcohol for 1 minute, and in a 20% commercial chlorine solution for 20 minutes, then four rinses were made with sterile distilled water; technique that showed a high pollution index after six days; for that reason, the seed disinfection procedure was modified by adding two fungicides: Evito T and Thachigaren 36% LS, at a dose of 0,3 g / l, added four minutes before concluding the disinfection process with the commercial chlorine solution. It was achieved an axenic culture medium after 30 days. Four treatments were tested, with MS media at full dose and diluted at 50%, as liquid and semi-solid culture media with agar for seed germination, highlighting that the best treatment was liquid MS with a full dose. that will produced seedlings of better foliar area, with greater height development of the stem and longer roots, in order to take them to *in vitro* micropropagation processes and to continue with biotechnological investigations.

Keywords: Germination, cultivation, in vitro, seeds, contamination, treatments.

TABLA DE CONTENIDOS

CAPITULO I.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	2
1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.4 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	4
1.5 OBJETIVOS.....	4
CAPÍTULO II FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	5
2.1 ANTECEDENTES.....	5
2.2 BASES TEÓRICAS.....	6
CAPÍTULO III METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	13
3.1 LOCALIZACIÓN.....	13
3.2 CONDICIONES CLIMATICAS.....	13
3.3 TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	13
3.4 MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN.....	14
3.5 MUESTRAS VEGETALES Y TRATAMIENTOS.....	14
3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	14
3.7 METODOLOGÍA.....	15
3.8 FACTORES DE ESTUDIO.....	18
3.9 PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	19
CAPÍTULO IV RESULTADOS.....	20
4.1 VIABILIDAD DE LA SEMILLA DE BALSA.....	20
4.2 CICLO DE GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE BALSA <i>In vitro</i>	21
4.3 CONTAMINACIÓN DEL MEDIO.....	21
4.4 PÁRAMETROS MORFOLÓGICOS DE LAS PLÁNTULAS DE BALSA.....	24
4.4.1 Experimento 1: Plántulas desarrolladas.....	24
4.4.2 Experimento 2: Plántulas germinadas.....	26

CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	32
5.1 CONCLUSIONES.....	32
5.2 RECOMENTACIONES	33
CAPITULO VII.....	34
BIBLIOGRAFIA	34
ANEXOS	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ubicación del experimento	13
Figura 2: Métodos de desinfección estándar y modificado para las semillas de balsa.....	17
Figura 3: Porcentaje de germinación	20
Figura 4: Contaminación del medio de cultivo	22
Figura 5: Contaminación del medio de cultivo	23
Figura 6: Contaminación del medio de cultivo	24
Figura 7: Parámetros morfológicos	25
Figura 8: Número de Raíces	27
Figura 9: Largo de las raíces.....	27
Figura 10: Diámetro del tallo.....	28
Figura 11: Altura de las plántulas.....	29
Figura 12: Número de hojas	30
Figura 13: Área foliar	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Compuestos químicos empleados en el Medio MS.....	11
Tabla 2: Tratamientos producto de la combinación de la concentración de sales MS y dosis de agente gelificante.	14
Tabla 3: Porcentaje de germinación	26

ÍNDICE DE ECUACIONES

1. Ecuación 1: Fórmula del diseño completamente aleatorizado	15
2. Ecuación 2: Fórmula del área foliar de la balsa.....	19

CAPITULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

La balsa, *Ochroma pyramidale* (Cav. ex. Lam.) Urb., es nativa de Sudamérica y frecuentemente se la encuentra en áreas intervenidas o degradadas (Rojas, 2011), ya que es uno de los árboles forestales que posee gran demanda a nivel internacional, la cual se cultiva de forma natural en especial en la selva subtropical del Ecuador.

La balsa es uno de los recursos forestales y maderables de mayor aprovechamiento, siendo de gran importancia económica para el país, por lo tanto, esta especie ha alcanzado casi el 95% de la cosecha mundial y hoy en día, a la madera se le da muchos usos comerciales y artesanales (Butterfield, 1995), que son fuentes de sustento de varias familias ecuatorianas tanto de la costa y la amazonia en donde se encuentran las características climáticas idóneas para el crecimiento y desarrollo de esta especie de interés comercial.

El Ecuador tiene características ambientales, de altitud y clima que han permitido el desarrollo de la balsa con características apreciadas y se ha convertido en una de las maderas más solicitadas por los principales exportadores del país, siendo así que casi un 10% sea de consumo interno y el resto se exporte a 45 países del mundo (Parra, 2015). Muchas especies forestales han disminuido su tala y otras han crecido en su aprovechamiento forestal, como es el caso de la balsa, que es un recurso maderero que no se ha cuidado con el establecimiento de plantaciones y esto ha conllevado al apareamiento de una serie de factores adversos como agentes patógenos, el cambio del clima y la pérdida de semillas que perjudican a este recurso que es una fuente de economía del país y de la región amazónica.

Por lo que la balsa es una especie requerida por sus características de rápido crecimiento, por tener un fuste limpio, corteza lisa, de hojas simples; alternas dispuestas en espiral de frutos capsulares alargados dehiscentes con semillas de forma esféricas, en donde la germinación de las semillas es un proceso fisiológico complejo (Méndez, 2000); debido a que los mecanismos que regulan la germinación están bajo presión, por la variación que tienen las semillas en función a sus condiciones de hábitat, así como por las características físicas o químicas que presenta el tegumento y su estructura sean difíciles de germinar con porcentajes bajos de 10% en semillas sin tratar (Beihefte, 1920), llegando a limitar la reproducción y propagación de esta especie (Rodríguez, Valdés y Rodríguez, 2012).

1.2 JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con López (2014), en la Amazonía ecuatoriana se encuentra una variedad de especies forestales extraordinarias, con alto valor natural y económico, conocidas entre las comunidades amazónicas con diferentes usos, tomando importancia las especies que tienen un crecimiento rápido y con madera que presente facilidad para ser trabajada, pues generan una fuente de ingresos para los artesanos de estas comunidades. Muchas de las especies forestales están siendo afectadas por la sobreexplotación del recurso maderero, por agentes patógenos, por cambios climáticos y por la pérdida de semillas a causa de su aprovechamiento como alimento por los animales del bosque, condiciones que están perjudicando a algunas de estas especies en cumplir su proceso fisiológico en especial, el de la germinación de sus semillas, peligros que llevan casi a su extinción; por lo tanto, se está implementando técnicas que permitan reproducir y masificar a las especies forestales como es el caso de la balsa que se utiliza en comunidades indígenas amazónicas.

Ochroma pyramidale, es una especie forestal tropical; admirada por su belleza, tamaño de hojas y en especial por su tallo que tiene una calidad de madera que es fácil para cortar y tallar, es liviana, pero mantiene una relación de materia prima resistencia-peso, por lo que se utiliza en la construcción de embarcaciones, maquetas, instrumentos musicales, embalajes, en la industria para la fabricación de palas aerogeneradoras, artesanía, entre otros usos que hacen de esta, una especie atractiva para establecerla como un cultivo que genera buenos ingresos económicos (Jiménez et al., 2017).

La balsa es originaria de la Amazonía ecuatoriana y esto ha sido muy discutido, entre las comunidades y regiones, ya que las semillas de balsa muchas veces, salen de la Amazonia a las zonas costeras, para mantener estos cultivos que son de rápido crecimiento y de diferentes usos entre las comunidades, pues posee la cualidad de madurar temprano fisiológicamente y por lo tanto es utilizada para su aprovechamiento y reforestación de zonas afectadas por la tala de bosques en nuestro país, en la que la explotación forestal genera un gran impacto sobre la biodiversidad.

Parra (2015) señala que la balsa ecuatoriana por sus características ambientales, de altitud y clima es considerada la mejor y es una de las más solicitadas para exportación siendo el Ecuador el principal exportador con 80 y 90% del volumen exportado, dándole al país un incentivo y crecimiento en la producción de la balsa, esta se destina para el consumo interno en el Ecuador el 10% y el resto se dirige para la exportación a cerca de 45 países.

Las semillas debido a las características físicas y químicas del tegumento muestran estructuras y consistencia compactas e impermeables al agua y gases, que inhiben de forma mecánica y química la germinación, por lo que es una limitante en la propagación de especies, que poseen semillas con tegumento de este tipo una vez deshidratada pierde la viabilidad (Rodríguez et al., 2012); las semillas cumplen una serie de procesos fisiológicos para entrar en el proceso de latencia y la germinación sólo se produce cuando hay rompimiento del tegumento, en el caso de las semillas de balsa está cubierta por una lana amarillenta y sedosa también poseen un tegumento duro (Rojas y Torres, 2019) condición que no permite a las semillas fijarse fácilmente al suelo, por lo que estudios de procesos de germinación *in vitro* a través de semillas están ayudando a esta especie forestal para reproducir y masificar a la balsa (Rodríguez et al., 2012).

Una de las alternativas que se propone para ayudar a las especies forestales es a través de la germinación *in vitro* de semillas, las cuales se colocan en condiciones óptimas y con procesos de desinfección que permitan mantener la sanidad de las especies forestales y favorecer un óptimo desarrollo; también ayuda a conservar plántulas con variabilidad genética para la conservación de germoplasma de árboles semilleros y además es un método que permite la germinación de semillas que de forma natural no lo hacen o son muy difíciles en condiciones normales, manejando especies que tienen un alto valor ecológico y económico como es el caso de la balsa, y también se destaca la ventaja que en la germinación *in vitro* se puede realizar procesos de germinación en grandes cantidades, reducir el tiempo y homogenizarla (Rojas y Torres, 2009). Además, lograr plantas de balsa germinadas en condiciones asépticas permitiría, pasar a procesos de micropropagación sin que la desinfección de las yemas apicales o internodales sea una limitante.

1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El árbol de balsa (*Ochroma pyramidale*) crece de forma natural en el Ecuador y su producción es una fuente económica para el país, por lo que su consumo se ha incrementado, gracias a las características que representa esta madera y su crecimiento rápido, por lo que los rodales existentes en la Amazonia son de regeneración natural en su mayoría. Pero cuando se plantea la siembra de balsa, muchas veces se lo hace en lugares sin tomar en cuenta las condiciones que requiere y a su vez el manejo a las semillas que tienen una cosecha estacional de agosto a octubre no siempre proviene de árboles semilleros ni fue seleccionada en función de los parámetros para la producción de la misma, además que al tratar de conservar la semilla esta va perdiendo su poder germinativo a causa de la deshidratación y

daño del embrión, por lo que disminuye el porcentaje de germinación, pero además existen reportes sobre el apareamiento de agentes patógenos que perjudican este proceso o dañan la semilla impidiéndola germinar, se han hecho varias investigaciones sobre escarificación de semilla para mejorar su capacidad germinativa y procesos de micropropagación en condiciones de la Costa utilizando yemas apicales cuyo proceso de desinfección para la introducción *in vitro* ha sido complicada.

1.4 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cómo obtener plántulas de balsa (*Ochroma pyramidale*) germinadas *in vitro* con la influencia de cuatro medios de cultivo Murashige y Skoog (MS) modificados?

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 General

Evaluar la germinación de la semilla y sus parámetros morfológicos en plántulas de balsa *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. en condiciones *in vitro* con cuatro medios de cultivo.

1.5.2 Específicos

- Describir el ciclo de germinación de la semilla *O. pyramidale* en condiciones *in vitro* con cuatro medios de cultivo.
- Evaluar los parámetros morfológicos en plántulas de balsa en condiciones *in vitro* de acuerdo al medio de cultivo.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 ANTECEDENTES

Ochroma pyramidale es una especie forestal y maderera que a través del tiempo ha mostrado un gran crecimiento en mercados nacionales como internacionales, en el Ecuador se cultiva de manera natural y para reforestaciones en especial para selvas o fincas agroecológicas, por lo tanto se ha convertido en uno de los rubros económicos de importancia para el país; siendo conocida como balsa ecuatoriano, ya que alcanzó un alto nivel de desarrollo, desde su reforestación hasta su posterior transformación, otorgándole así ser una de las maderas de calidad reconocidas a nivel mundial (González et al., 2010).

García et al., 2017 señala que el Ecuador posee más de 20 000 hectáreas de plantaciones entre bosques naturales y reforestados que permiten cubrir la demanda de esta especie, que es una excelente opción para un inversor a corto plazo debido a que la balsa es una especie muy demandada y gracias a los usos que se le da a esta madera.

También por sus características como una altura de 18 a 25 m, tener un tronco cilíndrico y recto, con corteza lisa por lo que es un recurso de explotación, que constantemente se está regenerando en regiones en las que se las cultiva para procesarlas y cultivarlas posteriormente (Moral, 2013). Pues es un recurso renovable en el que la tala no daña al medio ambiente, ni se encuentra en vías de agotamiento como recurso natural o en peligro de extinción, sino al contrario va aumentando su demanda y mejorando su disponibilidad año tras año.

Por lo que es importante destacar que no se ha investigado sobre temas de reproducción, ni plantación *in vitro* de balsa y otras especies de importancia en la Amazonia, que son una fuente de sustento para las familias a través de diversas transformaciones que los pueblos locales e indígenas amazónicos le dan a la especie forestal, que les permita mejorar su calidad de vida y conocer alternativas de siembra de esta especie, la cual tiene una de las mejores cualidades que a nivel del país es muy solicitada, por un sinnúmero de cualidades que la hacen superior a muchos productos que permiten generar ingresos a los pueblos amazónicos y que sean alternativas de regeneración para mantener fincas ecológicas sostenibles y sustentables a través de procesos biotecnológicos en la balsa.

