

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS DE LOS RECURSOS
NATURALES RENOVABLES**



**“MICROPROPAGACIÓN DE *Cedrelinga cateniformis* (Ducke)
Ducke “tornillo” A PARTIR DE YEMAS”**

TESIS

Para optar el Título de:

Ingeniero en Recursos Naturales Renovables

Mención Forestales

ROLANDO NAVARRO GOMEZ

PROMOCIÓN 2000 – I

“ Unasinos Hacia el Desarrollo de un Nuevo Ecomilenio ”

Tingo María – Perú

2001



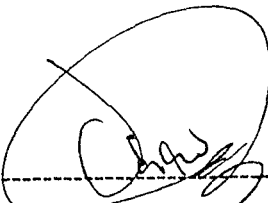
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

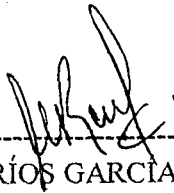
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

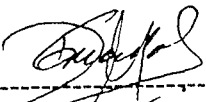
BACHILLER : Rolando Navarro Gómez
TITULO DE LA TESIS :
"MICROPROPAGACIÓN DE *Cedrelinga cateniformis*
(Ducke) Ducke "tornillo" A PARTIR DE YEMAS"
JURADO CALIFICADOR
• Presidente : CASIANO AGUIRRE ESCALANTE, Ing. M. Sc.
• Vocal : WARREN RÍOS GARCÍA, Ing.
• Vocal : DAVID GUARDA SOTELO, Ing. M. Sc.
• Patrocinador : CESAR S. LÓPEZ LÓPEZ, Mtblgo. M. Sc.
• Co Patrocinador : LOURDES TAPIA Y FIGUEROA, Ing. M. Sc.
FECHA DE SUSTENTACIÓN : 05 de abril de 2,001
HORA DE SUSTENTACIÓN : 11:00 p.m.
CALIFICATIVO : BUENO
RESULTADO : APROBADO
OBSERVACIONES :

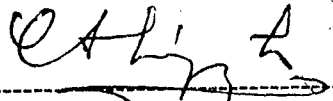
Tingo María, 10 de abril 2,001.


CASIANO AGUIRRE ESCALANTE, Ing. M. Sc.
Presidente




WARREN RÍOS GARCÍA, Ing.
Vocal


DAVID GUARDA SOTELO, Ing. M. Sc.
Vocal


CESAR S. LÓPEZ LÓPEZ, Mtblgo. M. Sc.
Patrocinador

DEDICATORIA

A nuestro Divino Redentor...

DIOS MIO...

Te doy gracias por iluminar mi camino y
vencer todos los obstáculos y permitir el
logro de mi mayor anhelo.

A mis Padres:

NILO PACO y BETTY, cuyos
invalorables e indiscutibles consejos a
través de los días refuerzan el sentido
del camino a seguir; a ellos con
respeto, afecto y gratitud, por la
confianza y sacrificio desplegados para
poder ver forjado en mí sus más
ambicionados sueños.

A mis estimados tíos :

ALEJANDRO, DOLLY, ANITA,
RICHAR, con el cariño y respeto de
siempre, por su incuestionable apoyo
moral para la culminación de mi carrera.

A mis queridos hermanos:

GONZALO, FRANCO, y NIEL, que
prosigan con el paradigma evidente
hasta alcanzar su propia superación y
no se desalienten en la continua lucha
por lograr un mejor porvenir.

A mi pequeño hijo:

NILO CESAR, con mucho amor, en
quien tengo cifradas mis esperanzas y
que con propio esfuerzo logre realizarse
como persona de éxito.

