

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA  
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES  
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS DE LOS RECURSOS  
NATURALES RENOVABLES**



**DESINFECCIÓN DE YEMAS AXILARES DE TORNILLO  
(*Cedrelinga catenaeformis* Ducke) PARA  
MICROPROPAGACIÓN**

**Tesis**

**Para optar el título de:**

**INGENIERA EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES  
MENCIÓN FORESTALES**

**PRESENTADO POR:**

**SILVIA ISABEL YARINGAÑO PANDURO  
PROMOCIÓN 2010-I**

**TINGO MARÍA – PERU**

**2012**



**K10**

**Y78**

**Yaringaño Panduro, Silvia Isabel**

Desinfección de yemas axilares de tornillo (*Cedrelinga catenaeformis* Ducke) para micropropagación

69 páginas; 23 cuadros; 21 fgrs.; 23 ref.; 30 cm.

Tesis (Ing. en Recursos Naturales Renovables Mención: Forestales) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de Recursos Naturales Renovables

**1. DESINFECCION**

**2. MICROPROPAGACION**

**3. HONGO**

**4. TRATAMIENTOS**

**5. BACTERIA**

**6. SIEMBRA**



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**  
Tingo María – Perú



**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES**

## **ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**


Los que suscriben, Miembros del Jurado de Tesis, reunidos con fecha 13 de setiembre del 2012, a horas 6:00 p.m. en la Sala de Conferencias del Paraninfo de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, para calificar la Tesis titulada:

### **“DESINFECCIÓN DE YEMAS AXILARES DE TORNILLO (*Cedrelinga catenaeformis* Ducke ) PARA MICROPROPAGACIÓN”**

Presentado por la Bachiller: **SILVIA ISABEL YARINGAÑO PANDURO**, después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las interrogantes formuladas por el Jurado, se declara aprobado con el calificativo de **“MUY BUENO”**

En consecuencia, la sustentante queda apta para optar el Título de **INGENIERO EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES**, mención **FORESTALES**, que será aprobado por el Consejo de Facultad, tramitándolo al Consejo Universitario para la otorgación del Título correspondiente.

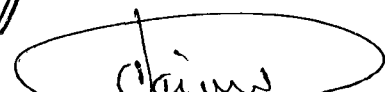
Tingo María, 11 de diciembre del 2012.

  
Dr. CÉSAR S. LOPEZ LOPEZ  
PRESIDENTE

  
Blga. MARIELA MORILLO ALVA  
VOCAL

  
Ing. M.Sc. LADISLAO RUIZ RENGIFO  
VOCAL



  
Ing. M.Sc. CASIANO AGUIRRE ESCALANTE  
ASESOR

## DEDICATORIA

A mi Padre Celestial; quien mediante la guía de su Espíritu Santo iluminó mi camino dándome capacidad y sabiduría y así poder cumplir mis metas espirituales y profesionales.

A mis queridos abuelos Walter y Elvira por el gran apoyo que me dan para salir adelante y por su gran amor.

A mí querida madre Silvia por la fuerza y valor transmitidos y por todo su amor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi alma mater Universidad Nacional Agraria de la Selva, Facultad de Recursos Naturales Renovables y plana docente, por la contribución en mi formación como profesional.

A todas las personas que de otra forma me brindaron su apoyo moral, a mis familiares y amigos sinceros con quienes compartimos vivencias muy gratas que enriquecieron mi vida espiritual y profesional.

## ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCCIÓN .....	01
II. REVISION DE LITERATURA .....	03
2.1. Descripción taxonómica de tornillo ( <i>Cedrelinga catenaeformis</i> Ducke).....	03
2.2. Aspectos generales sobre cultivos de tejidos.....	03
2.3. Características que influyen en la técnica de micropropagación.....	04
2.4. Aspectos generales sobre la desinfección .....	07
2.4.1. Desinfección .....	07
2.4.2. Desinfección del material vegetal .....	09
2.5. Desinfección en diversos explantes .....	09
2.6. Asepsia .....	12
2.6.1. Esterilización química .....	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. Lugar de ejecución .....	16
3.2. Materiales.....	16
3.2.1. Material vegetal.....	16
3.2.2. Material de vidrio y de plástico.....	16
3.2.3. Equipos.....	17
3.2.4. Reactivos.....	17
3.2.5. Otros materiales.....	17
3.3. Metodología.....	17
3.3.1. Recolección de muestras .....	17
3.3.2. Lavado de muestras.....	18

3.3.3. Esterilización del material de laboratorio .....	18
3.3.4. Preparación del medio de cultivo .....	18
3.3.5. Tratamientos de desinfección ene estudio .....	21
3.3.6. Desinfección de los explantes .....	26
3.3.7. Siembra del explante.....	26
3.3.8. Evaluaciones.....	27
3.3.9. El diseño experimental .....	28
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
4.1. Primera evaluación para hallar el pretratamiento .....	29
4.2. Segundo ensayo de desinfección con ceftriaxona .....	35
4.3. Tercer ensayo de desinfección con estreptomycin.....	42
4.4. Cuarto ensayo de desinfección con benomilo .....	49
4.5. Pruebas combinadas para la elección del mejor tratamiento de desinfección .....	56
V. CONCLUSIONES .....	64
VI. RECOMENDACIONES.....	65
VII. ABSTRACT.....	66
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
IX. ANEXOS.....	70

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Media basal para el cultivo en yemas axilares de tornillo ( <i>Cedrelinga catenaeformis</i> Duke).....	20
2. Primer ensayo búsqueda del pretratamiento de desinfección .....	21
3. Segundo ensayo de desinfección con ceftriaxona.....	22
4. Tercer ensayo de desinfección con estreptomycinina.....	23
5. Cuarto ensayo de desinfección con benomilo .....	24
6. Pruebas combinadas con ceftriaxona, estreptomycinina y benomilo .....	25
7. Puntuaciones utilizadas en las evaluaciones de contaminación <i>in vitro</i> .....	27
8. ANVA de un diseño completamente al azar con arreglo factorial.....	28
9. Descripción estadística del primer ensayo de desinfección.....	29
10. Primer ensayo de desinfección por bacterias para hallar el pretratamiento.....	32
11. Primer ensayo de desinfección por hongos para hallar el pretratamiento.....	34
12. Descripción estadística del segundo ensayo de desinfección .....	36
13. Segundo ensayo en bacterias de desinfección con ceftriaxona .....	39
14. Segundo ensayo en hongos de desinfección con ceftriaxona .....	41
15. Descripción estadística del tercer ensayo de desinfección.....	43
16. Tercer ensayo de bacterias en desinfección con estreptomycinina.....	46
17. Tercer ensayo de hongos en desinfección con estreptomycinina .....	48
18. Descripción estadística del cuarto ensayo de desinfección.....	49
19. Cuarto ensayo de bacterias en desinfección con benomilo.....	53



20.	Cuarto ensayo de hongos en desinfección con benomilo.....	55
21.	Descripción estadística del mejor tratamiento de desinfección .....	56
22.	Pruebas combinadas de bacterias para la elección del mejor tratamiento de desinfección.....	60
23.	Pruebas combinadas de hongos para la elección del mejor tratamiento de desinfección.....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Flujograma del proceso de desinfección en el cultivo <i>in vitro</i> de tornillo ( <i>Cedrelinga catenaeformis</i> Ducke).....	19
2. Comportamiento de las bacterias ante el pretratamiento .....	30
3. Comportamiento de los hongos ante el pretratamiento.....	31
4. Primer ensayo de desinfección por bacterias para hallar el pretratamiento .....	33
5. Primer ensayo de desinfección por hongos para hallar el pretratamiento .....	35
6. Comportamiento de las bacterias ante el Segundo ensayo de desinfección con ceftriaxona .....	37
7. Comportamiento de los hongos ante el Segundo ensayo de desinfección con ceftriaxona .....	38
8. Segundo ensayo en bacterias de desinfección con ceftriaxona.....	40
9. Segundo ensayo en hongos de desinfección con ceftriaxona.....	42
10. Comportamiento de las bacterias ante tercer ensayo de desinfección con estreptomycinina.....	44
11. Comportamiento de los hongos ante tercer ensayo de desinfección con estreptomycinina.....	45
12. Tercer ensayo de bacterias en desinfección con estreptomycinina .....	47
13. Tercer ensayo de hongos en desinfección con estreptomycinina.....	48
14. Comportamiento de las bacterias ante el cuarto ensayo de desinfección con benomilo .....	50

15.	Comportamiento de los hongos ante el cuarto ensayo de desinfección con benomilo .....	51
16.	Cuarto ensayo de bacterias en desinfección con benomilo .....	53
17.	Cuarto ensayo de hongos en desinfección con benomilo .....	55
18.	Comportamiento de las bacterias ante pruebas combinadas para la elección del mejor tratamiento de desinfección .....	57
19.	Comportamiento de los hongos ante pruebas combinadas para la elección del mejor tratamiento de desinfección .....	58
20.	Pruebas combinadas de bacterias para la elección del mejor tratamiento de desinfección.....	61
21.	Pruebas combinadas de hongos para la elección del mejor tratamiento de desinfección.....	62
22.	Explantes fragmentados de tornillo ( <i>Cedrelinga catenaeformis</i> ) .....	71
23.	Diversos ensayos en la sala de incubación del laboratorio.....	71
24.	Ensayo de tornillo ( <i>Cedrelinga catenaeformis</i> ) <i>in vitro</i> en condiciones no óptimas .....	72
25.	Ensayos con tornillo en condiciones óptimas para su crecimiento.....	72

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación tuvo por objetivo ensayar tratamientos de inmersión en fungicida (benomilo), desinfectantes (alcohol, lejía), ceftriaxona y estreptomina en yemas axilares de tornillo (*Cedrelinga catenaeformis* Ducke).

Para determinar los métodos de desinfección de yemas axilares se tuvo presente la siguiente metodología: recolección de las muestras de *Cedrelinga catenaeformis* Duke, lavado de las muestras, esterilización del material de laboratorio, preparación del medio de cultivo, tratamiento de desinfección en estudio, desinfección de los explantes, siembra del explante, y la realización del diseño experimental.

Los resultados hallados de las pruebas para la elección del mejor tratamiento de desinfección para las bacterias y los hongos es la Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 550 g/L + benomilo 1g/L) para las yemas axilares de la especie forestal del tornillo (*Cedrelinga catenaeformis* Ducke).

## I. INTRODUCCIÓN

Las nuevas tecnologías han aumentado los métodos a través de los cuales las plantas se pueden propagar de manera vegetativa. Una de estas alternativas es la micropropagación o propagación clonal in vitro, provee la capacidad de producir un gran número de plantas, debido al rápido desarrollo de la tecnología de cultivo de tejidos de ciertas plantas con características deseables, dentro de un espacio limitado y tiempo independiente de temporada, bajo condiciones ambientales controladas como temperatura, intensidad lumínica y fotoperiodo. Este es un método alternativo de propagación clonal de especies forestales que no responden bien a métodos de propagación convencionales, ya sea sexual o vegetativamente (GEORGE *et al.* 2008).

*Cedrelinga catenaeformis* (tornillo) es actualmente la especie forestal nativa más promisoría en la amazonia peruana, con características maderables valiosas; lo que ha generado extracción selectiva de la especie, como tal los árboles son cada vez menos en el bosque, reduciendo el potencial maderable. Razones por la que existen alternativas de propagación de plantones forestales, siendo una de ellas la propagación clonal in vitro por medio de yemas axilares, requiriéndose estudios del comportamiento a la desinfección de explantes o yemas.

En el presente trabajo de investigación se planteó la interrogante ¿Cuál será la susceptibilidad de las yemas axilares de tornillo (*Cedrelinga catenaeformis* Ducke) a la desinfección, a priori de la micropropagación?

### **Objetivos específicos**

- Ensayar tratamientos de inmersión en fungicida (benomilo) y desinfectantes (alcohol, lejía) en las yemas axilares de tornillo (*Cedrelinga catenaeformis* Ducke).
  
- Ensayar tratamientos de inmersión en fungicida (benomilo) y un antibiótico (ceftriaxona) en las yemas axilares de tornillo (*Cedrelinga catenaeformis* Ducke).
  
- Ensayar tratamientos de inmersión en fungicida (benomilo) y un antibiótico (estreptomycinina) en las yemas axilares de tornillo (*Cedrelinga catenaeformis* Ducke).
  
- 
  
- Determinar el mejor tratamiento a base del fungicida (benomilo) y los antibióticos (ceftriaxona y estreptomycinina) para el control de la contaminación del medio de cultivo.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Descripción taxonómica de “tornillo” *Cedrelinga catenaeformis*

**Ducke**

DIVISIÓN : Angiospermae

CLASE : Dicotyledoneae

ORDEN : Fabales

FAMILIA : Mimosaceae

GENERO : *Cedrelinga*

ESPECIE : *catenaeformis*

NOMBRE CIENTÍFICO: *Cedrelinga catenaeformis* Ducke (ARÓSTEGI, 1992).

### 2.2. Aspectos generales sobre cultivos de tejidos

La propagación *in vitro* de tejidos o micropropagación, es una técnica de la biotecnología muy utilizada en cultivos de importancia económica, cultivo de tejidos *in vitro* se define como el cultivo aséptico de células, tejidos, y órganos vegetales intactos en condiciones de laboratorio, con el fin primordial de inducir la formación de los órganos o parte faltante. La técnica se basa fundamentalmente en el principio de totipotencialidad, que establece, que en cualquier célula somática joven o en proceso de diferenciación tiene una alta

capacidad o potencialidad para regenerar una planta completa si se le coloca en condiciones adecuadas (ROCA , 1991).

### **2.3. Características que influyen en la técnica de micropropagación**

Existen diferentes factores que determinan el éxito en los sistemas de micropropagación, entre los más importantes tenemos:

- Planta que dona el explante (planta madre)
- El explante
- Asepsia
- Medio de cultivo
- Control riguroso de las condiciones ambientales del cultivo

Estos factores del cultivo de tejidos proporcionan las ventajas principales que tienen dicha técnica sobre los métodos de propagación vegetativa tradicionales en cuanto a la posibilidad de lograr resultados en un mayor número de especies difíciles de multiplicar (ROCA, 1991).

La elección, aislamiento y desinfección del explante es el primer paso para el establecimiento *in vitro* de cualquier especie vegetal y el éxito de esta fase depende en gran medida de una serie de parámetros relacionados con el propágulo (estado fisiológico, edad, estado de desarrollo y estado sanitario) y con el sistema seguido para su manipulación y esterilización (SERRANO y PINOL, 1991), las características principales de la técnica son las siguientes:



- Empleo de explantes o propágulos vegetativos de dimensiones pequeñas, el tamaño promedio de los tejidos proporcionales utilizados es menor de 1 cm; esto permite tener una gran cantidad de propágulos de un mismo individuo.
- Asepsia completa del material biológico, medio de cultivo herramientas y procedimientos, es indispensable que el cultivo de tejidos se haga en un ambiente totalmente estéril con el fin de evitar los hongos, bacterias y otros patógenos que puedan destruir los explantes.
- Medio de cultivo con las condiciones necesarias para el desarrollo del explante, para el buen establecimiento de cultivos de tejidos es necesario utilizar un medio de cultivo nutritivo compuesto por una mezcla de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, reguladores de crecimiento, fuentes de energía, azúcar y sustrato de soporte (agar).
- Control riguroso de las condiciones ambientales de cultivo; controlar de manera estricta los factores ambientales que influyen sobre el potencial morfogenético, (luz, fotoperiodo, temperatura y termoperiodo) y que permite que este se manifieste en menor grado (BONGA, 1985 y PIERIK, 1990).
- Los cultivos en incubación deben considerar el efecto de la temperatura, intensidad de luz, fotoperiodo y humedad relativa, lo que está en función con el sistema de cultivo utilizado; sin embargo la temperatura puede

oscilar entre 24 y 28 °C, la iluminación entre 1 – 10 W.m<sup>-2</sup>, el fotoperiodo de 16/8h y la humedad relativa de 70 – 80%. Como fuente luminosa es recomendable la utilización de lámparas fluorescentes de 30 – 40 W.

Estas características del cultivo de tejidos le proporcionan las ventajas principales que tiene dicha técnica sobre los métodos de propagación vegetativa tradicionales en cuanto a la posibilidad de lograr resultados satisfactorios en un mayor número de especies difíciles de multiplicar.

Por otro lado, las mismas características, vistas desde otro ángulo, también le confieren al cultivo de tejidos *in vitro* ciertas desventajas con respecto a los métodos tradicionales; las principales consisten en el mayor grado de complejidad y la necesidad de mayor costo.

La micropropagación de plantas, principalmente ornamentales, está siendo utilizada comercialmente en varias partes del mundo, pero las plantas leñosas aún presentan limitaciones específicas que impiden el uso extensivo del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (CTV) para realizar forestaciones comerciales.

A pesar del gran número de leñosas obtenidas por cultivo *in vitro*, varios factores como la contaminación interna de los explantes, la necrosis apical, la vitrificación, la oxidación, el enraizamiento y la supervivencia *ex vitro*, constituyen aún impedimentos para la micropropagación a gran escala. La edad

de la planta madre y el estado de desarrollo representan aún hoy significativas limitaciones para la multiplicación masiva de árboles adultos selectos.

Resumiendo este tipo de cultivo tiene como factor común, el crecimiento en condiciones estériles, en un medio nutritivo, generalmente gelidificado, y en condiciones ambientales controladas (temperatura y luz), y por tanto óptimas para el cultivo de una determinada parte de la planta original, generando condiciones para la inducción de la formación de brotes, multiplicación y luego las plantas o brotes obtenidos deben someterse a un proceso de aclimatación, para adaptarlas a las nuevas condiciones *in vivo*, dónde se cultivan hasta diferentes estadios según la finalidad (BONGA, 1985 y PIERIK, 1990).

## **2.4. Aspectos generales sobre la desinfección**

### **2.4.1. Desinfección**

Es el proceso de destrucción de los microorganismos mediante métodos químicos; la esterilización se refiere a menudo al método físico para la destrucción de los microorganismos (ROCA, 1991; PIERIK, 1990).

