

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES**



**INDUCCIÓN DEL ENRAIZAMIENTO DE  
VITRO PLANTAS DE *CROTON LECHLERI*  
MUELL.ARG. EN CONDICIONES IN VITRO  
Y EX VITRO**

Presentado por:

**Marilia Shally Del Castillo Santillana**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO FORESTAL

---

Lima - Perú  
2015

## *DEDICATORIA*

*En memoria de mi querida madre Ena y mi abuelo Ricardo, por el amor que siempre me demostraron en vida.*

*A mi abuelita Esther, por su inmenso amor, protección y consejos.*

*A mis tías Nery y Sindy, por su apoyo incondicional e inmenso amor.*

*A mí querido hermano Joel, por el amor, apoyo y por los momentos compartidos en su compañía.*

## *AGRADECIMIENTOS*

*Quiero expresar mi más sincero agradecimiento*

*A Dios por darme la fortaleza, salud y darme una maravillosa familia que en todo momento me mostró su infinito amor y apoyo incondicional*

*A mi familia, en especial a mi Tía Nery por ser mi guía y apoyo en el desarrollo de esta investigación.*

*Al Dr. Gilberto Domínguez Torrejón, patrocinador de este trabajo de investigación, por su paciencia, profesionalismo y gran apoyo en esta tesis.*

*A la Dra. Lourdes Tapia y Figueroa por su gran ayuda y por brindarme las facilidades para el desarrollo esta tesis.*

*Al Ing. Luis Palomino y al Ing. Elber Ramos por su amistad y recomendaciones para el desarrollo de esta tesis.*

*A los miembros de jurado, por sus recomendaciones y apoyo en la revisión de la tesis.*

*A la Universidad Nacional Agraria como Alma mater y al Instituto de Biotecnología por brindarme la oportunidad de realizar el presente trabajo de investigación.*

*A mis compañeras de Instituto de Biotecnología por su apoyo.*

*A mis amigos por su apoyo y consejos.*

## *RESUMEN*

*Croton sp.* es una especie de uso medicinal con importancia comercial para la industria farmacéutica, sin embargo hay mucha variabilidad del producto, como causa de ello se puede atribuir a muchos factores, los mismos que tienen la necesidad de investigarse, actualmente no se cuenta con una metodología adecuada para su producción a gran escala, que garantice la calidad de planta ni calidad de producto. La micropropagación in vitro, es una técnica importante en la Biotecnología que hace posible la reproducción del material vegetal de forma más rápida que los métodos tradicionales empleados en vivero. La principal dificultad que se presenta en las especies leñosas es la etapa de enraizamiento, por ello el presente trabajo de investigación se desarrolló con el objetivo de establecer una técnica de propagación que permita lograr el enraizamiento de *Croton lechleri*, además de seleccionar el tipo de explante, que mejor responde a esta técnica. Como resultado se obtuvo el enraizamiento en condiciones in vitro se evaluó el comportamiento del desarrollo radicular y estuvo constituido de dos etapas, la primera, pasando a un medio líquido (MS más vitaminas y hormonas ANA 0,01 mg/l y 0,1 AG<sub>3</sub>) y la segunda etapa, el traspaso a un medio MS con la mitad de concentración de macroelementos. Además se hicieron ensayos de enraizamiento ex vitro lográndose buenos resultados. Se hicieron pruebas con diferentes tipos de explantes, evaluándose tres tipos diferentes de yema: Tipo I (yemas apicales de planta madre); Tipo II (yemas axilares de planta madre) y tipo III, aquellas provenientes de subcultivos. Se comprobó que el explante tipo III es el que mejor responde al tratamiento de enraizamiento. Durante la etapa de aclimatación, se determinó que el 69 % de los explantes que no pasaron por un tratamiento de enraizamiento in vitro lograron enraizar ex vitro.

**Palabras claves:** *Croton lechleri* Muell. Arg. , in vitro, ex vitro, propagación, enraizamiento, aclimatación.

# ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>I. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>II. Revisión de Literatura</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Aspectos generales de <i>croton sp.</i></b> .....	<b>3</b>
1.1. Taxonomía .....	3
1.2. Distribución natural .....	3
1.3. Descripción general .....	4
1.4. Ecología y fenología del género <i>croton</i> .....	5
1.5. Propagación y usos .....	6
1.6. Características del látex.....	7
1.7. Rendimiento.....	8
<b>2. Cultivo in vitro</b> .....	<b>8</b>
2.1. Micropopagación.....	8
2.1.1. Ventajas .....	9
2.1.2. Desventajas.....	10
2.2. Factores que influyen en la micropopagación.....	11
2.3. Reguladores de crecimiento .....	14
2.4. Cantidad de medio por recipiente de cultivo .....	19
2.5. Esterilización .....	19
2.6. Regeneración de explantes.....	19
<b>3. Etapas de la propagación in vitro</b> .....	<b>19</b>
3.2. Establecimiento del cultivo aséptico.....	20
3.3. Crecimiento del explante .....	20
3.4. Enraizamiento de los brotes y preparación para su trasplante .....	21
<b>4. Tipos de explante</b> .....	<b>22</b>
4.1. Yemas axilares .....	22
4.2. Yemas apicales.....	23
<b>5. Micropopagación de especies leñosas</b> .....	<b>23</b>
5.1. Factores que influyen en la micropopagación.....	25
<b>6. Aclimatación</b> .....	<b>25</b>
6.1. Tratamiento antes del trasplante.....	25
6.2. Tratamiento después del trasplante .....	26
6.2.1. Sustrato utilizado.....	26
<b>7. Antecedentes de la propagación de <i>croton lechleri</i></b> .....	<b>27</b>
<b>III. Materiales y Métodos</b> .....	<b>31</b>
<b>1. Lugar de ejecución</b> .....	<b>31</b>
<b>2. Materiales</b> .....	<b>31</b>
2.1. Materiales vegetal (explante).....	31
2.2. Materiales e insumos de laboratorio .....	32
2.2.1. Materiales y equipos de laboratorio .....	32
2.2.2. Insumos .....	33
2.3. Materiales para aclimatación .....	34
2.3.2. Especificaciones técnicas del tsi .....	34
<b>3. Métodos y procedimientos</b> .....	<b>35</b>
3.1. Preparación del explante .....	35
3.2. Selección y establecimiento del explante .....	36
3.3. Desinfección de yemas.....	39
3.4. Fase de multiplicación de yemas.....	40
3.5. Enraizamiento in vitro .....	40
3.6. Aclimatación .....	41
3.7. Enraizamiento ex vitro.....	41
<b>4. Diseño de la investigación</b> .....	<b>42</b>
4.1. Tratamientos .....	42
<b>IV. Resultados y discusión</b> .....	<b>46</b>

<b>1. Desinfección de explantes .....</b>	<b>46</b>
1.1. Desinfección de semillas .....	46
1.2. Prueba de desinfección de yemas.....	46
<b>2. Establecimiento in vitro de explantes .....</b>	<b>47</b>
2.1. Establecimiento in vitro de semillas .....	47
2.2. Establecimiento in vitro de yemas .....	48
<b>3. Enraizamiento .....</b>	<b>49</b>
3.1. Selección del tratamiento de enraizamiento .....	49
3.1.1. Evaluación del desarrollo del explante.....	50
3.1.2. Selección de tipos de yema.....	52
3.1.3. Evaluación del desarrollo del explante.....	53
3.1.4. Evaluación del medio de enraizamiento in vitro y tipo de yema.....	54
<b>4. Aclimatación .....</b>	<b>56</b>
4.1. Enraizamiento de vitroplantas (con tratamiento) .....	57
4.2. Enraizamiento de vitroplantas (sin tratamiento) .....	57
4.3. Supervivencia de explantes.....	59
4.4. Enraizamiento ex vitro de yemas apicales (despunte).....	60
<b>V. Conclusiones.....</b>	<b>61</b>
<b>VI. Recomendaciones .....</b>	<b>63</b>
<b>VII. Referencias bibliográficas .....</b>	<b>65</b>
<b>VIII. Anexos.....</b>	<b>68</b>

## Índice de tablas

	Página
Tabla 1: Tratamiento de desinfección para yemas .....	28
Tabla 2: Medio de Enraizamiento.....	28
Tabla 3: Composición del medio de Multiplicación .....	29
Tabla 4: Porcentaje de sobrevivencia y mortandad en la desinfección .....	37
Tabla 5: Causas de mortandad de explantes.....	38
Tabla 6: Tratamiento de desinfección para yemas .....	42
Tabla 7: Tratamientos de Enraizamiento.....	43
Tabla 8: Tipos de explante evaluado.....	44
Tabla 9: Prueba de enraizamiento y tipo de explantes .....	44
Tabla 10: Tratamientos de desinfección. ....	46
Tabla 11: Porcentaje de sobrevivencia y mortandad en la desinfección.....	47
Tabla 12: Porcentaje de germinación .....	48
Tabla 13: Enraizamiento de vitroplantas .....	49
Tabla 14: Desarrollo foliar y radicular de las vitroplantas.....	50
Tabla 15: ANVA para el número de raíces en tratamientos de enraizamiento. ....	50
Tabla 16: ANVA para la longitud de raíces en tratamientos de enraizamiento.....	51
Tabla 17: Porcentaje de enraizamiento por tipo de explante. ....	52
Tabla 18: Desarrollo foliar y radicular .....	53
Tabla 19: ANVA para el número de raíces en función del Tipo de explante .....	53
Tabla 20: ANVA para la longitud de raíces en función del Tipo de explante .....	54
Tabla 21: Enraizamiento <i>in vitro</i> de 26 vitroplantas.....	55
Tabla 22: ANVA para el número de raíces en el enraizamiento <i>in vitro</i> .....	56
Tabla 23: ANVA para la longitud de raíces en el enraizamiento <i>in vitro</i> .....	56
Tabla 24: Resultados de enraizamiento a los 2 meses. ....	57
Tabla 25: Resultados de enraizamiento a los 2 meses. ....	57
Tabla 26: ANVA para la longitud de raíces en el enraizamiento <i>ex vitro</i> .....	58
Tabla 27: ANVA para la longitud de raíces en el enraizamiento <i>ex vitro</i> .....	59
Tabla 28: Sobrevivencia de plantas aclimatadas.....	59
Tabla 29: Evaluación a los 30 días del enraizamiento <i>ex vitro</i> .....	60

## *Índice de figuras*

	Página
Figura 1: Tipos de yema .....	32
Figura 2: Ciclo de producción .....	35
Figura 3: Germinación incompleta de semillas.....	36
Figura 4: Germinación de semilla .....	37
Figura 5: Establecimiento de explantes en medio líquido y sólido .....	38
Figura 6: Crecimiento de brotes .....	39
Figura 7: Planta aclimatada con despunte.....	41
Figura 8: Establecimiento de yema axilar y apical en 15 días.....	48
Figura 9: Enraizamiento de vitroplantas .....	49
Figura 10: Porcentaje de enraizamiento por explante.....	52
Figura 11: Enraizamiento de vitroplantas .....	58
Figura 12: Micro invernadero .....	60
Figura 13: Protocolo de propagación .....	64



## *Índice de anexos*

	Página
Anexo 1 Composición del medio de cultivo ms .....	68
Anexo 2 Composición del medio de cultivo de enraizamiento .....	69
Anexo 3 Anva para el número de hojas y altura para el tratamiento de enraizamiento .....	70
Anexo 4 Anva para el número de hojas y altura para el tipo de explante .....	71
Anexo 5 Cuadro de comparación de medias tukey para el enraizamiento para cada tratamiento de la variable número de raíces.....	72
Anexo 6 Cuadro de comparación de medidas tukey para el enraizamiento para cada 2 tratamientos de la variable longitud de raíces.....	73
Anexo 7 Camara de flujo .....	74
Anexo 8 Preparación de explantes .....	75
Anexo 9 Mortandad de explantes por contaminación.....	76
Anexo 10 Mortandad de explantes por necrosis.....	77
Anexo 11 Establecimiento de tipos de yema .....	78
anexo 12 Establecimiento de tipos de yema .....	79
Anexo 13 Vitroplantas enraizadas por tipo de explante .....	80
Anexo 14 Enraizamiento de vitroplantas .....	81
Anexo 15 Aclimatación.....	82
Anexo 16 Evaluación de enraizamiento de plántulas.....	83
Anexo 17 Mortandad de plántulas.....	84
Anexo 18 Enraizamiento ex vitro de yemas apicales.....	85

## I. INTRODUCCIÓN

La deforestación de los bosques del Perú cada vez se va agudizando, hasta el año 2 000 la superficie deforestada ascendía a 7 172 553,98 ha. (Che *et al.*, 2011). Esto es evidencia de la pérdida de territorio boscoso que genera el riesgo de no disponer de árboles de muchas especies valiosas que son las más susceptibles al proceso de deforestación, por sus características e importancia de uso y comercialización.

El Perú es un país megadiverso, dentro de sus bosques existen especies de uso medicinal con valor comercial de importancia. MINAM (2011) menciona a *Croton sp.* como una de las especies prometedoras para el futuro; los productos forestales no maderables han tenido un incremento significativo en exportaciones, dentro de éstos, están consideradas las plantas medicinales. *Croton sp.* es una especie muy importante comercialmente, es por ello su interés para muchas industrias; Su extracción está sujeta al tumbado de árboles y se viene haciendo a escala comercial, como consecuencia de ello su población natural va disminuyendo progresivamente. Existe variabilidad en la calidad de látex (densidades, colores, sp, variedades o procedencias, una forma de simplificar el análisis de factores que condicionan esta variabilidad de producto es clonando la especie e instalando en condiciones de sitio para observar comparativamente los factores mencionados que dificultan el comercio. *Croton draconoides* y *Croton lechleri* presenta dificultades de propagación debido a que sus semillas pierden rápidamente su poder germinativo; es por eso la importancia de encontrar una metodología que permita propagar esta especie a gran escala en un menor tiempo y con material de propagación seleccionado.

La propagación *in vitro*, favorece la producción masiva de individuos seleccionados en comparación con otros métodos de propagación; también permite mantener la calidad genética de individuos que presentan características deseables que se quieren perpetuar. *Croton sp* se puede propagar a nivel *in vitro* y convencionalmente por la propagación vegetativa, ambas técnicas brindan buenos resultados, según estudios realizados por Donayre (2002) y Ruiz (2003) a nivel *in vitro*, aunque estos no tuvieron como objetivo evaluar la efectividad y calidad del enraizamiento, por lo cual sus resultados son

preliminares. Román (2014) utilizó estaquillas provenientes de rebrotes inducidos de árboles adultos, y logró buenos resultados en el enraizamiento; sin embargo, la disponibilidad de este tipo de material puede ser muy limitada, si se requiere de plantones de origen conocido en grandes cantidades. Esta técnica tiene la desventaja de no poder aplicarse a gran escala si no se dispone de suficientes árboles seleccionados donantes del material de propagación para hacer la inducción del rebrote al mismo tiempo.

La dificultad principal en la micro propagación radica en el enraizamiento, esta etapa resulta ser un gran inconveniente para las especies leñosas, debido a que las raíces formadas son muy vulnerables por presentar pocos pelos radicales (Pierik, 1990). Es por ello que se realizó la presente investigación con el objetivo de estandarizar la propagación *in vitro* de *Croton lechleri*, determinar el tipo de explante que mejor responde a la inducción del enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* y caracterizar la calidad de enraizamiento en términos de longitud y abundancia de raíces.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 1. ASPECTOS GENERALES DE *CROTON SP.*

#### 1.1. TAXONOMIA

- Reino : Vegetal
- División : Fanerógamas
- Sub-división : Angiosperma
- Clase : Dicotiledónea
- Orden : Euphorbia
- Familia : Euphorbiaceae
- Género : *Croton*
- Especie : *Croton lechleri*,
- Nombre común: Sangre de grado

#### 1.2. DISTRIBUCIÓN NATURAL

Originario de regiones tropicales y subtropicales de Sudamérica localizada principalmente en Perú, creciendo en estado silvestre en las cumbres montañosas y regiones selváticas, especialmente en bosques húmedos. Distribuido en la región Amazónica, en un rango altitudinal de 705 – 1660 msnm; en los departamentos de Amazonas, Cusco, Huánuco, Junín, San Martín, Madre de Dios y Loreto, valles de Oxapampa, Entaz, Cacazú y Palcazú. Ramírez, (2003).

Aguirre (1984) citado por Atanacio (1998) menciona que en los bosques secundarios de Pucallpa, no se encuentran especies productoras de maderas preciosas. Sin embargo, es notoria la presencia de Sangre de Grado como producto no maderable.