MI AGRADECIMIENTO

- A la UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA, por darme la oportunidad de plasmarme profesionalmente.
- A los docentes de la Facultad de Recursos Naturales Renovables por sus singulares enseñanzas que forjaron en mí el espíritu de la carrera que aflora a través del transcurso del tiempo.
- Al Mtblgo. M.Sc. César Samuel López López, amigo y patrocinador de la presente tesis; por su incondicional, inquebrantable e inagotable apoyo en la dirección de la misma.
- Al Ing. M.Sc. Lourdes Tapia y Figueroa, copatrocinador, por su valioso y desinteresado apoyo en la realización del presente trabajo.
- A los integrantes de la XV Promoción “Conservacionistas para el tercer milenio” de la Facultad de Recursos Naturales Renovables, quienes fueron compañeros y amigos que compartieron experiencias vividas en las aulas, haciendo mas placentera mi vida universitaria.
- A mis amigos Jorge Rengifo; Waldir Rodríguez, Blgo. José Guerra, Vicente Huamán, Migdonio Guzmán, Alejandro Buleje, Pohl Javier, Enoc Babilonia, por haberme brindado soporte moral y material para poder concluir satisfactoriamente mi formación profesional académica .
- A todas aquellas personas que de una u otra manera me manifestaron constante apoyo.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	9
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	11
	A. Generalidades de <i>Cedrelinga cateniformis</i> (Ducke) Ducke "tornillo" ...	11
	1. Posición taxonómica	11
	2. Conservación	11
	B. Aspectos generales sobre cultivo de tejidos.....	12
	C. El cultivo de meristemas.....	14
	1. Desarrollo histórico.....	14
	2. Organización del meristema apical	15
	3. Factores que influyen en el cultivo de meristemas.....	15
	4. Fundamentos del cultivo de meristemas.....	17
	5. Regeneración de plantas sanas en cultivo de callos.....	18
	D. Aspectos generales sobre el cultivo "in vitro" de leñosas	18
	E. Importancia del cultivo "in vitro"	23
	F. Cultivo in vitro de <i>Cedrelinga cateniformis</i> (Ducke) Ducke "tornillo"	24
III.	MATERIALES Y METODOS	25
	A. Ubicación y Muestras en Estudio.	25
	B. Materiales y Equipo.....	25
	1. Material vegetal.....	25
	2. Equipos.....	26
	3. Medios de Cultivo.....	26
	4. Material de Vidrio.....	27

5. Materiales de desinfección.....	27
6. Material de loza.....	27
7. Reactivos.....	28
8. Desinfectantes.....	28
9. Otros.....	28
C. Metodología.....	29
1. Preparación de explante (Yemas).....	29
2. Preparación de medio.....	29
3. Excisión del explante.....	29
4. Siembra del explante.....	30
5. Diseño del estudio.....	30
IV. RESULTADOS.....	33
V. DISCUSION.....	46
VI. CONCLUSIONES.....	49
VII. RECOMENDACIONES.....	50
VIII. RESUMEN.....	51
IX. BIBLIOGRAFIA.....	52
X. ANEXO.....	58

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1.	Análisis de varianza del crecimiento diametral de callos a los 15 días Fase I.....	33
CUADRO 2.	Análisis de varianza del crecimiento diametral de callos a los 30 días Fase I.....	35
CUADRO 3.	Análisis de varianza del crecimiento diametral de callos a los 60 días Fase I.....	37
CUADRO 4.	Análisis de varianza del crecimiento diametral de callos a los 15 días Fase II.	39
CUADRO 5.	Análisis de varianza del crecimiento diametral de callos a los 30 días Fase II	41
CUADRO 6.	Análisis de varianza del crecimiento diametral de callos a los 60 días Fase II.	43
CUADRO 7.	Evaluación a los 15 días Fase I.	64
CUADRO 8.	Evaluaciones a los 30 días Fase I.	64
CUADRO 9.	Evaluaciones a los 60 días Fase I.	65
CUADRO 10.	Evaluaciones a los 15 días Fase II.....	65
CUADRO 11.	Evaluaciones a los 30 días Fase II.....	66
CUADRO 12.	Evaluaciones a los 60 días Fase II.....	66