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 Descripción de la especie y clasificación taxonómica

Ochroma pyramidale es conocida comúnmente como balsa, guano, corcho, lana, pau de balsa y bois flot, es una planta colonizadora importante para el realce del bosque secundario. Es una especie de crecimiento rápido produce una madera de muy baja densidad que se usa para juguetes, artesanías, chapas de interiores y material aislante (Urbano,1920).

Según Whitmore y Wooh-Khoon (1983) presenta la siguiente clasificación: Reino: Plantae, division: Spermatophyta/Magnoliophyta, clase: Magnoliopsida, orden: Malvales, familia: Malvaceae (Bombaceae), género: *Ochroma*, especie: *pyramidale*. **Nombre científico:** *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb.

2.2.2 Generalidades de la especie

El árbol de *O. pyramidale* alcanza hasta 30 m de altura a 70 m de DAP, también presenta un fuste limpio, de corteza lisa y un color grisáceo a café con manchas blanquecinas de tronco recto y cilíndrico con raíces tablares grandes y en profundidad las raíces son fasciculares, de hojas simples y alternas dispuestas en espiral, pubescentes por el peciolo casi del tamaño de la lámina foliar; presenta flores grandes, blancas y campanuladas, los frutos capsulares alargados dehiscentes con semillas de forma esférica de 4 a 5 mm de diámetro rodeadas por una lana (Jiménez et al., 2017). La germinación de las semillas es un proceso fisiológico causado por la imbibición de agua después de los posibles mecanismos de latencia y la velocidad de germinación ocurre en la mayoría de las especies que se reproducen por semilla por lo que las condiciones ambientales y los microorganismos influyen en la germinación, crecimiento y desarrollo de la balsa.

2.2.3 Condiciones de adaptación

Vinueza (2012) menciona que las condiciones que requiere la balsa para su adaptación son altitud, clima y suelos:

Altitud: Crece en forma adecuada de 0 a 1800 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.)

Clima: Requiere de una temperatura media de 20 a 28°C, lluvia anual: 1000 a 4000 mm. Es exigente en luz y tolera períodos de sequía de hasta 4 meses, solo cuando la humedad atmosférica no es menor a 75%.

2.2.4 Aspectos fenológicos de la especie

La balsa tiene un follaje perennifolio y una floración que dura 6 meses, son solitarias, las flores son hermafrodita, vistosas, fragmentadas, grandes, de 10-15 cm de largo y 7-9 de diámetro, con pétalos blanquecinos a amarillo pálido con bordes marrón, los frutos se recolectan entre los meses de julio a octubre (Directorio Forestal Maderero (DFM), 2018).

2.2.4.1 Semillas

Las semillas de balsa deben ser almacenadas o conservadas en lugares con buena aireación, su dispersión es ornitoquiropterócora por aves o murciélagos frugívoros, las semillas llegan a germinar 8 días como promedio y muestran un 70% de germinación. La recolección o extracción de frutos se cosechan semiverdes y al secarse al rayo del sol adquieren un color café-rojizo, el cual se obtiene al quinto día. Las semillas no requieren tratamiento pregerminativo, solo se lavan y se secan (Beihefte, 1920).

2.2.4.2 Forma de la semilla

Las semillas de balsa son abundantes en las cápsulas recubiertas de lana, son de forma ovoide, de 3 a 5 mm de diámetro (Villareal et al., 2012).

2.2.4.3 Producción y diseminación

Las cápsulas que contienen la semilla cuando maduran se rompen en 5 partes, exponiendo una masa de fibras blancas y sedosas, en donde se encuentran las pequeñas semillas de color café-rojizo, se contó un promedio de 950 semillas por cápsula y éstas son acarreadas por el viento y probablemente por el agua; también, las semillas no se ven dispensadas mucho más allá de la extensión de la copa de los árboles (Francis y Lowe, 2000), pero también se dispersan a través de aves y murciélagos (Beihefte, 1920).

2.2.4.4 PRETRATAMIENTO DE LAS SEMILLAS

La capacidad de germinación en las semillas de balsa no tratadas es baja, para lograr mejores resultados se recomienda tratarlas con agua hirviendo por 30 a 60 segundos dejando las semillas en agua hasta que se enfríen por 15 minutos (DFM, 2018). Sin embargo, se han probado también tratamientos pregerminativos físicos como la escarificación por medio del lijado de las semillas (Jiménez et al., 2017)

2.2.4.5 GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO

La germinación de la *O. pyramidale* sin tratamientos en condiciones naturales, presenta una tasa de germinación baja de 10 a 15%, esta inicia a los 7 días después de sembrada y finaliza de 12 a 20 días después y en semillas tratadas llega a germinar hasta 70% e inicia a los 3 o 4 días después de la siembra (DFM, 2018).

2.2.4.2 Propagación

Vinueza (2012) y Beihefte (1920) alegan que la balsa al ser hermafrodita muestra dos tipos de reproducción: reproducción asexual: Difícil propagación por esquejes, inexistente en algunos casos, estudios preliminares de micropropagación y la reproducción sexual por semilla para la obtención de plántulas.

2.2.5 Importancia ecológica

Es una especie secundaria, muy apropiada para introducir su cultivo en zonas de vegetación secundaria y terrenos abandonados (producto de roza-tumba-quema). Forma generalmente rodales puros (Beihefte, 1920).

2.2.6 Germinación de semillas

La germinación inicia con la entrada del agua a la semilla (imbibición) y finaliza con el comienzo de la elongación de la radícula. En condiciones de laboratorio, la posterior rotura de las cubiertas seminales por la radícula es el hecho que se utiliza para considerar que la germinación ha tenido lugar (criterio fisiológico). En cambio, en el campo no se considera que la germinación ha finalizado hasta que se produce la emergencia y desarrollo de una plántula normal (Pita y Pérez, 1989).

Las plántulas de balsa poseen germinación epigea, pues los cotiledones emergen del suelo debido de un considerable crecimiento del hipocótilo (porción comprendida entre la radícula y el punto de inserción de los cotiledones). Posteriormente, en los cotiledones se diferencian cloroplastos, transformándolos en órganos fotosintéticos y, actúan como si fueran hojas. Finalmente, comienza el desarrollo del epicótilo (porción del eje comprendida entre el punto de inserción de los cotiledones y las primeras hojas) (López, 2014).

2.2.7 Tipos de semillas

2.2.7.1 Semillas ortodoxas

Las semillas ortodoxas adquieren tolerancias a la deshidratación durante su desarrollo y pueden almacenarse en estado seco, por períodos predecibles y bajo condiciones específicas. A no ser que estén debilitadas por hongos con tolerancia cero en almacenamiento, las semillas deben mantener un alto vigor y viabilidad por lo menos desde la cosecha hasta la siguiente temporada de cultivo. Por lo que cualquier semilla que no se comporte de esta manera no es ortodoxa y de hecho las semillas de un gran número de especies tropicales pueden ser no ortodoxas o ser intermedias (Peña, 2018).

2.2.7.2 Semillas recalcitrantes

Son aquellas que pasan por un corto o ningún secado de maduración, y permanecen sensibles a la deshidratación, tanto en desarrollo como en su desprendimiento, sin embargo, esta situación es mucho más compleja debido a la amplia gama de variabilidad entre semillas recalcitrantes, ya que al poco tiempo de ser colectadas y extraídas del fruto pierden la viabilidad y ya no germinan y si se va a multiplicar hay que ponerlas a germinar muy rápido para que no se pierdan (Peña, 2018).

2.2.8 Aplicaciones de la germinación *in vitro* de semillas

López (2014) manifiesta que la germinación de semillas bajo condiciones controladas que simulan los parámetros óptimos naturales, ya que, en muchas ocasiones, es difícil hacerlo en condiciones normales. Por otra parte, muchas semillas se encuentran en estado de dormición y en condiciones controladas en el laboratorio es posible romper esa dormición y estimular su germinación, esto a través de un medio de cultivo aséptico.

2.2.9 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de plantas o tejidos vegetales se define como el cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles de partes de una planta, semillas, embriones, órganos, explanes. Se caracteriza porque ocurre a micro escala sobre una superficie pequeña, se optimiza las condiciones ambientales y además se elimina por completo la presencia de microorganismo y organismos patógenos o plagas (Pierik, 1990).

Según Roca y Mroginski (1993) las técnicas de micropropagación se agrupan en cinco etapas definidas: la etapa cero en la que selecciona el material con el que se va a trabajar, la etapa

uno o de establecimiento, la etapa dos de multiplicación, etapa tres de enraizamiento, y la etapa cuatro denominada acondicionamiento y aclimatación o plantas vigorosas trasferencia final a campo se realizan con la finalidad de obtener plantas vigorosas. Pierik (1990) reporta que las técnicas de cultivo de semillas *in vitro* dan un giro en la experimentación debido a modificaciones que se realizan en el cultivo *in vitro* de las semillas con la finalidad de obtener plántulas sin contaminaciones y poder utilizarlas como explantes para la fase uno de multiplicación o proliferación dentro la micropropagación.

2.2.10 Medio de cultivo

Una vez que se ha determinado el objetivo del cultivo *in vitro* es necesario seleccionar un medio de cultivo que contenga todos los elementos necesarios para obtener la respuesta deseada, estos pueden ser semisólidos o líquidos.

En lo que un medio de cultivo debe ser fuente de carbono, nutrimentos minerales, vitaminas, agente gelificante, reguladores de crecimiento entre otros compuestos. Por cuanto a los nutrimentos minerales se deben incluir macroelementos como el carbono, hidrógeno, oxígeno, fosforo, potasio, nitrógeno, calcio, magnesio y azufre, y los microelementos como el boro, zinc, manganeso, cobre, molibdeno, hierro, cloro; también las vitaminas son un elemento más del medio de cultivo, pero no son indispensables (Roca y Mroginski, 1993). Por lo que se utiliza como medio estándar Murashige y Skoog (1962) por ser el más completo cuya constitución química se resume en la tabla 1. Además, hay que considerar la inclusión dentro de este medio de las vitaminas que son cuatro mioinositol, ácido nicotínico, piridoxina y tiamina HCl.

Tabla 1: Compuestos químicos empleados en el Medio MS

Compuestos (mg l ⁻¹)	Murashige y Skoog (MS)
NH ₄ NO ₃	1,65 g.L ⁻¹
KNO ₃	1,9 g.L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,37 g.L ⁻¹
CaCl ₂	0,33 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,17 mg.L ⁻¹
H ₃ BO ₃	6,2 mg.L ⁻¹
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3 mg.L ⁻¹
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	83,6 mg.L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	025 mg.L ⁻¹
CuSo ₄ . 5H ₂ O	0,025 mg.L ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025 mg.L ⁻¹
KI	0,83 mg.L ⁻¹
FeSo ₄ .7H ₂ O	27,85 mg.L ⁻¹
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,27 mg.L ⁻¹

FUENTE: Pelacho, Closas y Sanfeliu, 2005.

2.2.10.1 Agente gelificante

La propiedad de un agente gelificante primordialmente es que resiste la esterilización por medio del autoclavado; los agentes gelificantes utilizados en el cultivo *in vitro* de organismos vegetales son agar, agarosa, Gelrite y Phytigel (Bhojwani & Razdan, 1996). Debergh, 1982 menciona que los medios semisólidos comúnmente se adiciona agar (0,6% a 1,0%), en lo que se debe tomar en cuenta la presencia de impurezas de la naturaleza, la marca comercial y concentraciones del agar pueden alterar las respuestas *in vitro* de los cultivos (Roca & Mroginski, 1991).

2.2.10.2 pH del medio

El pH es importante ya que interviene en la solubilidad de las sales, disponibilidad de nutrientes y la gelificación adecuada del medio (Sathyanaraya, 2007). El pH del medio debe ser ajustado antes de ser autoclavado, a valores comprendidos entre 5,5 y 6,0; la variación en el valor del pH se logra añadiendo pequeñas cantidades de diluciones preparadas, principalmente de NaOH O HCl, a concentraciones 0,1 o 1,0 N. Un medio de cultivo que su

pH es inferior a 5,5 no gelifica apropiadamente, uno con pH a 6,0 es demasiado firme (Paul, 2012).

2.2.10.3 El recipiente de cultivo

El recipiente es importante para evitar contaminaciones, ya el aire debe estar libre de patógenos, para lo cual se lo esteriliza mediante autoclavado y son sellados con tapas que permiten el intercambio gaseoso (Pérez, 2006).

2.3 Experiencias de germinación de semillas *in vitro*

Existen un sinnúmero de trabajos sobre germinación de semillas *in vitro* mayoritariamente en orquídeas, pero se destacan algunos con especies forestales:

Se destaca el estudio de *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees en la que estas semillas mantienen su poder germinativo solo por períodos cortos de tiempo, en donde se determinó el efecto a diferentes concentraciones y tiempos de desinfección con hipoclorito de sodio por 20 y 30 min en las que se evaluó el número de semillas germinadas y libres de contaminantes microbianos a los 10 días de cultivo (García-Ramírez et al., 2007).

Otra experimentación además de la desinfección probó que la micropropagación vegetal es una herramienta útil para la conservación de especies en riesgo de extinción, como es el caso de Cinchona, planta de la que se extrae la quinina, con el objetivo de estudiar la propagación como es el caso de la *Cinchona officinalis* L cuya semilla se desinfectó con hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones y tiempos de inmersión, previa a la siembra en medio de cultivo MS semisólido suplementado con GA con la finalidad de obtener el mayor porcentaje de germinación sin contaminación (Lima et al., 2018).