Sangre de grado, presenta una amplia distribución en el Perú, está presente en 12 departamentos. Localizados tanto en ceja de selva, selva alta y selva baja. En la provincia de Oxapampa, se encontró al menos 4 especies diferentes de “Sangre de Grado”: *Croton lechleri*, *Croton perspicuosus*, *Croton nrimbachii* y *Croton sampatik*. El rango de distribución altitudinal es amplio (370-2080 msnm) y en Iquitos se encuentra a 104 msnm (Meza, 1999).

Brako, Zaruchi, (1993) citados por Meza (1999) indican que en el departamento de Loreto se encontraron tres especies arbóreas: *Croton lechleri*, *Croton palanostigma* y *Croton draconoides*.

### **1.3. DESCRIPCIÓN GENERAL**

Reynel *et al.*, (2003) menciona que el *Croton lechleri*, es una especie heliófita, de crecimiento rápido, característica en bosques secundarios pioneros y zonas con alteración humana, en suelos de textura y niveles de acidez variados, de baja fertilidad, bien drenados, con pedregosidad baja a media. Meza, (1999) menciona que su característica principal es segregar un látex de color rojo, el cual posee propiedades anti inflamatorias, cicatrizantes y en el tratamiento de anemia. También menciona que actualmente existe una creciente demanda nacional e internacional. Es la segunda especie de origen amazónico que está ganando importancia económica como fuente de látex medicinal.

#### **a. Hojas**

Simple, con dos glándulas en la base alternas, a veces opuestas de 12-20 cm de largo por 5-14 cm de ancho, las hojas más tiernas de color blanco – rojizo y con abundante indumento, tomentosa en ambos lados, glabrescente y estelado. Ramírez, (2003).

#### **b. Inflorescencia**

Inflorescencia con racimos laxos, con flores en glomérulos, color blanco cremoso. Ramírez, (2003).

#### **c. Frutos**

El fruto es una capsula globos de 3 mm de largo por 4.5 mm de ancho. Semillas lisas con carúncula y endosperma oleaginoso. Ramírez, (2003).

## **1.4. ECOLOGÍA Y FENOLOGÍA DEL GÉNERO *CROTON***

### **a. Ecología**

Jena (1964) y Grandez (1994) citados por Atanacio (1998) mencionan la existencia de poblaciones naturales de *Croton sp.*, en lugares donde la temperatura media es de 25 °C, con precipitaciones anuales de 2000 milímetros y piso altitudinal que va desde los 250 m.s.n.m. hasta los 1 700 m.s.n.m. Jena (1964), Arevalo (1993) y Grandez (1994), clasifican a *Croton sp.* como una especie codominante de bosques secundarios.

### **b. Suelos**

Esta especie prefiere suelos aluviales, de franco a franco limoso, de buen drenaje y profundos. Al sur de Ecuador, estas especies soportan suelos arcillosos (Lujan 1992 citado por Atanacio 1998).

### **c. Aspectos fenológicos en la selva central**

Ñaupari (1993) citado por Atanacio (1998) realiza la descripción fenológica y la describe de la siguiente manera:

#### **c.1. Floración**

La época de floración se puede observar desde el mes de diciembre, en que aparecen los primeros botones florales. Con mayor frecuencia la floración se nota en los meses de enero a marzo, la duración de flor abierta es más o menos 22 días dependiendo del clima.

#### **c.2. Fructificación**

Los frutos se hacen visibles conforme las flores se van marchitando y cayendo. En su lugar quedan pequeños puntitos que son los ovarios, luego estos se van desarrollando y forman frutos. Los frutos son de color verde amarillento, con gran cantidad de pulverulencia amarillenta, que es característica de esta especie forestal. Botánicamente es una capsula septifraga, seco dehiscente, de forma globosa depresionada. Su maduración demora en promedio de 48 días y la época en que la fructificación se hace más notoria es entre setiembre a diciembre.

Una vez alcanzada su plena madurez y con una insolación considerable, los frutos aceleran la diseminación de la capsula, desprendiéndose las tres semillas dispersándose en diferentes direcciones alrededor del árbol.

### **c.3. Defoliación**

La defoliación ocurre después de la diseminación de las semillas, porque los pedúnculos empiezan a secarse. De igual manera las hojas adyacentes toman un color anaranjado y posteriormente caen, éste proceso se observa durante los meses de mayor insolación, en que también las hojas son más pequeñas pero conservan sus características. También se observa con mayor frecuencia en ésta época la presencia de hojas anaranjadas.

### **c.4. Foliación**

La aparición de nuevos rebrotes y hojas, se observan al comienzo de la época lluviosa, desde el mes de setiembre, notándose con mayor intensidad en los meses de octubre a noviembre.

## **1.5. PROPAGACIÓN Y USOS**

### **a. Cosecha de semillas**

Cuadrado (1989) citado por Atanacio (1998) menciona que la cosecha de frutos-semilla es en el periodo comprendido entre agosto-octubre en la Selva Central del Perú, durante la fase de dehiscencia, es decir al momento de expulsión de la semilla. Sobre la forma de cosechar Ñaupari (1993) citado por Atanacio (1998) indica que las inflorescencias seleccionadas se envuelven en bolsitas de tul o gasa para captar las diminutas semillas, que son aproximadamente 150 000 por kilogramo.

### **b. Germinación**

Brese (1992) citado por Venturo (1998) demuestra en su trabajo de investigación, que la germinación de semillas ocurre a los 5 y 10 días después de almacenado, requiriendo condiciones de buena humedad, sustrato y temperatura adecuada.

### **c. Regeneración natural**

Las semillas que caen naturalmente ocurren después de 15 a 20 días. Naturalmente se regeneran en potreros, claros abiertos en los bosques y bordes de carreteras. Ésta se caracteriza por presentar una buena densidad poblacional en la categoría brinzales (300 a 400 individuos/m<sup>2</sup>), (Meza 1999).

## **d. Usos**

### **d.1. Medicinal**

En la medicina tradicional recomiendan tomar diariamente por la noche, ocho gotas de látex de sangre de grado (*Croton sp.*), vertiéndolas en la infusión de cualquier hierba aromática para curar dolencias del hígado y riñones. También se dice que esta medicina cura el malestar que resulta de las libaciones y además cura el dolor de cabeza, la amigdalitis y la úlcera estomacal (Carnevale 1995 citado por Atanacio 1998)

### **d.2. Otros usos**

Tienen propiedades melíferas, el valor melífero y polinífero es bueno. Se usa también como sombra, cerco, protección, leña, etc. (Arévalo 1993 citado por Atanacio 1998)

Nalvarte *et al.*, (1999) citado por Domínguez (2002) mencionan que además de aprovecharse su látex también se puede usar la corteza.

## **1.6. CARACTERÍSTICAS DEL LÁTEX**

Urrunaga (1977) citado por Meza (1999) determinó mediante cromatogramas, la presencia de varios compuestos orgánicos: alcaloides, taninos, azúcares y compuestos fenólicos en las muestra de resina. Se encontraron taninos en un 54 % y los azúcares representan 4 %, también se encontró lactosa, galactosa y manosa, ácido gálico y saponina en concentraciones muy bajas.

En estudios realizados en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, se encontró que la resina de sangre de grado, muestra una actividad farmacológica como cicatrizante. Responsable de ese efecto es la tapsina, sustancia aislada de la sangre de grado de *Croton lechleri* traído de Iquitos.

### **a. Cosecha del látex**

La cosecha de uso familiar, no requiere el tumbado de árboles, a diferencia de la cosecha comercial que si requiere, además de seleccionar árboles grandes. Para la colección del látex, se realiza incisiones en la corteza.

Meza (1999) indica los siguientes factores que influyen en la cosecha del látex:

- 1) Árboles de buen diámetro (mayores a 27 cm de DAP)



- 2) No debe presentar cortes anteriores en la corteza del fuste del árbol.
- 3) Hora de cosecha durante el día.
- 4) Presencia temporal de agua en el suelo donde se desarrolla la planta.
- 5) Hábitat de la planta.
- 6) Buena fase lunar, desde inicios de la fase creciente hasta la fase llena.

## **1.7. RENDIMIENTO**

Meza (1999) menciona que la edad máxima de cosecha de látex es entre los 15 a 20 años, ya que son especies con un ciclo de vida corto. Rengifo (2001) citado por Fabián (2011) y Meza (1999), coinciden en que el máximo rendimiento de látex de *Croton sp.* se produce a partir de los 7 años aproximadamente, cuando el árbol tiene aproximadamente 30 cm de dap.

A partir del séptimo u octavo año de edad, cuando el árbol mide aproximadamente 30 cm de ancho a la altura del pecho produce de 3 a 4 L de látex con la técnica del tumbado (Quevedo 1992 citado por Atanacio 1998).

La cantidad de látex extraído está en relación al diámetro del tronco y a la edad de los árboles.

Por el método de sangría, se puede obtener hasta 50 ml por árbol por año. Por el método del tumbado la producción de látex, para un diámetro de 20 cm a 30 cm es de 1 L, para un diámetro de 30 cm a 40 cm, es de 1.5 a 2 L, para un diámetro de 40 cm a 50 cm se tiene una producción de hasta 5 L Torres, (2013).

## **2. CULTIVO IN VITRO**

### **2.1. MICROPOPAGACIÓN**

Roca y Mroginski (1991) definen la micropropagación como un procedimiento aséptico, que comprende la manipulación, en las plantas, órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente. Implica que cada una de las plantas que se produce puede crecer y ser fenotípica y genéticamente idéntica a la planta original de la que se deriva.

Todas las células de las plantas son totipotentes, o sea capaces de dar origen a una planta entera; aunque hasta el momento los ápices del tallo han tenido mayor importancia para la multiplicación clonal en varias especies., también se han utilizado otros explantes como hojas, ovarios y capullos de flores para obtener plántulas (Roca y Mroginski 1991).

Las técnicas de cultivo de vegetales pueden usarse para la conservación del germoplasma, en condiciones asépticas y libres de patógenos (Azurdia *et al.*, 1995).

Roca y Mroginski (1991) mencionan que algunas coníferas especialmente árboles de los géneros Pinus, Picea, Tsuga, Pseudotsuga, Thuja, Juniperus, Sequoia y Araucaria, pueden combinarse exitosamente con una combinación de estrategias convencionales y de cultivo aséptico. Una de las estrategias es inducir yemas y brotes, mediante la aplicación de citocinina a niveles altos. Los brotes juveniles inducidos, son extraídos y se cultivan *in vitro* para producir yemas adicionales que a la vez se separan y enraízan en el medio de enraizamiento.

### **2.1.1. VENTAJAS**

Villarroel *et al.*, (2010), Roca y Mroginski (1991) y Hartmann (1997) mencionan las siguientes ventajas:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y tiempos económicamente costeados.
- Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga.
- Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduaneras.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos.
- Propagación de plantas recalcitrantes a las técnicas de propagación vegetativa.
- Propagación clonal de parentales para la producción de semillas híbridas

- Producción continua en invernadero.
- Posibilidad de conservar germoplasma a mediano y largo plazo.
- La propagación puede realizarse en cualquier temporada del año.

Vargas (1982) cita a White (1964), Libby (1974), Durzan (1980), Smith (1980), Mckeand (1981), mencionan las ventajas de la micropropagación de especies forestales:

- La posibilidad y relativa rapidez de propagación de especies leñosas que son difíciles de obtener por los métodos de propagación asexual, lo cual permite reducir hasta un 75 % de tiempo para obtener plántula mejorada para los programas de plantación o reforestación.
- La gran cantidad de plántulas obtenidas a partir de un solo explante.
- La micropropagación puede ser más adecuada que un huerto semillero en la producción de material vegetativa para sitios especiales, permitiendo aumentar la productividad al optimizar la interacción genotipo-ambiente.
- Es útil en la reproducción en grandes cantidades de híbridos intra e inter específicos deseables.
- Puede ser útil en la selección temprana o indirecta de genotipos superiores, mediante la evaluación y correlación de algunas características y parámetros de las plántulas *in vitro*.
- Las plántulas obtenidas pueden ser de gran ayuda como material experimental en diferentes tipos de investigaciones, ya que su uniformidad genética elimina una fuente de variación, con lo que se reduce el posible error experimental, así mismo aumenta la precisión de la prueba de progenie y estudios fisiológicos (fertilización, aspectos ambientales, riego, etc.).

### **2.1.2. DESVENTAJAS**

Hartmann (1997) y Villaroel *et al.*, (2010) mencionan:

- Requiere personal entrenado y técnicas especializadas

- Relativo costo de producción, en función de la importancia del problema a resolver y de la posibilidad evidente de métodos convencionales de menos costo.
- Estabilidad genética débil en algunos sistemas de propagación *in vitro*.
- Aclimatación de las plántulas, como un proceso difícil con mayores probabilidades de pérdidas en esta etapa.
- Poca respuesta inicial de algunas especies y genotipos.
- Se requiere grandes espacios para altos volúmenes de producción
- Contaminación o infestación con insectos puede causar pérdidas en corto tiempo.
- Variabilidad de producción de plantas de características no deseadas puede ser un riesgo en la micropropagación.
- La economía y el marketing son la clave para el éxito de operaciones comerciales.
- Alta dependencia de energía eléctrica.

## **2.2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MICROPROPAGACIÓN**

### **a. Planta donante del explante**

El estado fisiológico de la planta utilizada como explante influye significativamente en su capacidad morfogenética. Roca y Mroginski (1991) cita a Styer *et al.*, (1983) e indican que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas en diferentes edades fisiológicas.

Asimismo, Villalobos *et al.*, (1980) citado por Roca y Mroginski (1991) mencionan que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis.

### **b. Explante**

Montoya (1991) recomienda tomar en cuenta el tamaño, la fuente y la edad fisiológica del explante. A medida que se aumenta el tamaño del explante se disminuye la posibilidad de lograr el objetivo de liberación viral y a medida que se disminuye el tamaño, la posibilidad de establecer el cultivo y alcanzar la morfogénesis es menor. Los tejidos más jóvenes y

menos diferenciados son en general los del mayor éxito en cultivo de tejidos. Para cultivos arbóreos, los callos pueden iniciarse solamente a partir de tejidos juveniles.

En caso de micropropagación a partir de semillas, éstas tienen que ser desinfectadas superficialmente y germinar en condiciones de asepsia. En el caso de propagación vegetativa, los brotes y los ápices meristemáticos han sido generalmente la fuente de los explantes. (Villalobos, 1980 citado por Roca y Mroginski 1991).

Existen otros factores que pueden alterar las respuestas de los explantes cultivados, como la época del año en que se realizan los cultivos, explantes obtenidos de invernadero o campo, los pretratamientos a los explantes y las condiciones de crecimiento de las plantas donantes de los mismos. Roca y Mroginski (1991).

#### **c. Factores físicos**

Chee *et al.*, 1982 citado por Roca y Mroginski (1991) indican que la temperatura de la mayoría de las especies fluctúa entre 24 °C y 28 °C. Variando los regímenes de temperatura en el día y la noche, han encontrado que únicamente en un reducido número de especies tal variación es ventajosa.

Villalobos *et al.*, (1980) citado por Roca y Mroginski (1991) demostraron que la luz es un factor fundamental en la morfogénesis. En el caso de *Pinus radiata*, observaron que la luz interacciona con una citoquinina durante la diferenciación de los brotes adventicios y que la morfogénesis no ocurre cuando falta uno de esos componentes. El factor luz involucra varios componentes como son la importancia morfogenética de estos componentes.

Los factores físicos ambientales influyen en todos los procesos: Absorción de agua, evaporación, fotosíntesis, respiración, crecimiento, floración, cuajado del fruto, etc. (Roca *et al.*, 1991).

#### **d. Asepsia**

Esta referida tanto al material vegetal, a los medios, recipientes de cultivo, cuartos de cultivo, lugares de transferencia de cultivo, operarios y herramientas con los cuales se manipula los cultivos (Montoya, 1991).

**e. Medio de cultivo**

Es uno de los factores más determinantes del éxito, existen respuestas diferentes de las plantas a cada medio específico. Montoya (1991) indica los requisitos particulares de nutrición y hormonas de una determinada planta.

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta. Los reguladores, vitaminas en mínimas concentraciones, regulan la distribución de todo tipo de sustancias en el interior de la planta y por consiguiente, son responsables de la división celular, las auxinas y citoquininas regulan el desarrollo de los órganos (regeneración) sobre partes de plantas (explantes), cultivados *in vitro*, Roca y Mroginski (1991).

La elección de las sales inorgánicas y los niveles de sales, están básicamente dictados por los recursos del investigador y las necesidades de la planta de que se trate (Montulban, 1982; citado por Salinas, 1988).

**f. Genotipo**

Montoya (1991) menciona que algunas plantas resultan ser aptas y logran mejores respuestas en cultivos *in vitro*, las diferencias en la regeneración de plantas son dependientes del genotipo. La constitución genética y factores como temperatura óptima son determinantes para el crecimiento y la floración, forma, color de flores. Ésta depende también de las condiciones físicas y químicas que se crean *in vitro*.