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Promedio de Crecimiento Diametral de la Proliferación de Callos a los 15 días de cultivo en la Fase I.....	34
FIGURA 2.	Promedio de Crecimiento Diametral de la Proliferación de Callos a los 30 días de cultivo en la Fase I.....	36
FIGURA 3.	Promedio de Crecimiento Diametral de la Proliferación de Callos a los 60 días de cultivo en la Fase I.....	38
FIGURA 4.	Promedio de Crecimiento Diametral de la Proliferación de Callos a los 15 días de cultivo en la Fase II.....	40
FIGURA 5.	Promedio de Crecimiento Diametral de la Proliferación de Callos a los 30 días de cultivo en la Fase II.....	42
FIGURA 6.	Proliferación de callo a los 15 días de la Fase I.....	60
FIGURA 7.	Proliferación de callo a los 15 días de la Fase I.....	60
FIGURA 8.	Proliferación de callo a los 30 días de la Fase I.....	61
FIGURA 9.	Proliferación de callo a los 60 días de la Fase I.....	61
FIGURA 10.	Proliferación de callo a los 15 días de la Fase II.....	62
FIGURA 11.	Proliferación de callo a los 30 días de la Fase II.....	62
FIGURA 12.	Proliferación de callo a los 60 días de la Fase II.....	63
FIGURA 13.	Diferenciación del callo, luego del termino de la presente investigación.....	63

I. INTRODUCCIÓN

En las zonas aledañas a la ciudad de Tingo María se han hecho numerosos intentos por reforestar suelos degradados, pero se conoce que el número de plantones forestales utilizados con este propósito a gran escala no cubre los requerimientos cuantitativos, son presa fáciles de enfermedades o de las inclemencias ambientales, una vez instalados en campo.

Este problema podría ser solucionado paulatinamente con la aplicación de métodos biotecnológicos, especialmente del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, el cual se fundamenta en la totipotencia de las células vegetales, sustentando que cada célula es una unidad independiente con la información genética necesaria para formar una nueva planta.

Esta moderna tecnología presenta ventajas, para la producción a gran escala de plántulas, sobre los actuales métodos tradicionales, además permitirá que estos individuos así producidos, sean resistentes a las enfermedades, plagas e incluso a condiciones adversas del medio ambiente. Es necesario indicar que las modernas técnicas biotecnológicas de cultivo ofrecen una alternativa para la preservación de germoplasma de diferentes especies forestales.

Cedrelinga cateniformis (Ducke) Ducke "tornillo" es una especie forestal que pierde muy rápidamente su viabilidad por tener semilla recalcitrante, y por lo general su propagación tiene a menudo, entre otros problemas la disponibilidad de semillas, el corto periodo y/o bajo poder germinativo, mala respuesta a técnicas de propagación por estacas; problemas que se agravan, al tratarse de

una especie que se encuentra en vías de extinción por la alta incidencia de explotación a la que es sometida por su gran valor comercial.

El presente trabajo se centró bajo el objetivo de determinar el medio de cultivo óptimo respecto a la concentración de reguladores de crecimiento (Citoquinina – Auxinas, Inositol – Agua de coco) y la obtención de callos diferenciados o plántulas a partir de yemas de *Cedrelinga cateniformis* (Ducke) Ducke “tornillo”, enunciándose como hipótesis la posibilidad de producir plántulas de esta especie a partir de yemas terminales.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. Generalidades de *Cedrelinga cateniformis* (Ducke) Ducke “tornillo”

1. Posición taxonómica

División	:	MAGNOLIOPHYTA
Clase	:	MAGNOLIOPSIDA (Dicotiledóneas)
Sub - clase	:	Rosidae
Orden	:	Fabales
Familia	:	Minosaceae
Especie	:	<i>Cedrelinga cateniformis</i> (Ducke) Ducke (Cronquist citado por Jones ,1987)

2. Conservación

Los estudios de conservación de las semillas realizadas por el proyecto INIAA – JICA (1991), determinaron que las semillas de *Cedrelinga cateniformis* (Ducke) Ducke “tornillo” a prueba durante un periodo de 120 días a 25° C, dejaron de germinar después de 20 días, a 5° C, dejaron de germinar después de 40 días y a temperatura ambiente después de 60 días.

Después de los 80 días de almacenamiento, no hubo germinación a ninguna temperatura; las semillas de esta especie tienen una vida muy corta cuando ya están invadidas por hongos al tiempo de la recolección, por lo tanto se pudren en el almacenamiento.