En lo que respecta a investigaciones que realicen la germinación *in vitro* podemos encontrar la investigación de las pasifloras cultivadas *in vitro*, ya que esta investigación tiene fines de utilizar a las plantas logradas por la germinación como explantos para la micropropagación, sometiénolas a la alternancia de temperatura (Severin et al., 2004).

Así también las investigaciones a base de la germinación *in vitro* de Moringa en la que se sembró dos experimentos de germinación con y sin testa en medios basales líquidos compuestos de agua (control) y sales de Murashige y Skoog (MS) en su concentración original o diluido al 50 y 25%, con 0, 15 y 30 g l⁻¹ de sacarosa. Se evaluaron los porcentajes de germinación, indicadores de vigor y crecimiento en plántulas. (Luna, 2019).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 LOCALIZACIÓN

Las actividades referentes a la germinación *in vitro* de semillas de balsa se realizaron en los laboratorios de Biología y Biotecnología de la Universidad Estatal Amazónica, ubicados en la sede Central de la misma, en la ciudad de Puyo, Km 2,5 de la vía Puyo Tena; y, en el Centro de Investigación, Posgrado y Conservación (CIPCA), localizado en el Cantón Arosemena Tola, Provincia de Napo; en el Km 44 vía Puyo – Tena, respectivamente. Los dos laboratorios constituyen espacios estratégicos para la investigación en temas biotecnológicos (Anónimo, 2017).



Figura 1: Ubicación del experimento

Fuente: Viera, 2019.

3.2 CONDICIONES CLIMATICAS

Los laboratorios están climatizados y mantienen una temperatura constante de 22 °C con un porcentaje de humedad relativa que oscila alrededor del 80%.

3.3 TIPO DE INVESTIGACIÓN

La investigación fue de tipo experimental ya que integró actividades metodológicas, bajo condiciones de laboratorio para el proceso de germinación *in vitro* de semillas de balsa utilizando cuatro medios de cultivo diferentes.

3.4 MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN

El método de investigación utilizado fue también experimental pues integra en el proceso un diseño completamente aleatorizado, en el que se mide la causa y efecto, a través de las variables independientes y dependientes respectivamente, como sucede en esta investigación, donde se evaluó la germinación de las semillas y los parámetros morfológicos de las plántulas, bajo condiciones controladas del laboratorio, en los cuatro tratamientos constituidos por medios de cultivo MS en donde se modificó la concentración de las sales y por la presencia o ausencia de agar en el medio como agente gelificante.

3.5 MUESTRAS VEGETALES Y TRATAMIENTOS

Se trabajó con semillas de balsa de árboles semilleros desinfectadas con Vitavax ®. Para la germinación *in vitro*, las semillas fueron cultivadas en cuatro medios de cultivo con sales Murashige y Skoog (MS) modificados: se empleó la concentración estándar del medio que corresponde a 4,43 g.L⁻¹ y otra en la que se utilizó el 50% de esta concentración equivalente a 2,215 g.L⁻¹ por dos contenidos de agar a razón de 0,6% y 0% correspondientes a medios gelificados y líquidos en cada caso. El esquema del experimento con un diseño completamente aleatorizado, se resume en la tabla 2.

Tabla 2: Tratamientos producto de la combinación de la concentración de sales MS y dosis de agente gelificante.

Tratamientos	Medio	Agente gelificante
T1	MS (4,43 g)	Agar (0,6%)
T2	MS (4,43 g)	Sin Agar (0)
T3	MS (2,215 g)	Agar (0,6%)
T4	MS (2,215 g)	Sin Agar (0)

Elaborado: Viera, 2019.

3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la investigación se analizó los datos mediante un diseño completamente aleatorizado, el cual tiene 4 tratamientos con 10 unidades experimentales por cada uno, con cinco semillas dentro de cada frasco. Los datos de las variables evaluadas fueron sometidos al análisis de

varianza (ANOVA) como se detalla en la ecuación 1 y la separación de medias se efectuó a través de la prueba de rango múltiple de Tukey, para el valor $p \leq 0,05$.

Ecuación 1: Fórmula del diseño completamente aleatorizado

$$y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

μ : media general

T_i : Efecto de los tratamientos con diferentes dosis de MS.

ϵ_{ij} : Error atribuible a la germinación

Fuente: García y Leal, 1998.

3.7 METODOLOGÍA

Como fase preliminar se realizó pruebas de germinación de las semillas de balsa disponibles, para determinar el poder germinativo de las mismas y el comportamiento previo. En el cual se puso a germinar 60 semillas divididas en tres cajas Petri, con 20 semillas en cada una, con una cama de algodón, embebida con agua, a estas se las vigiló por un período de 15 días (anexo 1).

En el experimento 1, se probó medios MS a razón de $4,43 \text{ g.L}^{-1}$, azúcar al 3% semisólidos con agar al 0,6% y líquidos sin agar (Tabla 2).

Debido al elevado porcentaje de contaminación se planteó el experimento 2, en el que se decidió eliminar el azúcar y probar medios MS con $4,43 \text{ g.L}^{-1}$ y $2,215 \text{ g.L}^{-1}$, líquidos (sin agar) y semisólidos con agar a dosis de 0,6% (Tabla 2). Pero además se limpió el laboratorio, se retiraron los frascos contaminados que se autoclavaron previo al lavado y se repitió el procedimiento.

En el laboratorio se preparó 400 ml de medio para cada uno de los tratamientos probados (anexo 2 y 3), que se dispensaron en 10 frascos autoclavables para cada tratamiento, con 40 ml por frasco (anexo 4).

También se ajustó el pH de los medios entre 5,6 -5,7 para esterilizar los 10 frascos de cada tratamiento previamente sellados en autoclave a 110 °C y 1 atmósfera de presión por 20 minutos (anexo 5).

Se realizó la selección de la semilla, las cuales debían tener forma esférica de 4 a 5 mm de diámetro (anexo 8) según Villareal et al., 2012.

Las semillas se sometieron a la fase de desinfección utilizando el procedimiento estándar (Pierik, 1990) en los experimentos 1 y 2 para finalmente modificar el procedimiento de desinfección estándar con el uso de dos fungicidas como prueba preliminar para una futura experimentación sobre desinfección de semillas y/o explantes; mediante la adición de Evito T en su dosis de 0,3 g.L⁻¹ y Tachigaren 36% LS en una dosis de 0,3 g.L⁻¹ que fueron agregados a la solución de cloro comercial, al faltar 4 minutos del período probado que fue de 20 minutos, y al final se procedió a realizar los cuatro enjuagues con agua destilada estéril como se aprecia en la figura 2, por la alta contaminación que presentaban las unidades experimentales.

Posteriormente, se ingresaron los materiales a la cámara de flujo laminar (anexo 6) con las debidas normas de asepsia y se realizó la siembra de las semillas en los diferentes tratamientos. En cada frasco se colocaron 5 semillas sobre torundas de algodón en el caso de los medios líquidos o sobre la superficie del medio de cultivo para los tratamientos con medio semisólido.

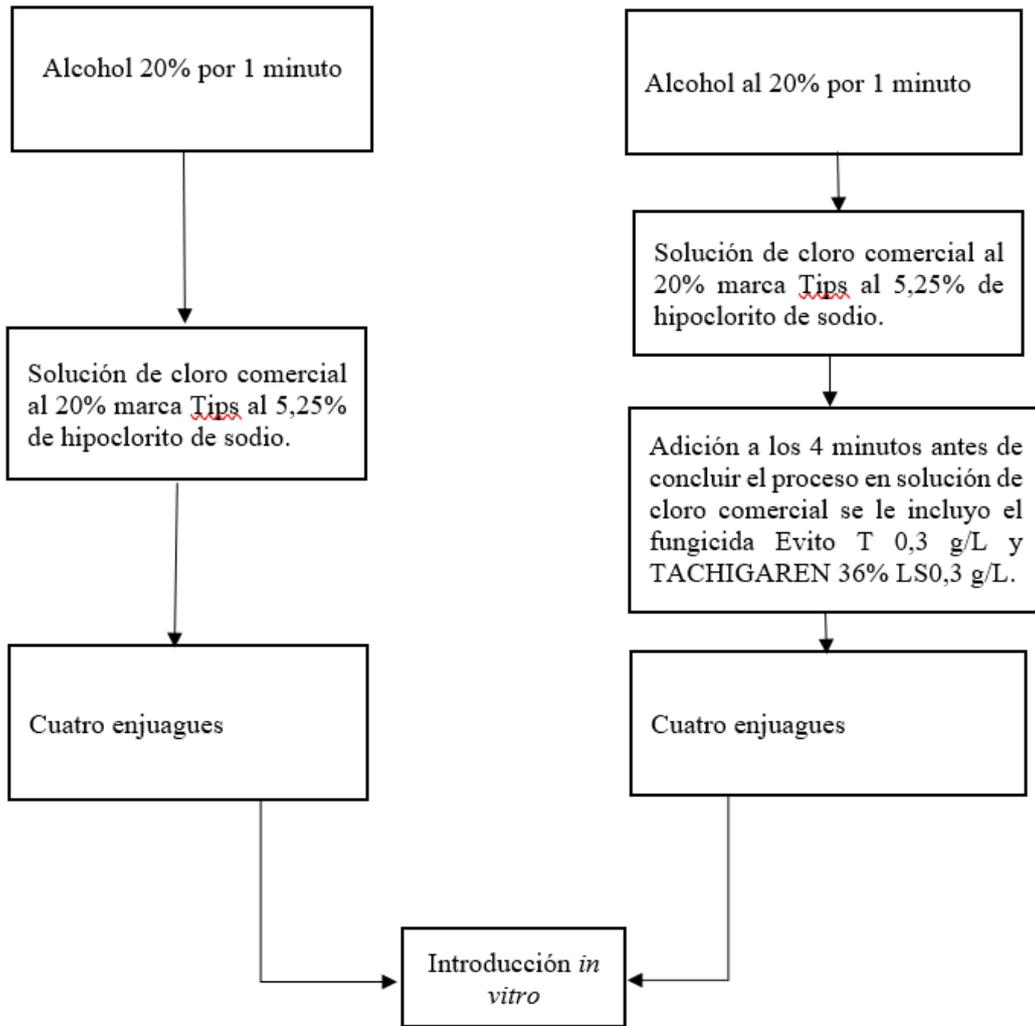


Figura 2: Métodos de desinfección estándar y modificado para las semillas de balsa

Elaborado: Soria, 2019.

Se procedió a la observación de las semillas y se tomó datos de contaminación diariamente, en cada uno de los tratamientos; al observarse unidades experimentales con la presencia de colonias de microorganismos en el medio de cultivo, luego de haber procedido a la siembra bajo condiciones asépticas, se eliminaban los frascos del área de crecimiento (anexo 7), para posteriormente, los frascos que no estaban contaminados y lleguen a la fase de plántulas se puedan realizar la toma de datos morfológicos a los 20 días.

Las unidades experimentales no contaminadas, pasaron al proceso de evaluación para determinar el porcentaje de germinación hasta los 15 días de la siembra, y se les dejó 5 días más en evaluación hasta que las plántulas germinadas tuvieran sus primeras hojas verdaderas completamente desarrolladas. Posteriormente se evaluó sus parámetros morfológicos los

cuales fueron número de raíces, largo de las raíces, diámetro del tallo, altura de la plántula, número de hojas, largo y ancho de las hojas para el cálculo del área foliar (anexo 9); y así, ver como reaccionaron a la germinación y el tamaño que alcanzaron al momento de la evaluación.

3.8 FACTORES DE ESTUDIO

3.8.1 Variables independientes

Cuatro medios de cultivo *in vitro*, variantes de Murashige y Skoog (1962)

3.8.2 Variables dependientes

Viabilidad de la semilla de balsa: Se determinó la viabilidad de la semilla a través del porcentaje de germinación por medio de pruebas preliminares para observar el poder germinativo de las semillas de material utilizado, para ello se puso a germinar 60 semillas en tres cajas Petri con 20 semillas en cada caja, sobre un sustrato de algodón e hidratado apropiadamente con agua, por un período de 15 días.

Contaminación del medio (%): Se determinó en forma visual, los frascos contaminados se retiraron del área donde se ubicaron los frascos para la germinación y crecimiento de las plántulas. Se calculó el porcentaje de contaminación para el experimento, en función de la aparición de colonias de microorganismos en el medio de cultivo y la eficiencia de los procesos de desinfección.

Tiempo a la germinación: se contabilizó los días hasta la emisión de la plúmula y la radícula.

Porcentaje de germinación de las semillas: Se determinó en función del número de plántulas en el período de evaluación.

Altura de la planta (cm): Con ayuda del calibrador se midió desde el cuello de la raíz hasta el ápice de la plántula

Diámetro del tallo (mm): con la ayuda de un calibrador se midió el diámetro de tallo.

Número de hojas: Se contabilizó el número de hojas

Largo y ancho de las hojas (cm): Se midió el largo y el ancho de las hojas desarrolladas con la ayuda de una regla.

Área foliar (cm): Se midió y multiplicó el largo y ancho de las hojas y el resultado se multiplico por el factor 0,75.

Ecuación 2: Fórmula del área foliar de la balsa

$$AF = L \text{ (cm)} \times A \text{ (cm)} \times 0,75$$

AF: Área foliar

L: largo de la hoja (cm)

A: ancho de la hoja (cm)

0,75: factor de corrección

Número de raíces: Se contabilizó el número de raíces desarrolladas.