**g. Efectos de posición y competencia**

A pesar de considerarse que en todas las células de un organismo, existe el mismo genotipo, existen fuertes diferencias entre célula y célula y entre distintos tipos de órganos en cuanto a capacidad de regeneración en cultivos de tejido. Se considera en general que los tejidos embriogénesis, meristemáticos y reproductivos parecen tener una mayor propensión para el crecimiento y morfogénesis en cultivos de tejidos. (Montoya, 1991).

**h. Subcultivo**

Montoya (1991) menciona que tanto en los callos como en las suspensiones celulares existe una capacidad de proliferación celular indefinida, originando dos fenómenos importantes: la pérdida de potencial morfogenético y la variabilidad genética (el fenómeno se ha observado menos pronunciado en cultivo de órganos).

Noiton *et al.*, (1986) citado por Pierik 1990 demostraron que un número creciente de repicado, favorecen el enraizamiento en plantas de manzano, explicado quizá por el proceso de rejuvenecimiento.

**i. Suministro de Oxígeno**

El suministro de oxígeno en el medio y el uso de un medio líquido favorecen el enraizamiento, (Pierik, 1990).

**j. Agar**

Estudios realizados por Nemeth (1986) citados por Pierik (1990) demostraron que la formación de raíces adventicias es pobre en medios sólidos, en comparación de los medios líquidos.

La concentración del agar en cultivo de tejidos vegetales varía de 0,6 % a 1,0 %. Los problemas de mala gelificación se deben principalmente al empleo de un pH bajo; cuando el gel queda muy firme se debe a un pH elevado. Se deben evitar periodos prolongados a altas temperaturas de la autoclave para impedir el deterioro del agar.

**k. pH**

Según Pierik (1990) se conoce poco acerca de la influencia del pH del medio nutritivo en el cultivo in vitro. El rango apto para el crecimiento está entre 5,0 - 6,5. Un pH menor a 4,5 y un pH mayor a 7, generalmente frena el crecimiento y desarrollo in vitro.

**2.3. REGULADORES DE CRECIMIENTO**

**a. Hormonas**

Las sustancias de crecimiento pueden ser endógenas si se producen dentro de la misma planta ó exógena si se aplican externamente. Frecuentemente las sustancias de crecimiento o fitoreguladores sintéticos pueden estimular unos procesos y reprimir otros. Del mismo modo, algunas hormonas pueden ser estimulantes a dosis bajas o inhibitorias a dosis altas; el nivel depende de la especie. Por otra parte, el proceso puede ser afectado por la administración de una hormona exógena si ésta es producida endógenamente en cantidades suficientes, (Osorio, 1984 citado por Salinas, 1988).

Los grupos más importantes de hormonas vegetales son las auxinas, las citoquininas y las giberelinas que pueden actuar solas o combinadas. Las respuestas hormonales están en función del genotipo y del tipo de tejido utilizado, (Cisneros, 1988 citado por Salinas, 1988).

#### **b. Auxinas**

Mejía (1984) menciona que las auxinas están identificadas por ocasionar elongación del tallo e internudos, tropismo y dominancia apical, abscisión y enraizamiento.

Según Pierik (1990) las auxinas producen la elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callos) y formación de raíces adventicias, inhibición de vástagos axilares y adventicios y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión. A bajas concentraciones, se da la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones no se producen raíces y tiene lugar a la formación de callos. La utilización del 2,4-D, puede inducir mutaciones e inhibir la fotosíntesis.

En algunos casos las auxinas interactúan positivamente junto con las citoquininas en la regulación de la división, elongación y diferenciación celular así como en la formación de órganos (Dodds y Roberts, 1982 citados por Mejía, 1991).

Roca y Mroginski (1991) indican que las auxinas tienen una gran capacidad de producir agrandamiento y alargamiento celular, han encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos. Existen auxinas naturales: AIA, indol-3-acetonitrilo, ácido indol-3-propiónico, etilindo-3-acetato, entre otros. Entre las auxinas sintéticas se consideran la 2,4-D, ANA y el AIB. Las concentraciones más usadas son 0,001 a 10 mg/L, 0,1 a 10 mg/L y 1 a 10 mg/L con un punto óptimo de 0,1 a 1 mg/L, 1 a 5 mg/L y 2 mg/L, para el AIA, 2,4-D y ANA respectivamente. Generalmente se usa una auxina cada vez, sin embargo, en investigaciones realizadas con *Euphorbia marginata* obtuvieron buenos resultados con el uso simultáneo de 2,4-D y ANA, (Roca y Mroginski, 1991).

#### **c. Citoquininas**

Mejía (1991), Roca y Mroginski (1991) mencionan que la citoquinina inhibe la dominancia apical y estimula el desarrollo de los tallos laterales. Osorio (1984) citado por Salinas (1988) menciona que las citoquininas tienen efecto sobre la síntesis de ADN. Además, está comprobado que induce actividad de las amilasas y proteasas y la síntesis de la tiamina y auxina.



Las citoquininas producen una mayor actividad en el ritmo de la mitosis celular, lo que implica que promueve la división celular y retarda el envejecimiento o senescencia de los órganos, ya sea por una acción sobre el ADN o porque la presencia de citoquinina hace fluir, por un mecanismo desconocido, auxina y nutrientes. Las más utilizadas son: Benzilaminopurina (BAP), Isopentil-adenina (2-ip) y furfurylamino purina (Kinetina) (Roca y Mroginski, 1991).

En concentraciones altas (1-10 mg /L) pueden inducir la formación de vástagos adventicios sin embargo, inhiben la formación de raíces. Promueven la formación de vástagos axilares, porque disminuyen la dominancia apical; también retardan el envejecimiento (Pierik, 1990).

#### **d. Acción combinada de la Auxina con Citoquinina**

Según Hurtado y Merino (1994), las auxinas son importantes para estimular la iniciación de la raíz, y las citoquininas promueven la formación de brotes. Frecuentemente sus efectos son antagónicos: una de las dos sustancias inhibe la acción de la otra. La eficiencia de ambas depende del tipo de auxina o citoquinina También mencionan que la auxina más efectiva es el 2,4-D y la menos activa, el AIA. Entre las citoquininas, las más efectivas son la zeatina y el zip. Para satisfacer las necesidades hormonales, algunas veces se emplean en un mismo medio dos auxinas o dos citoquininas.

#### **e. Giberelinas**

Las giberelinas han sido definidas biológicamente como compuestos que causan elongación de entrenudos. Se sabe que entre el endosperma y el embrión existe muy poca o ninguna actividad enzimática, pero la actividad de varias enzimas, incluyendo la alfa\_amilasa, aumenta mucho después de la aplicación del ácido giberélico. En la semilla en germinación, el embrión secreta ácido giberélico y así controla la movilización de las reservas en el endosperma para su crecimiento y desarrollo (Salinas, 1988).

Pierik (1990) indica que el AG3 es muy sensible al calor: Se pierde el 90 % de su actividad biológica después del autoclavado. Además de causar la elongación de entrenudos, induce el crecimiento de los meristemas y yemas in vitro. También menciona que inhibe la formación de raíces. Juntamente con Steegmans (1975) indican que inhibe la formación de vástagos adventicios. Mejia (1991) menciona que influyen en el alargamiento celular.

El AG3 es usado con frecuencia como un regulador de suplemento de las auxinas y citoquininas en medios de cultivo. Es fácilmente soluble en agua, se usa hasta 1000 mg/L.

#### **f. Vitaminas**

Roca y Mroginski (1991) mencionan que es necesario agregar vitaminas al medio, hasta que los cultivos hayan crecido o se hayan vuelto verdes. En la mayoría de los medios, la tiamina, pirodoxina y el ácido nicotínico se consideran benéficas y se añaden de forma rutinaria. Otras vitaminas como el ácido pantoténico, biotina, riboflavina y colina pueden ser útiles, pero no absolutamente necesarias. Existen vitaminas que son termolábiles como la glutamina, asparagina, la hipoxantina y el ácido ascórbico, éstas deben esterilizarse por filtración.

Según Moran (1983) citado por Salinas (1988) el uso de vitaminas favorece el desarrollo de los cultivos de tejidos, además de actuar como reguladores del proceso metabólico.

#### **g. Compuestos Nitrogenados**

Se reconoce que las formas de nitrógeno reducido tienen cierto valor en el cultivo de tejidos. Se ha comprobado que el  $\text{NH}_4$  permite mayor crecimiento, pero la adición de asparagina, glutamina u otros aminoácidos no permiten aumento de crecimiento, (Montoya, 1991).

#### **h. Sustancias Orgánicas**

Los hidratos de carbono, son indispensables en cultivo de tejidos, debido a la incapacidad del explante en un primer momento, o porque no realiza una fotosíntesis lo suficientemente intensa para poder ser completamente autótrofa; por consiguiente el carbono debe ser provisto por un hidrato de carbono que generalmente se suministra a través de un azúcar, sacarosas, glucosas y otros. (Osorio, 1984 citado por Salinas, 1988).

En muchos medios de cultivo de tejidos se usan complejos orgánicos como la leche de coco, jugo de tomate, leche de maíz etc. Con la adición de estos complejos orgánicos, especialmente la leche de coco, se aporta factores que promueven el crecimiento en todos los estadios de desarrollo de muchos cultivos vegetales de angiospermas (Osorio 1984, citado por Salinas, 1988).

**i. Endosperma de coco:**

La leche de coco (endosperma líquido de la semilla de coco) es una sustancia que contiene una elaborada mezcla de nutrientes orgánicos y una combinación de hormonas como auxinas, giberelinas y citoquinonas (Salinas, 1988).

Montoya (1991) además menciona que contiene Myo-inositol, algunos agentes de división celular como la difenilúrea, 9,  $\beta$ -D ribofuranosinol-zeatina y contiene una serie de aminoácidos libres como fenilalanina. La calidad de leche de cocos jóvenes es mayor que la de los viejos, que en algunos casos puede inhibir el crecimiento.

Hurtado y Merino (1994) mencionan que la aplicación de este compuesto natural debe aplicarse en una concentración del 10 al 20 %.

Steward (1958) citado por Pierik (1990) demostró que la utilización con auxinas produce una fuerte división celular en los tejidos. Estudios realizados por Kovoov (1962), Letham (1974), Van Satden y Drevis (1975) citados por Pierik (1990) encontraron dentro de la leche de coco, compuestos como kinetina, 9,  $\beta$ -D -ribofuranosilzeatina, zeatina y ribósido, respectivamente.

**j. Carbón activado**

Pierik (1990) indica que el carbón activado se usa en una concentración de 0,2 - 3,0 % p/v. Su uso se justifica por lo siguiente:

- Adsorción de pigmentos tóxicos, marrones y negros (compuestos de tipo fenólico y melanina), y de otros compuestos tóxicos incoloros.
- Oscurece el medio, y como resultado de ello induce la formación de raíces y el crecimiento puede ser modificado.
- Estabiliza el pH.
- Es posible que elimine sustancias que pueden promover el crecimiento.
- Adsorción de otros compuestos orgánicos (auxinas, citoquininas, etileno, vitaminas, etc).

## **2.4. CANTIDAD DE MEDIO POR RECIPIENTE DE CULTIVO**

Para tener una supervivencia y crecimiento de los cultivos se requiere un balance entre la masa del inóculo y la cantidad de nutrientes. Los inóculos muy pequeños se ven grandemente afectados por cantidades grandes de medio; de la misma manera, el crecimiento de inóculos grandes frecuentemente está restringido por un inadecuado suministro de medio.

## **2.5. ESTERILIZACIÓN**

El tiempo empleado para una buena esterilización es de 15 min a una presión de 15 lb/in<sup>2</sup> (kg/cm<sup>2</sup>) y a una temperatura de 120 °C - 121 °C. Debe evitarse la sobreesterilización, ya que podría traer como consecuencia la degradación de ciertos componentes del medio nutritivo, así como la caramelización de los azúcares. Calentamientos prolongados inactivan los factores de crecimiento, degradan azúcares, aminoácidos y reducen la calidad gelificante del agar.

## **2.6. REGENERACIÓN DE EXPLANTES**

Pierik (1990) indica que existen limitaciones tanto cualitativas como cuantitativas debidas a un gran número de factores. En este proceso se pueden distinguir las siguientes etapas:

- Des-diferenciación de células diferenciadas (que conduce probablemente a una redefinición y rejuvenecimiento de las células).
- División celular, generalmente seguida por formación de callo; cuando se dirige la división celular, puede comenzar la iniciación de órganos.
- Iniciación de órganos (formación).
- Desarrollo de órganos.

## **3. ETAPAS DE LA PROPAGACIÓN IN VITRO**

Murrashige (1962) citado por Roca y Mroginski (1991) define cinco etapas

### **a. Etapa 0:**

Etapa inicial, que comprende la selección de la planta madre y la selección de una modalidad de pre tratamiento para volver funcional a la estrategia que se adopte.

**b. Etapa I:**

Es la etapa iniciación o de establecimiento, en el cual se establece el cultivo inicial o primario.

**c. Etapa II:**

Es la etapa de multiplicación de brotes, o multiplicación simplemente.

**d. Etapa III:**

Corresponde al enraizamiento o etapa de pretrasplante; tiene como objetivo producir una planta autótrofa que pueda sobrevivir en las condiciones de trasplante del suelo.

**e. Etapa IV:**

Aclimatación o transferencia final a la etapa del medio ambiente.

De estas etapas, son tres las más fundamentales para micropropagar eficientemente una especie.

### **3.2. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO ASÉPTICO**

Una vez seleccionado el mejor explante, se requiere desinfectarlo superficialmente, para tal efecto se utilizan diferentes compuestos, siendo los más comunes el hipoclorito de sodio y de calcio, alcohol, nitrato de plata, peróxido de hidrógeno y otros. La selección, concentración y tiempo de los desinfectantes se determina por las características del explante, Roca y Mroginski (1991).

Hurtado y Merino (1994) sugieren sumergir el material vegetativo en alcohol al 70 % durante 30 seg, con lo cual se eliminan las grasas, permitiendo así una mejor penetración del agente desinfectante en el material. Así mismo recomiendan emplear unas gotas de tween.

### **3.3. CRECIMIENTO DEL EXPLANTE**

Los tejidos meristemáticos de árboles introducidos en un medio estéril que contenga los nutrientes, vitaminas y hormonas necesarias para estimular y soportar el crecimiento posterior de los tejidos, mediante la manipulación del balance químico y hormonal, son capaces de formar yemas, brotes y raíces. (Mckeand, 1981; Marayanas, 1977 citado por Vargas, 1982).

El explante se multiplica con la formación de callos o sin ella. También se debe a la división de células y/o aumento de tamaño. La diferenciación está asociada con la producción de células en la que influyen las condiciones *in vitro*, Roca y Mroginski (1991).

### **3.4. ENRAIZAMIENTO DE LOS BROTES Y PREPARACIÓN PARA SU TRANSPLANTE**

La función de esta etapa es preparar la planta para las condiciones *ex vitro*.

#### **a. Enraizamiento *in vitro*:**

El proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. Murashige (1962) citado por Roca y Mroginski (1991) demostró que la reducción a un 50 % ha dado resultados positivos en diferentes especies. Roca y Mroginski (1991) y Hartmann (1997) recomiendan cambiar el balance hormonal, esto es, disminuir las citoquininas y aumentar las auxinas exógenas. En algunas especies, la eliminación de las citoquininas exógenas ha sido suficiente estímulo para la diferenciación del sistema radical (Thorpe, 1981 citado por Roca y Mroginski, 1991).

Hartmann (1997) recomienda la transferencia individual a un medio inductor de raíces, por algunos días y luego se transfiere a un medio libre de auxina, para finalmente lograr el enraizamiento. Este proceso puede realizarse en luz u oscuridad y en algunas especies incluye factores adicionales, tal como el floriglucinol.

Pierik (1990) recomienda utilizar medios líquidos, que faciliten las condiciones que permiten el desarrollo de la raíces *in vitro*.

#### **b. Enraizamiento *ex vitro***

Las raíces *ex vitro*, tienen menos células corticales y sistema vascular bien formado, con mayor capacidad de sobrevivencia en condiciones de invernadero. A diferencia de las raíces *in vitro*, su capacidad de sobrevivencia es menor. (Hartmann, 1997)

Existen 2 procedimientos, para lograr el enraizamiento *ex vitro*:

- El explante es sumergido en un medio con auxina, para luego proceder a la aclimatación en un ambiente con alta humedad. (Hartmann, 1997 y Pierik, 1990)

- Los explantes son transferidos a un medio sólido durante 5 a 15 días, luego son lavados del agar y llevados a un ambiente ex vitro.

Pierik (1990) menciona que si se llega a formar los primordios radicales in vitro, estos se pueden convertir en auténticas raíces subterráneas.