La manera en que los desinfectantes químicos ejercen sus actividades germicidas, varían con el tipo de componente o compuesto. Los hipocloritos, cloro aminas y halógenos generales dependen de la intensidad de proteínas y sustancias similares. Otros agentes oxidantes, peróxido de hidrógeno, los permanganatos, el formaldehído, también reaccionan vigorosamente con proteínas celulares y también casi todos el efecto de destruir

la estructura molecular básica de las proteínas. También el óxido de etileno, amino etileno, sulfuro de etileno, como también el bromuro de etileno, són bactericidas. En la desinfección de material vegetal a cultivarse *in vitro*, se ha encontrado más dificultades en la eliminación de poblaciones bacteriales que fungosas, los procedimientos de desinfección son muy variados, es por eso importante considerar la propiedad bien reconocida de muchos compuestos en relación a su influencia selectiva sobre poblaciones mixtas de bacterias; es decir, que ciertos compuestos pueden matar e inhibir algunos grupos de organismos, y dejar a otros que sobrevivan aparentemente ilesos, el mecanismo de ésta selección es probablemente lo menos entendido en todo proceso de desinfección.

Tres fenómenos básicos son de importancia para la acción desinfectante a través de medios químicos: absorción del compuesto por la pared celular, penetración dentro del protoplasma celular, y finalmente la reacción del compuesto con uno o más constituyentes celulares. Los dos primeros no son exclusivos a la sustancia en sí. Estos pueden estar influenciados por otros constituyentes en su entorno inmediato.

En cuanto a grupos de desinfectantes, se tiene que el mecanismo de acción de los alcoholes es bactericida más que bacteriostático, pero también son fungicidas. La explicación más práctica y sencilla de su mecanismo de acción letal es a través de su capacidad para desnaturalizar proteínas (DOMINGUEZ, 1986).

#### **2.4.2. Desinfección del material vegetal**

En cultivo *in vitro* de tejidos vegetales existe la presencia de microorganismos contaminantes, tales como hongos y bacterias que causan la muerte del explante, por lo que es necesaria la utilización de procedimientos eficientes de desinfección, como fungicidas y antibióticos. Como el uso de benomilo que actúa en algunas funciones celulares, como la división de las células y los mecanismos de transporte intracelulares, interviniendo en el crecimiento bacteriano (RAP-AL, 1994).

Este proceso tiene como finalidad eliminar los microorganismos presentes en la superficie del explante, sin considerar la eventual presencia de micoplasmas, virus y estructuras. En el proceso de desinfección del explante es importante encontrar el equilibrio entre la concentración y tiempo de acción del desinfectante sobre los microorganismos contaminantes, con el efecto fitotóxico que pueda ejercer sobre el explante, es decir, el objetivo es alcanzar una máxima esterilización con una máxima sobrevivencia de los tejidos. Además del hipoclorito de sodio (NaOCl), muchos productos han sido utilizados como agentes desinfectantes. Entre ellos tenemos: peróxido de hidrogeno, nitrato de plata, hipoclorito de calcio  $[Ca(OCl)_2]$ , entre otros (DELGADO y ROJAS, 1999).

#### **2.5. Desinfección en diversos explantes**

En los primeros intentos por establecer explantes de fresa *in vitro* se observó una alta contaminación por hongos y bacterias, a más del ennegrecimiento de algunos cultivares. En el presente trabajo se evaluó el efecto del tiempo de inmersión (10, 20 y 30 min) y tres concentraciones (10, 20

y 30%) de cloro comercial (5,25% de hipoclorito de sodio) en la desinfección de explantes de fresa. El tratamiento 20 min en cloro comercial al 20% mostró la menor contaminación y la mayor sobrevivencia de los explantes, y mayor formación de brotes (SANCHEZ, 2004).

BORGES (2009) sostiene que en el establecimiento *in vitro* de explantes primarios de ñame (*Dioscorea alata* L.). Las variantes de desinfección consistieron en la utilización de diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (1,5; 2 y 2,5%) durante distintos tiempos de inmersión (10; 20 y 30 min). A los 7 días se evaluó el porcentaje de contaminación de bacterias y hongos respectivamente, y a los 40 días el número de nudos, la longitud del vástago, el número de hojas, y el porcentaje de explantes establecidos y necrosados. Se realizó la prueba de comparación de medias de Tukey para un nivel de significación del 5%. Los resultados obtenidos arrojaron que el tratamiento de desinfección de segmentos uninodales de ñame con hipoclorito de sodio al 1,5% durante un tiempo de inmersión 30 min es el de mayor efectividad.

GONZALES (1989) manifiesta que las yemas axilares en dormancia, del *Eucalyptus globulus* de 3 meses desde la germinación, fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de calcio al 3.5% adicionando Tween 80 durante 10 minutos. Luego son enjuagados en agua destilada estéril. ESCALANTE (1984) utilizó material vegetal (porción de tallo con una yema) procedentes de plantas madres de papa del invernadero, fueron desinfectados por separados (yemas apicales y axilares) en alcohol de 90° durante un minuto, para luego someterlos a una solución de hipoclorito de calcio al 10%, por

espacio de 5 a 30 minutos. Finalmente se enjuagan estos tejidos, repetidas veces en agua destilada estéril, de las yemas desinfectadas se extraen las hojas primordios foliares, hasta el meristemo, se seccionan lo más pequeño posible, colocándolos rápidamente en el medio de cultivo.

SUÁREZ *et al.* (2006) indican que utilizaron brotes axilares, del roble (*Tabebuia rosea*) con el fin de producir masivamente clones de ésta especie. Para determinar el mejor tratamiento de desinfección superficial, el electo de cuatro concentraciones (1%, 2%, 3% y 4%) de hipoclorito de sodio con cuatro tiempos (5, 10, 15 y 20 minutos) de exposición de los explantes consistentes de brotes axilares de 2-3 cm de longitud fueron evaluadas después de establecidos en medio  $\frac{1}{2}$  MS, Murashige y Skoog (1962), el Hipoclorito de sodio al 4% durante 10 minutos fue el mejor tratamiento de esterilización superficial.

NAVARRO (2001) explica que para tratamientos de desinfección en yemas de tornillo (*Cedrelinga cateniformis*), con la finalidad de micropropagación *in vitro*, realizó inmersiones en diferentes soluciones (detergente por 2 minutos, luego lejía al 2.5 % durante 5 minutos, posteriormente benlate al 2 % durante 5 minutos y por último alcohol al 96 % durante 1 minuto). Luego procedió a la siembra. VARGAS (2007) utilizó yemas axilares de Sangre de Grado (*Croton lechleri*) introduciendo dichas yemas en alcohol etílico 70% por 1 minuto, luego los explantes se llevaron a concentraciones: 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4% y 5%, diferentes de hipoclorito de sodio y de calcio adicionados con Tween 80 (1 mL a 2 mL) considerando cuatro

tiempos diferentes (5, 10, 15 y 20 minutos) para cada concentración. Posteriormente enjuagó tres veces los explantes en agua destilada estéril.

## 2.6. Asepsia

PIERIK (1990) manifiesta que en principio existen cuatro fuentes de infección: la planta, el medio nutritivo, el aire y el operador. La más importante de estas condiciones es la planta misma, el material vegetal debería ser bien esterilizado antes de su aislamiento *in vitro*. Antes de empezar el proceso de esterilización, se debe retirar cualquier porción de suelo, porciones muertas, etc. que aún pudiesen quedar, en las plantas o porciones de plantas con las que se trabaje. A continuación se debe realizar un lavado con agua, si la contaminación externa es fuerte. Luego el pelado eliminara toda la capa más exterior. Después de estos pasos, se iniciará la esterilización, generalmente de la siguiente forma: se sumerge el órgano en alcohol de 70% durante algunos segundos, para eliminar las burbujas de aire. Luego se realiza una esterilización durante 10 a 30 minutos en NaOCl al 1% conteniendo algunas gotas de Tween 20 u 80, después se enjuaga con agua corriente estéril, generalmente se hace tres enjuagues, durante 2,5 - 15 minutos respectivamente. Si, a pesar de una buena esterilización química del material vegetal, después se producen infecciones, esto se puede deber a las siguientes causas:

- A las llamadas infecciones internas.
- Trabajo poco escrupuloso (falta de lavado de manos; superficie de la mesa no esterilizada con alcohol de 96%; pinzas o bisturís no esterilizados;



insuficiente esterilización de las placas petri, papel y/o medio nutritivo, batas de laboratorio sucias, etc.). La utilización de máscaras, cubrirse el pelo, y el empleo de guantes estériles pueden contribuir a disminuir el número de infecciones.

- La cámara de flujo laminar defectuosa.
- El alcohol en el que se sitúan los instrumentos no están estériles en su exterior.
- Los tubos, etc., que contienen los medios nutritivos no están estériles en su exterior.
- Los suelos no se limpian y desinfectan de forma irregular.
- La habitación que contiene la cámara de flujo laminar no está estéril.
- Se permite el paso a la habitación de inoculación a más personas de la necesaria, produciéndose la infección del suelo y del aire.
- Generalmente se producen infecciones cuando se aíslan ápices del vástago de plantas en roseta, ya que estos son difíciles de esterilizar.
- Si las cámaras de crecimiento no se mantienen limpias, pueden producirse infecciones, en algunos casos debidas a la presencia de ácaros, los cuales pueden ser portadores de infecciones fúngicas.

### **2.6.1. Esterilización química**

La esterilización química, se puede realizar con:

- Alcohol (etanol): para material vegetal se utiliza alcohol de 70%, ya que el de 96% deshidrata demasiado. Cuando se esteriliza plantas, al sumergirlas en alcohol durante unos cuantos segundos no es suficiente

para matar todos los microorganismos, y después de esto, los tejidos son tratados con hipoclorito.

- Lejía o hipoclorito de sodio. Generalmente se utiliza una solución de 1 % de NaOCl, aunque también puede utilizarse concentraciones más altas. Si las plantas son especialmente sensibles a la lejía, es aconsejable utilizar hipoclorito de calcio para la esterilización.
- Hipoclorito de calcio [Ca (ClO)<sub>2</sub>]. Se utiliza durante 5-30 minutos. El hipoclorito de calcio penetra en los tejidos vegetales con más lentitud que el hipoclorito de sodio.

A veces la esterilización puede llevarse a cabo en 5 minutos de tratamiento con NaOCl 1%, en otros pueden ser necesarios hasta 30 minutos. Una esterilización prolongada puede producir efectos negativos sobre el explante, el tiempo y la concentración adecuada de lejía debe elegirse cada vez, en función del material experimental.

La estreptomycin es un antibiótico que pertenece al grupo de los aminoglucósidos, es un antibiótico bactericida de espectro pequeño derivado de la actinobacteria. (ESTOPA, 2005). La ceftriaxona es un antibiótico de la clase cefalosporina de tercera generación, por lo que tiene acciones de amplio espectro en bacterias gram positiva y negativas; mientras que para hongos sucede lo contrario a menor concentración de ceftriaxona, el crecimiento de hongos es menor (OTÁROLA et al. 2001). RAMIREZ (2000) manifiesta que en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales del guayabo (*Psidium guajava* L.) existen microorganismos contaminantes como hongos y bacterias. De brotes

terminales de plantas de cuatro años de edad se tomaron 80 segmentos nodales desinfectándolos por 30 min en 8 g L<sup>-1</sup> de benomil + 300 mg L<sup>-1</sup> de rifampicina, por 1 min en alcohol etílico al 70 % y 15 min en hipoclorito de sodio 2,625 %, sembrándolos en el medio de Murashige y Skoog. Después de 5 días se detectó la presencia de hongos contaminando los segmentos nodales y causando posteriormente su muerte. Al identificar los hongos se halló que pertenecen a los géneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Helminthosporium* y *Rhizopus*. Estos hongos contaminantes posiblemente están localizados dentro de las irregularidades de la superficie de los segmentos nodales del guayabo, lo que quizás impide la acción de los desinfectantes superficiales usados.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de ejecución**

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Micropropagación in vitro de la Universidad Nacional Agraria de la Selva; ubicado en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, ciudad Tingo María a una altitud de 660 msnm, humedad relativa media de 84% y temperatura media anual de 24°C. La ejecución del trabajo fue de mayo a noviembre del 2011.

#### **3.2. Materiales**

##### **3.2.1. Material vegetal**

Se utilizó yemas axilares de la especie de "Tornillo" *Cedrelinga catenaeformis* Duke.; para las pruebas de desinfección, dichas yemas fueron extraídas de arbustos del Bosque Reservado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS) de la ciudad de Tingo María.

##### **3.2.2. Material de vidrio y de plástico**

Baguetas, beakers, matraz erlenmeyer, mecheros, pipetas de 1, 5, 10 y 25 ml, micropipetas 100 – 1000 ul, placas petri, probetas, frascos de vidrio, magentas (frascos de vidrio).

### **3.2.3. Equipos**

Autoclave, balanza analítica, cámara de flujo laminar, cámara fotográfica, destilador, microondas, termómetro de máxima y mínima, timer (regulador de fotoperíodo).

### **3.2.4. Reactivos**

Hipoclorito de sodio, vitaminas: tiamina, piridoxina, HCl, ácido nicotínico, aminoácidos: glicina, mioinositol, ácido cítrico, sucrosa, phyta-gel, agar, medio de sales minerales de Lloyd y Mc Cown (Woody Plant Medium - WPM). Agua destilada, alcohol 70% y 96%, lejía 1%, fungicida: benomilo y antibióticos: ceftriaxona y estreptomicina.

### **3.2.5. Otros Materiales**

Algodón, bisturí, espátulas, magnetos, papel secante, guantes estériles y mascarilla.

## **3.3. Metodología**

### **3.3.1. Recolección de muestras**

Se procedió a la recolección de las muestras de la especie tornillo (*Cedrelinga catenaeformis* Duke). en el bosque reservado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, cortando con una tijera podadora las muestras; se consideró las siguientes características físicas para la elección de la planta madre: 1 a 5 m de altura, ramas verdesas, libre de ataque por insectos u otras enfermedades, (SERRANO y PINOL, 1991).

### **3.3.2. Lavado de muestras**

Los explantes fueron lavados inmediatamente en el laboratorio, utilizando un cepillo, detergente y abundante agua corriente, de manera cuidadosa para preservar las yemas.

### **3.3.3. Esterilización del material de laboratorio**

Se colocaron las placas petri envueltas en papel, se vertió el agua destilada en vasos de precipitación sellados con láminas de polipropileno y elásticos y luego se llevó a la autoclave (15 minutos a 121 °C).

### **3.3.4. Preparación del medio de cultivo**

Para la preparación del medio Lloyd y Mc Cown - Woody Plant Medium (WPM) citado por GAMBORG y PHILLIPS (1995) (Cuadro 1) se utilizó diversos componentes, con las respectivas concentraciones, de la siguiente manera:

- En un vaso Erlenmeyer de 1000 ml se vertió las sustancias del medio, haciendo el cálculo respectivo de acuerdo al número de repeticiones para cada ensayo a utilizar.
- Se enrazó con agua destilada a la cantidad apropiada.
- Se disolvió el medio calentándolo en un microondas, inspeccionando que no llegue a hervir, moviéndolo hasta homogeneizarlo.

- El medio fue separado de acuerdo a los tratamientos realizados en cada ensayo que posteriormente se vertieron en frascos de vidrio a los que se llevó a la autoclave por 15 minutos a 121 °C.
- Los frascos con el medio contenido fueron llevados a conservarlos en una refrigeradora.

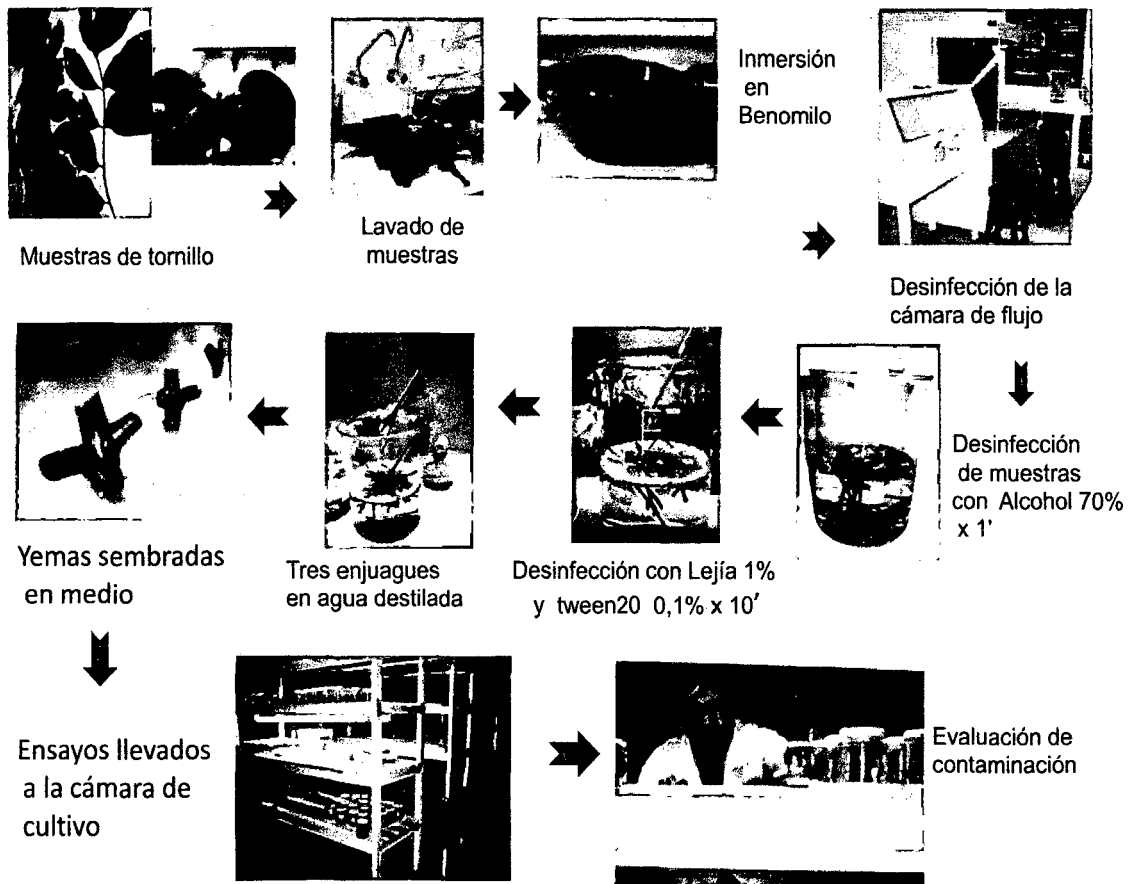


Figura 1. Flujograma del proceso de desinfección en el cultivo *in vitro* de tornillo (*Cedrelinga catenaeformis* Ducke)

Cuadro 1. Medio basal para el cultivo en yemas axilares de tornillo (*Cedrelinga catenaeformis* Duke)

Componentes	Concentración
<b>Macronutrientes</b>	mg/L
KNO <sub>3</sub>	950
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	720
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	185
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	166
<b>Micronutrientes</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	19
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
KI	-
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8
NA <sub>2</sub> EDTA	37.3
<b>Compuestos Orgánicos</b>	
Tiamina HCl	0.5
Piridoxina HCl	0.5
Ac. Nicotínico	0.5
Mio Inositol	5
Glicina	100
Sucrosa	20 g
pH	5.5

Fuente: GAMBORG y PHILLIPS, 1995



### 3.3.5. Tratamientos de desinfección en estudio

Se realizó pretratamientos de inmersión en benomilo y lejía, así como el uso de antibióticos (ceftriaxona y estreptomycin) en el medio de cultivo. Se separaron en 5 ensayos con sus respectivos tratamientos en función a los componentes usados.