B. Aspectos generales sobre cultivo de tejidos

Winton (Vargas, 1982), define que el cultivo aséptico de células, tejidos y órganos vegetales intactos en condiciones de laboratorio, con el fin primordial de inducir la formación de órganos o partes faltantes para completar un individuo normal. La técnica se basa fundamentalmente en el principio de la "totipotencia", que establece que cualquier célula somática joven o en proceso de diferenciación tiene una alta capacidad de potencialidad para regenerar una planta completa si se coloca en condiciones adecuadas.

Los primeros intentos de la aplicación de esta técnica en la propagación de especies forestales leñosas datan de 1934 en trabajos realizados por Gautheret con poco éxito (Haissig citado por Vargas, 1982); el mayor impulso en este campo se ha obtenido a partir de los resultados generados en los últimos 10 años (Sommer citado por Vargas, 1982; Bonga, 1986; Wilkins y Dodds, 1985).

Las características principales de la técnica (Bonga, 1986; Pierik, 1990), son las siguientes:

- i. Empleo de explantes o propágulos vegetativos de dimensiones pequeñas. El tamaño promedio de los tejidos proporciones utilizadas es menor de 1cm.; esto permite tener una gran cantidad de propágulos de un mismo individuo.
- ii. 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.

- iii. Medio de cultivo más o menos complejo. Para el buen establecimiento del cultivo de tejido es necesario utilizar un medio de cultivo nutritivo compuesto por una mezcla de macronutrientes y micronutrientes, vitaminas, reguladores de crecimiento, fuentes de energía, azúcar y substrato de soporte (agar).
- iv. Control riguroso de las condiciones ambientales de cultivo; hacer el control más estricto de los factores ambientales que influyen sobre el potencial morfogénico, (luz, fotoperiodo; temperatura y termoperiodo) permite que este se manifieste en menor grado.

Asimismo menciona que 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.

Roca (1982) manifiesta, que en los años 60, el desarrollo de procedimientos para manipular y mantener plantas en cultivo aséptico recibió un gran impulso, gracias al descubrimiento de la capacidad que tienen los brotes y meristemas de orquídea *Cymbidium sp.* cortados apropiadamente y sembrados en cultivos asépticos para producir

protuberancias que asemejan protocormos normales capaces de crecer y desarrollarse en plántulas, este método es bueno para obtener una rápida multiplicación clonal, y es aplicado a una gran variedad de especies, desde las herbáceas hasta las leñosas.

C. El cultivo de meristemas.

1. Desarrollo histórico

Kotte y Robbins (1922), trabajando independientemente, observaron el crecimiento de ápices de raíces en soluciones minerales suplementarias con azúcares, aspargina y peptona. Posteriormente White (1943), cultivo con éxito raíces de tomate infectado con TMV, disectó las mismas en regiones definidas e hizo inoculaciones en plantas hospederas, observando que la concentración de virus en la región terminal fue más baja que en la región basal de la raíz e incluso estableció que no existían evidencias de la presencia del virus en el ápice radicular. Limasset y Cornuet (1949), extrapolar los resultados anteriores al ápice caulinar, observaron, en efecto, que la concentración relativa de virus disminuía acropetalmente hacia el meristema apical. Esto condujo a Morel y Martín (1952), a postular la posibilidad de aislar el meristema apical de una planta infectada de virus y obtener una planta sana y que sea además genéticamente idéntica a esta. La primera confirmación práctica de esta hipótesis fue lograda por estos mismos autores trabajando

en Dalia y Papa. Desde entonces, numerosos investigadores vienen utilizando la técnica en el saneamiento clonal de numerosas especie cultivadas.

2. Organización del meristema apical

El meristema apical del tallo, al igual que de la raíz, el cual es en realidad subapical, constituyen ontogénicamente los tejidos meristemáticos primarios, que en conjunto determinan el crecimiento de longitud de los tallos y raíces. El meristema apical esta conformado por una cúpula diminuta, brillante, de color blanco - cremoso a blanco verdoso, de 0.1 a 0.3 mm de diámetro y 0.25 mm. De altura, que ha sido denominada domo apical; esta región está a su vez acompañada por dos pequeñas estructuras foliares denominadas primordios foliares, protuberancias foliares o esbozos foliares.