## **4. TIPOS DE EXPLANTE**

### **4.1. YEMAS AXILARES**

Según Pierk (1990), este método utiliza generalmente plantas con tallos largos y no se necesita la citoquinina para el desarrollo de yemas.

Camarena (2008) menciona que la importancia del cultivo de tejidos de yemas axilares se debe a que cuenta con una gran estabilidad genética.

Cuando se utiliza el método de yemas axilares, se aísla un ápice del vástago, a partir del cual se desarrollan las yemas axilares. La adición de citoquinina hace que la dominancia de meristema apical desaparezca, permitiendo el desarrollo de las yemas axilares. El método de explantos nodales se usa generalmente en combinación con el método de yemas axilares, Inicialmente se permite que la yema se desarrolle y posteriormente se añade citoquinina para inducir la formación de vástagos axilares (Pierk, 1990).

Ventajas del método:

- Es más simple que otros métodos de multiplicación.
- La velocidad de multiplicación es relativamente rápida.
- Generalmente se mantiene la estabilidad genética.
- El crecimiento de las plantas obtenidas es muy bueno, quizá debido a la juvenalización y/o a la falta de infecciones.

## 4.2. YEMAS APICALES

El cultivo de yemas apicales es de gran importancia, los meristemas apicales se encuentran por lo general libres de patógenos. Los meristemas son extremadamente pequeños (0,8 mm) y su aislamiento de la planta madre debe realizarse bajo el microscopio, lo cual requiere de gran cuidado y habilidad para remover los primordios foliares sin maltratar el ápice. Los meristemas se desarrollan directamente en tallos (Camarena *et al.*, 2008).

## 5. MICROPOPAGACIÓN DE ESPECIES LEÑOSAS

La micropropagación de árboles forestales se puede realizar utilizando tejidos somáticos de las diversas zonas que presentan una actividad meristemática elevada en las diferentes etapas de desarrollo del individual. Dentro de estas, podemos incluir los meristemas secundarios o explantes de cambium, tomados de las ramas y tallo del árbol. Estos tipos de explantes pasan por tres procesos; establecimiento de un cultivo continuo (callo), formación de la planta, transferencia de los propágulos, de condiciones asépticas al suelo (Bonga, 1977 citado por Vargas, 1982). Los meristemas primarios, que incluyen a meristemas apicales, yemas brotes terminales o axilares, hojas, ápices radicales y partes florales, tejidos del embrión (cotiledones e hipocotilo) forman directamente las plantas sin la necesidad de la obtención de callos (Bonga, 1977; Konar *et al.*, 1974; Libby 1974; Winton, 1978 citados por Vargas, 1982).

Dentro de las especies leñosas, existen estudios de especies forestales, entre ellas las coníferas. Hasta 1984, se han reportado 57 especies maderables a partir de las cuales se pudo regenerar plantas completas *in vitro*, según Brown *et al.*, (1974), Mott (1981), Patel *et al.*, (1984) citados por Roca y Mroginski (1991).

Valverde (1995) desarrolló estudios de propagación de yemas, provenientes de plántulas seleccionadas por su fenotipo entre cuatro y seis meses de edad de especies como: *Terminalia amazonica*, *Callophyllum brasiliense*, *Hieronyma alchorneoides* y *Vochysia guatemalensis*

Reilly *et al.*, (1979) obtuvieron la formación de plántulas de Pino a partir del tejido embrionario, estimularon la iniciación de brotes, elongación y proliferación de yemas, en un medio nutritivo Schenk y Hildebrandt (1972) sin citoquinona, las raíces se formaron después de pasar a un medio modificado de Gresshoff y Doy conteniendo 0,5 ppm de NAA Y 2,0



ppm de IBA, dando como resultado brotes más verdes y extendiéndose las raíces de 1 a 4 cm.

Los brotes adventicios se pueden producir a partir del explante directamente, o bien a partir de callos derivados del explantes primarios, Para fines de propagación, actualmente se prefiere producirlos directamente del explante, ya que a partir de callos su formación ha sido muy difícil y frecuentemente genera anomalías. En la diferenciación de brotes adventicios existe una interrelación entre el explante, el medio y las condiciones ambientales de cultivo. En muchos casos se requiere el trasplante a un medio con otro balance hormonal y nutricional para la formación de brotes adventicios. En otras ocasiones, el trasplante a otro medio, después de formados los brotes estimula el alargamiento de los tallos, los cuales se pueden separar y enraizar. En este caso el trasplante continuo permite generalmente la formación de un gran número de brotes, por ejemplo en *Pinus radiata* el número de brotes capaces de ser enraizados se ha podido incrementar desde 180 a más de 1300, haciendo el trasplante a intervalos de tres semanas durante 12 a 24 semanas (Aitken *et al.*, 1981 citado por Roca y Mroginski, 1991).

Castilla (s/f) citado por Arias (1995) menciona que la mayor dificultad que se presenta en especies forestales con importancia económica, es el enraizamiento, sobre todo si los explantes provienen de plantas adultas. También hace mención problemas en la adaptación del explante, esto a causa de las grandes cantidades de compuestos polifenólicos, inhibidores de crecimiento y diferenciación.

Roca y Mroginski (1991) menciona que la inducción del sistema radical en angiospermas se logra reduciendo la concentración de sales minerales y el uso de auxinas, asociado generalmente con la disminución de la temperatura. También recomienda enraizar en condiciones *ex vitro*, pero antes de ello, estimular los brotes diferenciados in vitro, los sustratos que permitirían la formación de raíces serían la agrolita, la vermiculita y otros; esta medida es simple, más económica y frecuentemente produce mejores raíces.

Otras de las dificultades en la propagación de especies arbóreas, mencionada por Roca y Mroginski (1991) es la variación genética en las respuestas de regeneración y el proceso de maduración; estos problemas dificultan considerablemente la ejecución de sistemas prácticos de propagación de fenotipos seleccionados. Entre otros problemas están la

formación de órganos y plantas aberrantes, la dificultad para erradicar las infecciones internas y la secreción de sustancias tóxicas como fenoles y sustancias volátiles.

### **5.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MICROPROPAGACIÓN**

El explante es extremadamente importante, su influencia en el desarrollo *in vitro* ha sido demostrada por Villalobos *et al.*, 1980 citado por Roca y Mroginski (1991). La edad del explante es un factor crítico en las especies maderables según Bonga (1982) citado por Roca y Mroginski (1991). En general, la micropropagación es relativamente fácil empleando tejidos juveniles y es progresivamente más difícil con tejidos adolescentes y maduros. Sin embargo, aunque se haya delimitado la edad del material, el mejor explante se tiene que determinar experimentalmente; los explantes más comunes en coníferas, por ejemplo, han sido los embriones, partes de plántulas, los cotiledones y los hipocótilos provenientes de semillas germinadas asépticamente.

La cinetina como regulador de crecimiento es clave en la formación de brotes, sin embargo, las auxinas en bajas concentraciones han tenido respuesta en algunas especies.

Los factores físicos más importantes son: la forma física del medio, la humedad del medio y su atmosfera gaseosa, la luz y la temperatura.

## **6. ACLIMATACIÓN**

Es el proceso por el cual un organismo se adapta fisiológicamente a los cambios en su medio ambiente. Hartmann (1997), menciona los siguientes tratamientos para lograr que la aclimatación sea exitosa.

### **6.1. TRATAMIENTO ANTES DEL TRANSPLANTE**

- Se reduce la humedad en un 35 %.
- Incrementar el potencial osmótico del medio, usualmente con la adición de Sucrosa.
- Agregar reguladores de crecimiento tales como paclobutrasol.

## **6.2. TRATAMIENTO DESPUÉS DEL TRASPLANTE**

- Gradualmente ir reduciendo la humedad.
- Usar antitranspirantes

Las plantas cultivadas en tubos de ensayo tienen generalmente la cutícula escasamente desarrollada, debido a un alta humedad relativa (90 % - 100 %), que se da *in vitro*. En el momento de la aclimatación, se produce una transpiración cuticular extra, ya que la humedad del aire en las condiciones *in vivo* es más baja. Las hojas de plantas *in vitro*, son frecuentemente finas, blandas y fotosintéticamente poco activas. Los estomas no son suficientemente operativos y al permanecer abiertos, pueden generar estrés hídrico. La conducción de agua entre vástagos y raíces puede verse reducida por una pobre conexión vascular. La aclimatación puede realizarse permitiendo a las plantas *in vitro* habituarse de forma gradual a una humedad relativa más baja, como la que encontrarán *in vivo*. Se puede realizar la aclimatación directamente, después de la fase *in vitro*, manteniendo *in vivo* una humedad relativa alta y también una baja irradiancia y temperatura. Otra opción es dejar el tubo abierto en un ambiente estéril, durante algunos días, para ajustarse a las condiciones *in vivo*. Las raíces generadas *in vitro* son vulnerables, presentan pelos radicales, dificultando el crecimiento *in vivo*. (Pierik, 1990).

Previo al endurecimiento, las plantas enraizadas *in vitro* deberán tener una buena proporción de primordios y raíces que los haga capaces de sobrevivir (Sommer y Caldas, 1981 citado por Rojas, 2001).

### **6.2.1. SUSTRATO UTILIZADO**

De acuerdo a estudios realizados por Granada (1990) citado por Rojas (2001), la mezcla de sustratos que se usan en el trasplante (musgo, esfagneo, agrolita, vermiculita, arena) puede influir en el porcentaje de sobrevivencia y en el subsecuente desarrollo de las plantas, es aconsejable emplear los sustratos en los cuales las especies normalmente se desarrollan. En la mayoría de las plantas es importante que el sustrato sea poroso, con buen drenaje, buena aireación y con un pH adecuado.

## **7. ANTECEDENTES DE LA PROPAGACIÓN DE *CROTON LECHLERI***

Para el desarrollo de este trabajo de investigación se consideró como base los trabajos de investigación de Donayre (2002) titulado “Avances en la caracterización citogenética y respuestas al cultivo *in vitro* en 2 especies de Género *Croton* (Sangre de grado)” y de Ruiz (2003), “Micropropagación y determinación cromosómica del Genero *Croton* productores de Latex”

Donayre (2002), usó semillas, yemas de plantas adultas de *Croton draconoides* y plantones de 2 meses y 15 días de *Croton lechleri*. Consideró 5 tratamientos de desinfección para semillas, utilizó como agente desinfectante detergente y alcohol al 98 %, además utilizó HCL para la escarificación, cada uno de los tratamientos varió en el tiempo de exposición. Paralelamente desarrolló un estudio de viabilidad de las semillas obteniendo 10 a 12% de viabilidad y al realizar la prueba de germinación en tubos de ensayo con medio MS (Murashige y Skkoog) ver Anexo 1, obtuvo 0 % de germinación. Para la desinfección de yemas consideró 5 tratamientos, utilizó como agente desinfectante detergente, alcohol 70 %, hipoclorito de sodio al 2,75 % y 0,5% en tiempos diferentes de exposición. Seleccionó el mejor de ellos, el cual se detalla en el cuadro 1. Asimismo, evaluó 8 tratamientos de medio MS con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento. Logró enraizar plántulas con el medio de cultivo MS con reguladores de crecimiento, cuya composición se detallan en el cuadro 2. Este mismo protocolo utilizó Ruiz (2003) en la etapa de enraizamiento, así mismo realizó más estudios sobre el medio de multiplicación, Obtuvo mejores resultados en un medio MS con reguladores de crecimiento, el cual se detalla en la Tabla 3.

Ambos autores realizaron ensayos en la etapa de introducción, multiplicación y enraizamiento. Demostraron que se logra mejores resultados con explantes provenientes de plantones que con explantes provenientes de árboles maduros. Ruiz (2003), alcanzó buenos resultados en el enraizamiento de vitroplantas. En la etapa de aclimatación, se probó cuatro sustratos: Tierra agrícola, musgo y arena de río (1:1:1); tierra agrícola y arena de río (1:1); tierra agrícola y musgo (1:1), musgo y arena de río (1:1). El mejor tratamiento fue el sustrato compuesto de tierra agrícola y musgo, ya que obtuvo un 84 % de sobrevivencia.

Román (2014), realizó el estudio de propagación vegetativa mediante estacas juveniles, para ello realizó la inducción de brotes en árboles adultos. Determinó el efecto del ácido

indolbutírico (AIB) en el enraizamiento de estacas juveniles de *Croton lechleri*, para tal fin realizó tres aplicaciones de AIB: 1000 PPM, 2000 ppm y 3000 ppm, concluyó que la aplicación de 2000 ppm es el mejor tratamiento debido que encuentra diferencias estadísticas significativas en porcentaje sobrevivencia, porcentaje de enraizamiento, mayor número y longitud de raíces. Las estaquillas tenían 5 a 6 cm de largo y un diámetro de 3 a 5 mm. Como resultado los tratamientos más efectivos fueron los de 1000 y 2000 ppm, con enraizamiento del 90 % y 96,67 %, el tratamiento con 3000 ppm presentó un enraizamiento de 67 y 78 % y el testigo solo obtuvo 2,22% de enraizamiento.

**Tabla 1: Tratamiento de desinfección para yemas**

<b>Agente desinfectante</b>	<b>T1</b>	
	<b>Concentración</b>	<b>Tiempo (minutos)</b>
Detergente	0,20%	3
Benlate	0,20%	0
Hipoclorito de sodio	0,50%	5
	2,75%	5
Alcohol	70%	1

FUENTE: Donayre (2002)

**Tabla 2: Medio de Enraizamiento**

<b>REACTIVO</b>	<b>Sólido (T4)</b>
Medio Basal	1 Macroelementos
	1 Microelementos
Glicina (mg/L)	2
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina (mg/L)	0,5
Tiamina (mg/L)	0,1
Ac. Alfa-naftaleno acético (ANA) (mg/L)	0,01
Ac. Giberélico (GA <sub>3</sub> ) (mg/L)	0,1
Myo-inositol (mg/L)	100
Sucrosa (gr/L)	20
Agar (gr/L)	6
Ph	5,7

FUENTE: Donayre (2002)

**Tabla 3: Composición del medio de Multiplicación**

<b>REACTIVOS</b>	<b>Medio de Multiplicación (T2)</b>
<b>MACROELEMENTOS</b>	
KNO <sub>3</sub>	1 900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 650
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>MICROELEMENTOS</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
KI	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
FeSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	27,85
Na <sub>2</sub> -EDTA	37,25
Na <sub>2</sub> Mo.2H <sub>2</sub> O	0,25
<b>VITAMINAS</b>	
Thiamina.HCl	0,1
Pyridoxina.HCl	0,5
Acido nicotínico	0,5
Glycina	2
Myoinositol	100
<b>HORMONAS</b>	
Ácido alfa-Naftaleno acético (ANA) (mg/L)	0,01
Ac. Giberélico (GA3) (mg/L)	0,1
6-Bencilaminopurina (BAP) (mg/L)	0,1
Agua de coco (ml/L)	20
Sucrosa (g/L)	20
Phytigel (g/L)	5
Ph	5,7

FUENTE: Ruiz (2003)



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

El trabajo fue realizado en la Universidad Nacional Agraria La Molina, la etapa de introducción in vitro se realizó en el instituto de Biotecnología (IBT) y la etapa de aclimatación se realizó en las instalaciones de un invernadero de policarbonato.

#### **2. MATERIALES**

##### **2.1. MATERIALES VEGETAL (EXPLANTE)**

Se recolectaron muestras botánicas de los árboles de Sangre de Grado del IIAP de Pucallpa, ubicado en la margen derecha de la carretera Federico Basadre Km 12 400, perteneciente al Distrito de Yarinacocha, Provincia de Coronel Portillo, localizado a 8°22'31'' Latitud Sur y 74°34'35'' Longitud Oeste. Las muestras fueron identificadas como *Croton lechleri* en el herbario MOL de la UNALM.

La introducción in vitro se realizó utilizando dos tipos de explante:

##### **a. Semillas**

Estas fueron recolectadas en el mes de setiembre del 2012.

##### **b. Yemas**

Se realizaron ensayos preliminares de tipo de yema, en donde se consideraron explantes pequeños y medianos. Los explantes pequeños no dieron buenos resultados por lo que se considera trabajar con explantes Tipo I, II y III. Posterior a la obtención de vitroplantas se consideró un tipo de explantes (IV) con la finalidad de obtener información, con respecto al tipo de material para la instalación de jardines clonales. Se prepararon varios tipos de yema (Figura 1):



- Explante Tipo I: Yemas apicales de plantas jóvenes de *Croton lechleri*.
- Explante Tipo II: Yemas axilares de plantas jóvenes de *Croton lechleri*.
- Explante Tipo III: Explantes provenientes de sub cultivos
- Explante tipo IV: Yemas apicales similares al tipo I, pero provenientes de plantas aclimatadas, producidas *in vitro*.