Cuadro 2. Primer ensayo búsqueda del pretratamiento de desinfección.

Tratamiento	Pretratamiento	Desinfección	Medio de cultivo	Repeticiones
T1	Inmersión agua destilada x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM sin antibióticos	7
T2	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM sin antibióticos	7
T3	Inmersión benomilo 2g/L + lejía 0.1% x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM sin antibióticos	7
T4	Inmersión benomilo 2g/L + lejía 0.2% x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM sin antibióticos	7

Cuadro 3. Segundo ensayo de desinfección con ceftriaxona

Tratamiento	Pretratamiento	Desinfección	Medio de cultivo	Repeticiones
T1	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM sin antibióticos	7
T2	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM + ceftriaxona 250 mg/L	7
T3	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM + ceftriaxona 550 mg/L	7
T4	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM + ceftriaxona 750 mg/L	7

Cuadro 4. Tercer ensayo de desinfección con estreptomicina

Tratamiento	Pretratamiento	Desinfección	Medio de cultivo	Repeticiones
T1	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM sin antibióticos	5
T2	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM + estreptomicina 250 mg/L	5
T3	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM + estreptomicina 500 mg/L	5
T4	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM + estreptomicina 750 mg/L	5

Cuadro 5. Cuarto ensayo de desinfección con benomilo

Tratamiento	Pretratamiento	Desinfección	Medio de cultivo	Repeticiones
T1	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM sin antibióticos	5
T2	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM + benomilo 0.5 g/L	5
T3	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM + benomilo 1 g/L	5
T4	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM + benomilo 1.5 g/L	5
T5	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM + benomilo 2 g/L	5

Cuadro 6. Pruebas combinadas con ceftriaxona, estreptomina y benomilo

Tratamiento	Pretratamiento	Desinfección	Medio de cultivo	Repetición
T1	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM sin antibióticos	5
T2	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM + ceftriaxona 550 g/L	5
T3	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM + estreptomina 750 g/L	5
T4	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM + ceftriaxona 550 g/L + estreptomina 750 g/L	5
T5	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM + ceftriaxona 550 g/L + benomilo 1g/L	5
T6	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM + estreptomina 750 g/L + benomilo 1g/L	5
T7	Inmersión benomilo 2g/L x 24h	Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10'	WPM + ceftriaxona 550 g/L + estreptomina 750 g/L + benomilo 1g/L	5

### **3.3.6. Desinfección de los explantes**

- Las yemas se remojaron en 2 g/L de benomilo por 24 horas.
- El día de la siembra las muestras previamente cortadas se sumergieron en alcohol 70 % durante un minuto.
- Seguido se remojaron las muestras en una concentración de tween 20 al 0.1 % más lejía al 1% durante 15 minutos.
- Luego se realizó tres enjuagues en agua destilada estéril con intervalos de 5 minutos.

### **3.3.7. Siembra del explante**

#### **- Operaciones previas**

Se desinfectaron: la mesa y las paredes de la cámara con alcohol al 70 %, de la misma manera se desinfectó la parte externa de los recipientes que contenían los medios de cultivo, el agua estéril y las placas petri, antes de introducirlos en la cámara.

También se desinfectó con alcohol al 70 % las manos, se utilizó mascarillas y mandil para disminuir la contaminación dentro de la cámara de aire estéril. Se sumergieron las pinzas y los bisturís en alcohol 70 %, que luego se utilizó flameadas al mechero en el momento de la siembra, como soporte para los cortes de los explantes del vegetal, para ello también se utilizó varias placas petri previamente esterilizadas.

### - Siembra del explante

Los explantes, se introdujeron con la ayuda de una pinza las yemas de tornillo en frascos de vidrio que contenía el medio WPM, todo esto se realizó cerca del mechero para evitar que ingresen algunos microorganismos dentro del frasco, luego rápidamente se cerraron los frascos de siembra con sus respectivas tapas sellados con Parafilm, para asegurar la esterilidad dentro de ellos. Una vez sellados los frascos fueron llevados a la sala de incubación, sobre un andamio con iluminación (fluorescentes de 40 watts) considerando un foto período de 16/8 (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad), con sistema de aire acondicionado, de humedad relativa de 65 % y 24 °C.

### 3.3.8. Evaluaciones

Las evaluaciones se realizaron cada 3 días. Se evaluó el nivel de contaminación por bacterias y hongos de acuerdo a la siguiente puntuación propuesta en el laboratorio de micropropagación de la Universidad Nacional Agraria De La Selva.

Cuadro 7. Puntuaciones utilizadas en las evaluaciones de contaminación *in vitro*.

Nivel de contaminación	Diámetro (mm)
Muy alta	>16
Alta	5-8
Regular	2-4
Inicio (baja)	<2

### 3.3.9. El diseño experimental

Se ha utilizado el diseño completo al azar con un arreglo factorial, que constaron de 7 tratamientos.

Modelo aditivo lineal

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

$i = 1, 2, a$  (desinfección).

$j = 1, 2, 3, 4, b$  (medio de cultivos).

Todas las características evaluadas de cada uno de los tratamientos fueron sometidos al análisis de variancia (ANOVA) y pruebas de significación estadística al nivel de 0.05 de significancia.

Cuadro 8. ANVA de un diseño completamente al azar con arreglo factorial

Fuente de variación	G.L.
Tratamientos	(t-1)
A	(a-1)
B	(b-1)
AxB	(a-1)(b-1)
Error (b)	a(b-1)(t-1)
Total de Sub Parcela.	(abt-1)

Fuente: PIMENTEL, 1997



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Primera evaluación para hallar el pretratamiento

El tratamiento T4 (inmersión benomilo 2g/L + lejía 0.2% x 24h), ha tenido menor infestación por bacterias, teniendo un coeficiente de variación de 11.21 %, seguido por el tratamiento T3 (inmersión benomilo 2g/L + lejía 0.1% x 24h), con un coeficiente de variación estadística de 20.16 % (Cuadro 9 y Figura 2), pero el que ha tenido mayor infestación por bacterias fue el tratamiento T1 (inmersión agua destilada x 24h), con un coeficiente de variación estadística de 17.13 %.

**Cuadro 9. Descripción estadística del primer ensayo de desinfección**

Tratamiento	Descripción estadística	día 3		día 6		día 9	
		Bacteria	Hongo	Bacteria	Hongo	Bacteria	Hongo
T1	PROMEDIO	1.00	0.00	2.00	1.71	2.86	2.00
	SD	0.00	0.00	0.00	0.41	0.49	0.29
T2	PROMEDIO	0.71	0.00	2.14	0.86	2.71	1.29
	SD	0.41	0.00	0.24	0.98	0.41	1.18
T3	PROMEDIO	0.86	0.00	2.00	1.00	2.43	1.86
	SD	0.24	0.00	0.00	0.57	0.49	0.53
T4	PROMEDIO	1.00	0.00	2.00	0.86	2.14	1.43
	SD	0.00	0.00	0.00	0.49	0.24	0.94

T1: Inmersión agua destilada x 24h; T2: Inmersión benomilo 2g/L x 24h; T3: Inmersión benomilo 2g/L + lejía 0.1% x 24h; T4: Inmersión benomilo 2g/L + lejía 0.2% x 24h; SD: Desviación estándar

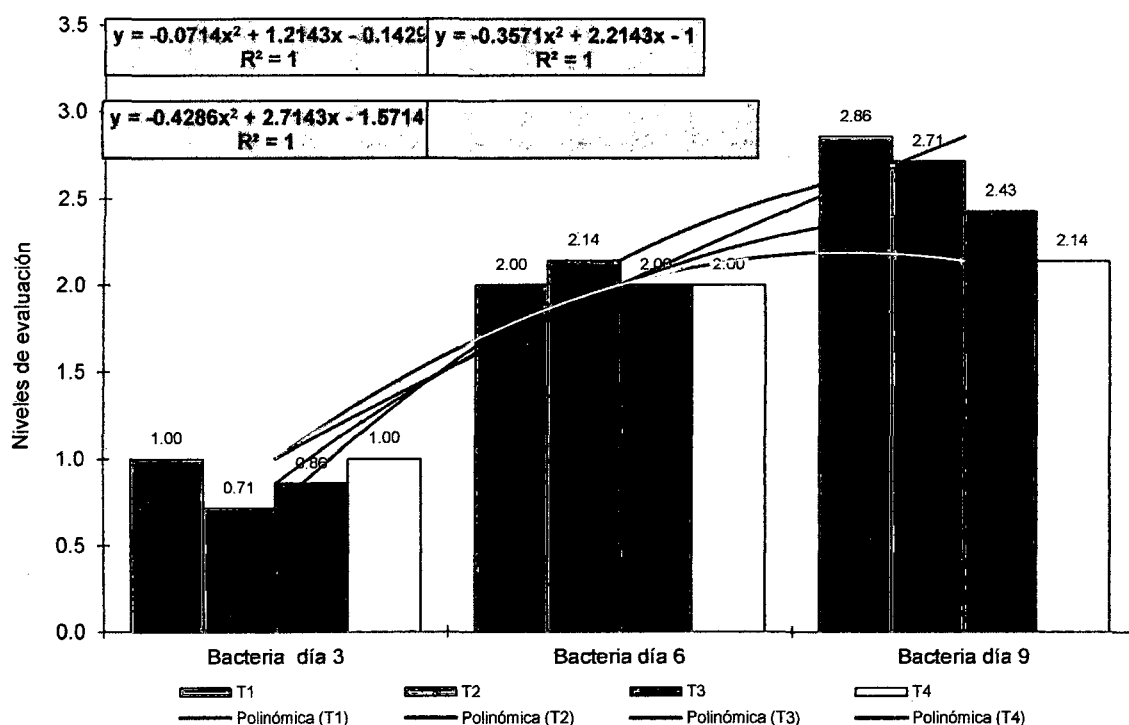


Figura 2. Comportamiento de las bacterias ante el pretratamiento

El tratamiento T4 (inmersión benomilo 2g/L + lejía 0.2% x 24h) describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = -0.428x^2 + 2.285x - 0.857$ , con un coeficiente de determinación de 1.00 (Figura 2). Una de las posibles explicaciones es que el benomilo puede interferir en el metabolismo de las hormonas de las bacterias, ello genera que reduzca el crecimiento bacteriano (RAP-AL, 1994) en los medios, además también ayudo el uso de lejía a 0.2 % ya que tiene una acción bactericida excelente (LENNTECH, 2010), mientras que los demás tratamiento tuvieron menor concentración de lejía, por lo que existió mayor contaminación. El tratamiento T1 (inmersión agua destilada x 24h), describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = -0.071x^2 + 1.214x - 0.142$ , con un coeficiente de determinación de 1.0, la cual presento mayor contaminación.

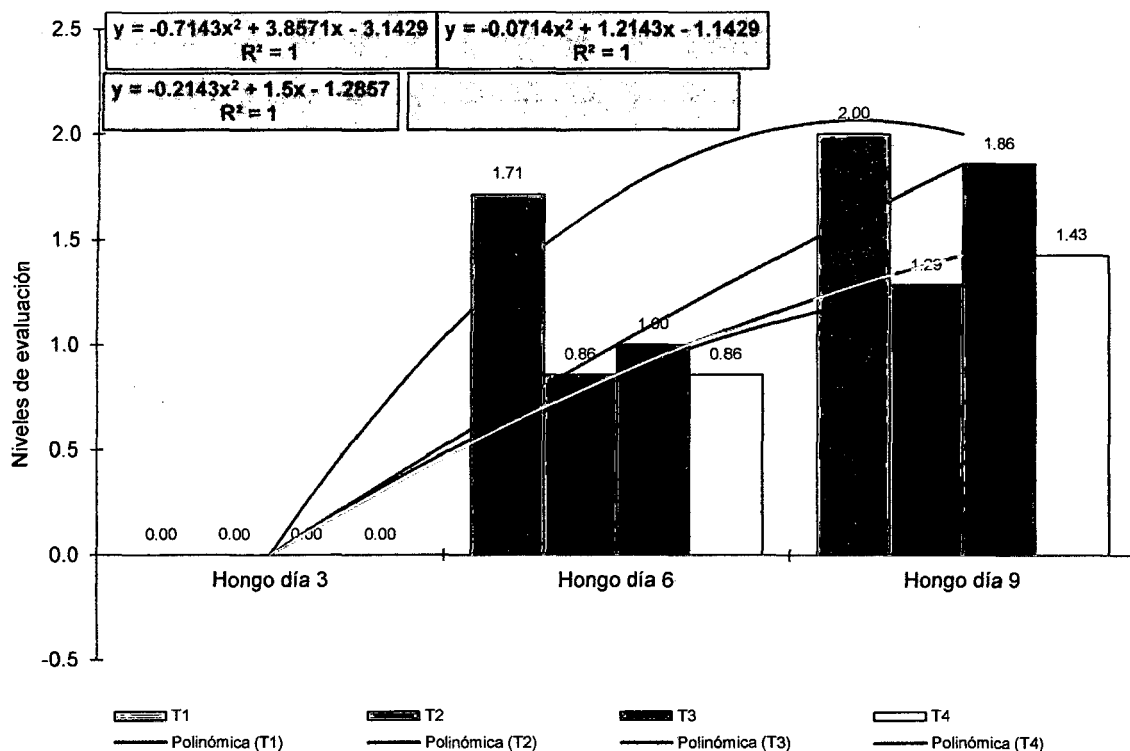


Figura 3. Comportamiento de los hongos ante el pretratamiento

El tratamiento T2 (inmersión benomilo 2g/L x 24h), ha tenido menor infestación por hongos, presentando un coeficiente de variación de 91.47 %, seguido por el tratamiento T4 (inmersión benomilo 2g/L + lejía 0.2% x 24h), con un coeficiente de variación estadística de 65.73 %, pero el que tuvo mayor infestación por hongos fue el tratamiento T1 (inmersión agua destilada x 24h), con un coeficiente de variación estadística de 14.5 % (Cuadro 9 y Figura 3).

El tratamiento T2 (inmersión benomilo 2g/L x 24h) describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = -0.214x^2 + 1.500x - 1.285$ , con un coeficiente de determinación de 1.00 (Figura 3). Una de las posibles explicaciones es que el benomilo puede interferir en el metabolismo de las hormonas de los hongos (RAP-AL, 1994), ello genera que reduzca el

crecimiento fúngico en los medios, mientras que los hongos son resistentes a la lejía, pero a medida que se aumenta la concentración de la lejía estas se ven afectados (LENNTECH, 2010), por lo que existió menor contaminación por hongos. El tratamiento T1 (inmersión agua destilada x 24h), describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = -0.714x^2 + 3.857x - 3.142$ , con un coeficiente de determinación de 1.00, la cual presento mayor contaminación.

El modelo es altamente significativo estadísticamente (tratamientos son diferentes entre sí), ya que el F calculado es mayor que el F tabular a 0.05 (nivel de confianza del 95 %), pero la diferencia es mucho más altamente significativa por el periodo de evaluación (factor B) (día 3, 6 y 9), mientras que el factor A (niveles de tratamientos) no es significativo estadísticamente. (Cuadro 10 y Figura 4).

Cuadro 10. Primer ensayo de desinfección por bacterias para hallar el pretratamiento

ANVA	GL	SC	CM	Pr > F
Modelo	11	42.3214	3.8474	0.0001
A	3	0.7023	0.2341	0.1777
B	2	39.7142	19.8571	0.0001
A*B	6	1.9047	0.3174	0.0448
Error	72	10.0000	0.1388	
Total	83	52.3214		

CV = 20.46 y  $R^2 = 0.81$ ; A: Tratamientos; B: Tiempo de evaluación

El tratamiento T1 (inmersión en agua destilada por 24 horas y con desinfección en alcohol 70% por 1 minuto + lejía 1% y tween 20 0.1%/1'), ha presentado mayor cantidad de crecimiento de bacterias (2.86 promedio), mientras que en el tratamiento T4 (inmersión benomilo 2 g/L + lejía 0.2%/24h y con desinfección en alcohol 70% por 1 minuto + lejía 1% y tween20 0.1%/1') hubo menor cantidad de bacterias, 2.14 en promedio (Figura 4). También se observa que entre tratamientos no existen diferencias significativas (factor A). En relación a los resultados encontrado en la presente investigación. RAMIREZ (2000) sostiene que los microorganismos contaminantes posiblemente están localizados dentro de las irregularidades de la superficie de los segmentos del explante, lo que quizás impide la acción de los desinfectantes superficiales (LENNTECH, 2010) usados en el presente trabajo de investigación.