3. Factores que influyen en el cultivo de meristemas

Los factores estudiados que influye en el cultivo de meristemas, en la bibliografía se refieren a especies no leñosas, pero por generalidad pueden influenciar en leñosas.

a. Tipo de virus.

En general los viroides y estructuras relacionadas son de mas difícil erradicación que los virus y entre otros, algunos son de mas fácil erradicación.

b. Tamaño del explante.

De manera general, a mayor tamaño del meristema la probabilidad de prendimiento es mayor, pero es menor la probabilidad de erradicación de virus; por el contrario a menor tamaño del meristema la probabilidad de prendimiento es menor, pero es mayor la probabilidad de erradicación.

c. Tipo del explante.

Tanto las yemas apicales o terminales como las yemas axilares o laterales constituyen fuentes de meristemas; sin embargo, algunas observaciones parecen demostrar que los meristemas procedentes de yemas apicales tienen mayor probabilidad de prendimiento que los aislados de yemas laterales. Es posible que por efecto de la dominancia apical ocurra una mayor concentración endógena de auxinas en la yema apical en relación a la yema axilar.

d. pH.

El pH usualmente ajustado en el medio de cultivo es de 5.8 - + 0.1 y es conocido que este puede ser alterado durante el autoclavado y durante el proceso de cultivo, sea por la

absorción de nutrientes por el explante como por la eliminación de sustancias metabólicas.

e. Consistencia del medio de cultivo.

Aun cuando en la mayoría de los casos los meristemas son cultivados en medio de cultivo con agar (0.6 – 0.8 %), existen algunos reportes donde un mejor crecimiento de meristema ha sido alcanzado en medio líquido, con soportes de papel filtro. Pero sin duda que los modernos tipos de agar disponibles, como el phytigel, gelita y la misma agarosa, constituyen mejores substratos, para el cultivo de meristemas, que el agar tradicionalmente utilizado.

4. Fundamentos del cultivo de meristemas

La distribución irregular de los virus en la planta, disminuyendo progresivamente su concentración hacia el meristema apical, es sin duda la primera condición que fundamenta el cultivo de meristemas. La escasa o nula concentración de virus en esta región ha sido explicada con diversas hipótesis :

(i) Una de ellas se refiere a que el meristema apical del tallos es sitio de biosíntesis de auxinas, una hormona inhibidora de la multiplicación viral. El uso del 2,4-D una auxina sintética, como sustancia quimioterapéutica refuerza esta aseveración.

(ii) También se ha hipotizado que la carencia de tejido vascular en el meristema impide la diseminación rápida de los virus entre sus células, y aun cuando los virus podrían desplazarse a través de las conexiones plasmodésmicas, esta se realizaría lentamente.

(iii) Asimismo, como un complemento a esta segunda hipótesis, sea observado que las células meristemáticas se dividen a una mayor velocidad que la multiplicación de las partículas virales, lo que prácticamente le haría inalcanzables por aquellos.

5. Regeneración de plantas sanas en cultivo de callos.

En un callo infectado por virus, posible la ocurrencia de las células sanas de las cuales pueden regenerarse plantas sanas. la observación de Omura y Waquimoto (1978), de que callos desorganizados y friables de tabaco exhibían bajas concentraciones de virus, que en cierta forma ejemplifica lo aseverado, podía explicarse a la luz de la hipótesis de la desorganización celular postulada por Quak (1977).

D. Aspectos generales sobre el cultivo “in vitro” de leñosas

En el transcurso de las dos últimas décadas, manifiesta Vargas (1982), el cultivo de tejidos “in vitro” se ha convertido en una herramienta apropiada en la propagación asexual de infinidad de especies herbáceas de valor económico.

Estos hechos han originado que en la actualidad exista un gran interés

en el cultivo de tejidos como medio complementario o alternativo de propagación de especies forestales leñosas, y en particular de aquellas que tienen problemas en su propagación por los métodos convencionales (Vargas, 1982).