**Figura 1:** Tipos de yema

*FUENTE: Elaboración propia*

## **2.2. MATERIALES E INSUMOS DE LABORATORIO**

### **2.2.1. MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO**

#### **a. Material de vidrio**

- Probetas de 100 y 1000 ml
- Pipetas de 1 y 10 ml
- Frascos de vidrio
- Placa petri
- Mecheros de vidrio
- Gotero
- Bagueta

**b. Equipos**

- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Microondas
- Potenciómetro
- Balanza analítica

**c. Otros**

- Pinzas, tijeras y bisturíes
- Papel aluminio
- Cinta selladora
- Papel filtro
- Alcohol 70 % y 96 %
- Detergente
- Hipoclorito de sodio
- Vernier

**2.2.2. INSUMOS**

Los insumos utilizados corresponden al medio de cultivo base que se utiliza convencionalmente en la introducción in vitro, este es, el medio de Murashige y Skoog (1962), al cual se le adiciona diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento y hormonas. El medio de cultivo para la propagación in vitro de *Croton sp* fue determinado por Ruiz, (2003) ver cuadro 3. El medio de enraizamiento fue determinado por Donayre (2002), ambos tipos de medios están compuesto por reactivos como sales de Murashige & Skoog (1962), vitaminas, hormonas, phytigel, sacarosa.

El pH de los medios se ajustó a 5,7 antes de la esterilización es el valor recomendado para el crecimiento de las vitroplantas y experiencias en la misma especie, la esterilización se realizó mediante el autoclavado a 15 libras de presión (120 °C), durante 25 min.

### **2.3. MATERIALES PARA ACLIMATACIÓN**

#### **a. Material de Invernadero**

- Vasos descartables
- Regadera
- Sustrato
- Bidones de agua

#### **b. Sustrato**

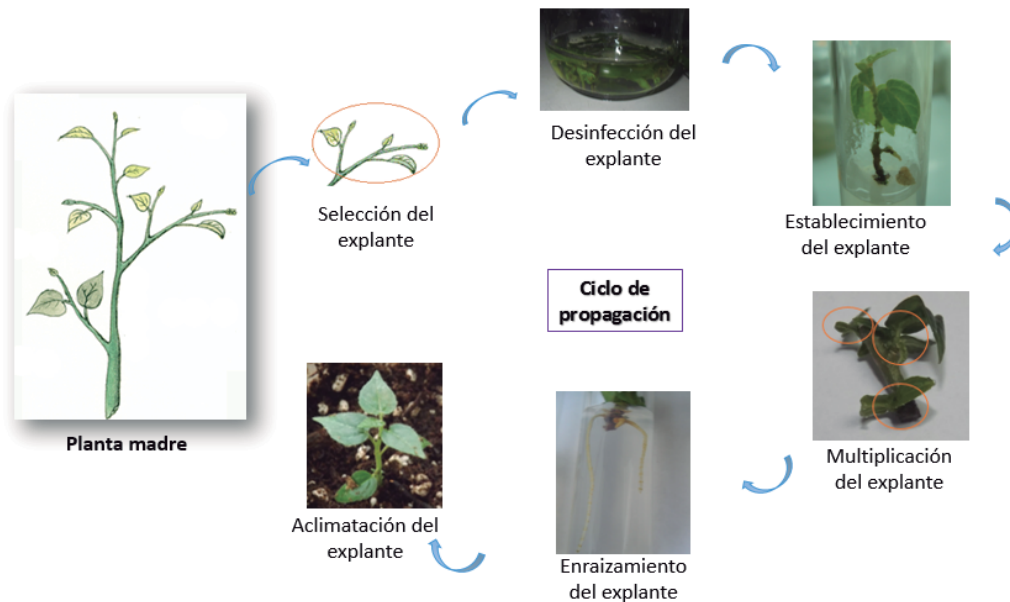
Para el enraizamiento *ex vitro* se utilizó el sustrato TS1, compuesto por una mezcla entre turba y fibra, al que se le adicionó perlita. Su estructura permite una buena retención de agua y permite la aireación de sistema radicular. Además no requiere desinfección previa.

#### **2.3.2. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DEL TSI**

- pH: 4,5
- Conductividad: 350 – 450 ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
- **Concentración de sales:** 1000 mg/L
- **Fertilizantes:** 1,0 gr/L

### 3. METODOS Y PROCEDIMIENTOS

La propagación *in vitro* involucra varias etapas, que van desde la selección del explante hasta la aclimatación. En la Figura 2, se muestra el proceso para la producción de vitroplantas.



**Figura 2: Ciclo de producción**

*FUENTE: Elaboración propia*

#### 3.1. PREPARACIÓN DEL EXPLANTE

Se preparó dos tipos de explante de material madre (yemas y semillas), las mismas que fueron introducidas *in vitro* y también germinadas en viveros en condiciones *in vitro* y *ex vitro*, estos explantes provienen de árboles maduros ubicados en el IIAP de Pucallpa con sede Ucayali. Dichos árboles cuentan con características de calidad, en cuanto a la producción de látex. Las yemas seleccionadas como explantes provienen de plántulas mayores a 1 año; ubicadas en el invernadero de la Universidad Nacional Agraria la Molina.

### 3.2. SELECCIÓN Y ESTABLECIMIENTO DEL EXPLANTE

Para seleccionar el tipo de explante adecuado se realizaron ensayos preliminares, descritos a continuación:

#### a. Semillas

Se consideró este tipo de material tomando en cuenta los resultados obtenidos por Donayre, (2002) que tuvieron un bajo porcentaje de germinación *in vitro*, en donde la procedencia y el tiempo de almacenamiento no es precisado por lo que se desconoce si el bajo porcentaje de germinación se debe a la pérdida de viabilidad. Para la presente investigación se utilizaron semillas cosechadas 3 meses antes de su introducción *in vitro*.

Para poder realizar la introducción de semillas, primero se realizó la desinfección, protocolo determinado por Donayre, (2002), inicialmente se lavó con agua y detergente, luego se realizó el escarificado con HCl a 1 N, durante un minuto, se enjuagó con agua destilada por 3 veces, enseguida fueron sumergidas en alcohol por un minuto, lavadas con agua destilada, sumergidas en hipoclorito de sodio (2.75 %) durante 10 min, y finalmente enjuagadas con agua destilada.

Una vez realizada la desinfección, se realizó la introducción de semillas en un medio MS (Anexo 1) durante 2 meses. En cada mes se realizó la introducción de 50 semillas.

En la primera introducción se observó que algunas semillas, no completaron el proceso de germinación, en la Figura 3, se observa que las semillas rompen la testa, llegan a formar la radícula, sin embargo, no completan el proceso de germinación y no llegan a formar el talluelo y hojas como se muestra en la Figura 4.



**Figura 3: Germinación incompleta de semillas**

*FUENTE: Elaboración propia*



**Figura 4: Germinación de semilla**

*FUENTE: Elaboración propia*

Las semillas introducidas *in vitro* se incubaron a una temperatura de 26 °C – 28 C°, humedad relativa de 60 % - 80 %, fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad e intensidad de 3000 lux.

**b. Yemas**

Las yemas apicales y axilares, fueron aisladas de plantones mayores a un año, ubicadas en el invernadero. El tipo de yema utilizado tuvo características de tener el tallo lignificado. Para el establecimiento de yemas se usó el protocolo determinado por Ruíz (2003).

Para la prueba preliminar se utilizó 75 explantes y se obtuvo 72 % de sobrevivencia y 28 % de contaminación en plantas mayores a un año, siendo un porcentaje aceptable para las condiciones *in vitro* (Tabla 4). La muerte de los 21 explantes fue causada por necrosis y contaminación (Tabla 5).

**Tabla 4: Porcentaje de sobrevivencia y mortandad en la desinfección**

<i>Explantes</i>	<i>Número de explantes</i>	<i>Porcentaje (%)</i>
Vivos	54	72
Muertos	21	28
Total	75	100

*FUENTE: Elaboración propia*

Los explantes lignificados, fueron cortados hasta obtener sólo las yemas, esta manipulación causó necrosis y formación de callos. Dodds y Roberts (1986) citado por De la Cruz (2003), mencionan que generalmente el callo se forma a causa de las heridas.

**Tabla 5: Causas de mortandad de explantes**

<i>Explantos</i>	<i>Número de explantes</i>	<i>Porcentaje de explantes (%)</i>
Necrosado	8	38.1
Contaminados	9	42.85
Ambos	4	19.05
Total	21	100

*FUENTE: Elaboración propia*

Se observó además que algunos explantes, no llegaron a diferenciarse y formaron callos, por esta razón, se decidió realizar una prueba preliminar en medio líquido y sólido, producto de esta prueba se observó que los explantes establecidos en medio líquido fueron los que dieron mejores resultados, ya que no formaron callos. (Figura 5). De la Cruz (2003), utilizó tratamientos en medio líquido y sólido para regenerar plántulas a partir de la embriogénesis indirecta, determinó que el medio sólido permitió la formación de más callos en comparación al medio líquido. Relaciona la fenolización o formación de metabolitos secundarios con la formación de callos. El medio sólido tiene la mayor concentración de fenoles en contacto con el explante a comparación del explante en medio líquido, que llegan a disolverse.

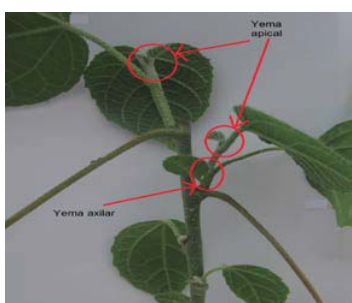


**Figura 5: Establecimiento de explantes en medio líquido y sólido**

*FUENTE: Elaboración propia*

Frente a los inconvenientes observados se decidió trabajar con explantes mayores a 1cm. Como resultado de las pruebas preliminares se determinó que el tipo de explante que mejor responde son aquellos con 1 cm a más, que tengan una yema o dos yemas y poco lignificados.

En la Figura 6 se muestra la inducción de rebrotes de las yemas, después del corte de la yema apical. Por cada planta madre se seleccionaron explantes con yemas apicales (Explantes tipo I) y yemas axilares (Explantes tipos II). Inmediatamente fueron llevados al laboratorio para realizar la desinfección.



**Figura 6:** Crecimiento de brotes

*FUNETE: Elaboración propia*

Las yemas introducidas in vitro se incubaron a una temperatura de 26 °C – 28 °C, humedad relativa de 60 % - 80 %, fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad e intensidad de 3000 lux.

Con los resultados obtenidos con los tipos de explante, se eligió trabajar con yemas, ya que la introducción de semillas, no dio un buen porcentaje de germinación, además es importante resaltar que la propagación por yemas, tiene la ventaja de generar individuo genéticamente igual al material madre seleccionado.

### **3.3. DESINFECCIÓN DE YEMAS**

Las yemas fueron sometidas a cuatro tratamientos de desinfección, siendo uno de ellos el recomendado por Ruiz, (2003). La diferencia entre estos cuatro tratamientos es el tiempo de exposición, los agentes utilizados y la concentración aplicada. Se decidió considerar más tiempo de inmersión, ya que a diferencia de las yemas utilizadas en investigaciones realizadas por Donayre, (2002) y Ruiz, (2003), los explantes utilizados en esta investigación



son yemas con mayor desarrollo, es decir requieren un tratamiento más intenso de desinfección.

La desinfección con detergente y benlate, se realizó fuera de cámara, las yemas fueron sumergidas por 30 minutos en cada uno de los agentes desinfectantes. Al concluir, inmediatamente se realizó la desinfección propiamente dicha, primero se sumerge en alcohol a una concentración del 70 %, luego se sumerge en hipoclorito de sodio, con diferentes concentraciones, además de ello los tiempos de inmersión también variaron de acuerdo al tipo de tratamiento. Al momento de la inmersión en hipoclorito de sodio se adicionó tween. Finalmente se realizó el enjuague con agua destilada.

Según los tratamientos de desinfección aplicados (cuadro 3) se seleccionó un protocolo de desinfección, el cuál fue aplicado tanto para yemas apicales como yemas axilares, antes de su introducción *in vitro*.

#### **3.4. FASE DE MULTIPLICACIÓN DE YEMAS**

Para esta fase se consideró como explante seleccionado yemas apicales y axilares, esta etapa consiste en la propagación *in vitro* de las yemas mencionadas obtenidas de las plántulas de invernadero. Para ambos casos, la multiplicación se realizó en un medio de multiplicación determinado por Ruiz (2003). Esta etapa se realizó a las ocho semanas de la introducción *in vitro*, los explantes seleccionados fueron aquellos que desarrollaron como mínimo dos yemas axilares que generaron los subcultivos.

#### **3.5. ENRAIZAMIENTO IN VITRO**

Se realizó pruebas preliminares en los que se usaron cinco tratamientos de enraizamiento, entre ellos se usó el medio de enraizamiento determinado por Donayre, (2002). Este proceso contempla dos etapas para el enraizamiento (Cuadro N° 07) la primera consistió en pasar las vitro plantas a los tratamientos T1, T2, T3 y T4 (Anexo 2) durante 1 mes, en la segunda etapa y durante un mes todos los explantes fueron transferidos a un medio MS con la mitad de concentración de las sales de los macroelementos (T5) (Anexo 2) y con la finalidad de inducir el enraizamiento.

Una vez definido el tratamiento de enraizamiento se realizó un ensayo, para seleccionar el tipo de explante que mejor responde al enraizamiento *in vitro*. Los explantes utilizados

fueron los explantes Tipo I, Tipo III y Tipo IV (Figura 1). Con este último, no se realizaron más pruebas por la limitación de material.

### **3.6. ACLIMATACIÓN**

La aclimatación se llevó a cabo en el invernadero a una temperatura de 26 °C a 38 °C, con una humedad relativa de 90 % a 99 %.

Para esta etapa, primero se preparó el sustrato en la proporción de 3:1 (TS 1: perlita), se procedió a humedecer, mezclar y llenar los vasos.

Las plántulas que previamente pasaron por el tratamiento de enraizamiento, fueron sometidas al proceso de aclimatación. Las raíces de las plántulas se lavaron con agua destilada estéril, con la finalidad de liberar el agar, inmediatamente fueron sumergidas en una solución de benlate al 0,2 % durante 20 min. Finalmente se procedió a plantar las vitropiantas en los vasos descartables. Los explantes Tipo I y Tipo III, fueron considerados como testigos.

### **3.7. ENRAIZAMIENTO EX VITRO**

Se realizó un segundo método de enraizamiento, que consistió en cortar la parte apical de las vitropiantas aclimatadas, con tres meses de crecimiento.

Estos explantes fueron sumergidos en un enraizante “rotor” durante 15 min, con concentración de 0,5 ml/L. El sustrato utilizado fue TS 1.

En la Figura 7, se muestra una plántula a la que se le cortó la parte apical, se puede observar que esto indujo la formación de nuevos brotes como explante para la introducción in vitro después de tres semanas de la inducción.



**Figura 7: Planta aclimatada con despunte.**

*FUENTE: Elaboración propia*

## 4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación fue conducida con un diseño completamente al azar (DCA) con diferentes número de repeticiones, a un nivel de significancia  $\alpha=0,05$ . La comparación entre medias de los tratamientos se realizó mediante la prueba de Tukey al 95 % de confianza.

### 4.1. TRATAMIENTOS

La investigación contempla diferentes tratamientos, desde la selección hasta la aclimatación de vitroplantas.

#### a. Desinfección

En la etapa de desinfección se consideró los resultados obtenidos por Donayre (2002), la cual alcanza buenos resultados con un 98 % de sobrevivencia, por ello no es definido como uno de los objetivos de la presente investigación. Entonces esta etapa no es materia de evaluación, por lo que no se presentará resultados estadísticos. Sin embargo, se evaluaron tratamientos adicionales al aplicado por Donayre (2002), como se observa en la Tabla 6.

**Tabla 6: Tratamiento de desinfección para yemas**

Agente	T1*		T2		T3		T4	
	Concen.	Tiempo (minutos)	Concen.	Tiempo (minutos)	Concen.	Tiempo (minutos)	Concen.	Tiempo (minutos)
Detergente	0,20 %	3	0,20 %	15	0,20 %	30	0,20 %	30
Benlate	0,20 %	0	0,20 %	15	0,20 %	30	0,10 %	30
Hipoclorito de sodio	0,50 %	5	1,25 %	15	2,5 %	15	2,5 %	25
	2,75 %	5	2,5 %	10	1,25%	10	-	-
Tween	-	-	-	25	-	25	1 N	25
Alcohol	70 %	1	70 %	1	70 %	1	70 %	1

\*TI: Tratamiento aplicado por Donayre (2002)

FUENTE: Elaboración propia

#### 1) Parámetros de evaluación

Se evaluaron los siguientes parámetros:

- Explantes contaminados: Fueron considerados todos aquellos explantes que tenían presencia de hongos o bacterias, indiferentemente de la intensidad.