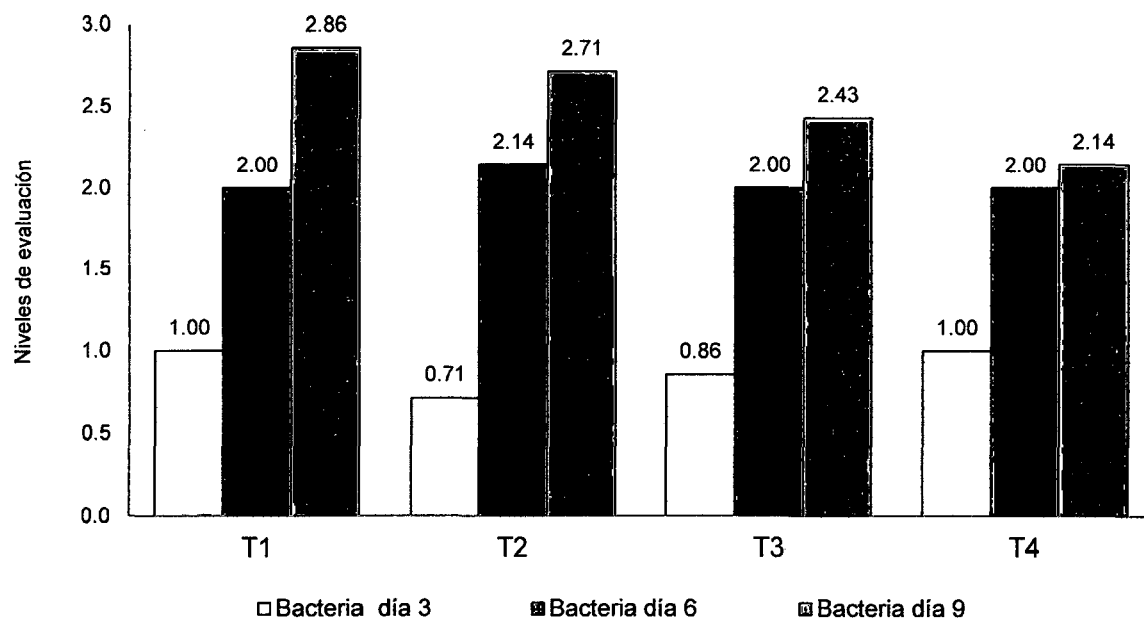


Figura 4. Primer ensayo de desinfección por bacterias para hallar el pretratamiento

Se observa el mismo comportamiento en los hongos que en las bacterias, donde el modelo es altamente significativo estadísticamente ya que el F calculado es mayor que el F tabular a 0.05 (nivel de confianza del 95 %), también se observa que el factor A (tratamientos) no es significativo, mientras que el factor B (periodo de evaluación) si es altamente significativo estadísticamente; el tratamiento T2 tiene un promedio de 1.29 siendo el menor, mientras que el tratamiento T1 es el mayor teniendo un promedio de 2.00 del nivel de contaminación (Cuadro 11).

En el proceso de desinfección del explante es importante encontrar el equilibrio entre la concentración y tiempo de acción del desinfectante sobre los microorganismos contaminantes, con el efecto fitotóxico que pueda ejercer sobre el explante, es decir, el objetivo es alcanzar una máxima esterilización con una máxima sobrevivencia de los tejidos (DELGADO y ROJAS, 1999).

Cuadro 11. Primer ensayo de desinfección por hongos para hallar el pretratamiento

ANVA	GL	SC	CM	Pr > F
Modelo	11	45.2738	4.1158	0.0001
A	3	3.5595	1.1865	0.1109
B	2	39.3095	19.6547	0.0001
A*B	6	2.4047	0.4007	0.6494
Error	72	41.1428	0.5714	
Total	83	86.4166		

CV = 82.46 y  $R^2 = 0.52$ ; A: Tratamientos; B: Tiempo de evaluación

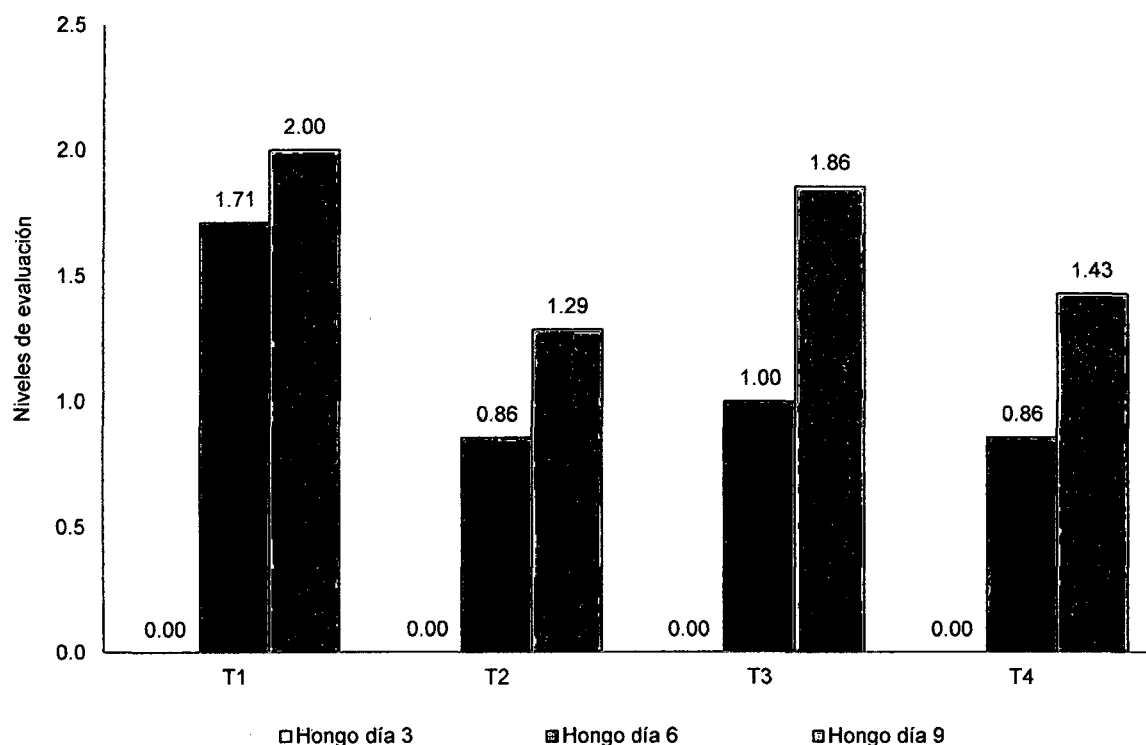


Figura 5. Primer ensayo de desinfección por hongos para hallar el pretratamiento

El tratamiento T1 (inmersión en agua destilada por 24 horas y con desinfección en alcohol 70% por 1 minuto + lejía 1% y tween 20 0.1%/1'), hubo mayor cantidad de crecimiento de bacterias (2.00 promedio), mientras que en el tratamiento T2 (inmersión benomilo 2 g/L y con desinfección en alcohol 70% por 1 minuto + lejía 1% y tween20 0.1%/1') (Figura 5) hubo menor cantidad de hongos (1.29 en promedio).

#### 4.2. Segundo ensayo de desinfección con ceftriaxona

El tratamiento T3 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 550 mg/L), ha tenido menor infestación por bacterias, teniendo un coeficiente de variación de 141.86 %, seguido por el tratamiento T2 (inmersión

benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 250 mg/L), con un coeficiente de variación estadística de 115.49 %, pero el que tuvo mayor infestación por bacterias fue el tratamiento T4 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 750 mg/L), con un coeficiente de variación estadística de 91.47 % (Cuadro 12 y Figura 6).

Cuadro 12. Descripción estadística del segundo ensayo de desinfección

Tratamiento	Descripción estadística	día 3		día 6		día 9	
		Bacteria	Hongo	Bacteria	Hongo	Bacteria	Hongo
T1	PROMEDIO	0.00	0.00	0.29	0.14	0.57	1.57
	SD	0.00	0.00	0.41	0.24	0.65	0.90
T2	PROMEDIO	0.00	0.14	0.14	0.57	0.57	0.71
	SD	0.00	0.24	0.24	0.65	0.82	0.82
T3	PROMEDIO	0.00	0.14	0.14	0.29	0.43	0.86
	SD	0.00	0.24	0.24	0.49	0.61	1.22
T4	PROMEDIO	0.00	0.00	0.14	0.14	0.86	1.29
	SD	0.00	0.00	0.24	0.24	0.73	1.18

T1: Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM sin antibióticos); T2: Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 250 mg/L); T3: Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 550 mg/L); T4: Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 750 mg/L); SD: Desviación estándar

El tratamiento T3 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 550 mg/L) describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 0.071x^2 - 0.071x$ , con un coeficiente de determinación de 1.00 (Figura 6). Una de las posibles explicaciones es que la ceftriaxona 550 mg/L, el anillo betalactámico es parte de la estructura de las cefalosporinas, por lo tanto, la ceftriaxona es un antibiótico betalactámico; el modo de acción de este



antibiótico es la inhibición de la síntesis de la pared celular de las bacterias, específicamente por unión a unas proteínas bacterianas llamadas "proteínas ligandos de la penicilina (PBPs), por lo tanto inactiva a las bacterias gram positivas y negativas (KATZUNG *et al.*, 2007); mientras que los demás tratamientos tuvieron mayor contaminación por bacterias. El tratamiento T4 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + WPM + ceftriaxona 750 mg/L), describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 0.285x^2 - 0.714x + 0.428$ , con un coeficiente de determinación de 1.00, la cual presenta mayor contaminación debido a que la concentración de ceftriaxona 750 mg/L, fue muy alta, de esta manera no es letal a las bacterias (LENNTECH, 2010), más bien es benéfica, generando mayor contaminación en los explantes del tornillo.

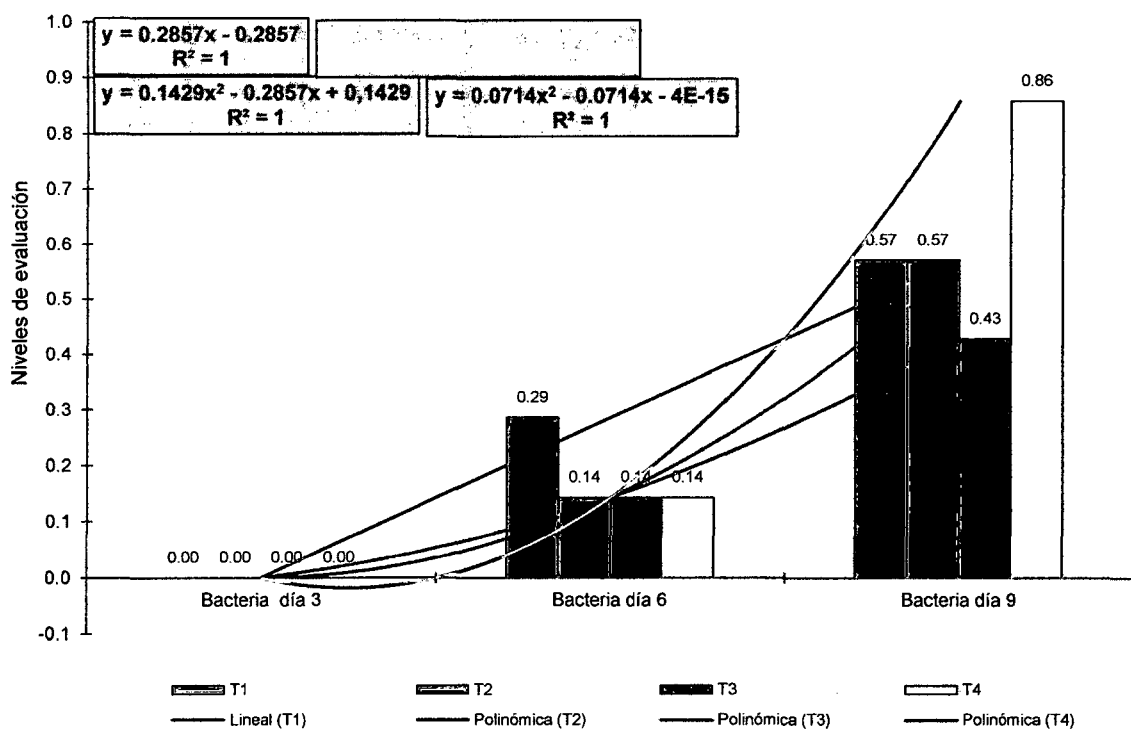


Figura 6. Comportamiento de las bacterias ante el segundo ensayo de desinfección con ceftriaxona

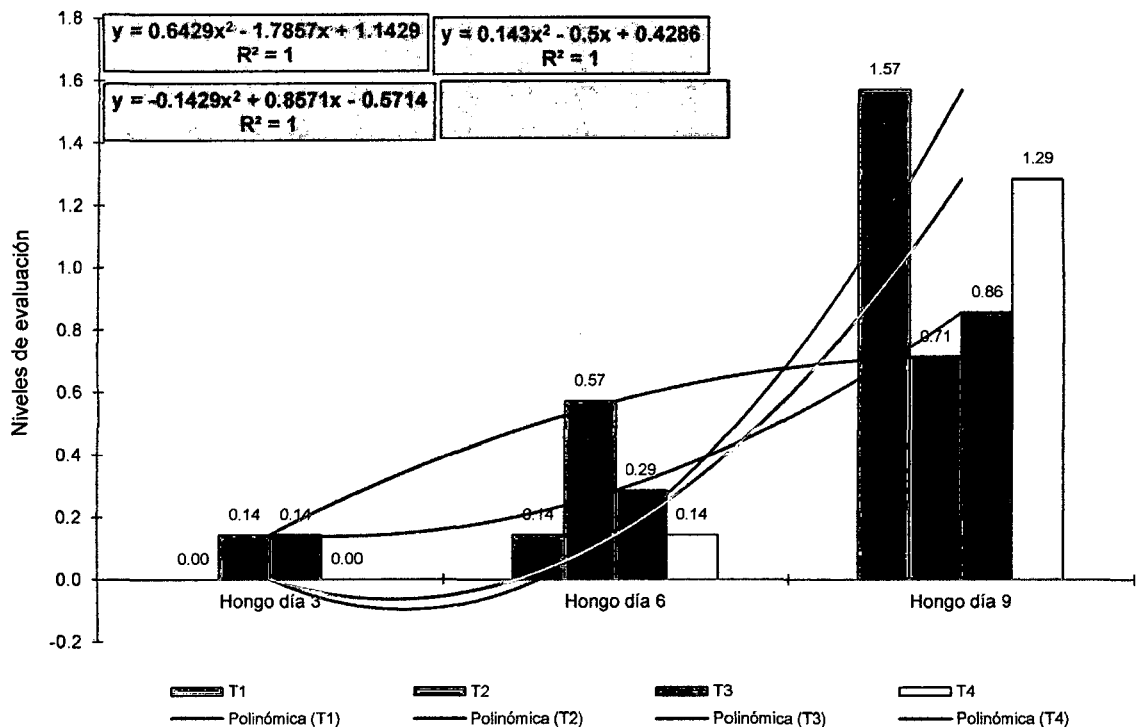


Figura 7. Comportamiento de los hongos ante el segundo ensayo de desinfección con ceftriaxona

El tratamiento T2 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 250 mg/L), ha tenido menor infestación por hongos, teniendo un coeficiente de variación de 115.49 %, seguido por el tratamiento T3 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 550 mg/L), con un coeficiente de variación estadística de 141.86 %, pero el que tuvo mayor infestación por hongos fue el tratamiento T1 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + WPM sin antibióticos), con un coeficiente de variación estadística de 57.32 % (Cuadro 12 y Figura 7). El tratamiento T2 (inmersión benomilo 2g/L x 24h - WPM + ceftriaxona 250 mg/L) describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = -0.142x^2 + 1.857x - 0.571$ , con un coeficiente de determinación de 1.00 (Figura 7). Una de las posibles explicaciones es que la ceftriaxona tiene el

anillo betalactámico como parte de la estructura (KATZUNG, 2007), por lo tanto, la ceftriaxona es un antibiótico betalactámico; de modo que la acción de este antibiótico es inhibir la síntesis de la pared celular de las bacterias, específicamente por unión a unas proteínas bacterianas llamadas "proteínas ligandos de la penicilina (PBPs), mas no de los hongos (LENNTECH, 2010), es por ello que a medida se aumentaba la concentración de la ceftriaxona también aumentaba la contaminación por hongos en los explantes. El tratamiento T1 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + WPM sin antibióticos), describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 0.642x^2 - 1.785x + 1.142$ , con un coeficiente de determinación de 1.00, la cual presento mayor contaminación.

Cuadro 13. Segundo ensayo en bacterias de desinfección con ceftriaxona

ANVA	GL	SC	CM	Pr > F
Modelo	11	6.2381	0.5671	0.0601
A	3	0.2381	0.0793	0.8542
B	2	5.4523	2.7262	0.0003
A*B	6	0.5476	0.0912	0.9356
Error	72	22.0000	0.3055	
Total	83	28.2381		

CV = 211.06 y  $R^2 = 0.22$ ; A: Tratamientos; B: Tiempo de evaluación

El modelo tiene una significancia baja estadísticamente; y de acuerdo al diseño experimental, el factor A (tratamientos) no es significativo estadísticamente, mientras que el factor B (periodo de evaluación) es altamente significativo estadísticamente. El tratamiento T3 (mejor inmersión del primer

ensayo + alcohol 70%/1` + lejía 1% y tween 20 0.1%/10`, con medio de cultivo WPM: Sales Minerales del Medio Lloyd y Mc Cown, + ceftriaxona 550 mg/L) (Cuadro 13), ha resultado mejor para el segundo ensayo con menor crecimiento de bacterias (Figura 6 y 8).