Largo de Raíces (cm): Se midió la longitud de la raíz con la ayuda de una regla por debajo de la placa Petri, desde el cuello de la raíz hasta el meristemo radicular.

3.9 PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se utilizó estadística descriptiva para la determinación de los porcentajes de germinación de las semillas de balsa, porcentajes de contaminación de los frascos en cada experimento. Así mismo, para la descripción morfológica de los promedios, de las plántulas de balsa germinadas en el experimento 1.

En la evaluación del experimento 2, se utilizó el análisis estadístico de los datos a través del Software Infostat para las variables morfológicas de las plántulas de balsa germinadas; utilizando el análisis de varianza ANOVA y además la Prueba de Rango Múltiple de Tukey a $p \leq 0,05$ para la separación de medias en las variables. Parámetros similares se agruparon en figuras.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 VIABILIDAD DE LA SEMILLA DE BALSA

Las pruebas de viabilidad de la semilla de balsa (*Ochroma pyramidale*) se realizaron con la finalidad de saber el poder germinativo que tenían las semillas, debido a que llevaban 6 meses en refrigeración, y una de las características de esta especie, es que, al transcurrir el tiempo, su semilla va perdiendo la viabilidad. Es así que se obtuvo un valor promedio del 40% de poder germinativo, con un máximo del 50% y un mínimo del 25% como se aprecia en la figura 3, con semillas evaluadas por un período de 15 días; tiempo en el cual las semillas germinadas ya llegaron a un estado de plántulas con dos hojas verdaderas, con lo cual se verifica que las semillas de balsa pertenecen al rubro de semillas recalcitrantes, al ser sensibles a los cambios de temperatura y pérdida de humedad (Nieto y Rodríguez, 2003). Además, la selección del calibre de la semilla es de 4 a 5 mm que favorece la germinación, lo que coincide con los resultados de Ruiz, Muñoz, Guzmán, Velázquez Rodríguez, Días, Martínez y Almeida, (2018).

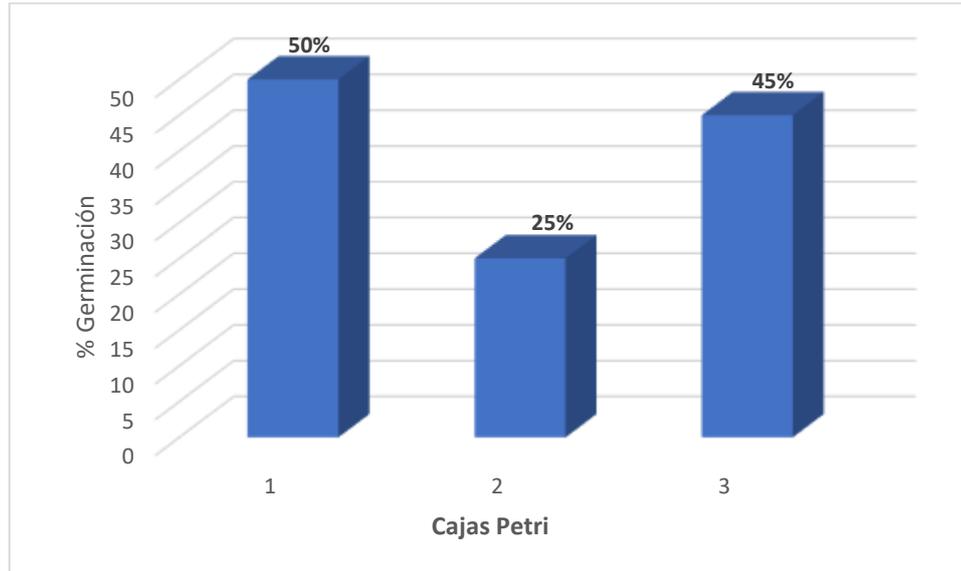


Figura 3: Porcentaje de germinación

Elaborado: Viera, 2020.

4.2 CICLO DE GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE BALSA

In vitro

El ciclo de la germinación de las semillas de balsa dura de 15 a 20 días, el proceso comienza con la imbibición de agua por parte de la semilla, cuyas características fueron: muestra un ligero hinchamiento y rotura de los tegumentos por parte de la testa en los primeros 3 días, posteriormente aparecen las raíces y empuja la testa para emitir la plúmula hasta los 6 días; para continuar con el desarrollo morfológico y emitir sus primeras hojas entre los 12 a 17 días posteriores a la aparición de la testa, mostrando similar comportamiento en los experimentos 1 y 2.

4.3 CONTAMINACIÓN DEL MEDIO

Se evaluó en forma visual a través de la observación de las colonias desarrollada en el medio de cultivos y que fueron: el micelio desarrollado en las colonias de hongos tuvo una apariencia algodonosa de color blanco, y que al observarlos con el frasco invertido presentaban una coloración rosada, este hongo fue identificado por Valle (2018) como *Fusarium oxysporum*; mientras que en otros frascos, cerca de la semilla se detectaron colonias pequeñas, brillantes de color amarillento o rojizo con textura de nata a nivel superficial pero que le otorgaban al medio cultivo una cierta opacidad, características asociadas a contaminación bacteriana.

4.3.1 Experimento 1: Medio líquido con MS 4,43 g más azúcar

La figura 4 muestra el porcentaje de contaminación que tuvieron los frascos en el transcurso de los 15 días del experimento, se evaluó la contaminación en 4 momentos importantes de crecimiento. El primer momento fue a las 24 horas de la siembra, en el cual con MS líquido a dosis completa (4,43 g.L⁻¹) no mostraron algún cambio o variación; el segundo momento se presentó a las 48 horas (segundo día) en el que ya se observó cambios en la coloración del medio puesto que empezó a contaminarse, con la aparición de un color amarillento en las torundas de algodón y el medio se observaba con una ligera nata, esto nos muestra que el área de crecimiento no se encontraba en condiciones asépticas para el desarrollo de las plántulas por lo que se registró el 35% de contaminación. Posteriormente se retiraron las unidades experimentales contaminadas. El tercer momento se dio a las 72 horas (tercer día) de la siembra de las semillas en el medio de cultivo, en este momento el porcentaje de contaminación alcanzó el 40% y se destaca que los frascos contaminados aparecieron

tonalidades de color fucsia y amarillas sobre las torundas de algodón y también el medio se encontraba amarillento y con una ligera nata por lo que se retiraron las unidades experimentales. El cuarto momento de evaluación se dio a las 192 horas (8 días), pues transcurrido este tiempo, el experimento se había contaminado en su mayoría, llegando a un 95% de contaminación en el que además de contaminación bacteriana aparecieron colonias de hongos, y el 5% es decir una unidad experimental no se contaminó y se mantuvo así hasta el día 15. En este frasco germinaron 3 semillas.

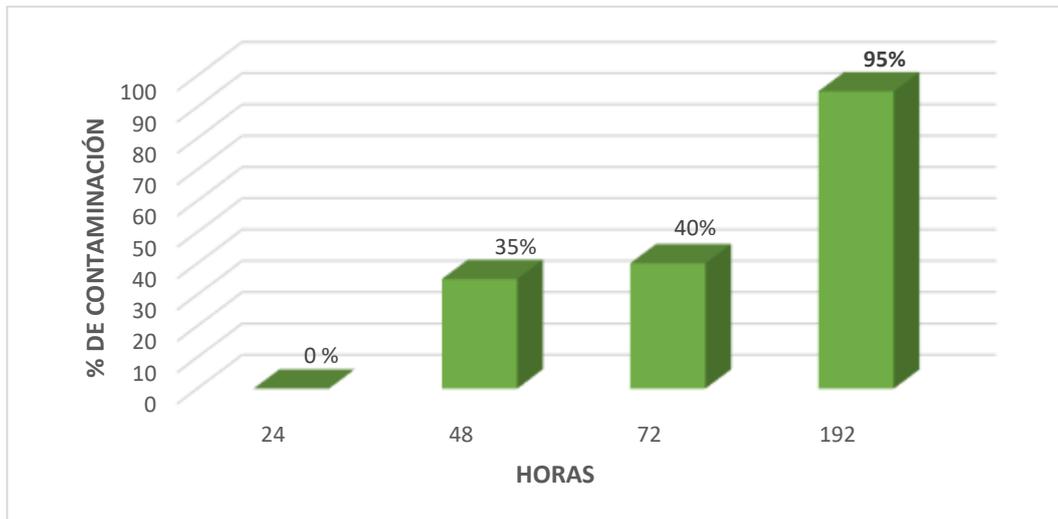


Figura 4: Contaminación del medio de cultivo líquido con MS 4,43 g.L⁻¹

Elaborado: Viera, 2020.

4.3.2 Experimento 2: Cuatro tratamientos con medio MS a dosis de 4,43 y 2,215 g líquidos y semisólidos

En el experimento 2, las semillas sembradas se las colocaron en el área de crecimiento y se pudo observar que tuvo tres momentos críticos para la evaluación de la contaminación externa. El primer momento fue la observación a las 24 horas de haber sembrado las semillas en los frascos con los diferentes tratamientos. En el tratamiento 1 (4,43 g MS + agar) se observa una contaminación del 10%, y a las 48 horas se registró una contaminación del 70% de las unidades experimentales de éste (figura 5), valor que permaneció sin cambios hasta el tercer momento de evaluación a las 144 horas y se mantuvo en condiciones asépticas durante los 20 días que duró el experimento.

En el tratamiento 2 de 4,43 MS líquido mostró a las 24 horas después de la siembra de las semillas en los frascos un 10% de contaminación y en el segundo momento de evaluación

que fue a las 48 horas registró un 60% de contaminación, valor que se mantuvo hasta el tercer momento de evaluación a las 144 horas, cuando los frascos ya se encontraban en el área del laboratorio destinada para la germinación de las semillas y crecimiento de las plántulas, lográndose el 40% de frascos sin contaminación hasta los 20 días, cuando se evaluaron las plántulas en los frascos (figura 5).

Para el tratamiento 3 (2,215 g MS más agar), presentó también los 3 momentos críticos, pues a las 24 horas luego de la siembra, se observó un 20% de contaminación, el cual a las 48 horas (segundo día) subió hasta el 50% y en las 144 horas (día 6) se contó con un 70% de contaminación. Por lo cual el T3 registró 30% de frascos no contaminados hasta los 20 días (figura 5).

En el tratamiento 4 (2,215 g MS líquido) se pudo observar la presencia de tres momentos críticos de alta contaminación de las muestras; el primero a las 24 horas con un 50% el día después de la siembra, el segundo a las 48 horas (dos días) con un 70% de contaminación y el tercer momento a las 144 horas manteniendo el porcentaje de contaminación, por lo que se procedió a retirar los frascos contaminados de una sola vez (figura 5). El 30% de los frascos mantuvieron condiciones asépticas hasta la evaluación a los 20 días.

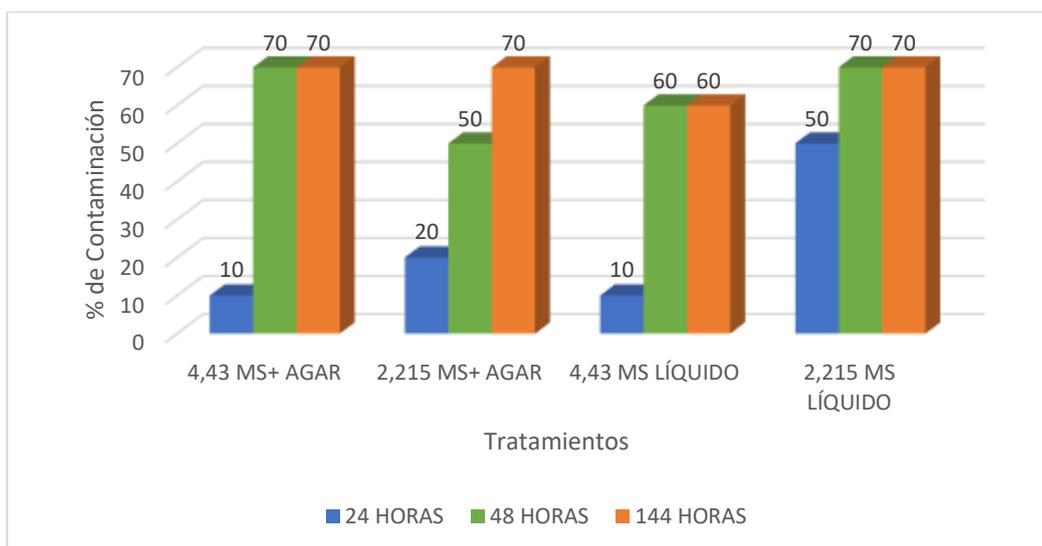


Figura 5: Contaminación del medio de cultivo

Elaborado: Viera, 2020.

Debido a la alta contaminación registrada en los experimentos 1 y 2 se decidió agregarle dos fungicidas: Evito T y TACHIGAREN 30% LS a la solución de cloro (figura2) durante la desinfección como también a los tratamientos que contienen agar en sus dosis de 4,43 g y

2,215 g, tratamientos de desinfección con los cuales se obtuvo resultados altamente favorables como se observa en la figura 6, en la que se encuentra un 0% de contaminación en los cuatro tratamientos hasta los 30 días; sin embargo esta dosis debe ser ajustada para conseguir un equilibrio entre % de contaminación y % de germinación de semillas (figura 6).