- Explantes sanos: Fueron todos aquellos explantes que mantuvieron una coloración verde y mostraron diferenciación de tejidos.
- Mortandad de explantes (A causa de necrosis): Fueron los explantes que inicialmente mostraron un cambio de coloración, estos explantes pasaron por un proceso de observación durante 15 días, si la coloración se torna marrón pajizo se considera muerto o con necrosis.

2) El parámetro evaluado para las semillas, fue el número de semillas germinadas. La población fue 100 semillas.

**b. Medio de enraizamiento:**

En la evaluación de tratamientos de enraizamiento, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones para cada tratamiento de la primera etapa, y en la segunda etapa con un solo tratamiento con cuatro repeticiones para cada uno de los tratamientos. Se realizó el análisis de varianza con un índice de confiabilidad del 0,05. Se consideró cuatro tratamientos con cuatro repeticiones en la primera etapa y un quinto tratamiento para la segunda etapa, se trabajó con una población de 16 individuos.

La Tabla 7 muestra los tratamientos de enraizamiento que se determinaron para la selección posterior de uno de ellos.

1) Parámetros de evaluación: Número de explantes enraizados, longitud, número de raíces.

**Tabla 7: Tratamientos de Enraizamiento**

<i>Etapa</i>	<i>Primer etapa</i>				<i>Segunda etapa</i>
Tratamiento	T1	T2	T3 Ruiz,(2003) modificado	T4 Ruiz,(2003)	T5
Medio	MS*	Medio de multiplicación *	Enraizamiento (Líquido)*	Enraizamiento (Sólido)*	Macroelementos(MS/2)+1 Microelementos (MS)*

\*La composición de cada uno de los tratamientos se aprecia en el anexo 2.

*FUENTE: Elaboración propia*

Concluida la primera etapa, los explantes de todos los tratamientos fueron transferidos al tratamiento cinco, que corresponde a la segunda etapa.

**c. Tipo de explante**

En la evaluación de tratamientos para la selección del tipo de explante (Figura 1), se utilizó el diseño completamente al azar (DCA), con tres tipos de yemas y cuatro repeticiones para cada tratamiento. Se realizó el análisis de varianza con un índice de confiabilidad del 0,05. Se consideró una población de 12 individuos.

En la Tabla 8 se muestra los tres tipos de explante utilizados para evaluar el enraizamiento de cada uno de ellos.

- 1) Parámetros de evaluación: Número de explantes enraizados, longitud, número de raíces.

**Tabla 8: Tipos de explante evaluado**

-	<b>Te5</b>	<b>Te6</b>	<b>Te7</b>
Explante	Tipo III	Tipo II	Tipo IV

*FUENTE: Elaboración propia*

**d. Evaluación del tratamiento de enraizamiento y tipo de explante seleccionados. (Enraizamiento in vitro)**

En la evaluación de la prueba final de la selección del tratamiento de enraizamiento del medio y tipo de explante, se utilizó el diseño completamente al azar (DCA), en el que se consideró una población de 26 vitroplantas, con dos tratamientos y 13 repeticiones.

En la Tabla 9, se muestra los tratamientos aplicados, tipo de explante y las repeticiones que corresponde a cada tratamiento.

**Tabla 9: Prueba de enraizamiento y tipo de explantes**

<b>Tratamiento</b>	<b>Tipo de explante</b>	<b>N° de repeticiones</b>
T3	Tipo III	13
Testigo	Tipo III	13

*FUENTE: Elaboración propia*

- 1) Parámetros de evaluación: Número de vitroplantas enraizados, longitud, número de raíces.

**e. Aclimatación (Enraizamiento *ex vitro*)**

En la evaluación de la prueba final de la selección del tratamiento de enraizamiento del medio y tipo de explante, se utilizó el diseño completamente al azar (DCA), en el que se consideró una población de 26 vitroplantas, con dos tratamientos y 13 repeticiones. Las plántulas evaluadas fueron las mismas del enraizamiento *in vitro*.

- 1) Parámetros de evaluación: Número de plántulas enraizadas, longitud, número de raíces, sobrevivencia de explantes.

**f. Enraizamiento *ex vitro* de yemas apicales**

Finalmente se consideró una última prueba, a la que no se realizó ningún análisis de variabilidad, porque los resultados fueron logrados al 100 %. Se consideró ocho repeticiones para un solo tratamiento.

- 1) Parámetros de evaluación: Número de plantas enraizadas, longitud, número de raíces.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. DESINFECCIÓN DE EXPLANTES

#### 1.1. DESINFECCIÓN DE SEMILLAS

El tratamiento de desinfección empleado y aplicado por Donayre (2002), dio buenos resultados, en el sentido que no se observó contaminación, sin embargo no se logró la germinación de semillas.

#### 1.2. PRUEBA DE DESINFECCIÓN DE YEMAS

Se realizó una prueba de desinfección aplicando cuatro tratamientos, Tc-1, Tc-2, Tc3 y Tc-4 (Tabla 10), de los cuales se determinó que los tratamientos Tc-3 y Tc-4, dieron mejores resultados en comparación al método utilizado por Donayre (2002).

**Tabla 10: Tratamientos de desinfección.**

<i>Tratamiento</i>	<i>N explantes</i>	<i>Vivos</i>	<i>Muertos</i>	<i>% Contaminación</i>
Tc-1	10	0	10	100 %
Tc-2	10	2	8	80 %
Tc-3	10	5	5	50 %
Tc-4	10	6	4	40 %

*FUENTE: Elaboración propia*

Se pudo observar que los tratamientos expuestos a un mayor tiempo de inmersión en Benlate y NaCl son los que dan un mayor porcentaje de explantes libres de hongos y bacterias. El tratamiento Tc-1 aplicado por Donayre (2002), no garantizaba una buena respuesta debido a que estos explantes provenían de plántulas de 2 meses, para la presente investigación se utilizaron explantes mayores a un año.

Como tratamiento de desinfección, se determinó aplicar el Tc-3 y Tc-4, los cuales fueron usados durante toda la etapa de introducción *in vitro*. Este tratamiento es referencial, ya que los tipos de explantes con los que se contaron no fueron homogéneos, durante la

introducción se realizó algunas variaciones en cuanto a la inmersión en NaCl, para explantes poco lignificados, el tiempo fue entre 15 a 20 min y para explantes que ya presentaban formación de leño fue 25 min.

Los tratamientos seleccionados en la desinfección fueron Tc3 y Tc4, los cuales pueden variar de acuerdo al tamaño y desarrollo del explante. Durante la desinfección del explante, la variación del tiempo se realizó en función del estado del explante (Al evidenciarse indicios de quemadura del tejido). Se introdujeron *in vitro* explantes con un tiempo mayor a 1 año

Tomando como antecedente los resultados preliminares, se decidió trabajar con explantes de 1 cm a más, que tengan 1 yema o 2 yemas y principalmente poco lignificados, por ello se hace una poda radical a los plántones con la finalidad de obtener nuevos brotes, los cuales pasaron por un proceso de desinfección, se obtuvo un 31.43 % de mortandad de explantes, por razones de contaminación, necrosis y ambos (Tabla 11).

**Tabla 11: Porcentaje de sobrevivencia y mortandad en la desinfección**

<i>Explantes</i>	<i>Numero de explantes</i>	<i>Porcentaje (%)</i>
Muertos	48	31.43
Vivos	22	68.57
Total	70	100

*FUENTE: Elaboración propia*

## **2. ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE EXPLANTES**

### **2.1. ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE SEMILLAS**

En la Tabla 12, se muestra el resultado de dos ensayos de introducción, inicialmente se obtuvo un 0,67 % de germinación, lo cual corrobora los datos poco satisfactorios obtenidos por Donayre, (2002). Se pudo observar en el segundo ensayo de introducción que el porcentaje de germinación aumentó a un 6 %, esto puede ser causado por la maduración de la semilla o por la técnica de introducción, ya que inicialmente no estaba perfeccionada.



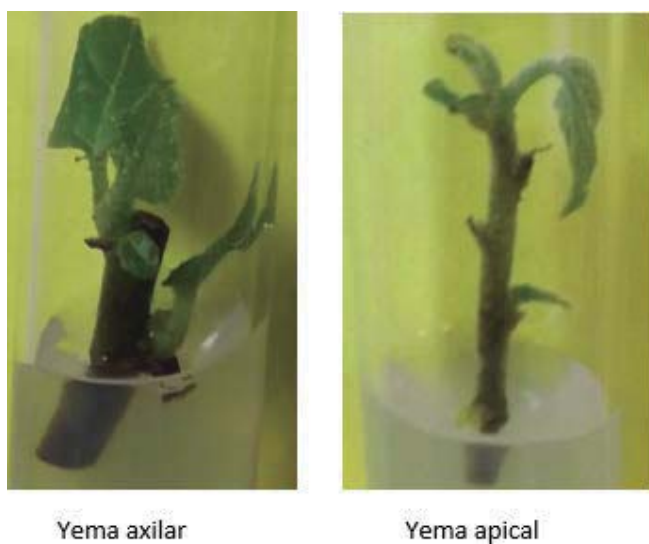
**Tabla 12: Porcentaje de germinación**

	<i>1er introducción</i>		<i>2° Introducción</i>	
	<i>N° semillas germinadas</i>	<i>Porcentaje de semillas germinadas (%)</i>	<i>N° semillas germinadas</i>	<i>Porcentaje de semillas germinadas (%)</i>
-	1	0.67	9	6

*FUENTE: Elaboración propia*

## **2.2. ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE YEMAS**

Se realizó la evaluación de los tipos de yemas a los 15 días de la introducción *in vitro*, en la Figura 8 se observa que los explantes apicales tienen la capacidad de generar una nueva vitroplanta con el tamaño adecuado para la aclimatación en un menor tiempo. Sin embargo, los explantes axilares generan mayor capacidad de explantes para posteriores subcultivos, la cual incrementa la tasa de multiplicación.



**Figura 8: Establecimiento de yema axilar y apical en 15 días**

*FUENTE: Elaboración propia*

### 3. ENRAIZAMIENTO

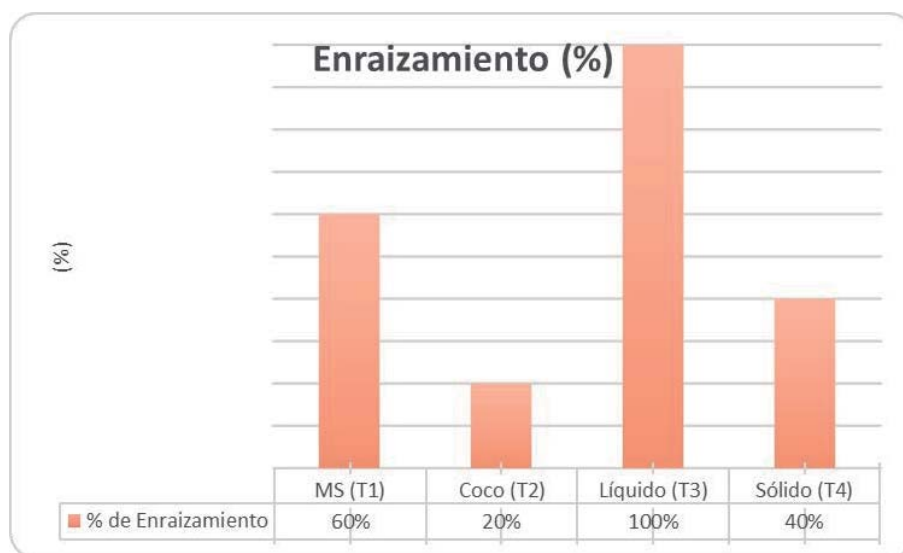
#### 3.1. SELECCIÓN DEL TRATAMIENTO DE ENRAIZAMIENTO

La evaluación del enraizamiento se realizó en dos etapas, la primera consistió en aplicar cuatro tratamientos indicados en el Anexo 2, y la segunda, en traspasar los explantes, sometidos a los tratamientos mencionados, a un medio sólido con concentración de macroelementos reducidos a la mitad, para inducir el enraizamiento. El mejor resultado se obtuvo con el tratamiento en medio líquido (T3), con 100 % de enraizamiento (Tabla 13 y Figura 9). Los parámetros evaluados fueron número de raíces y longitud de raíces, otros parámetros evaluados pero no determinantes para la selección del tratamiento, fue el desarrollo foliar. (Tabla 14).

**Tabla 13: Enraizamiento de vitroplantas**

<i>Tratamiento</i>	<i>I Etapa</i>	<i>II Etapa</i>	<i>% Enraizamiento</i>	<i>Observación</i>
T1	1	3	60 %	Raíces delgadas
T2	0	1	20 %	Raíces delgadas
T3	2	2	100 %	Raíces gruesas
T4	1	2	40 %	Raíces gruesas

*FUENTE: Elaboración propia*



**Figura 9: Enraizamiento de vitroplantas**

*FUENTE: Elaboración propia*

### 3.1.1. EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DEL EXPLANTE

En la Tabla 14 se observa que el medio líquido es el que mejor responde, obteniendo un mayor número de vitroplantas enraizadas, mayor longitud de raíz. Los valores de número de hojas y altura no fueron determinantes para la selección del tratamiento.

**Tabla 14: Desarrollo foliar y radicular de las vitroplantas**

Tratamiento	Promedio de crecimiento			
	N° vitroplantas enraizadas	Long. Raíz	N° Hojas	Altura (cm)
		(cm)		
T1 (MS)	2.6	1.33	8.2	2.33
T2 (Coco)	0.4	0.448	7.6	1.922
T3 (Líquido)	4	1.838	7.4	2.814
T4 (Sólido)	2.2	1.85	6.6	2.348

\*Los datos presentados corresponden a los resultados obtenidos al concluir la segunda etapa, promedio de cuatro repeticiones.

FUENTE: Elaboración propia

La Tabla 15 y 16 de los resultados del ANVA, demuestran que no hay diferencias significativas para el número de raíces y longitud de raíces, es decir, el efecto de los tratamientos de enraizamiento tienen el mismo comportamiento, a un nivel de significación de 95 % de confianza.

**Tabla 15: ANVA para el número de raíces en tratamientos de enraizamiento.**

FV	GL	SC	CM	P-VALUE $\alpha = 0,05$
Tratamiento	3	0.91837169	0.30612390	0.3147 ns
Error	11	2.53365145	0.23033195	-
Total	14	3.45202314	-	-

FUENTE: Elaboración propia

**Tabla 16: ANVA para la longitud de raíces en tratamientos de enraizamiento.**

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>P-VALUE</i> $\alpha = 0,05$
Tratamiento	3	9.87441000	3.29147000	0.1711 ns
Error	11	18.01675000	1.63788636	-
Total	14	27.89116000	-	-

*FUENTE: Elaboración propia*

El T3 y T4, tienen la misma composición, con la diferencia de que el T3 es un medio en estado líquido y el medio T4 es un medio en estado sólido, se observó que en medio líquido se obtiene un mayor porcentaje de enraizamiento, número de raíces y longitud de raíces. Según Pierik (1990), el suministro de oxígeno en el medio y el uso de un medio líquido favorecen el enraizamiento.

A pesar de que el ANVA demuestra que es indiferente usar cualquiera de los cuatro tratamientos, se seleccionó el tratamiento en medio líquido (T3), ya que mediante una evaluación cuantitativa se logró explantes con mayor número de raíces y mayor longitud de raíces, lo cual evidencia un mejor desarrollo radicular en comparación a los otros tratamientos. Se realizó el ANVA para el número de hojas, altura, (Anexo 3). Estos parámetros no fueron determinantes para la selección del tratamiento.

La composición de los medios favorece al enraizamiento, el T3-T4 en su composición contienen ANA y AG3, estas hormonas según Pierik (1990) favorecen la formación de raíces. El T2 además de estar compuesta por ANA, AG3 también contiene BAP. Pierik, (1990) menciona que al usar grandes concentraciones de BAP como es el caso en esta investigación, la hormona inhibe la formación de raíces. Se observó que la segunda etapa del tratamiento de enraizamiento que se desarrolla en un medio sólido con la concentración de macroelementos al 50 % favorece la inducción de raíces. Roca y Mroginski, (1991) mencionan que la reducción de sales a un 50 % favorece el enraizamiento. Además Hartmann, (1997) menciona que al transferir el explante de un medio inductor de raíces a un medio sin auxinas también favorece la formación de raíces.