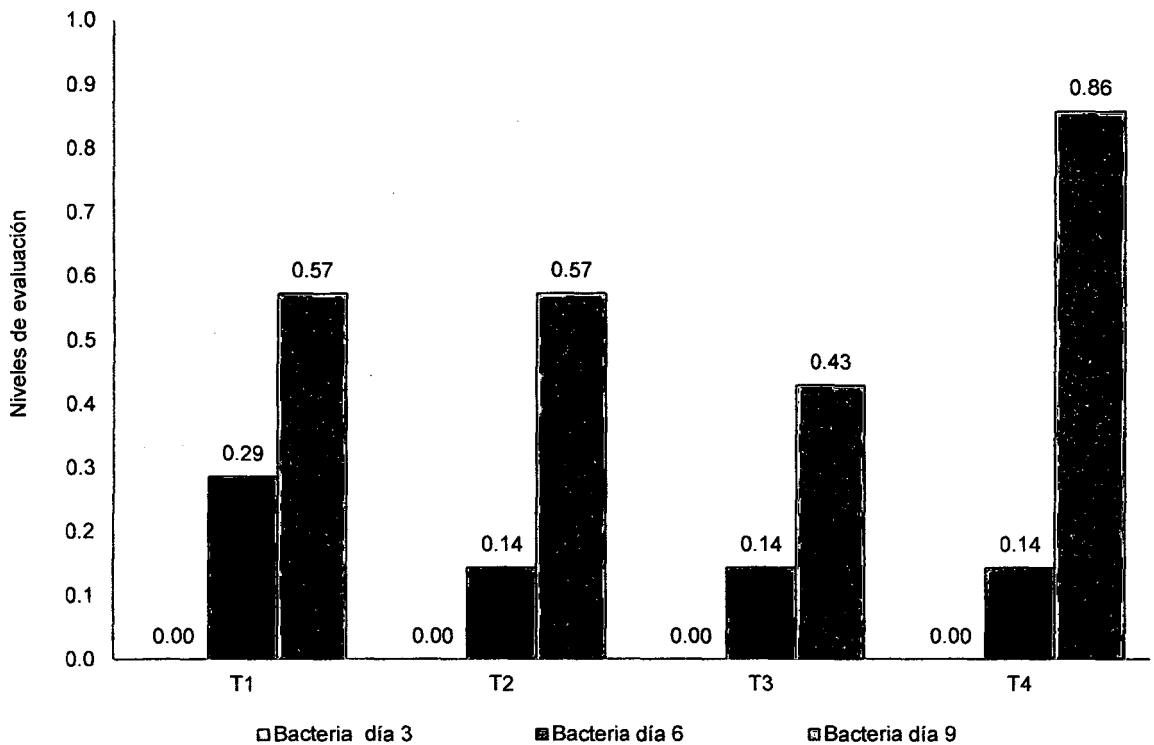


Figura 8. Segundo ensayo en bacterias de desinfección con ceftriaxona

Mientras los demás tratamientos que tuvieron como medio de cultivo ceftriaxona ya que este es un antibiótico de la clase cefalosporina de tercera generación, por lo que tiene acciones de amplio espectro en bacterias gram positiva y negativas; mientras que para los hongos sucedió lo contrario a menor concentración de ceftriaxona T2 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 250 mg/L), el crecimiento de hongos es menor (OTAROLA, 2001).

Cuadro 14. Segundo ensayo en hongos de desinfección con ceftriaxona

ANVA	GL	SC	CM	Pr > F
Modelo	11	20.9881	1.9080	0.0068
A	3	0.2261	0.0753	0.9572
B	2	16.7381	8.3690	0.0001
A*B	6	4.0238	0.6706	0.4799
Error	72	52.0000	0.7222	
Total	83	72.9881		

CV = 174.11 y  $R^2 = 0.29$ ; A: Tratamientos; B: Tiempo de evaluación

Se observa el mismo comportamiento en los hongos que en las bacterias (Cuadro 14), donde el modelo es altamente significativo estadísticamente ya que el F calculado es mayor que el F tabular a 0.05 (nivel de confianza del 95 %), también se observa que el factor A (tratamientos) no es significativo, mientras que el factor B (periodo de evaluación) si es altamente significativo estadísticamente; el tratamiento T2 tiene un promedio de 0.71 siendo el menor, mientras que el tratamiento T1 es el mayor teniendo un promedio de 1.57 del nivel de contaminación.

El tratamiento T1 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10' + WPM sin antibióticos), hubo mayor cantidad de crecimiento de hongos (1.57 promedio), mientras que en el tratamiento T2 (inmersión benomilo 2 g/L y con desinfección en alcohol 70% por 1 minuto + lejía 1% y tween20 0.1%/1' + WPM + ceftriaxona 250 mg/L) hubo menor cantidad de hongos (0.71 en promedio).

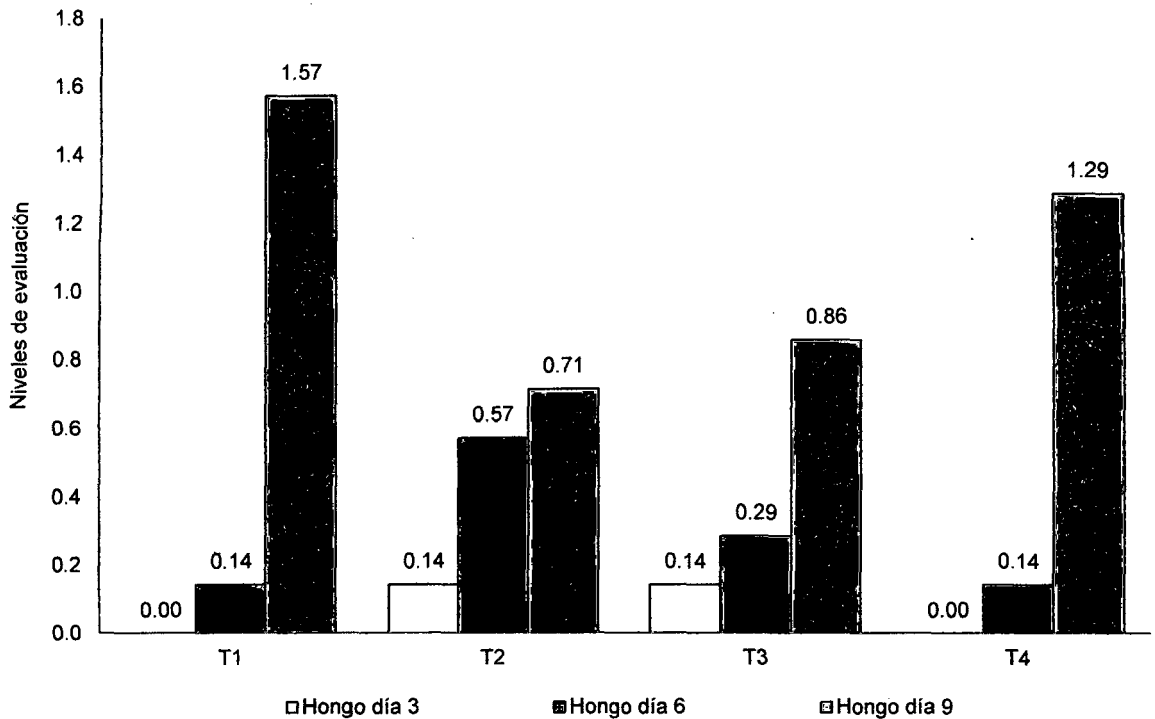


Figura 9. Segundo ensayo en hongos de desinfección con ceftriaxona

#### 4.3. Tercer ensayo de desinfección con estreptomyciná

El tratamiento T3 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + estreptomyciná 550 mg/L), ha tenido menor infestación por bacterias, teniendo un coeficiente de variación de 40.00 %, seguido por el tratamiento T4 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + estreptomyciná 750 mg/L) , con un coeficiente de variación estadística de 40.00 % (Cuadro 15 y Figura 10), pero el que tuvo mayor infestación por bacterias fue el tratamiento T1 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + WPM sin antibióticos), con un coeficiente de variación estadística de 17.78 % (Figura 9).

Cuadro 15. Descripción estadística del tercer ensayo de desinfección

Tratamiento	Descripción estadística	día 3		día 6		día 9	
		Bacteria	Hongo	Bacteria	Hongo	Bacteria	Hongo
T1	PROMEDIO	0.80	0.20	1.20	0.60	1.80	1.00
	SD	0.32	0.32	0.64	0.72	0.32	1.20
T2	PROMEDIO	0.60	0.00	0.80	0.40	1.40	0.80
	SD	0.48	0.00	0.32	0.48	0.72	0.64
T3	PROMEDIO	0.20	0.80	0.20	1.20	0.80	1.60
	SD	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.48
T4	PROMEDIO	0.80	0.00	0.80	0.20	0.80	0.60
	SD	0.32	0.00	0.32	0.32	0.32	0.72

T1: Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM sin antibióticos); T2: Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + estreptomicina 250 mg/L); T3: Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + estreptomicina 550 mg/L); T4: Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + estreptomicina 750 mg/L); SD: Desviación estándar

El tratamiento T3 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + estreptomicina 550 mg/L) describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 0.300x^2 - 0.900x + 0.800$ , con un coeficiente de determinación de 1.00. Una de las posibles explicaciones es que la estreptomicina 550 mg/L (Figura 10), al no penetrar bien al interior de las células, por lo que es un agente con efecto en contra de los bacilos exclusivamente extracelulares (MENSA *et al.*, 2008), necesita mayor concentración para su función, ya que este es un antibiótico bactericida de espectro pequeño, derivado de la actinobacteria *Streptomyces griseus*. Mientras que los demás tratamiento tuvieron mayor contaminación por bacterias. El tratamiento T1 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM sin antibióticos), describe una ecuación polinómica, de la forma  $y =$

$0.100x^2 + 0.100x + 0.600$ , con un coeficiente de determinación de 1.00, la cual presento mayor contaminación.

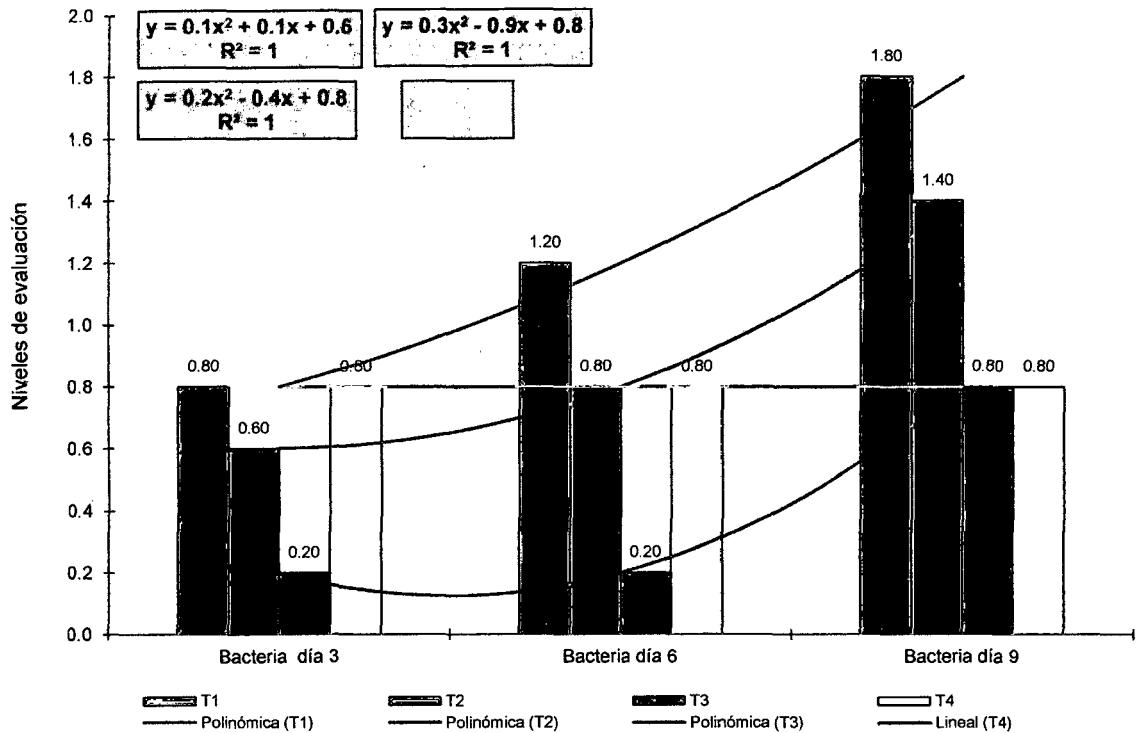


Figura 10. Comportamiento de las bacterias ante tercer ensayo de desinfección con estreptomicina

El tratamiento T4 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + estreptomicina 750 mg/L), ha tenido menor infestación por hongos, teniendo un coeficiente de variación de 120.0 %, seguido por el tratamiento T2 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + WPM + estreptomicina 250 mg/L), con un coeficiente de variación estadística de 80.00 %, pero el que tuvo mayor infestación por hongos fue el tratamiento T1 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + WPM sin antibióticos), con un coeficiente de variación estadística de 100.00 % (Cuadro 15 y Figura 11).



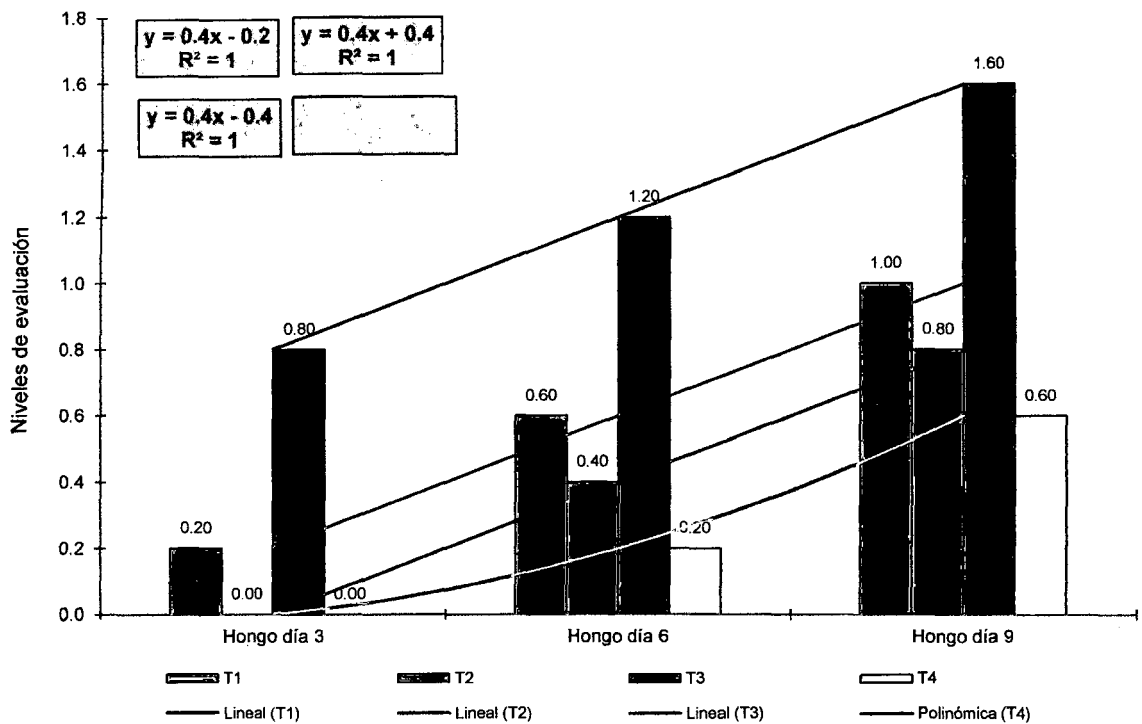


Figura 11. Comportamiento de los hongos ante tercer ensayo de desinfección con estreptomicina

El tratamiento T4 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + estreptomicina 750 mg/L) describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 0.100x^2 - 0.100x$ , con un coeficiente de determinación de 1.00 (Figura 11). Una de las posibles explicaciones es que la estreptomicina por ser un antibiótico bactericida de espectro pequeño afecta directamente parte de la estructura del hongo; de modo que la acción de este antibiótico es la inhibición de la síntesis de los hongos (MENZA *et al.*, 2008). El tratamiento T3 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + WPM + estreptomicina 550 mg/L), describe una ecuación lineal, de la forma  $y = 0.400x - 0.400x$ , con un coeficiente de determinación de 1.00, la cual presenta mayor contaminación.

El modelo es altamente significativo estadísticamente (nivel de confianza de 95 %), lo cual el diseño experimental del factor A (tratamientos) también muestra una alta significancia, asimismo el factor B (periodo de evaluación) (Cuadro 16 y Figura 12), también muestra un comportamiento altamente significativo. Pero la interacción del factor AxB muestra una baja significancia estadística.

Cuadro 16. Tercer ensayo de bacterias en desinfección con estreptomicina

ANVA	GL	SC	CM	Pr > F
Modelo	11	11.2500	1.0227	0.0015
A	3	5.7833	1.9288	0.0010
B	2	3.9000	1.9500	0.0032
A*B	6	1.5667	0.2611	0.5236
Error	72	14.4000	0.3000	
Total	83	25.6500		

CV = 64.43 y  $R^2 = 0.44$ ; A: Tratamientos; B: Tiempo de evaluación

El tratamiento T3 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0,1% x 10', con medio de cultivo WPM: Sales Minerales del Medio Lloyd y Mc Cown + estreptomicina 500 mg/L) tiene menor contaminación de bacterias; mientras que a menor concentración de estreptomicina del tratamiento T1 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + alcohol 70%/1' + lejía 1% y tween 20 0.1%/10', con medio de cultivo WPM: Sales Minerales del Medio Lloyd y Mc Cown, sin antibióticos), existe mayor contaminación por bacterias, corroborado por PIERIK (1990).