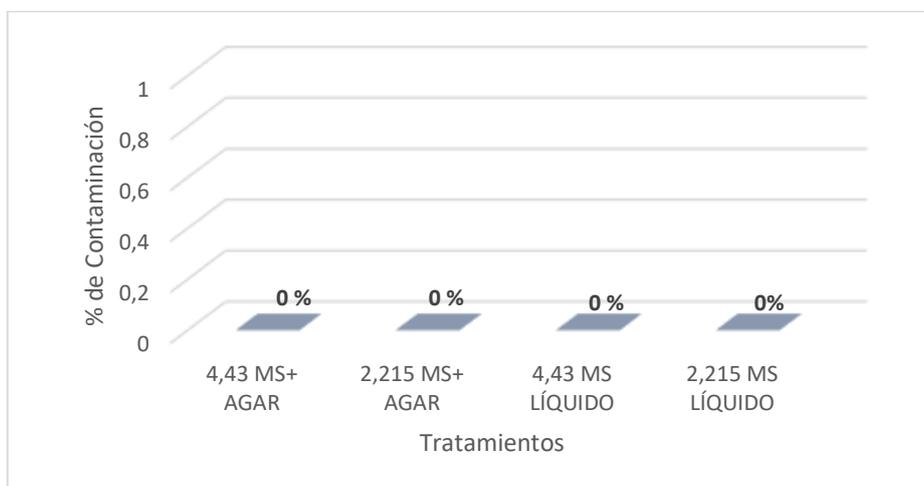


Figura 6: Contaminación del medio de cultivo

Elaborado: Viera, 2020.

4.4 PÁRAMETROS MORFOLÓGICOS DE LAS PLÁNTULAS DE BALSA

4.4.1 Experimento 1: Plántulas desarrolladas

En el experimento 1, se obtuvo un 5% de frascos sin contaminación (figura 4), de ellos, 3 semillas llegaron a ser plántulas; las cuales se evaluaron a los 20 días después de la germinación (ddg). En la figura 7 se resumen los parámetros registrados en las 3 plántulas individuales y el respectivo promedio. Así para el parámetro número de raíces se tuvo un valor promedio de 5,33 raíces, con un máximo de 9 y un mínimo de una raíz.

En lo que respecta a la altura de la planta se observó un mayor desarrollo en la plántula 3 con un valor de 5,5 cm y la plántula 1 fue la más pequeña con 1 cm, el valor promedio para esta variable fue de 2,667 cm. Se tomó el grosor del tallo el cual mostró un mayor grosor en la plántula 1 con 0,5 cm y el menor diámetro lo registraron las plántulas 2 y 3 con 0,1 cm respectivamente (figura 7). Se puede apreciar que la plántula con la menor altura obtuvo el mayor diámetro y viceversa es decir las plántulas más altas con el menor diámetro esto

implica que aquellas que tuvieron una mayor elongación en busca de la luz probablemente se ahilaron (Pierik, 1990).

También en el número de hojas se observan variaciones con un máximo de 4 hojas en la plántula 3 y con 2 hojas en la plántula 1 y en promedio se registra la presencia de 3 hojas alternas (Jiménez et al., 2017), en el ancho de las hojas la de mayor desarrollo fue la plántula 3 con 0,8 cm y seguido de la plántula 2 con 0,5 cm y por último a la plántula 1 con 0,3 cm, cuyo promedio corresponde a 0,533 cm. En lo que respecta al largo de la hoja, la plántula 2 muestra una mayor longitud con 0,6 cm, seguido de la plántula 1 con 0,5 cm y por último la plántula 3 con 0,11 cm: el valor promedio correspondiente a la longitud de la hoja fue 0,403 cm; lo que mantiene la tendencia en el comportamiento de las variables. Con el largo y ancho de las hojas se determinó el área foliar destacándose que la plántula 2 registró 0,225 cm², la plántula 1 alcanzó un área foliar de 0,115 cm², seguida en último lugar por la plántula 3 con 0,066 cm²; el valor promedio para esta variable fue de 0,135 cm² (figura 7). En general la plántula 3 fue la primera en germinar y debido a esto su comportamiento fue en general mejor que el resto de plántulas pues empezó a utilizar el medio líquido como fuente de alimento a través de su sistema radicular, sin embargo, en plantas más pequeñas se aprecia una mayor área foliar pero dentro del sistema *in vitro*, las hojas no son funcionales pues no realizan fotosíntesis (Rossel y Villalobos, 1990).

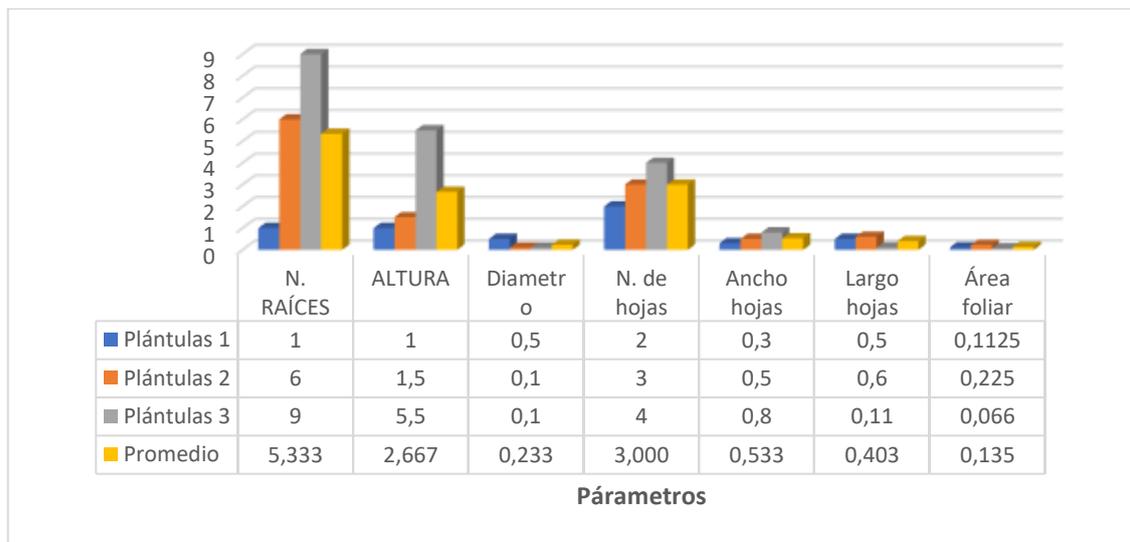


Figura 7: Parámetros morfológicos

Elaborado: Viera,2020.

4.4.2 Experimento 2: Plántulas germinadas

En el experimento 2, la germinación de semillas de *O. pyramidale* tuvo frascos sin contaminación en cada tratamiento (figura 5), por lo tanto, se las evaluó para observar el porcentaje de germinación de cada unidad experimental de los tratamientos, los cuales muestran un promedio de 22,5% de germinación con un máximo de 30% en el tratamiento 3 y un mínimo de 20% en los demás tratamientos (tabla 3).

Tabla 3: Porcentaje de germinación *in vitro*

Tratamientos	% frascos no		Total	Semillas	% de semillas
	contaminados	semillas/ frasco	semillas	germinadas	germinadas
T1	30	5	15	3	20
T2	30	5	15	3	20
T3	40	5	20	6	30
T4	30	5	15	3	20
Promedio					22,5

Elaborado: Viera,2020

4.4.2.1 Parámetros morfológicos

4.4.2.1.1 Número de raíces

El análisis de varianza (ANOVA) que se encuentra en el anexo 10 para el número de raíces no muestra diferencias significativas, pero si se puede observar a través de la separación de medias en la Prueba de Rango Múltiple de Tukey como el tratamiento 3 (2,215 MS + agar) es el que muestra un mejor número raíces de 1,33 con respecto a los demás tratamientos que mantuvieron 1,0 raíz por plántula (figura 8). Este comportamiento pudo estar asociado al tiempo de germinación de cada semilla más que al medio por sí mismo, puesto que semillas que germinan antes tienen la capacidad de emitir un mayor número de raíces (Pierik. 1990).

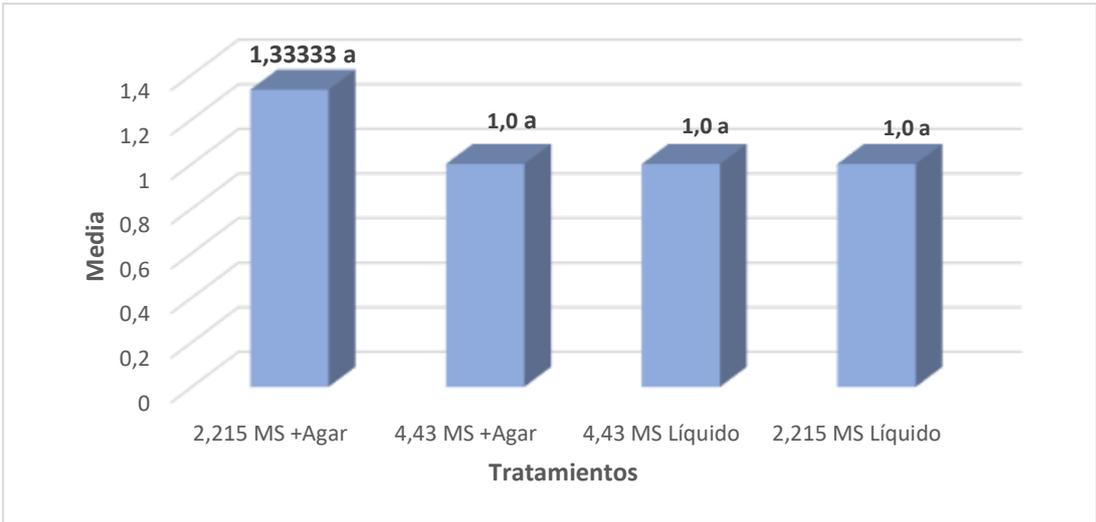


Figura 8: Número de Raíces

Elaborado: Viera, 2020.

4.4.2.1.2 Longitud de raíces (cm)

También se evaluó el largo de las raíces a través del ANOVA (anexo 11) el cual mostro diferencias significativas en los tratamientos, la mayor longitud de las raíces lo obtuvo el tratamiento 2 (4,43 MS Líquido), seguido el tratamiento 3 (2,215 MS + agar) y con el menor crecimiento de las raíces los tratamientos 1 (4,43 MS+ agar) y 4 (2,215 MS líquido) (figura 9).

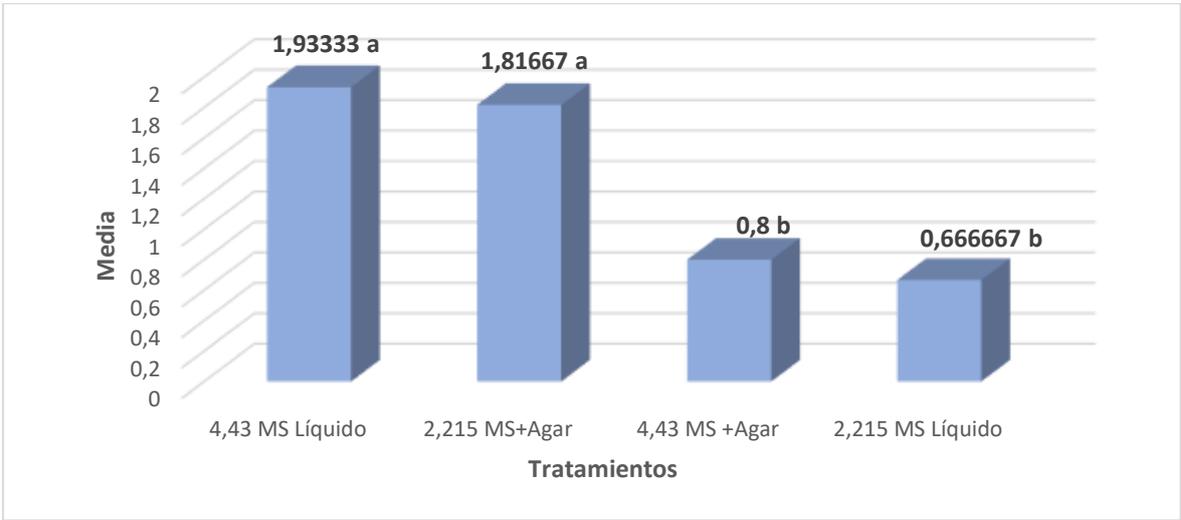


Figura 9: Largo de las raíces

Elaborado: Viera,2020

Este comportamiento pudo estar asociado a que, es el proceso de germinación y vigor de las plántulas obtenidas a partir de semillas las que proporcionan un mejor desarrollo en cuanto al largo de la raíz, pues en su fase inicial primero se desarrollan las raíces para que puedan sujetarse al medio antes de que se emita la plúmula de las plántulas (Hartmann, Kester y Davies, 1990).

4.4.2.1.3 Diámetro del tallo (cm)

En el ANOVA para el diámetro del tallo (anexo 12) se muestra que no hay diferencias significativas entre los tratamientos, es así que se puede observar por medio de la separación de medias en la Prueba de Rango Múltiple de Tukey que el tratamiento 2 (4,43 Ms líquido) tiene el mayor grosor del tallo de las plántulas con 0,2 cm ubicándose en primer lugar y el tratamiento 1 (4,43 MS + agar) mostró el tallo más delgado con un valor de 0,1 cm pero en el mismo rango de clasificación estadística (figura 10), esto confirma que el tratamiento 2 le proporciona las mejores condiciones en cuanto a contenido de nutrientes y posibilidad de absorción de los mismos desde el medio líquido (Pierik, 1990); a pesar, de que se mantiene la tendencia que en las fases iniciales postgerminación las plántulas aún asimilan los nutrientes de las reservas fisiológicas de la semilla.