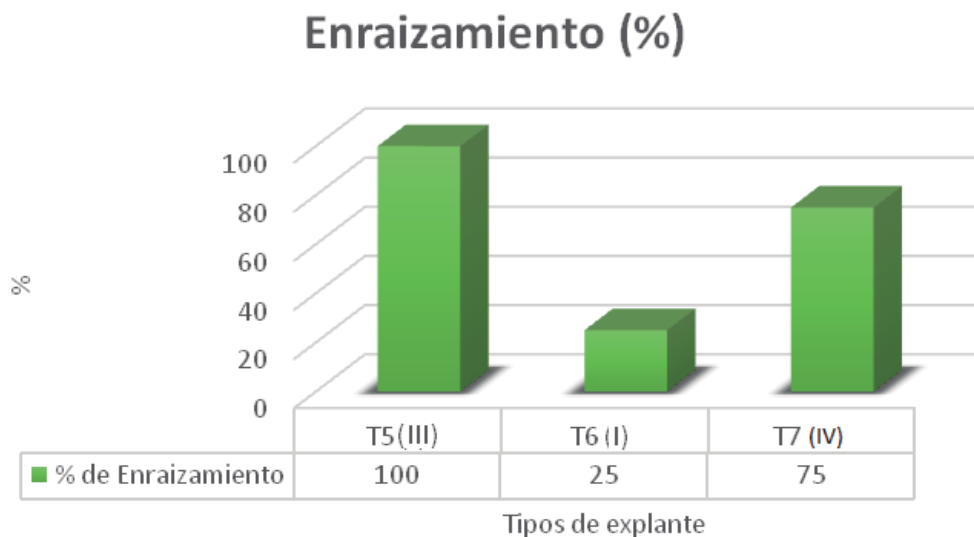
### 3.1.2. SELECCIÓN DE TIPOS DE YEMA

Una vez seleccionado el medio de enraizamiento, se realizó una prueba para seleccionar el tipo de yema que mejor responde al medio. Como resultado se obtuvo que los explantes Tipo III derivados de subcultivos y los explantes Tipo IV cuyo material madre son plantas aclimatas introducidas in vitro, son los que alcanzaron mayor porcentaje de enraizamiento 100 % y 75 % respectivamente. El tipo de explante I, tuvo como resultado 25 % de enraizamiento. (Tabla 17 y Figura10).

**Tabla 17: Porcentaje de enraizamiento por tipo de explante.**

<i>Tipo de explante</i>	<i>Porcentaje de Enraizamiento (%)</i>
T5 (III)	100
T6 (I)	25
T7 (IV)	75

*FUENTE: Elaboración propia*



**Figura 10: Porcentaje de enraizamiento por explante**

*FUENTE: Elaboración propia*

Noiton *et al.*, (1986) citado por Pierik, (1990) demostraron que un número creciente de repicado, favorecen el enraizamiento en plantas de manzano, explicado por el proceso de rejuvenecimiento que favorece la recuperación de la totipotencia de la planta.

### 3.1.3. EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DEL EXPLANTE

Al comparar los 3 tipos de explantes, el Tipo III, es el que presenta un mejor desarrollo radicular tanto en longitud como en abundancia, seguido del explante tipo IV y finalmente el explante I; éste presenta un desarrollo radicular pobre. El desarrollo foliar para los 3 tipos de explantes es casi el mismo (Tabla 19).

**Tabla 18: Desarrollo foliar y radicular**

<i>Explante</i>	<i>N° Raíces</i>	<i>Long. Raíces</i>	<i>N° Hojas</i>	<i>H</i>
Te5	2.75	2.48	4.5	3.46
Te6	0.75	0.20	3.5	2.54
Te7	2.25	0.67	5	3.08

\*Los datos presentados son el promedio de las 4 repeticiones.

*FUENTE: Elaboración propia*

En la Tabla 19, los resultados del (ANVA) nos demuestran que en el tipo de explante no hay diferencias significativas en cuanto al número de raíces, ya que tienen el mismo comportamiento, con nivel de significación de 95 % de confianza.

**Tabla 19: ANVA para el número de raíces en función del Tipo de explante**

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>P-VALUE <math>\alpha = 0,05</math></i>
Tipo de explantes	2	0.22459925	0.11229963	0.1839 ns
Error	6	0.29611084	0.04935181	-
Total	8	0.52071010	-	-

*FUENTE: Elaboración propia*

En la Tabla 20, los resultados del ANVA demuestran que en el tipo de explante no hay diferencias significativas en cuanto a la longitud de raíces, ya que tienen el mismo comportamiento, con nivel de significación de 95 % de confianza.

**Tabla 20: ANVA para la longitud de raíces en función del Tipo de explante**

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>P-VALUE</i> $\alpha = 0,05$
Tratamiento	2	1.40646667	0.70323333	0.3752 ns
Error	6	3.63893333	0.60648889	
Total	8	5.04540000		

*FUENTE: Elaboración propia*

A pesar de que el ANVA demuestra que no hay diferencias significativas y que es indiferente usar cualquiera tipo de yema, se decide seleccionar el T5, ya que mediante una evaluación cuantitativa se obtuvo, explantes con mayor número de raíces y longitud, lo cual evidencia un mejor desarrollo radicular en comparación a los otros tratamientos. Se realizó el ANVA para el número de hojas, altura, (Anexo 3). Estos parámetros no fueron determinantes para la selección del tipo de explante.

#### **3.1.4. EVALUACIÓN DEL MEDIO DE ENRAIZAMIENTO IN VITRO Y TIPO DE YEMA**

Una vez que se seleccionó el medio y el tipo de yema se realizó la última prueba de enraizamiento de vitroplantas, las mismas que fueron aclimatadas. En la Tabla 21, se muestra el número de explantes enraizados *in vitro*. Se observó el enraizamiento en el medio líquido, se validó nuevamente que el paso a un medio MS con la concentración de macro elementos reducidos a la mitad induce el enraizamiento.

En la Tabla 21, se muestra los resultados de enraizamiento. En la primera etapa (medio líquido) se logró enraizar seis vitroplantas y en la segunda etapa (medio sólido) lograron enraizar dos vitroplantas, las cinco restantes no llegaron a enraizar a nivel *in vitro*. Además se consideró 13 vitroplantas a las que no se aplicó tratamiento de enraizamiento, de las cuales ninguna logró enraizar.

**Tabla 21: Enraizamiento *in vitro* de 26 vitroplantas**

Código de vitroplantas	Enraizamiento <i>in vitro</i>				Medio de enraizamiento *	Tratamiento T3
	ETAPA I		ETAPA II			
	N°	Long.	N°	Long.		
	Raíces	Raíz	Raíces	Raíz		
Ta-1	6	9.5	0	0	Medio Líquido	Con tratamiento (Medio de enraizamiento)
Ta-2	4	0.8	0	0	Medio Líquido	
Ta-3	3	7	0	0	Medio Líquido	
Ta-4	1	3.6	0	0	Medio Líquido	
Ta-5	1	1.6	0	0	Medio Líquido	
Ta-6	1	1.3	0	0	Medio Líquido	
Ta-7	0	0	0	0	Medio Sólido	
Ta-8	0	0	0	0	Medio Sólido	
Ta-9	0	0	0	0	Medio Sólido	
Ta-10	0	0	0	0	Medio Sólido	
Ta-11	0	0	1	0.5	Medio Sólido	
Ta-12	0	0	0	0	Medio Sólido	
Ta-13	0	0	1	0.3	Medio Sólido	
Ta-14	0	0	0	0	-	Sin tratamiento (Medio de multiplicación)
Ta-15	0	0	0	0	-	
Ta-16	0	0	0	0	-	
Ta-17	0	0	0	0	-	
Ta-18	0	0	0	0	-	
Ta-19	0	0	0	0	-	
Ta-20	0	0	0	0	-	
Ta-21	0	0	0	0	-	
Ta-22	0	0	0	0	-	
Ta-23	0	0	0	0	-	
Ta-24	0	0	0	0	-	
Ta-25	0	0	0	0	-	
Ta-26	0	0	0	0	-	

FUENTE: Elaboración propia

En las Tablas 22 y 23, los resultados del ANVA demuestran que si hay diferencias significativas. El tratamiento de enraizamiento aplicado en cuanto a número de raíces y longitud de raíces tienen diferente comportamiento en las vitroplantas a las que no se aplicó ningún tratamiento de enraizamiento con nivel de significación de 95 % de confianza.



**Tabla 22: ANVA para el número de raíces en el enraizamiento *in vitro***

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>P-VALUE <math>\alpha =0,05</math></b>
Tratamiento	1	0.54685736	0.54685736	0.0129 *
Error	18	1.29201371	0.07177854	
Total	19	1.83887106		

FUENTE: Elaboración propia

**Tabla 23: ANVA para la longitud de raíces en el enraizamiento *in vitro***

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>P-VALUE <math>\alpha =0,05</math></b>
Tratamiento	1	3.28050000	3.28050000	0.0369 *
Error	18	11.62900000	0.64605556	
Total	19	14.90950000		

FUENTE: Elaboración propia

Según Tukey (Anexos 3 y 4) los tratamientos aplicados (vitroplantas con tratamiento de enraizamiento y sin tratamiento) si tienen significancia en los resultados obtenidos. Las vitroplantas sin tratamiento no llegan a enraizar si no son traspasados a un medio de enraizamiento.

#### **4. ACLIMATACIÓN**

Paralelamente a la aclimatación, las vitroplantas con y sin raíces, fueron sometidas al enraizamiento durante la etapa de aclimatación Se tomó como muestra 20 de las 26 vitroplantas aclimatadas, de las cuales siete provienen del explantes con tratamiento de enraizamiento (T3), las que fueron consideradas como vitroplantas con enraizamiento *in vitro* y las 13 restantes no recibieron ningún tratamiento, las que fueron consideradas como vitroplantas con enraizamiento *ex vitro*, todas fueron llevadas a aclimatación en condiciones microambientales y sustrato iguales.

#### 4.1. ENRAIZAMIENTO DE VITROPLANTAS (CON TRATAMIENTO)

En la Tabla 25, se muestra el número de plantas que lograron sobrevivir y las que enraizaron.

**Tabla 24: Resultados de enraizamiento a los 2 meses.**

<b>Tratamientos</b>	<b>N° plantas aclimatadas</b>	<b>N° plantas sobrevivientes</b>	<b>N° plantas enrizadas</b>	<b>Porcentaje de plantas enraizadas (%)</b>
Con raíz	7	6	6	85.71

*FUENTE: Elaboración propia*

La evaluación de enraizamiento se realizó hasta dos meses después de la aclimatación. Se logró el 85.71 % del enraizamiento, para los explantes a los que se le aplicaron tratamientos de enraizamiento.

#### 4.2. ENRAIZAMIENTO DE VITROPLANTAS (SIN TRATAMIENTO)

Paralelamente al enraizamiento, las plantas sin raíces fueron sometidas al enraizamiento *ex vitro* durante el proceso de aclimatación.

**Tabla 25: Resultados de enraizamiento a los 2 meses.**

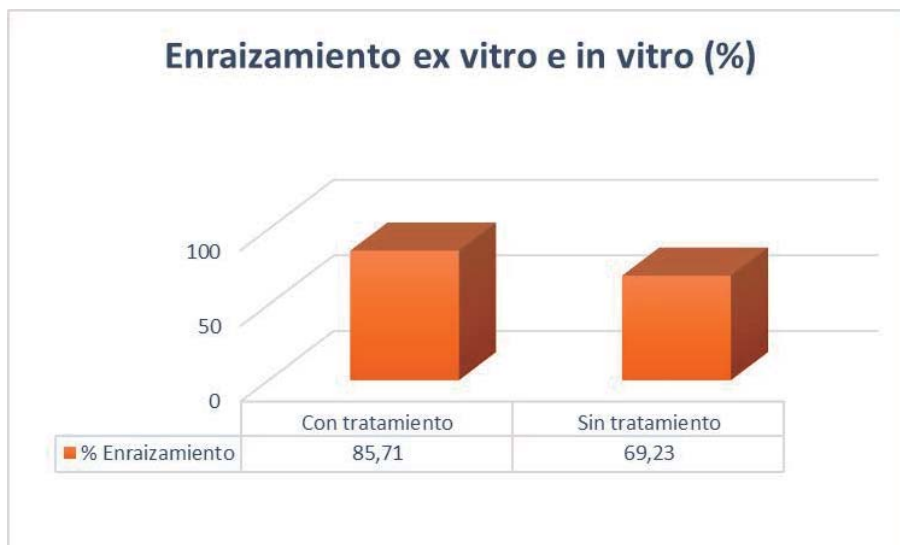
<b>Tratamientos</b>	<b>N° plantas aclimatadas</b>	<b>N° plantas sobrevivientes</b>	<b>N° plantas enrizadas</b>	<b>Porcentaje de plantas enraizadas (%)</b>
Sin raíz	13	11	9	69.23

*FUENTE: Elaboración propia*

La evaluación de enraizamiento se realizó hasta dos meses después de la aclimatación. En el caso de los explantes a los que no se aplicó el tratamiento de enraizamiento, el porcentaje de enraizamiento fue 69.233 %.

En la Figura 11 se muestra el enraizamiento de los explantes en condiciones *in vitro* y *ex vitro*, se puede observar que las vitroplantas sin tratamiento, tuvieron una gran respuesta al enraizamiento *ex vitro*, se obtuvo un 69.23 %, de enraizamiento, los explantes que pasaron por el tratamiento de enraizamiento lograron un 85.71 %, también muestran un incremento

en el porcentaje de enraizamiento. (Incremento de 62.54 % con tratamiento T3 a 85.71 % en la aclimatación).



**Figura 11: Enraizamiento de vitroplantas**

*FUENTE: Elaboración propia*

En las Tablas 29 y 30, los resultados del ANVA demuestran que no hay diferencias significativas. El tratamiento de enraizamiento aplicado en cuanto a número y longitud de raíces tienen el mismo comportamiento para las vitroplantas sin tratamiento, con nivel de significación de 95 % de confianza.

**Tabla 26: ANVA para la longitud de raíces en el enraizamiento ex vitro**

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>P-VALUE α =0,05</i>
Tratamiento	1	0.02631557	0.02631557	0.6679 ns
Error	18	2.49060344	0.13836686	-
Total	19	2.51691901	-	-

*FUENTE: Elaboración propia*

**Tabla 27: ANVA para la longitud de raíces en el enraizamiento ex vitro**

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>P-VALUE <math>\alpha=0,05</math></i>
Tratamiento	1	0. 0.01250000	0.01250000	0.9522 ns
Error	18	61.01700000	3.38983333	-
Total	19	61.02950000	-	-

*FUENTE: Elaboración propia*

### 4.3. SOBREVIVENCIA DE EXPLANTES

Durante la etapa de aclimatación se evaluó la sobrevivencia de las 20 vitroplantas. Las evaluaciones se realizaron a los 30 días y 60 días, en el primer mes se obtuvo 90 % de sobrevivencia, durante la evaluación se observó la presencia de hongos en las plantas muertas. Para el segundo mes se obtuvo otro individuo muerto, bajando la tasa de sobrevivencia a 85 % de sobrevivencia (Tabla29), se pudo observar que la planta murió a causa de la chupadera ya que se evidenció lesiones a nivel del cuello de la planta.

**Tabla 28: Sobrevivencia de plantas aclimatadas**

<i>Estado</i>	<i>30 días</i>		<i>60 días</i>	
	<i>Número</i>	<i>Porcentaje (%)</i>	<i>Número</i>	<i>Porcentaje (%)</i>
Vivo	18	90	17	85
Muerto	2	10	3	15
Total	20	100	20	100

*FUENTE: Elaboración propia*

La aclimatación es la etapa crítica, en el momento en que se extraen las vitroplantas enraizadas, tienen poca predisposición a crecer en un invernadero, ya que estos han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante (Castilla, 2004). Es por ello que para tener éxito en la etapa de aclimatación, se realizó en vasos descartables y a la vez fueron cubiertas por los mismos (Figura 11) lo cual crea un microclima y ayuda a retener la humedad. Además de los vasos, se protegió con una cámara de protección (micro invernadero).



**Figura 12: Micro invernadero**

*FUENTE: Elaboración propia*

También es importante mencionar que la época en la que se aclimata, influye en la sobrevivencia de las plantas, ya que tratamientos preliminares realizados durante el mes de Mayo a Junio tuvo 30 % de sobrevivencia mientras que en los meses de Setiembre y Noviembre se logró una sobrevivencia de 85 %.

#### **4.4. ENRAIZAMIENTO EX VITRO DE YEMAS APICALES (DESPUNTE)**

Las yemas apicales de vitroplantas aclimatadas, provenientes de subcultivos de yemas tipo III, enraizaron en un 100 %, mostraron un buen desarrollo radicular y foliar.

En la Tabla 30, se observa que todas las plántulas llegan a formar raíces, caracterizándolas en función de longitud y abundancia, con un buen desarrollo radicular.