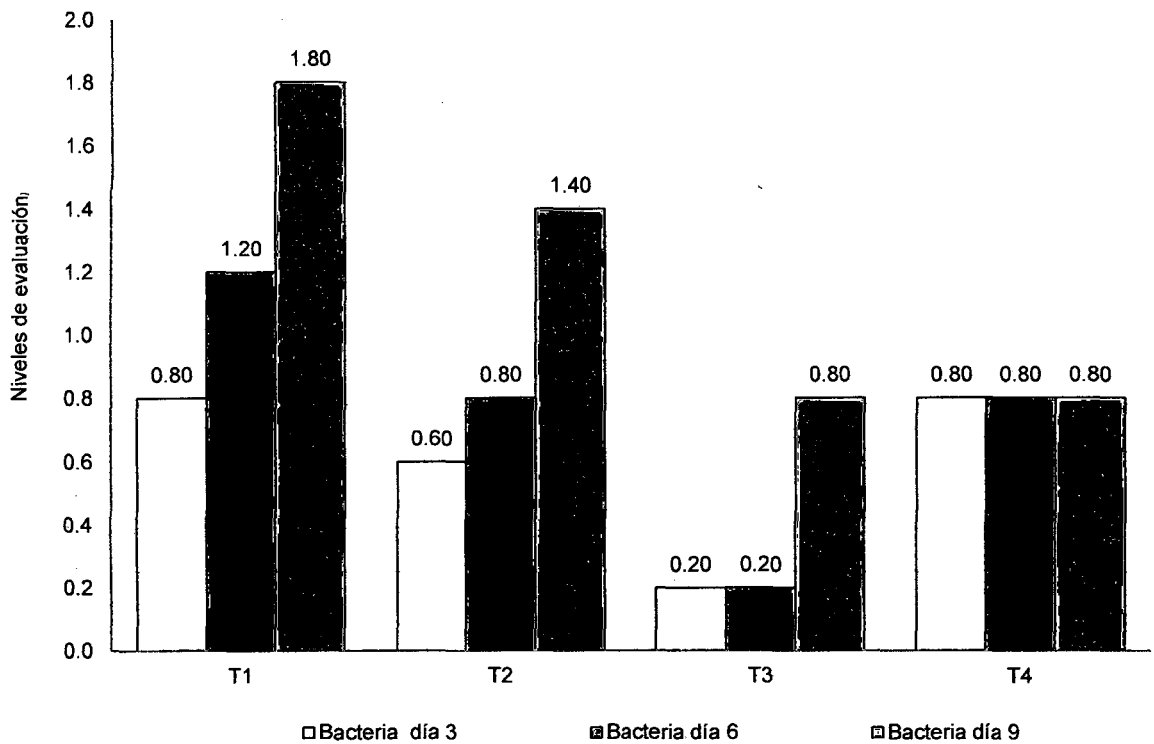


Figura 12. Tercer ensayo de bacterias en desinfección con estreptomycinina

Se observa el mismo comportamiento de las bacterias (Cuadro 17), donde el modelo es altamente significativo estadísticamente ya que el F calculado es mayor que el F tabular a 0.05 (nivel de confianza del 95 %), asimismo se observa que el factor A (tratamientos) es altamente significativo, de igual manera sucede con el factor B (periodo de evaluación) siendo altamente significativo estadísticamente; el tratamiento T4 tiene un promedio de 0.60 siendo el menor, mientras que el tratamiento T3 es el mayor teniendo un promedio de 1.60 del nivel de contaminación. La estreptomycinina es un antibiótico que pertenece al grupo de los aminoglucósidos, es un antibiótico bactericida de espectro pequeño (ESTOPA, 2005).

Cuadro 17. Tercer ensayo de hongos en desinfección con estreptomycinina

ANVA	GL	SC	CM	Pr > F
Modelo	11	13.8333	1.2167	0.0122
A	3	7.6500	2.5500	0.0029
B	2	5.6333	2.8166	0.0050
A*B	6	0.1000	0.0167	0.9998
Error	72	22.8000	0.4750	
Total	83	36.1833		

CV = 111.76 y  $R^2 = 0.37$ ; A: Tratamientos; B: Tiempo de evaluación

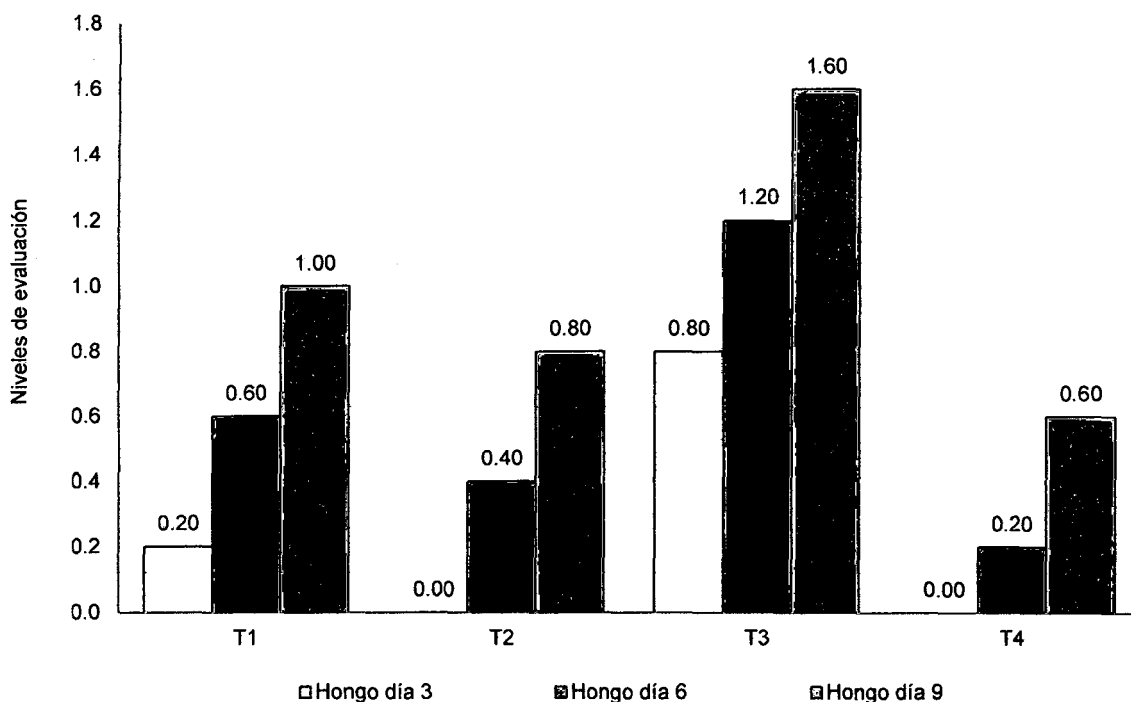


Figura 13. Tercer ensayo de hongos en desinfección con estreptomycinina

El tratamiento T3 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + Alcohol 70% x 1' + Lejía 1% y tween20 0.1% x 10' + WPM + estreptomycinina 500 mg/L), hubo

mayor cantidad de crecimiento de hongos (1.60 promedio), mientras que en el tratamiento T4 (inmersión benomilo 2 g/L y con desinfección en alcohol 70% por 1 minuto + lejía 1% y tween20 0.1%/1' + WPM + estreptomicina 750 mg/L) hubo menor cantidad de hongos (0.60 en promedio) (Figura 13).

#### 4.4. Cuarto ensayo de desinfección con benomilo

Cuadro 18. Descripción estadística del cuarto ensayo de desinfección

Tratamiento	Descripción estadística	día 3		día 6		día 9	
		Bacteria	Hongo	Bacteria	Hongo	Bacteria	Hongo
T1	PROMEDIO	0.20	0.00	1.00	1.40	2.40	1.40
	SD	0.32	0.00	0.80	0.72	0.72	1.12
T2	PROMEDIO	1.40	0.00	1.60	0.40	2.00	0.80
	SD	0.48	0.00	0.72	0.48	0.80	0.96
T3	PROMEDIO	1.40	0.00	1.80	0.40	2.40	0.60
	SD	0.48	0.00	0.32	0.64	0.48	0.96
T4	PROMEDIO	1.00	0.00	1.20	0.00	2.00	0.00
	SD	0.00	0.00	0.32	0.00	0.00	0.00
T5	PROMEDIO	1.20	0.00	2.00	0.20	2.00	0.20
	SD	0.32	0.00	0.00	0.32	0.00	0.32

T1: Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM sin antibióticos); T2: Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + benomilo 0.5 g/L); T3: Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + benomilo 1.0 g/L); T4: Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + benomilo 1.5 g/L); T5: Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + benomilo 2.0 g/L); SD: Desviación estándar

El tratamiento T5 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + benomilo 2.0 g/L), ha tenido menor infestación por bacterias, teniendo un coeficiente de variación de 1.00 %, seguido por el tratamiento T4 (inmersión benomilo 2g/L x

24h + WPM + benomilo 1.5 g/L), con un coeficiente de variación estadística de 2.00 %, pero el que tuvo mayor infestación por bacterias fue el tratamiento T1 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + WPM sin antibióticos), con un coeficiente de variación estadística de 30.00 % (Cuadro 18 y Figura 14).

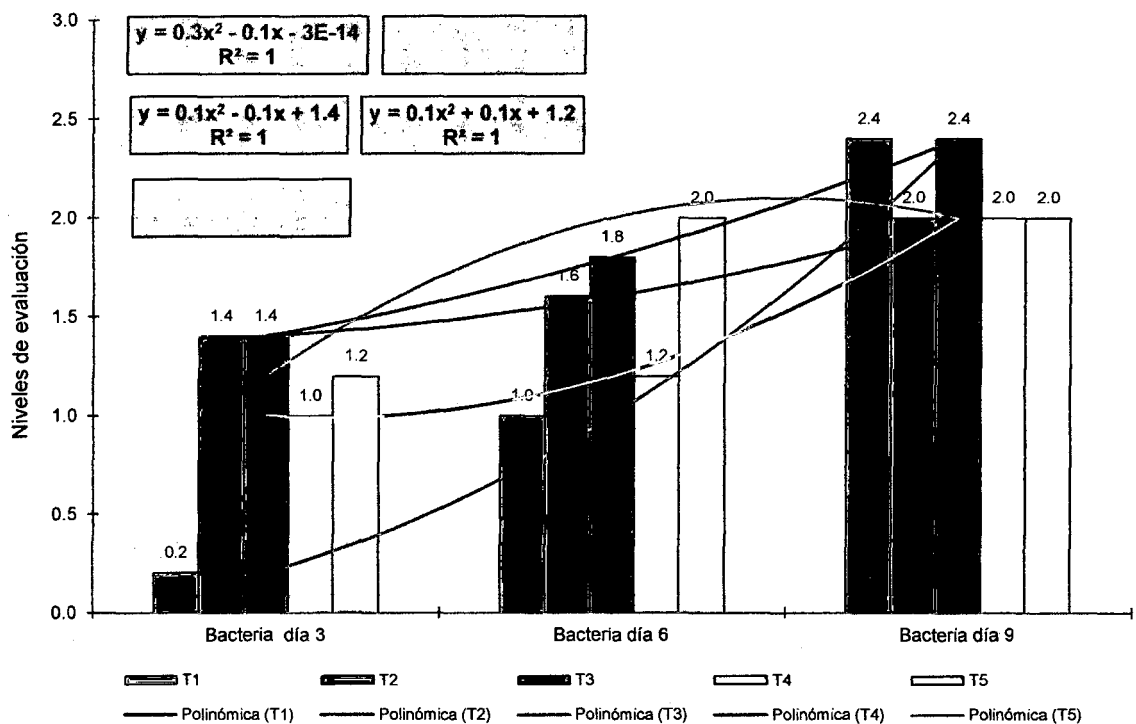


Figura 14. Comportamiento de las bacterias ante el cuarto ensayo de desinfección con benomilo

El tratamiento T5 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + benomilo 2.0 g/L) describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = -0.400x^2 + 2.00x - 0.40$ , con un coeficiente de determinación de 1.00 (Figura 14). Una de las posibles explicaciones es que el benomilo se comporta como fungicida (LENNTECH, 2010), su principal metabolito, carbendazim, se unen a los microtúbulos (estructura importante de todas las células) y por eso interfieren en

algunas funciones celulares, como la división de las células y los mecanismos de transporte intracelulares (RAP-AL, 1994), interviniendo en el crecimiento bacteriano. Mientras que los demás tratamiento tuvieron mayor contaminación por bacterias (SERRANO, 1991). El tratamiento Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM sin antibióticos), describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 0.300x^2 - 0.100x - 2.0 \times 10^{-14}$ , con un coeficiente de determinación de 1.00, la cual presento mayor contaminación.

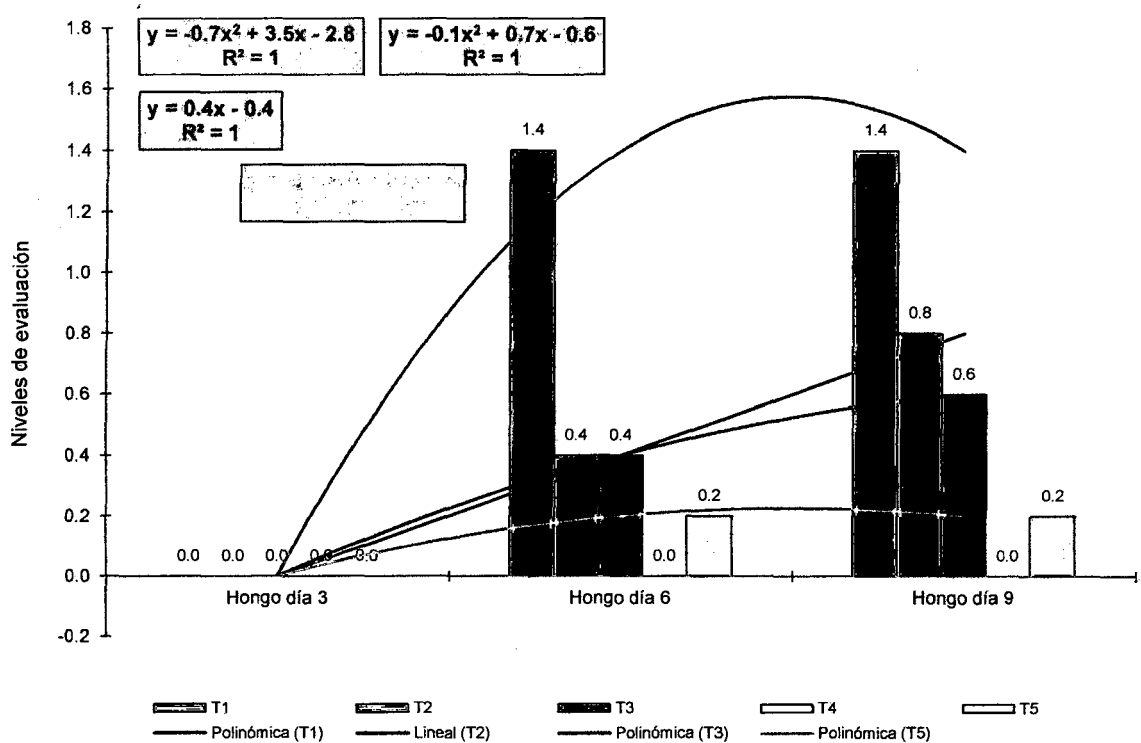


Figura 15. Comportamiento de los hongos ante el cuarto ensayo de desinfección con benomilo

El tratamiento T4 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + WPM + benomilo 1.5 g/L), ha tenido menor infestación por hongos, teniendo un coeficiente de variación de 0.00 %, seguido por el tratamiento T5 (inmersión

benomilo 2g/L x 24h + WPM + benomilo 2.0 g/L), con un coeficiente de variación estadística de 160.00 %, pero el que tuvo mayor infestación por hongos fue el tratamiento T1 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + WPM sin antibióticos), con un coeficiente de variación estadística de 80.00 % (Cuadro 18 y Figura 15).

El tratamiento T4 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + benomilo 1.5 g/L) describe una ecuación lineal, de la forma  $y = 0$ , con un coeficiente de determinación de 1.00 (Figura 15). Una de las posibles explicaciones es que la toxicidad selectiva del benomil como fungicida posiblemente se debió al aumento de su efecto en los hongos, la cual inhibió el crecimiento del fungi en el medio (RAP-AL, 1994); de modo que la acción de este antibiótico es la inhibición completa de la síntesis de los hongos (ROCA, 1991). El tratamiento T1 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + WPM sin antibióticos), describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = -0.70x^2 + 3.50x - 2.8$ , con un coeficiente de determinación de 1.00, la cual presento mayor contaminación.

EL modelo es altamente significativo estadísticamente (a niveles de confianza del 95 %), lo cual el diseño experimental del factor A (tratamientos) también muestra una significancia estadística, asimismo el factor B (periodo de evaluación) (Cuadro 19 y Figura 16), también muestra un comportamiento altamente significativo. Pero la interacción del factor Ax B muestra una nula significancia estadística.



Cuadro 19. Cuarto ensayo de bacterias en desinfección con benomilo

ANVA	GL	SC	CM	Pr > F
Modelo	11	25.1467	1.7962	0.0001
A	3	4.3467	1.0866	0.0332
B	2	15.7867	7.8933	0.0001
A*B	6	5.0133	0.6266	0.1380
Error	72	23.2000	0.3866	
Total	83	48.3466		

CV = 39.52 y  $R^2 = 0.52$ ; A: Tratamientos; B: Tiempo de evaluación

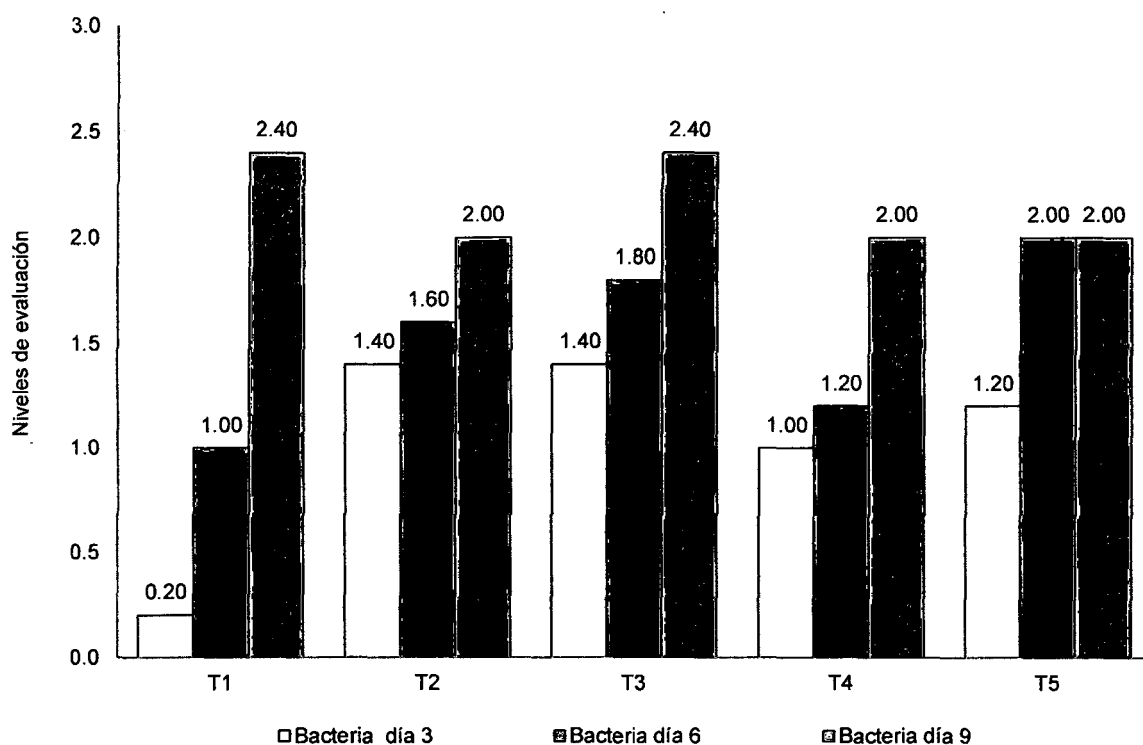


Figura 16. Cuarto ensayo de bacterias en desinfección con benomilo

El tratamiento T1 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + alcohol 70%/1' + lejía 1% y tween 20 0.1%/10', con medio de cultivo WPM: Sales Minerales

del Medio Lloyd y Mc Cown, sin antibióticos), es el que tuvo mayor contaminación de bacterias, mientras que el tratamiento T5 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + alcohol 70%/1' + lejía 1% y tween20 0.1%/10', con medio de cultivo WPM: Sales Minerales del Medio Lloyd y Mc Cown, mas benomilo 2 g/L), tuvo menor contaminación por bacterias, los resultados corroboran a lo mencionado de la actividad fúngica del benomilo por SUÁREZ *et al* (2006).