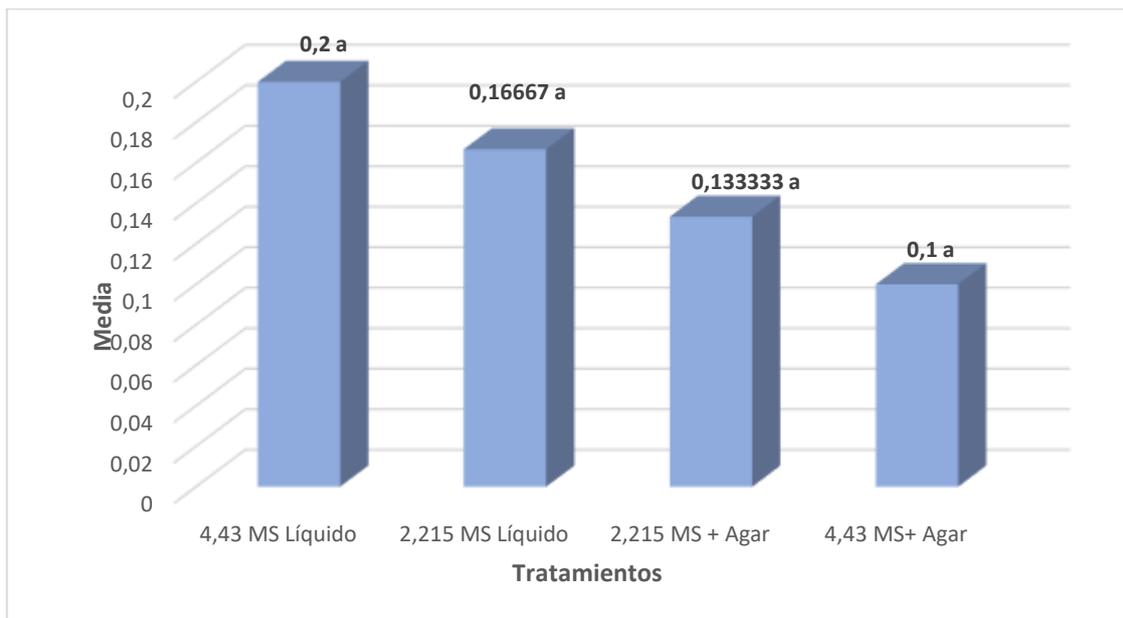


Figura 10: Diámetro del tallo

Elaborado: Viera, 2020.

4.4.2.1.4 Altura de las plántulas (cm)

El ANOVA para la altura de las plántulas no muestra diferencias significativas (anexo 13), pero en la separación de medias con la Prueba de Rango Múltiple de Tukey (figura 11), se puede apreciar una ligera variación en la altura de las plántulas, en la que el tratamiento 1 (4,43 MS + agar) es la más alta seguida por el tratamiento 2 (4,43 MS líquido), mientras que el tratamiento 3 (2,215 MS + agar) y el tratamiento 4 (2,215 MS líquido) son los que obtuvieron la menor altura con 1,76 cm. Esta tendencia verifica que los medios con la dosis completa de MS favorecen favorablemente el desarrollo en altura de las plántulas, y que además pudieron estar influenciados por la luz en el área de crecimiento, pues como tendencia natural los tallos se elongan hacia la fuente luminosa (Hartmann et al., 1990; Pierik, 1990).

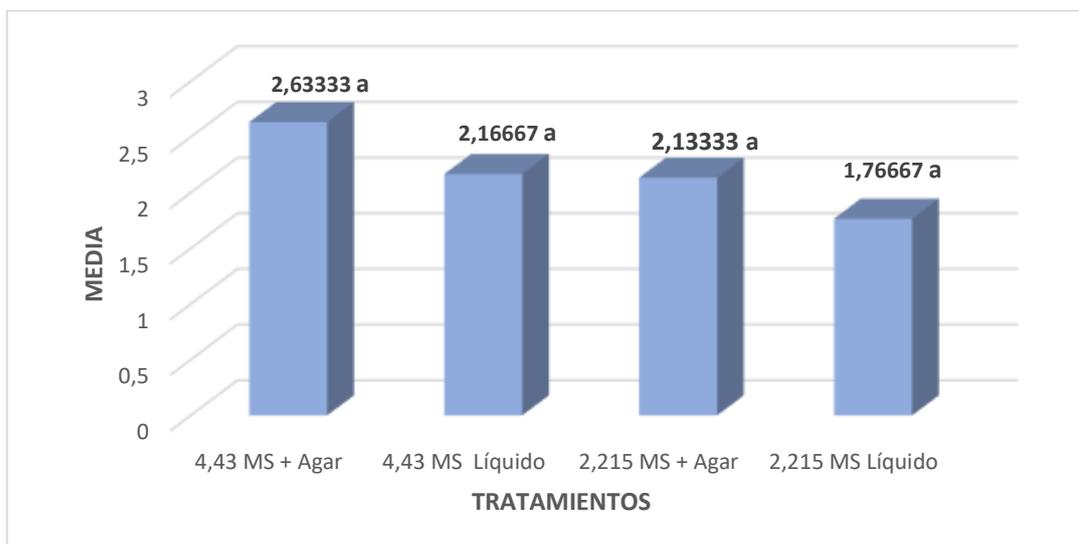


Figura 11: Altura de las plántulas

Elaborado: Viera, 2020.

4.4.2.1.5 Número de hojas

El ANOVA del número de hojas (anexo 14) reporta diferencias significativas. La figura 12 resume la separación de medias de la Prueba de Rango Múltiple de Tukey, destacándose el tratamiento 1 (4,43 MS + agar) con el mayor número de hojas seguido del tratamiento 3 (2,215 MS + agar) en el mismo rango (a), y con menor número de hojas el tratamiento 2 (4,43 MS líquido) y el tratamiento 4 (2,215 MS líquido) con 1 hoja. Este comportamiento está en función del vigor de la plántula y de la longitud de los tallos pues genéticamente en cada nudo se desarrolla una hoja, por lo que tallos más largos permiten mayor número de hojas (Hartmann et al., 1990).

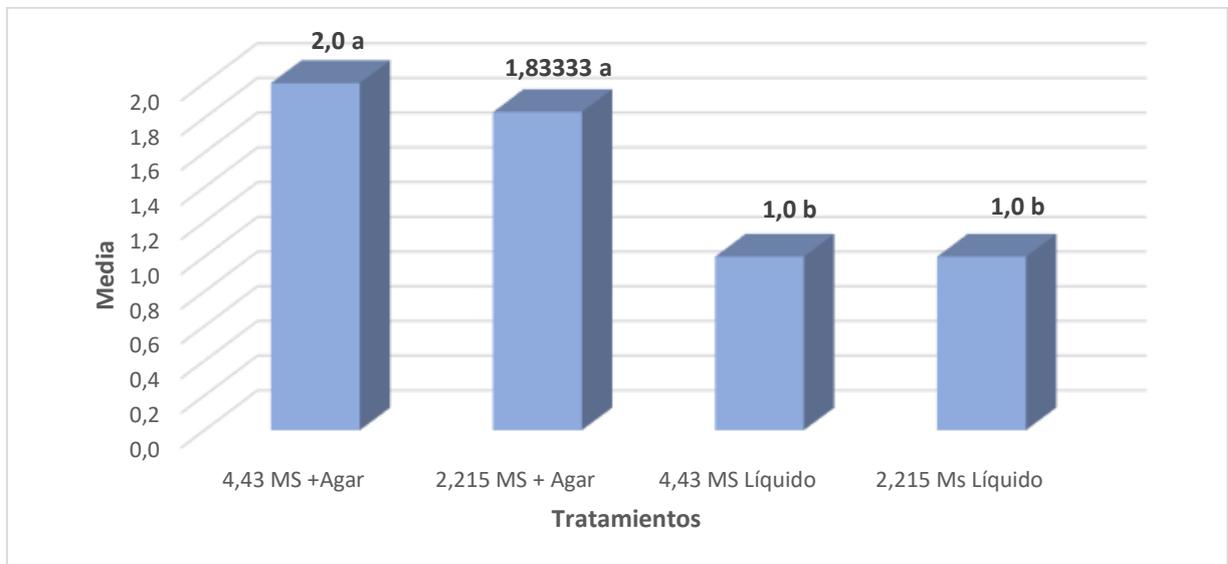


Figura 12: Número de hojas

Elaborado: Viera,2020.

4.4.2.1.6 Área foliar (cm²)

El área foliar es otro parámetro importante en el cual el ANOVA consignado en el anexo 15 muestra diferencias significativas entre los tratamientos. La figura 13 presenta la separación de medias a través de la Prueba de Rango Múltiple de Tukey para el área foliar de las plántulas, destacándose el tratamiento 2 (4,43 MS líquido) registró el mayor valor con 0,435 cm² registrándose en un rango (a) y diferenciándose completamente del tratamiento 4 (2,215 MS líquido) con 0,1425 cm². En general se mantiene la tendencia que las plantas que germinaron primero son las más desarrolladas y es el medio líquido el que favorece una mejor absorción de los nutrientes para la expresión de algunas de las variables.

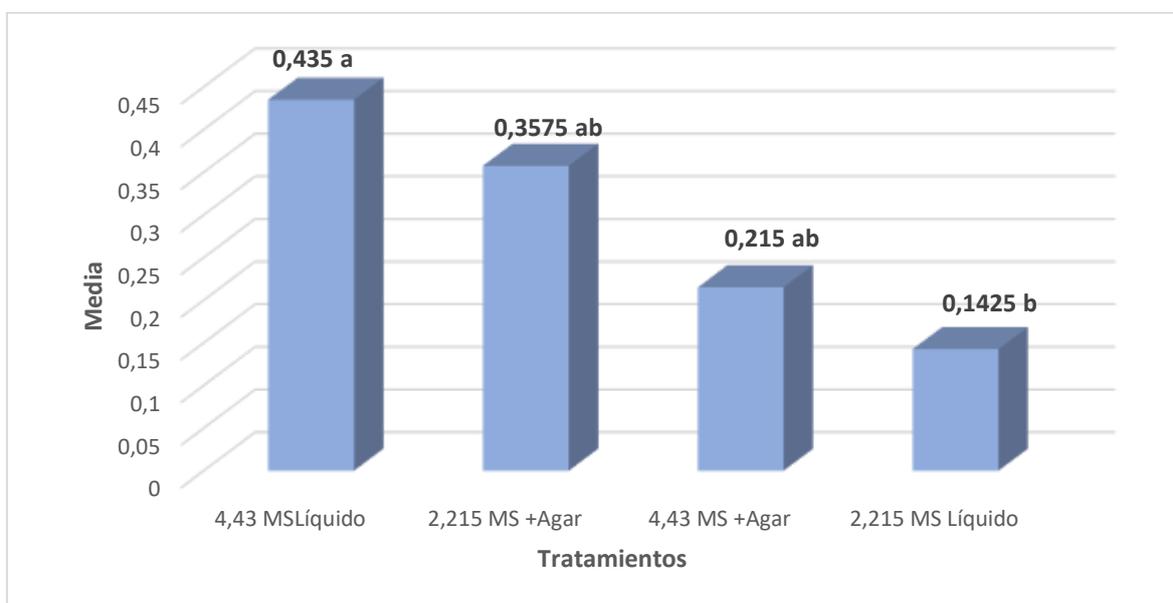


Figura 13: Área foliar

Elaborado: Viera, 2020.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- El ciclo de germinación de la balsa ocurre en un periodo de 15 a 20 días, en donde en donde requiere 3 días de imbibición, 3 días después para la ruptura y aparición de la testa y la diferencia para la elongación de la radícula y crecimiento de las raíces, hasta ser plántulas y la aparición de las primeras hojas.
- El mejor medio con respecto a los parámetros morfológicos en las plántulas de balsa en condiciones *in vitro* fue T2 con dosis completa de MS con 4,43 g.L⁻¹ líquido, cual permitió que las semillas tengan un mayor largo de las raíces (1,93333 cm), un mayor grosor (0,2 cm) y altura del tallo (2,16667 cm) y la mayor área foliar (0,435 cm²) del material experimental.
- El evaluar el comportamiento de la semilla en los cuatro medios de cultivo demostró que el medio líquido de dosis completa 4,43 g.L⁻¹ con torunda de algodón, le permitió a la semilla tener un mejor desarrollo en lo que respecta a sus características morfológicas rápidamente y en cambio en el medio con agar la semilla se retardo su proceso para desarrollarse siendo una variación solamente en la forma de germinación, sin afectar el ciclo de la balsa.
- La fase de germinación *in vitro* de balsa, depende de la calidad de la semilla y de la asepsia post siembra *in vitro*, puesto a que si las semillas no tienen una certificación estas pueden traer una alta carga bacteriana y por lo tanto ser más complicado el proceso de desinfección para evitar contaminaciones o proliferación de algún agente patógeno que impida la germinación, por lo que el uso de un procedimiento modificado con alcohol al 80% por 1 min y la solución de cloro comercial al 20% por 20 min más la adición de dos fungicidas se recomienda para obtener material estéril en cultivo.