**Tabla 29: Evaluación a los 30 días del enraizamiento *ex vitro***

<b>Código</b>	<b>N° Raíces</b>	<b>Long. Raíz</b>			<b>N° Hojas</b>	<b>Altura</b>
		<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>		
Td-1	9	7.1	6.2	1.5	5	6.2
Td-2	10	5.5	5.2	1.3	5	9.1
Td-3	12	5.6	5.4	0.9	4	4.5
Td-4	7	5.7	3.2	2.5	4	4.8
Td-5	9	7.3	6.5	2.2	3	3.8
Td-6	8	7.5	7.2	1.4	5	7.7
Td-7	5	7.4	6.2	1.1	4	4.6
Td-8	9	3.8	2.2	0.7	4	8.2

*FUENTE: Elaboración propia.*

## V. CONCLUSIONES

- 1) Se desarrolló un protocolo de propagación y enraizamiento, para su aplicación con material genético seleccionado.
- 2) Se determinó que el medio líquido modificado de Ruiz, (2003) responde mejor al enraizamiento, por el mayor porcentaje de vitroplantas enraizadas y por el mejor desarrollo radicular de las mismas. Sin embargo, el medio sólido también favorece la inducción de raíces en menor proporción.
- 3) Las yemas axilares responden mejor a la multiplicación y calidad de vitroplantas que las yemas apicales.
- 4) El explante proveniente de subcultivos muestra un mejor desarrollo radicular tanto *in vitro* como *ex vitro*.
- 5) El enraizamiento de vitroplantas *ex vitro*, ha permitido un alto porcentaje de vitroplantas con raíces, lo cual sugiere ser una mejor opción en el proceso de propagación *in vitro* de *Croton lechleri*.



## VI. RECOMENDACIONES

- El explante proveniente de subcultivos muestra un mejor desarrollo radicular tanto *in vitro* como *ex vitro*.
- Realizar más estudios, relacionados con las características de la descendencia de lo subcultivos.
- Evaluar la respuesta con otros sustratos y técnicas de vivero en el periodo de aclimatación para mejorar las condiciones de desarrollo de la vitroplantas.
- Realizar más ensayos de enraizamiento *ex vitro* de yemas apicales, para plantas aclimatadas con procedencia de diferentes tipos de yemas.
- Realizar más investigaciones en la etapa de aclimatación, usando diferentes sustratos y tubetes o bandejas de diferentes formatos, con la finalidad de disponer de plántones listos para campo.
- Propiciar el desarrollo de jardines miniclonaes a partir de vitroplantas provenientes de árboles con características ya seleccionadas, para su posterior introducción *in vitro*.
- El protocolo recomendado de propagación vegetativa de *Croton lechleri* es el que se observa en el esquema siguiente:





**Figura 13: Protocolo de propagación**

*FUENTE: Elaboración propia*

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias, E. 1995. Ensayos de desinfección y medios de cultivo para la micropropagación del nogal. Tesis Ing. Forestal. Lima, PE, UNALM. 102 p.
- Atanacio, N. 1998. Evaluación preliminar de látex de *Croton draconoides* M.Arg., en bosques secundarios de la provincia de Padre Abad - Región Ucayali. Tesis Mag Sc. Lima, PE, UNALM. 97 p.
- Azurdia, C; Franco, E; Mejia, L. 1995. Biotecnología y Biodiversidad. Tikalia 13(2): 7-25.
- Camarena, F; Chura, J; Blas, R. 2008. Mejoramiento genético y biotecnología de plantas. Lima, PE. 286 p. Consultado 09 ago. 2014 (en línea). Disponible en [http://www.agrobanco.com.pe/data/uploads/pdf\\_cpc/MEJORAMIENTO\\_GENETICO\\_Y\\_BIOTECNOLOGICO\\_DE\\_PLANTAS.pdf](http://www.agrobanco.com.pe/data/uploads/pdf_cpc/MEJORAMIENTO_GENETICO_Y_BIOTECNOLOGICO_DE_PLANTAS.pdf)
- Camelo, M; Vera, S; Bonilla, R. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria 2(12): 159-166.
- Che, H. Y Garcia, T. 2011. Estudio de Reducción de Emisiones por deforestación y Degradación de Bosques (REDD) Perú: la situación de REDD en el Perú. Derecho Ambiente y Recursos Naturales (DAR). Lima.
- De La Cruz, G. 2003. Inducción de callos, regeneración de plántulas in vitro y evaluación genética usando RAPD's en *Smallanthus sonchifolius* (Poepp & Endl.) H. Robinson. Tesis Mg. Sc. Lima, PE, UNALM. 90 p.
- Delzo, Y. 2009. Estudio comparativo entre la Micropropagación y Sistema Convencional para la producción de plántulas de papa (*solanum tuberosum* L.) a nivel comercial. Tesis Mg. Sc. Lima, PE, UNALM. 69 p.
- Dominguez, A. 2002. Caracterización Molecular de *Croton* sp “Sangre de Grado” de uso medicinal mediante marcadores RAPDS Y AFLPS. Tesis Ing. Forestal, Lima, PE, UNALM. 143 p.

- Donayre, M. 2002. Avances en la caracterización Citogenética y Respuestas al Cultivo in vitro en 2 Especies del Género *Cróton* (Sangre de Grado). Tesis Mg. Sc. Lima, PE, UNALM. 80 p.
- Flores, Y. 2009. Sangre de Grado en Sistemas Agroforestales (en línea). Consultado 27 ago. 2014. Disponible en <http://vonhumboldtinia.blogspot.com/2009/09/sangre-de-grado-en-sistemas.html>.
- Hartmann, H; Kester, F; Davies, F; Geneve, R. 1997. Plant propagation: Principles and practices. 6 ed. United States of América. 770 p.
- Hurtado, D; Merino, M. 1994. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas, MX. 232 p.
- Mejía, R. 1994. Agrobiotecnología, fundamentos y aplicaciones: propagación comercial de 312 especies de plantas por cultivo in vitro. Lima, PE. 240 p
- Meza, N. 1999. Sangre de Grado y el Reto de su Producción Sustentable en el Perú. Lima, PE. 259 p.
- MINAM (Ministerio del Ambiente). 2011. El Perú de los bosques: el almacén verde. Lima, PE. 140 p.
- Montoya, L. 1991. Cultivo de tejidos Vegetales. Medellin, CO, Universidad de Colombia. 168 p.
- Peña, J. 2009. Identificación y Caracterización Fenotípica de Árboles Plus de “Castaña”, *Bertholletia excelsa* H.B.K. (Lecythidaceae) en el Departamento de Madre de Dios. Tesis Mag Sc. Lima, PE, UNALM. 87p.
- Pierik, R.L.M. 1990. Cultivo In Vitro De Las Plantas Superiores. 3 ed. Mundi – Prensa, ES. 326 p.
- Quevedo, A; Gil, O. 1998. Influencia de la Intensidad de luz, método de conservación y tiempo de almacenamiento en la germinación de *Croton lechleri* Muell.Arg. *Folia Amazónica*. 9(1/2): 45-55.
- Ramirez, G. 2003. Sangre de drago (*Croton lechleri* Muell. Arg.). *Natura Medicatrix*. 4(21): 213-217.
- Reilly, K; Washer, J; Pliego, R. 1979. Propagación vegetativa del pino radiata por medio de cultivo de tejidos: Formación de la plántula a partir del tejido embrionario. *Ciencia Forestal* 4(20): 47-55.

- Reynel, C; Pennington, R; Pennington, T; Flores, C. 2003. Árboles útiles de la Amazonia: un manual con apuntes de identificación, ecología y propagación de especies. 50 p. Consultado 10 ago. 2014 (en línea). Disponible en <http://cdc.lamolina.edu.pe/treediversity/ARBOLES%20UTILES%20de%20la%20amazonia.htm>.
- Roca, W; Mroginski, L. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, fundamentos y aplicaciones. Cali, CO. 969 p.
- Rojas, M. 2001. Aclimatación de micro plántulas de tuna (*Opuntia ficus indica*). Tesis Ing. Agrónomo. Lima, PE, UNALM. 78p.
- Román, G. 2014. Efecto de la hormona AIB en el enraizamiento de estacas juveniles de *Croton lechleri* Muell. Arg. Tesis Ing. Forestal. Lima, PE, UNALM 99 p.
- Ruíz, A. 2003. Micropropagación y determinación cromosómica del Género *Croton* productores de Látex. Tesis Mag Sc. Lima, PE, UNALM. 80 p.
- Salinas, R. 1988. Cultivo in vitro de embriones de camote (*Ipomoea batatas* Lam). Tesis Mag Sc. Lima, PE, UNALM. 89 p
- Torres, G. 2013. El aprovechamiento de la Sangre de drago *Croton lechleri*: Manual de buenas prácticas de recolección de látex (en línea). Consultado 20 set. 2014. Gráfica Iberia. Ecuador. 40 p. Disponible en <http://chankuap.org/wp-content/uploads/2014/03/Manual-de-buenas-practicas-de-la-Sangre-de-Drago.pdf>
- Valverde, L. 1995. Cultivo in vitro de Especies Nativas. Guayacán 8 (2): 22-31
- Vargas, J. 1982. Aplicación del cultivo de tejidos en la propagación vegetativa de especies forestales. Ciencia Forestal 7(39): 44-63.
- Villarroel, G; Pierre, J; Leigue, L. 2010. Aplicación del Cultivo de Tejidos en la Multiplicación y Conservación de los Recursos Fitogenéticos. Cochabamba, BO. 134 p.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1

#### COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MS

<b>MACROELEMENTOS</b>	
KNO <sub>3</sub>	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>MICROELEMENTOS</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
KI	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
FeSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	27,85
Na <sub>2</sub> -EDTA	37,25
Na <sub>2</sub> Mo.2H <sub>2</sub> O	0,25
<b>VITAMINAS</b>	
Thiamina.HCl	0,1
Pyridoxina.HCl	0,5
Acido nicotínico	0,5
Glycina	2
Myoinositol	100
<b>HORMONAS</b>	
Ácido alfa-Naftaleno acético (ANA) (mg/L)	
Ac. Giberélico (GA3) (mg/L)	
6-Bencilaminopurina (BAP) (mg/L)	
Agua de coco (ml/L)	
Sucrosa (g/L)	20
Phytigel (g/L)	5
Ph	5.7

## ANEXO 2

### COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE ENRAIZAMIENTO

	<i>PRIMERA ETAPA</i>				<i>SEGUNDA ETAPA</i>
<i>REACTIVO</i>	<i>MS (T1)</i>	<i>Medio de Multiplicación (T2)</i>	<i>Sólido (T4) Ruiz,(2003)</i>	<i>Líquido (T3) Ruiz,(2003) modificado</i>	<i>1/2 Macro MS +1 Micro MS (T5)</i>
Medio Basal *	1 Macroelementos	1 Macroelementos	1 Macroelementos	1 Macroelementos	1/2 Macroelementos
	1 Microelementos	1 Microelementos	1 Microelementos	1 Microelementos	1 Microelementos
Glicina (mg/L)	2	2	2	2	2
Ácido nicotínico	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Piridoxina (mg/L)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tiamina (mg/L)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Ac. Alfa-naftaleno acético (ANA) (mg/L)		0.01	0.01	0.01	
Ac. Giberélico (GA <sub>3</sub> ) (mg/L)		0.1	0.1	0.1	
Myo-inositol (mg/L)	100	100	100	100	100
Sucrosa (gr/L)	20	20	20	20	20
Agar (gr/L)	6	6	6	6	6
pH	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7

### ANEXO 3

#### ANVA PARA EL NÚMERO DE HOJAS Y ALTURA PARA EL TRATAMIENTO DE ENRAIZAMIENTO

CUADRO DE ANVA PARA EL NÚMERO DE HOJAS PARA LOS CUATRO TRATAMIENTOS DE ENRAIZAMIENTO

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>P-VALUE <math>\alpha = 0,05</math></i>
Tratamiento	3	0.44727458	0.14909153	0.3517 ns
Error	11	1.35536081	0.12321462	
Total	14	1.80263539		

CUADRO DE ANVA PARA LA ALTURA PARA LOS CUATRO TRATAMIENTOS DE ENRAIZAMIENTO

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>P-VALUE <math>\alpha = 0,05</math></i>
Tratamiento	3	3.10642333	1.03547444	0.2621 ns
Error	11	7.45501667	0.67772879	
Total	14	10.56144000		

## ANEXO 4

### ANVA PARA EL NÚMERO DE HOJAS Y ALTURA PARA EL TIPO DE EXPLANTE

#### CUADRO DE ANVA PARA EL NÚMERO DE HOJAS PARA EL TIPO DE EXPLANTE

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>P-VALUE</i> $\alpha = 0,05$
Tratamiento	2	0.19341785	0.09670893	0.0344 ns
Error	6	0.09319703	0.01553284	
Total	8	0.28661488		

#### CUADRO DE ANVA PARA LA ALTURA PAR EL TIPO DE EXPLANTE

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>P-VALUE</i> $\alpha = 0,05$
Tratamiento	2	1.52682222	0.76341111	0.3799 ns
Error	6	4.01080000	0.66846667	
Total	8	5.53762222		



## ANEXO 5

### CUADRO DE COMPARACIÓN DE MEDIAS TUKEY PARA EL ENRAIZAMIENTO PARA CADA TRATAMIENTO DE LA VARIABLE NÚMERO DE RAICES.

<i>Agrupamiento</i>	<i>Media</i>	<i>Tratamiento</i>
A	1.3307	T3
B	1.0000	Testigo

## ANEXO 6

### CUADRO DE COMPARACIÓN DE MEDIDAS TUKEY PARA EL ENRAIZAMIENTO PARA CADA 2 TRATAMIENTOS DE LA VARIABLE LONGITUD DE RAICES

Agrupamiento	Media	Tratamiento
A	0.81	T3
B	0.0000	Testigo

**ANEXO 7**  
**CAMARA DE FLUJO**



Cámara de flujo con los materiales usados para la desinfección e introducción del explante

*FUENTE: Elaboración propia.*

## ANEXO 8

### PREPARACIÓN DE EXPLANTES



Corte de explantes



Explante con más de una yema



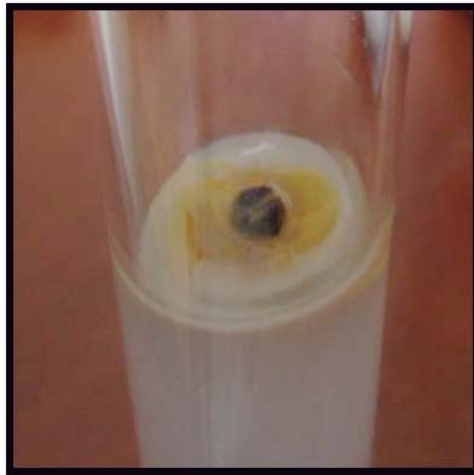
Explante con una yema

## ANEXO 9

### MORTANDAD DE EXPLANTES POR CONTAMINACIÓN



Muerte de explantes por ataque de hongos



Muerte de explantes por ataque de bacterias.

ANEXO 10

MORTANDAD DE EXPLANTES POR NECROSIS



Explante con necrosis



Explante con necrosis

## ANEXO 11

### ESTABLECIMIENTO DE TIPOS DE YEMA



Yema apical (1 mes)



Yema axilar (1 mes)

## ANEXO 12

### ESTABLECIMIENTO DE TIPOS DE YEMA



Yema apical (2 meses)



Yema axilar (2 meses)

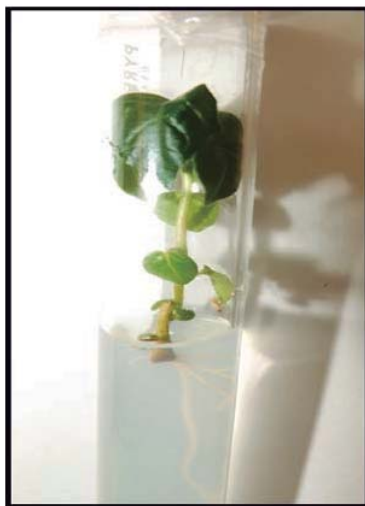


## ANEXO 13

### VITROPLANTAS ENRAIZADAS POR TIPO DE EXPLANTE



Origen de semilla



Origen de yema

## ANEXO 14

### ENRAIZAMIENTO DE VITROPLANTAS



Explante en medio líquido



Explante en medio sólido

## ANEXO 15

### ACLIMATACIÓN



Proceso de aclimatación

## ANEXO 16

### EVALUACIÓN DE ENRAIZAMIENTO DE PLÁNTULAS



Plántula no enraizada



Plántula enraizada

## ANEXO 17

### MORTANDAD DE PLÁNTULAS



Plántula muerta por ataque de hongo



Plántula muerta por ataque de hongo

## ANEXO 18

### ENRAIZAMIENTO EX VITRO DE YEMAS APICALES



Plántulas de origen de despunte