Debido a la nula resistencia de los hongos al benomilo, se comprueba que este producto tiene una acción fungicida en la contaminación *in vitro* a pesar de su acción sistémica, pero ayuda de una manera parcial (Figura 17). De acuerdo con RAMIREZ (2000) afirma que en cultivo *in vitro* de segmentos nodales del guayabo (*Psidium guajava* L.) utilizando benomilo como desinfectante, después de 5 días se detectó la presencia de hongos, pero a medida que se aumentaba la concentración del benomilo los hongos disminuían, de esta manera no contamina los segmentos nodales causando posteriormente su permanencia.

Para los tratamientos (factor A) y para el periodo de evaluación (factor B) son altamente significativos estadísticamente (a niveles de confianza del 95 %), pero la interacción del factor AxB no son significativos estadísticamente; donde el tratamiento T4 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + alcohol 70%/1' + lejía 1% y tween20 0.1%/10', con medio de cultivo WPM: Sales Minerales del Medio Lloyd y Mc Cown, mas benomilo 1.5 g/L) ha causado la inhibición completa de los hongos, en comparación de los demás tratamientos de este ensayo (Cuadro 20 y Figura 17).

Cuadro 20. Cuarto ensayo de hongos en desinfección con benomilo

ANVA	GL	SC	CM	Pr > F
Modelo	11	16.8800	1.2057	0.0063
A	3	7.6800	1.9200	0.0056
B	2	5.0400	2.5200	0.0074
A*B	6	4.1600	0.5200	0.3770
Error	72	28.4000	0.4733	
Total	83	45.2800		

CV = 191.11 y  $R^2 = 0.37$ ; A: Tratamientos; B: Tiempo de evaluación

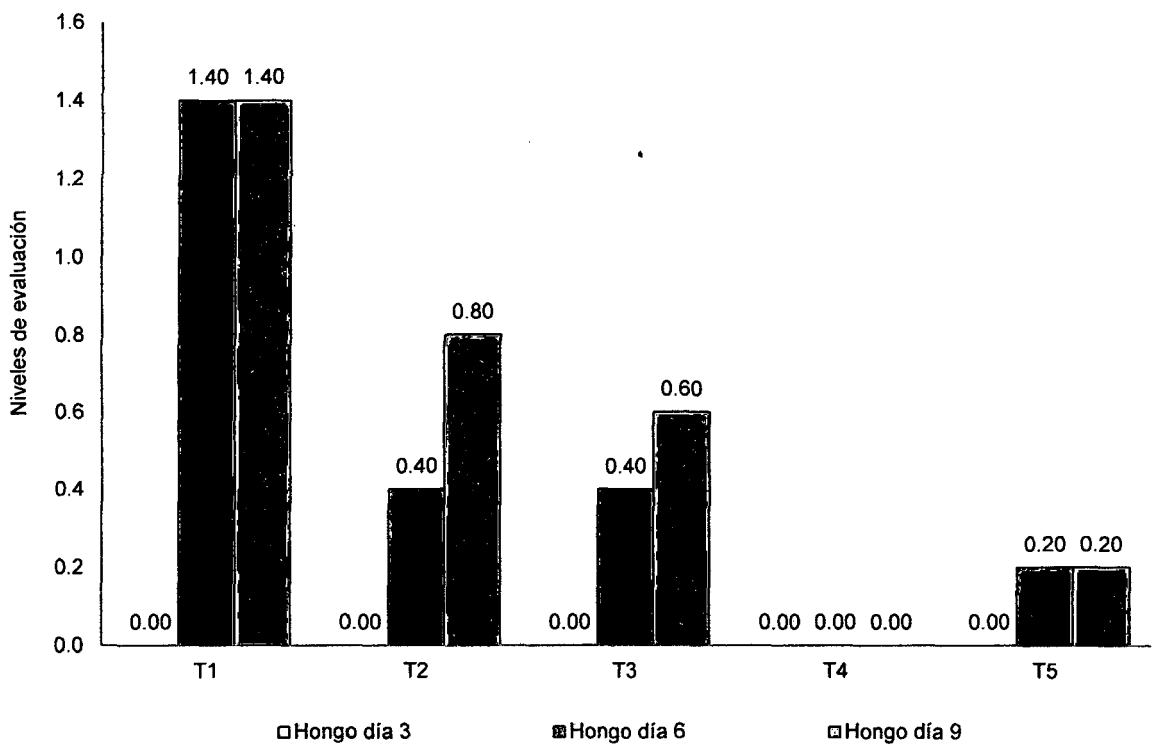


Figura 17. Cuarto ensayo de hongos en desinfección con benomilo

#### 4.5. Pruebas combinadas para la elección del mejor tratamiento de desinfección

Cuadro 21. Descripción estadística del mejor tratamiento de desinfección

Tratamiento	Descripción estadística	día 3		día 6		día 9		día 12	
		Bacteria	Hongo	Bacteria	Hongo	Bacteria	Hongo	Bacteria	Hongo
T1	PROMEDIO	0.00	0.20	0.60	1.00	2.00	2.60	2.20	2.00
	SD	0.00	0.32	0.48	0.00	0.00	0.48	0.32	0.00
T2	PROMEDIO	0.00	0.00	0.40	0.80	1.20	1.60	1.60	1.60
	SD	0.00	0.00	0.48	0.32	0.96	0.64	0.88	0.64
T3	PROMEDIO	0.00	0.80	0.80	1.40	0.50	2.20	1.20	2.60
	SD	0.00	0.32	0.96	0.72	0.75	0.96	0.96	0.64
T4	PROMEDIO	0.20	0.40	0.40	0.80	1.00	1.60	1.20	2.00
	SD	0.32	0.48	0.64	0.96	0.80	0.88	1.04	0.80
T5	PROMEDIO	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20	0.00
	SD	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.32	0.00
T6	PROMEDIO	0.40	0.20	0.60	0.00	0.80	0.00	1.00	0.60
	SD	0.48	0.32	0.48	0.00	0.32	0.00	0.00	0.72
T7	PROMEDIO	0.60	0.00	0.20	0.00	0.60	0.00	0.80	0.40
	SD	0.48	0.00	0.32	0.00	0.48	0.00	0.64	0.48

T1: Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM sin antibióticos); T2: Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 550 g/L); T3: Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + estreptomina 750 g/L); T4: Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 550 g/L + estreptomina 750 g/L); T5: Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 550 g/L + benomilo 1g/L); T6: Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + estreptomina 750 g/L + benomilo 1g/L); T7: Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 550 g/L + estreptomina 750 g/L + benomilo 1g/L); SD: Desviación estándar

El tratamiento T5 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 550 g/L + benomilo 1g/L), ha tenido menor infestación por bacterias,

teniendo un coeficiente de variación de 160.00 %, seguido por el tratamiento T7 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 550 g/L + estreptomicina 750 g/L + benomilo 1g/L), con un coeficiente de variación estadística de 80.00 %, pero el que tuvo mayor infestación por bacterias fue el tratamiento T1 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + WPM sin antibióticos), con un coeficiente de variación estadística de 14.54 % (Cuadro 21 y Figura 18).

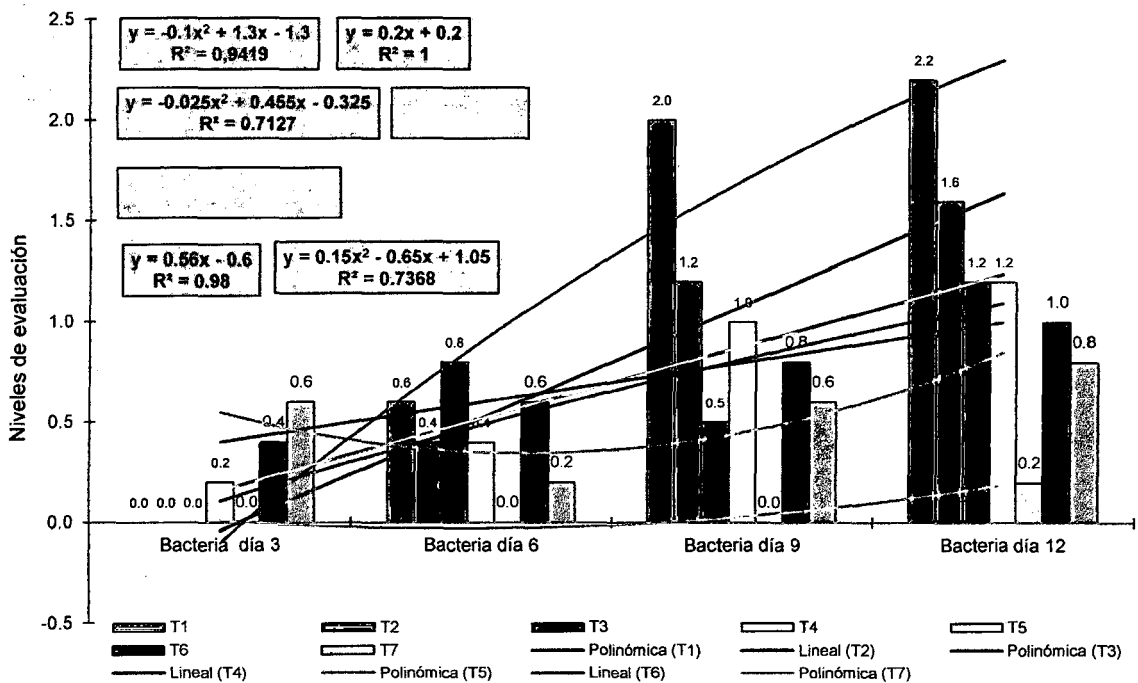


Figura 18. Comportamiento de las bacterias ante pruebas combinadas para la elección del mejor tratamiento de desinfección

El tratamiento T5 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 550 g/L + benomilo 1g/L) describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 0.050x^2 - 0.190x + 0.150$ , con un coeficiente de determinación de 0.93 (Figura 18). Una de las posibles explicaciones es que la ceftriaxona 550 g/L, tiene el anillo betalactámico que es parte de la estructura de

las cefalosporinas (MENSA *et al.*, 2008), por lo tanto, la ceftriaxona es un antibiótico betalactámico, inhibiendo la síntesis de la pared celular de las bacterias (LENNTECH, 2010); y el benomilo 1g/L como es un fungicida, su principal metabolito, carbendazim, se unen a los microtúbulos (estructura importante de todas las células), por eso interfieren en algunas funciones celulares (RAP-AL, 1994), como la división de las células y los mecanismos de transporte intracelulares, interviniendo en el crecimiento bacteriano. Mientras que los demás tratamiento tuvieron mayor contaminación por bacterias. El tratamiento T1 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + WPM sin antibióticos), describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = -0.100x^2 + 1.300x - 1.300$ , con un coeficiente de determinación de 0.94, la cual presento mayor contaminación debido a que en este medio no hubo antibióticos.

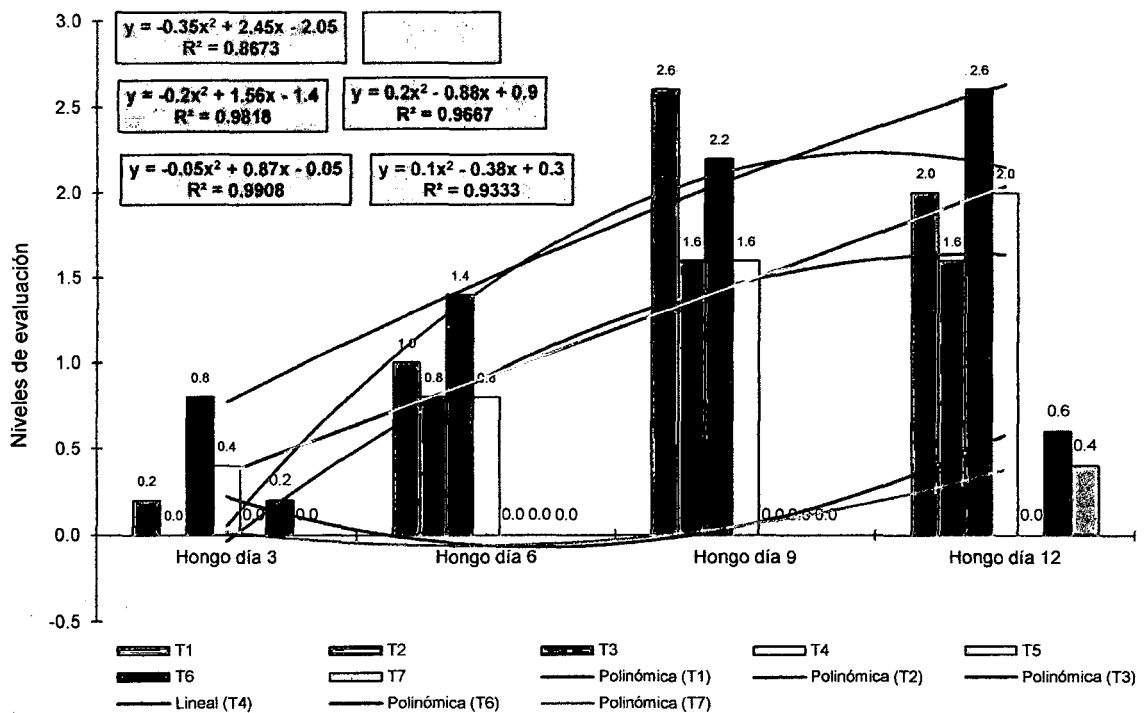


Figura 19. Comportamiento de los hongos ante pruebas combinadas para la elección del mejor tratamiento de desinfección

El tratamiento T5 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 550 g/L + benomilo 1g/L), ha tenido menor infestación por hongos, teniendo un coeficiente de variación de 1.00 %, seguido por el tratamiento T7 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + WPM + ceftriaxona 550 g/L + estreptomicina 750 g/L + benomilo 1g/L), con un coeficiente de variación estadística de 120.00 %, pero el que tuvo mayor infestación por hongos fue el tratamiento T3 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + WPM + estreptomicina 750 g/L), con un coeficiente de variación estadística de 24.61 % (Cuadro 21 y Figura 19).

El tratamiento T5 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 550 g/L + benomilo 1g/L) describe una ecuación lineal, de la forma  $y = 0.00$ , con un coeficiente de determinación de 1.00 (Figura 19). Una de las posibles explicaciones es que como la ceftriaxona 550 g/L tiene el anillo betalactámico como parte de su estructura, entonces, la ceftriaxona actúa como un antibiótico betalactámico (KATZUNG, 2007); de modo que la acción de este antibiótico es la inhibición de la síntesis de la pared celular de las bacterias y hongos (RAMIREZ, 2000); y el benomilo 1g/L es que la toxicidad selectiva actúa como fungicida, que posiblemente se debió al aumento de su efecto en los hongos (RAP-AL, 1994), la cual inhibió el crecimiento del fungi en el medio; de modo que la acción de este antibiótico es la inhibición de la síntesis de los hongos. El tratamiento T3 (inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + estreptomicina 750 mg/L), describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = -0.050x^2 + 0.870x - 0.05$ , con un coeficiente de determinación de 0.990, la cual presento mayor contaminación.

El modelo es altamente significativo estadísticamente (nivel de confianza de 95 %), lo cual el diseño experimental del factor A (tratamientos) también muestra una alta significancia, asimismo el factor B (periodo de evaluación) también muestra un comportamiento altamente significativo (Cuadro 22 y Figura 20). Pero la interacción del factor AxB muestra una baja significancia estadística.

Cuadro 22. Pruebas combinadas de bacterias para la elección del mejor tratamiento de desinfección

ANVA	GL	SC	CM	Pr > F
Modelo	27	48.5079	1.7965	0.0001
A	6	13.9868	2.3311	0.0001
B	3	21.0531	7.0177	0.0001
A*B	18	13.4679	0.7482	0.0618
Error	111	50.6000	0.4555	
Total	138	99.1079		

CV = 102.01 y  $R^2 = 0.48$ ; A: Tratamientos; B: Tiempo de evaluación

En el tratamiento T1 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + alcohol 70%/1` + lejía 1% y tween 20 0.1%/10`, con medio de cultivo WPM: Sales Minerales del Medio Lloyd y Mc Cown, sin antibióticos), hubo mayor crecimiento bacteriano (promedio 2.20), mientras que el tratamiento T5 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + alcohol 70%/1` + lejía 1% y tween 20 0.1%/10`, con medio de cultivo WPM: Sales Minerales del Medio Lloyd y Mc Cown, ceftriaxona 550 g/L + benomilo 1g/L), ha tenido menor crecimiento bacteriano con un promedio de los



niveles de contaminación de 0.20. Los dos elementos tanto la ceftriaxona como el benomilo son antibióticos que inhiben el crecimiento bacteriano, son los que han dado mejores resultados para el control de la contaminación por estos microorganismos (OTAROLA, 2001).