5.2 RECOMENTACIONES

- La asepsia es muy importante al momento de realizar cualquier procedimiento *in vitro* por lo que es necesario tener en cuenta que se deben cumplir con los protocolos para evitar contaminaciones, y desperdiciar el material. Por ello es necesario activar el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la UEA para trabajo continuo.
- Las semillas son susceptibles a la luz por lo que se les debe realizar estudios que midan la cantidad de luz necesaria de las semillas en la germinación *in vitro*.
- Realizar procesos de escarificación previos al cultivo *in vitro* como una técnica con características físicas o químicas, que se lleva a cabo con la finalidad de acortar el tiempo de la germinación.
- La balsa es una especie de interés y que puede ser usada en áreas para reforestación con beneficio económico por lo que se tiene que ser más estudiada, mejorar la recolección y clasificación de las semillas de balsa para así poder preservar el medio ambiente.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFIA

AgroSíntesis (AS). (2016). © 2018 Editorial Agro Cultivos S.C. de R.L. de C.V. Tipos de germinación. Disponible en: <https://www.agrosintesis.com/tipos-de-germanizacion/#.XXZ2cyhKhPZ> Recuperado 28/09/2019

Anónimo. (2017). Centro de Investigación, Posgrado y Conservación Amazónica. Disponible en: <https://www.uea.edu.ec/cipca/index.php/home/mision-vision/2013-09-24-08-38-45> Recuperado 29/09/2019

Aldás David, W. D. (2011). Evaluación de la actividad hormonal de: Thidiazuron (TDZ) con ácido α -Naftalen acético (TDZ/ANA) vs. 6- bencil amino purina (BAP), 6 Bencil amino purina con ácido α naftalén acético (BAP/ANA) como inductores de brotes en la etapa de multiplicación a partir de yemas apicales de balsa (*Ochroma lagopus*) documento previo a la obtención de Ingeniero en Biotecnología, ESPE, Departamento de Ciencias de la vida, Ingeniería en Biotecnología. San Golqui. 56p Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/4973> Recuperado 4/10/2019

Beihefte. (1920). *Ochroma pyramidale*. Repertorium Specierum Novarum Vegetabilis. Beihefte 5:123.1920. Sistema Nacional de Información Forestal. Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/15-bomba6m.pdf. Recuperado 5/10/2019

Bhojwani, S, S., & Razdan, M. K. (1996) Plant tissue culture: theory and practice (Ed. rev.). Delhi, India: ELSEVIER. pag.49. Recuperado 5/10/2019

Directorio Forestal Maderero (DFM). (2018). Balso. Disponible en: <https://www.forestmaderero.com/articulos/item/balso.html>. Recuperado 6/10/2019

Francis, J. K. y Lowe, Carol A. (2000). Biotecnología de árboles nativos y exóticos de Puerto Rico y las Indias Occidentales. Departamento de Agricultura. Servicio Forestal. Disponible en: https://data.fs.usda.gov/research/pubs/iitf/Bioecologia_gtr15.pdf#page=383 Revisado 30/01/2020.

García Leal, J. y Lara Porras, A.M. (1998). “Diseño estadístico de experimentos. análisis de la varianza.” Grupo Editorial Universitario. Disponible en:

<http://wpd.ugr.es/~bioestad/wp-content/uploads/EfectosFijos.pdf> Recuperado 6/10/2019

García-Ramírez, Y.; Freire-Seijo, M.; Tejada, M.; Reyes, M. (2007). Germinación *in vitro* de semillas de *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees. *Biología Vegetal* 7(1):41-44.

Disponible en:

<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/355> Recuperado 5/01/2020.

García, Y.; Arteaga, Y.; Abreu, R.; Decker, María, y Lazo, Yamila. (2017). Quality indicators in *Ochroma pyramidale* seeds from three sites in the Ecuadorian Amazon for reforestation in degraded areas. *MOL2NET, International Conference Series on Multidisciplinary Sciences*. MOL2NET,2017,3, DOI:10.3390/mol2net-03-014356. Recuperado 7/10/2019

González, B.; Cervantes, X.; Torres E.; Sánchez, C.; Simba, L. (2010). Caracterización del cultivo de balsa (*Ochroma pyramidale*) en la provincia de los Ríos- Ecuador. Unidad de Investigación Científica y Tecnológica. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Publicado como Nota Técnica en *Ciencias y Tecnología* 3(2): 7-11,2010. Disponible en: http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C1_2n22010.pdf Recuperado 8/10/2019

Hartmann, H. T.; Kester, D. E. & Davies Jr., F. T. (1990). *Plant propagation, principles and practices*. New Jersey, USA, Prentice Hall. 647p.7 Recuperado 3/01/2020.

Jiménez, E.; Garcías, L.; Carranza, M.; Carranza, H.; Morante J.; Martínez M.; Cuásquer J. (2017). Germinación y crecimiento de *Ochroma pyramidale* (Cav. Ex Lam.) Urb. en Ecuador. *Scientia Agropecuaria* vol.8 n°3 Trujillo jul./set.2017. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172017000300007 Recuperado 15/10/2019

Francis, J. K. y Carol A. Lowe, Edts; S. Trabanino, Trad. (2000). *Biología de Árboles Nativos y Exóticos de Puerto Rico y las Indias Occidentales*. Disponible en: https://data.fs.usda.gov/research/pubs/iitf/Bioecologia_gtr15.pdf#page=383 Recuperado 15/10/2019

Lima, N. R. Moreno J. A. Eras, V. H. Minchala J. Gonzales D. Yaguana M. Valarezo C. (2018). Propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L a partir de semillas. *Revista Investigaciones Altoandinas*. 20(2):169-178. Disponible en:

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2313-29572018000200002

López, J. (2014). Germinación In vitro de semillas. Universo Botánico. Disponible en: <http://universobotanico.blogspot.com/2014/05/germinacion-in-vitro-de-semillas.html>.

Recuperado 20/10/2019

Luna, C. V. (2019). Establecimiento de un método eficiente de estandarización de la germinación in vitro de *Moringa oleífera* (Moringaceae). Acta Botánica Mexicana. 126: e1496. DOI:10.21829/abm126.2019.1496.

Méndez, J. (2000). Manejo de semillas de 100 especies forestales de América Latina. Volumen 1. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE. Turrialba; Costa Rica. 91 pp. Disponible en: http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/2959/Manejo_de_semillas_de_100_especies.pdf;jsessionid=3A9A23D62245D182DDC43E45CC3A0A13?sequence=1 Recuperado 2/12/2019

Moral, C. (2013). Tipos de corte en la madera verde de balsa (*Ochroma pyramidale*), y su efecto en el rendimiento industrial para la obtención de madera aserrada y otros productos. Disponible en:

<http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/1750/1/T-UCSG-PRE-TEC-AGRO-24.pdf>

Recuperado 2/12/2019

Parra, P. (2015). La balsa, la apuesta del sector maderero. ene. Recuperado 2/12/2019

Paul Jr, F. (Ed.). (2012). Tissue culture: methods and applications. Elsevier. Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/tissue-culture/kruse/978-0-12-427150-0> Recuperado 5/12/2019

Pelacho, A.; Closas L. y Sanfeliu J. (2005). Medios. Universidad de Lleida. Disponible en:

<http://cv.udl.cat/cursos/76304/t5/t5.htm> Recuperado 10/12/2019

Peña, T. (2018). Jardín botánico. Instituto de Ciencias de la tierra. Universidad de San Carlos Guatemala. Disponible en:

<http://www.repositorio.usac.edu.gt/11937/1/TEVA%20PE%C3%91A.pdf> Recuperado 30/01/2020.

Pérez, J. (2016). Cultivo *in vitro* de plantas y sus aplicaciones en la Agricultura. San Cristóbal de La Laguna, España: Arte Comunicación Visual S. L. Disponible en:

<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/11656/1/UPS-QT09424.pdf> Recuperado 15/12/2019

Pierik, R. (1990). Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ediciones Mundi- prensa. 326p. Disponible en: https://books.google.com.ec/books/about/Cultivo_in_vitro_de_las_plantas_superior.html?id=ssn_AAAACAAJ&utm_source=gb-gplus-shareCultivo Recuperado 15/12/2019

Pita, J. y Pérez, F. (1989). Germinación de Semillas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1998_2090.pdf Recuperado 18/12/2019

Roca, W. y Mroginski, L. (1993). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Disponible en: http://ciatlibrary.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf Recuperado 20/12/2019

Rosell, C. H. y Villalobos, A., V. M. Eds. (1990). Fundamentos teóricos-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Roma, FAO. 112 p. (Estudio FAO producción y protección vegetal 105). Recuperado 22/12/2019

Rodríguez, J.; Valdés, Y.; Rodríguez, R. (2012). Tratamientos a semillas para mejorar la germinación de Colubrina ferruginosa Brong. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 18(1): 27-31,2012. 5p. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rcscfa/v18n1/v18n1a3.pdf>. Recuperado 23/12/2019

Rojas, F. y Torres, G. (2009). Arboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción. Revista Forestal Kurú (Costa Rica) 6 (17). (2009). 3p. Disponible en: <https://revistas.tec.ac.cr/index.php/kuru/article/view/390>. Recuperado 24/12/2019

Ruiz Sánchez, M.; Muñoz Hernández, Y.; Guzmán, D.; Velázquez Rodríguez, R.; Días López, G. S.; Martínez, A. Y.; Almeida, F. M. (2018). Efecto del Calibre semillas (masa) en la germinación del sorgo. Cultivos tropicales 39(4):51-59 Disponible en: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/1932/193260659007/193260659007.pdf>

Sathyannarayana, B. N. y Verghese, D. B. (2007). Cultivo de tejidos vegetales: prácticas y nuevos protocolos experimentales. IK International Pvt Ltd. Recuperado 5/12/2019

Severin, C.; Salinas, A.; Gattusso, S.; Gattusso, M.; Busilacchi H.; Giubileo, G. Aguirre, A. (2004). Estimulación de la germinación de semillas de *Passiflora caerulea* L. cultivadas *in vitro*. Revista de investigaciones de la facultad de ciencias agrarias-UNR. Año (4) 6:55-58
Disponible en:

<https://cienciasagronomicas.unr.edu.ar/journal/index.php/agronom/article/view/196>

Soria, S. L. (2019). Métodos de desinfección estándar y modificado para las semillas de balsa. Elaborado 11/11/2019.

Urbano, I. (1920). Trópicos *Ochroma pyramidale* (Cav. Ex Lam.) Urb. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/3900204>. Recuperado 28/12/2019

Valle A. (2018). Establecimiento de un protocolo para la inducción a brotes de explantes de *Vainilla sp.* nivel de cultivo *in vitro* en el CIPCA, cantón Arosemena tola, napo.

Viera, L. (2019). Tratamientos producto de la combinación de la concentración de sales MS y dosis de agente gelificante. Elaborado 11/11/2019.

Villarreal, G. A.; Estrada, R.A.; Cárdenas, M. L.; Limón, M. S.; Alvares, G. M.; López, V. V.; (2013). Caracterización morfométrica, viabilidad y germinación de semillas de mezquite y huizache en el noreste de México. Revista Internacional de Botánica Experimental. Disponible en:

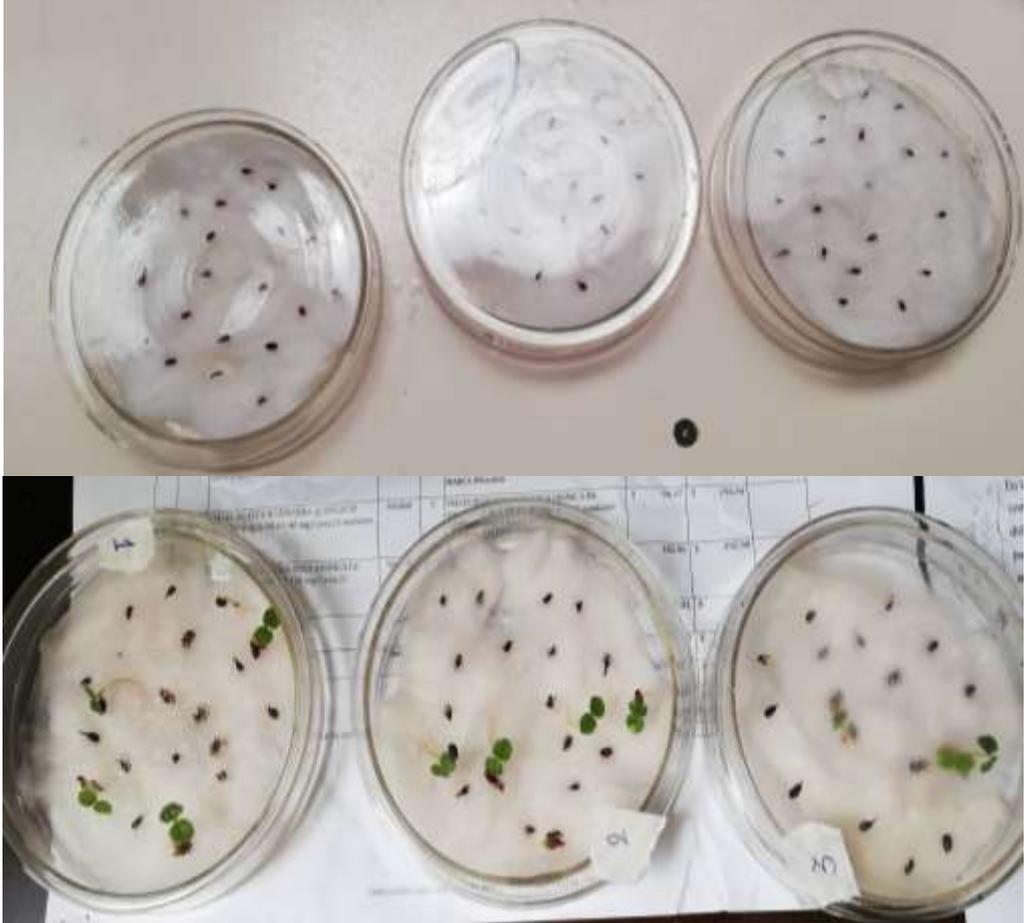
https://www.researchgate.net/profile/Sergio_Moreno24/publication/289106939_Morphometric_characteristics_viability_and_germination_of_mesquite_and_sweet_acacia_seeds_in_northeastern_Mexico/links/591db8e9aca272d31bcd96be/Morphometric-characteristics-viability-and-germination-of-mesquite-and-sweet-acacia-seeds-in-northeastern-Mexico.pdf
Recuperado 4/01/2020.