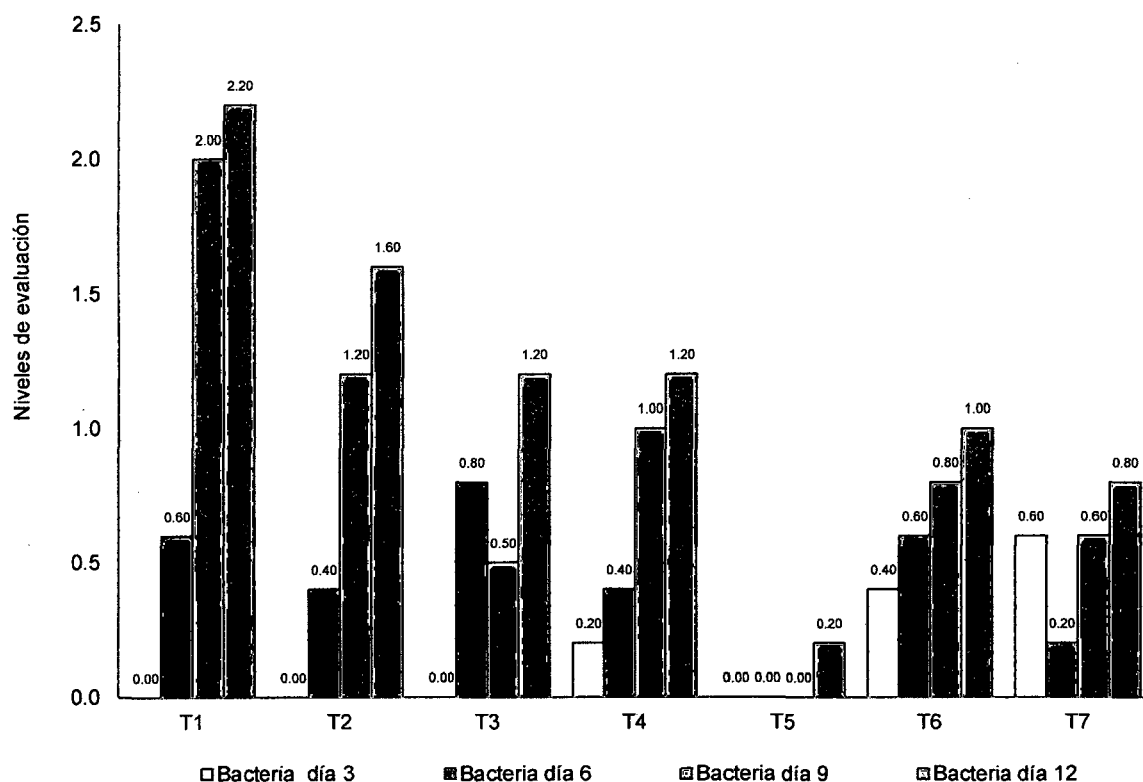


Figura 20. Pruebas combinadas de bacterias para la elección del mejor tratamiento de desinfección

Para los tratamientos (factor A: son los 7 tratamientos o combinaciones de los antibióticos) y para el periodo de evaluación (factor B: 4 evaluaciones cada 3 días) (Cuadro 23 y Figura 21), son altamente significativos estadísticamente (a niveles de confianza del 95 %), por lo cual la interacción del factor AxB también son altamente significativos estadísticamente.

Cuadro 23. Pruebas combinadas de hongos para la elección del mejor tratamiento de desinfección

ANVA	GL	SC	CM	Pr > F
Modelo	27	105.5714	3.9101	0.0001
A	6	60.2714	10.0452	0.0001
B	3	26.6000	8.8667	0.0001
A*B	18	18.7000	1.0389	0.0015
Error	112	45.6000	0.4071	
Total	139	151.1714		

CV = 78.36 y  $R^2 = 0.69$ ; A: Tratamientos; B: Tiempo de evaluación

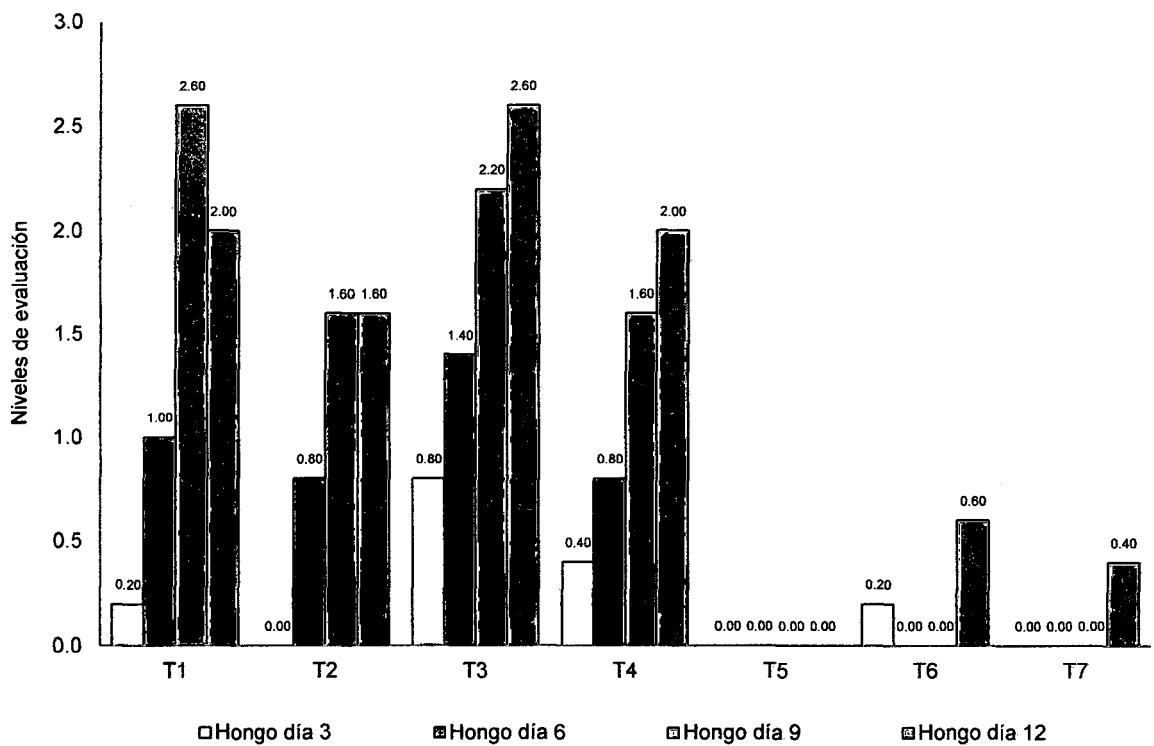


Figura 21. Pruebas combinadas de hongos para la elección del mejor tratamiento de desinfección

El tratamiento T5 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + alcohol 70%/1` + lejía 1% y tween20 0.1%/10`, con medio de cultivo WPM: Sales Minerales del Medio Lloyd y Mc Cown + ceftriaxona 550 g/L + benomilo 1g/L) ha causado la inhibición completa de los hongos, en comparación de los demás tratamientos de este ensayo, pero el tratamiento T3 (inmersión benomilo 2g/L x 24h + alcohol 70%/1` + lejía 1% y tween20 0.1%/10`, con medio de cultivo WPM: Sales Minerales del Medio Lloyd y Mc Cown + estreptomina 750 g/L), es la que tuvo más contaminación por la infestación de hongos.

SUÁREZ *et al.* (2006) indican que utilizaron brotes axilares, del roble (*Tabebuia rosea*) con el fin de producir masivamente clones de ésta especie. Para determinar el mejor tratamiento de desinfección superficial, el electo de cuatro concentraciones (1%, 2%, 3% y 4%) de hipoclorito de sodio con cuatro tiempos (5, 10, 15 y 20 minutos) de exposición de los explantes consistentes de brotes axilares de 2-3 cm de longitud fueron evaluadas después de establecidos en medio  $\frac{1}{2}$  MS, Murashige y Skoog (1962), el Hipoclorito de sodio al 4% durante 10 minutos fue el mejor tratamiento de esterilización superficial.

## V. CONCLUSIONES

- En el primer ensayo el tratamiento óptimo de desinfección para bacterias es benomilo 2g/L + lejía 0,2% x 24h y para los hongos es benomilo 2g/L x 24h, para las yemas axilares de la especie forestal *Cedrelinga catenaeformis* Ducke.
- En el segundo ensayo el tratamiento óptimo de desinfección para bacterias es 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 550 mg/L) y para hongos benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 250 mg/L) para las yemas axilares de la especie forestal *Cedrelinga catenaeformis* Ducke.
- Los resultados del tercer ensayo el tratamiento óptimo tanto para bacterias y hongos es benomilo 2g/L x 24h (WPM + estreptomycinina 750 mg/L) para la desinfección de yemas axilares de la especie forestal *Cedrelinga catenaeformis* Ducke.
- Se eligió como mejor tratamiento de desinfección de yemas axilares de la especie forestal *Cedrelinga catenaeformis* Ducke, contra bacterias y hongos la Inmersión en benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 550 g/L + benomilo 1g/L)

## VI. RECOMENDACIONES

- Para el mejor tratamiento de desinfección para las bacterias y los hongos usar la Inmersión benomilo 2g/L x 24h (WPM + ceftriaxona 550 g/L + benomilo 1g/L) para las yemas axilares de la especie forestal tornillo (*Cedrelinga catenaeformis* Ducke).
- Ensayar tratamientos de inmersión en fungicidas y desinfectantes en yemas axilares de la familia de las MIMOSACEAE.
- Realizar estudios de la acción del Benomilo en el control de la contaminación del medio de cultivo para especies forestales; considerando las concentraciones en menor rango.
- Analizar la acción del ceftriaxona y estreptomycinina en el control de la contaminación el medio de cultivo de las especies forestales de medio y alto valor comercial.

## VII. ABSTRACT

In the present research were used, test fungicide dip treatments (benomyl), disinfectants (alcohol, bleach), ceftriaxone and streptomycin in plant samples, for in vitro micropropagation of *Cedrelinga catenaeformis* Ducke.

To determine methods of disinfection for axillary buds had the following methodology: collection of samples *Cedrelinga catenaeformis* "tornillo" of the samples, sterilization of laboratory equipment, preparation of culture medium under study disinfection treatment, disinfection of explants, the explant seed, and the realization of experimental design.

The results obtained from tests for choosing the best treatment for disinfection for bacteria and fungi is the Immersion benomyl 2g / L x 24 (WPM + ceftriaxone 550 g/L + Benomyl 1g/L) for the axillary buds of the species forest *Cedrelinga catenaeformis* Ducke.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARÓSTEGI, V. 1992. Propagación de Especies Forestales Nativas Promisorias en Jenaro Herrera. Iquitos, Perú. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana. 119p.
- BONGA, J. 1985. Plants propagation through tissue culture. Plant cell cultures: results and perspectives. Amsterdam, Holanda. 264p.
- DELGADO, G.; ROJAS, I. 1999. Cultivos de vegetales I: Aplicaciones y procedimientos, Universidad Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú. 184 p.
- DOMINGUEZ, T. 1986. Cultivos de tejidos de árboles de importancia forestal. Instituto Superior de Ciencias Naturales ISCN. Colombia. 12 p.
- ESCALANTE, Z. 1984. Cultivos de meristemos para la producción de plantas madres de papa (*Solanum tuberosum*). Tesis. Ing. Agrónomo. Cajamarca, Perú. Universidad Nacional de Cajamarca. 70 p.
- ESTOPA, M. 2005. El cultivo in vitro en la reproducción vegetativa de plantas de vivero. Revista Viveros. 50-56.
- GEORGE, E.; HALL, M.; DE KLERK, G. 2008. Plant Propagation. Springer. Vol 1. 3<sup>rd</sup> Edition. 105p.
- GONZALES, O. 1989. Contribution de amelioration genetique de *Eucaliptus globulus*. Instituto Nacional de Recursos Naturales (INRENA). 1996. Guía explicativa del mapa forestal 1995. INR-49-DGF. Lima, Perú.

- KATZUNG, B. G. 2007. Antimycobacterial Drugs. *Basic & Clinical Pharmacology*. 9<sup>na</sup> edición. Editorial McGraw-Hill. ISBN 0071451536.
- LENNTECH. 2010. Water treatment solutions. [En línea]: Lenntech (<http://www.lenntech.com/processes/disinfection/chemical/disinfectants-sodium-hypochlorite.htm>, 12 de Febr. del 2012)
- MENSA, J., GATELL, J. y AZANZA, J. R. 2008. Guía de terapéutica antimicrobiana. Elsevier Doyma. ISBN 978-84-458-1813-8.
- MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann Rev. Plant Physiol* . 25 p. 135-166.
- NAVARRO, G. 2001. Micropropagación de *Cedrelinga cateniformis* (Ducke) Ducke "tornillo" a partir de Yemas. Tesis para optar el grado de Ingeniero de Recursos Naturales Naturales. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María. Perú. 57 p.
- OTÁROLA, E.; FREITAS, L.; LINARES, C.; BALAUARTE, J. 2001. Estimación de la calidad de sitio mediante "índices de sitio" para *Cedrelinga cateniformis* Ducke "tornillo" en plantaciones de Jeraro Herrera, Loreto, Perú. *Folia Amazónica*. Vol 12 (1-2); 39-51.
- PIERIK, R. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ed. Mundi – Prensa. Madrid, España. 326 p.
- PIMENTEL, F. 1997. Estadística Experimental. 12<sup>ava</sup> edic. Edit Livraria Novel. Univ. Sao Paulo. Paracicaba, Estado de Sao Paulo-Brasil.
- PREHN D., SERRANO C., BERRIOS G, JOHNSON P. 2003. Micropropagación de Quillaja saponaria Mol. a partir de semillas. Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Chile. Vol. 24 N° 2, 3-12.



- RAMIREZ, R. 2000. Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guajava* L. Venezuela 17: 217-225.
- RED DE ACCIÓN EN PLAGUICIDAS Y SUS ALTERNATIVAS PARA AMÉRICA LATINA (RAP-AL). 1994. Benomyl, Exttoxnet, Pesticide Management Education Program, Cornell University, NY.
- ROCA, W. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Colombia. 970 p.
- SERRANO, M.; PINOL, T. 1991. Biotecnología vegetal. Ed. Síntesis S.A. España p. 50-70.
- SUÁREZ, I.; JARMA, A.; AVILA M. 2006. Desarrollo de un protocolo para propagación *in vitro* de roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). Temas Agrarios, Montería, Colombia. Vol. 11:(2): 52-62.
- VARGAS, J. 2007. Desinfección de Yemas para la Micropropagación de Sangre de Grado (*Croton lechleri*) Tesis para optar el grado de Ingeniero de Recursos Naturales Naturales. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María. Perú. 77 p.

## **IX. ANEXOS**

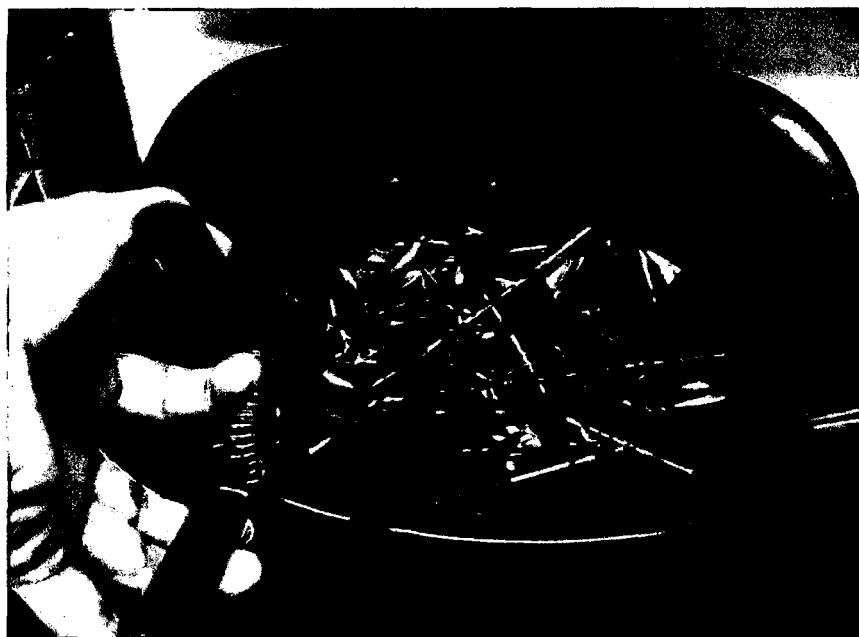
**Anexo 1. Panel fotográfico**

Figura 22. Explantes fragmentados de tornillo (*Cedrelinga catenaeformis*)



Figura 23. Diversos ensayos en la sala de incubación del laboratorio



Figura 24. Ensayo de tornillo (*Cedrelinga catenaeformis*) *in vitro* en condiciones no óptimas

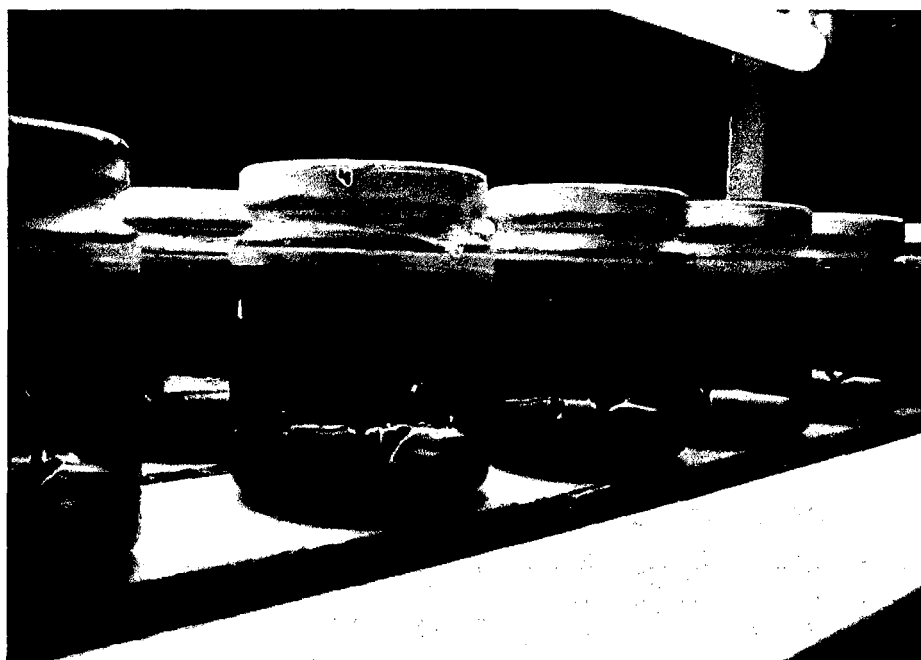


Figura 25. Ensayos con tornillo en condiciones óptimas para su crecimiento