Vinueza, M. (2012). Ficha Técnica N°7: Balsa. Ecuador Forestal. Disponible en: <https://ecuadorforestal.org/fichas-tecnicas-de-especies-forestales/ficha-tecnica-no-7-balsa/>

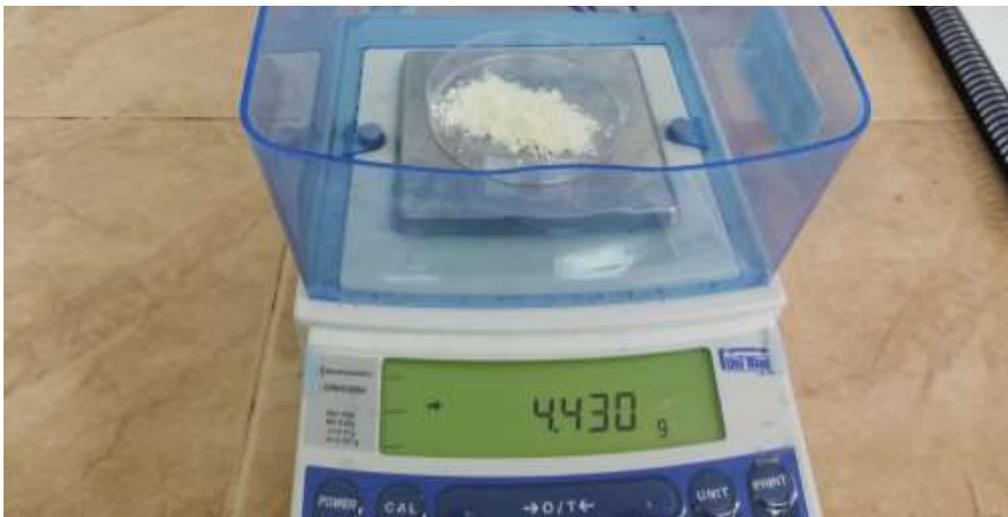
Whitmore, T. y Wooh-Khoon, G. (1993). Growth Analysis of the seedlings of Balsa, *Ochroma lagopus*. New Phytol. 95, 305-311. Recuperado 28/12/2019

ANEXOS

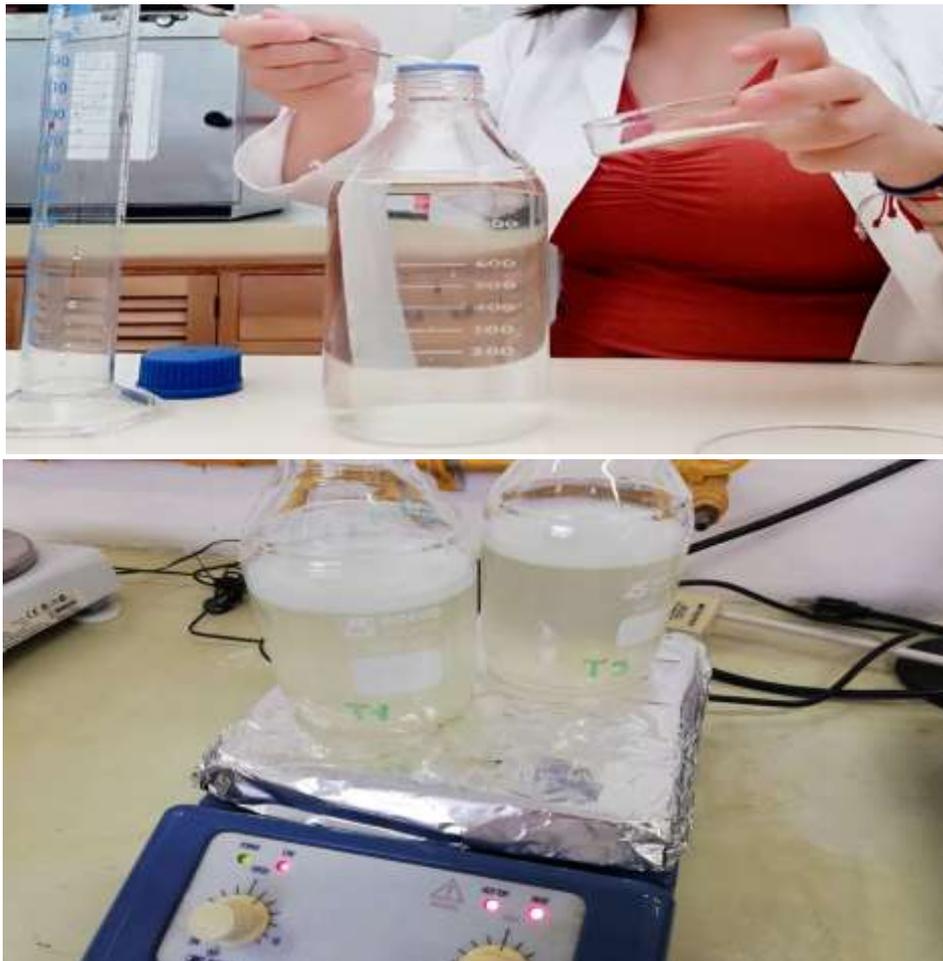
Anexo 1: Evaluación de la viabilidad de las semillas en tres cajas Petri con 20 semillas cada uno, evaluados por 15 días.



Anexo 2: Pesaje del MS en sus diferentes dosis



Anexo 3: Colocación del MS en el agua esterilizada para la preparación de los medios líquidos y semisólido.



Anexo 4: Etiquetado de los frascos y dispensados en los envases.



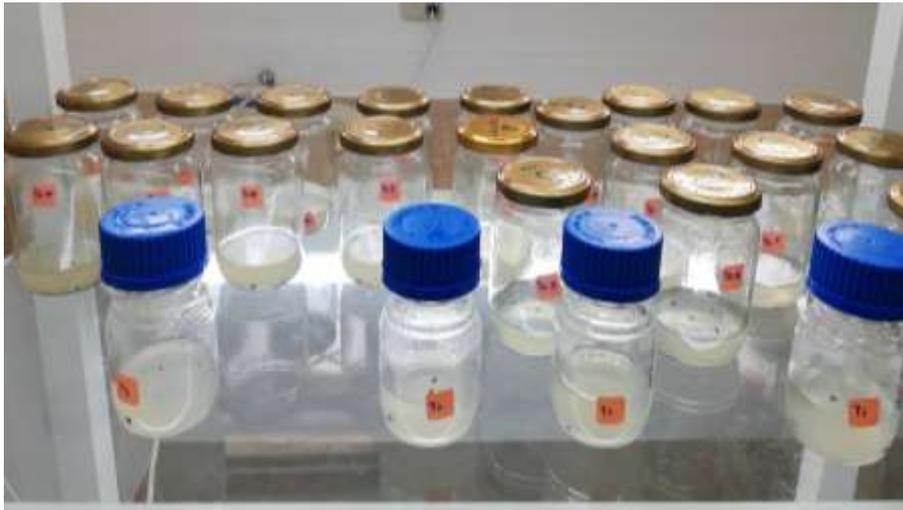
Anexo 5: Toma de pH de cada medio.



Anexo 6: Los tratamientos en la cámara de flujo laminar para la siembra.



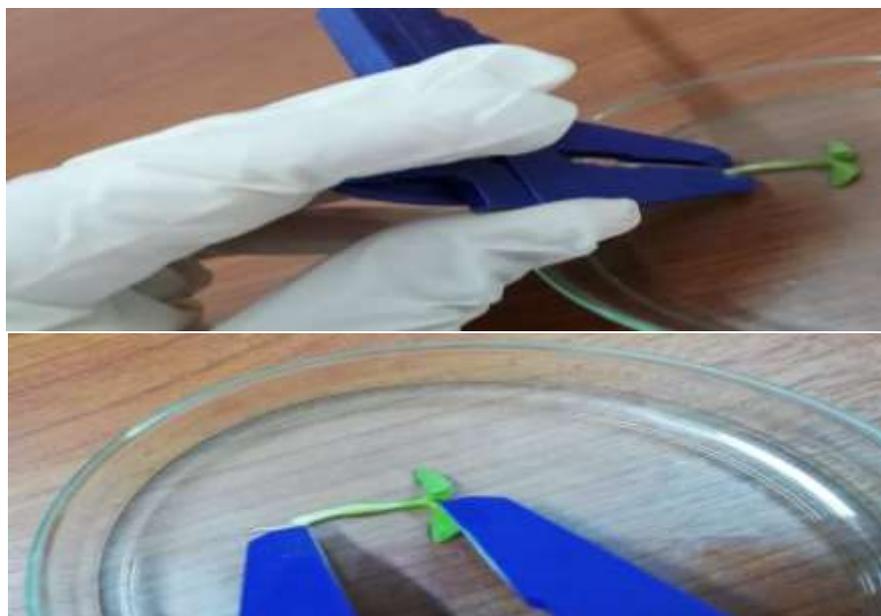
Anexo 7: Colocación en el área de crecimiento.



Anexo 8: Selección de las semillas de acuerdo a Pierik, 1990.



Anexo 9: Datos morfológicos de las plántulas en diámetro y la altura de la plántula.



Anexo 10:

Tabla de Análisis de varianza para la variable número de raíces

Fuente	Suma de cuadrados	g'	Media de cuadrados	F-Calculado	p Valor
Entre grupos	0,4	3	0,133333	0,44	0,7290 NS
Dentro de grupos	3,33333	11	0,30303		
Total	3,73333	14			

Tabla de la Prueba de Rango Múltiple de Tukey para la variable número de raíces

Tratamiento	Media	Grupos homogéneos
2,215 MS +Agar	1,33333	a
4,43 MS +Agar	1,0	a
4,43 MS Líquido	1,0	a
2,215 MS Líquido	1,0	a

Anexo 11:

Tabla de Análisis de varianza para la variable longitud de las raíces

Fuente	Suma de cuadrados	g'	Media de cuadrados	F-Calculado	p Valor
Entre grupos	4,58767	3	1,52922	5,39	0,0158 *
Dentro de grupos	3,12167	11	0,283788		
Total	7,70933	14			

Tabla de la Prueba de Rango Múltiple de Tukey para la variable longitud de las raíces

Tratamiento	Media	Grupos homogéneos
4,43 MS Líquido	1,93333	a
2,215 MS+Agar	1,81667	a
4,43 MS +Agar	0,8	b
2,215 MS Líquido	0,666667	b

Anexo 12:

Tabla de Análisis de varianza para la variable diámetro

Fuente	Suma de cuadrados	g'	Media de cuadrados	F-Calculado	p Valor
Entre grupos	0,0173333	3	0,00577778	3,18	0,0673 NS
Dentro de grupos	0,02	11	0,00181818		
Total	0,073333	14			

Tabla de la Prueba de Rango Múltiple de Tukey para la variable de diámetro

Tratamiento	Media	Grupos homogéneos
4,43 MS Líquido	0,2	A
2,215 MS Líquido	0,16667	A
2,215 MS + Agar	0,133333	A
4,43 MS+ Agar	0,1	A

Anexo 13:

Tabla de Análisis de varianza para la variable altura

Fuente	Suma de cuadrados	g'	Media de cuadrados	F-Calculado	p Valor
Entre grupos	1,64	3	0,546667	0,50	0,6916 NS
Dentro de grupos	12,0933	11	1,09939		
Total	13,7333	14			

Tabla de la Prueba de Rango Múltiple de Tukey para la variable altura

Tratamiento	Media	Separación de medias
4,43 MS + Agar	2,63333	a
4,43 MS Líquido	2,16667	a
2,215 MS + Agar	2,13333	a
2,215 MS Líquido	1,76667	a

Anexo 14:

Tabla de Análisis de varianza para la variable número de hojas

Fuente	Suma de cuadrados	g'	Media de cuadrados	F-Calculado	p Valor
Entre grupos	2,9	3	0,966667	3,75	0,04445 *
Dentro de grupos	2,83333	11	0,257576		
Total	5,73333	14			

Tabla de la Prueba de Rango Múltiple de Tukey para la variable número de hojas

Tratamiento	Media	Grupos homogéneos
4,43 MS +Agar	2,0	a
2,215 MS + Agar	1,83333	a
4,43 MS Líquido	1,0	b
2,215 MS Líquido	1,0	b

Anexo 15:

Tabla de Análisis de varianza para la variable área foliar

Fuente	Suma de cuadrados	g'	Media de cuadrados	F- calculado	p Valor
Entre grupos	0,170572	3	0,0568575	2,21	0,1444 *
Dentro de grupos	0,28305	11	0,0257318		
Total	0,453622	14			

Tabla de la Prueba de Rango Múltiple de Tukey para la variable área foliar

Tratamiento	Media	Grupos homogéneos
4,43 MS Líquido	0,435	a
2,215 MS +Agar	0,3575	ab
4,43 MS +Agar	0,215	ab
2,215 MS Líquido	0,1425	b