Las técnicas de cultivo de tejidos se encuentran en un estado más temprano de desarrollo que las de propagación tradicional. Por esta razón aún es difícil alcanzar una producción confiable, rutinaria y en la escala apropiada. Los costos de producción son altos y los propágulos todavía se encuentran en el inicio de las evaluaciones de campo (Villalobos *et al.*, 1983).

A pesar de esto, la aplicación de técnicas de cultivo de tejidos de especies leñosas, ofrecen una alternativa valiosa para la propagación de árboles élite, así como un modelo experimental, para estudios fisiológicos (Villalobos, 1984).

Debe tenerse en cuenta que el material de investigación en estos casos proviene del campo de los cultivos, de condiciones ambientales, de nutrición y sanidad no controladas (Castillo, 1992)

Probablemente una de las causas por las cuales hasta la fecha la propagación *in vitro* de especies leñosas no haya tenido aplicación comercial a gran escala es debido a que los porcentajes de enraizamiento son bajos, aún cuando existen especies que enraízan fácilmente. Las mayores dificultades que se presentan en las fases de enraizamiento, sobre todo cuando las plantas provienen de explantes

maduros; lo mismo ocurre para la fase de adaptación primaria de explantes en medios de cultivos debido a la existencia de grandes cantidades de compuestos polifenólicos inhibidores de crecimiento y diferenciación.

Nemeth (1981), publicó el uso de diferentes tipos y concentraciones de auxinas y encontró que si bien existen respuestas diferencial a las mismas, la respuesta depende de la especie y dentro de la especie, además fue evidente que al utilizar concentraciones de 2 a 3 mg/L se estimula el desarrollo de callo y se limita la formación de raíces, por lo que se recomienda utilizar dosis inferiores a 0.5 mg/L. Por otra parte, existe respuesta diferencial al tipo de auxina dando mejores resultados al AIB, sin embargo, en algunos casos como en los cítricos, hay respuesta con ANA.

Zimmerman y Brome (1981), encontraron que el enraizamiento se puede lograr en un medio sólido o líquido. Observaron que los mayores resultados se tienen en un medio líquido.

Villegas y Castillo (1982), utilizaron medio sólido y líquido con soportes de papel; los resultados de este trabajo demostraron que en un medio sólido existe un desarrollo excesivo de callo y 40% de enraizamiento, y al emplear medio líquido con soportes de papel, el porcentaje aumenta al 80% y se reduce el desarrollo de callo.

Muchos autores coinciden en mencionar que al utilizar medio líquido, se incrementa el enraizamiento por encontrarse los elementos más

fácilmente disponibles, además que el agar puede crear una presión de turgencia crítica que provoca una situación de agobio a las células.

Sriskandarajah y Mullins (1981) , indica que debido a que la sacarosa es la fuente de energía en tejidos de cultivo *in vitro*, es esencial para la formación de raíces, así se han empleado diferentes tipos (sorbitol, glucosa, fructuosa) a concentraciones de 10 a 70 g/L encontrándose para el caso de manzano que la mayor respuesta se tiene al utilizar 25% de sorbitol y 75% de sacarosa. Se ha observado también que concentraciones superiores a 20 g/L limitan el enraizamiento.

El rol que cumple la biotecnología y en especial el cultivo *in vitro* es importante en el mejoramiento de los cultivos, pero sólo constituye una herramienta que ayuda a suplir algunos problemas difíciles de superar usando técnicas convencionales (Castillo y Dualle, 1992).

Según Roca (1982) por ejemplo, se puede hacer uso del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales:

- i. Cuando se necesita una alta y rápida tasa de multiplicación vegetativa.
- ii. Cuando se requiere réplicas de material clonal élite.
- iii. Para obtener e intercambiar germoplasma promisorio libre de patógenos e insectos:
- iv. Para la obtención de haploides y diploides homocigotas en corto

tiempo (cultivo de anteras).

- v. Para la obtención de híbridos interespecíficos e intergenéricos (cultivo de embriones).
- vi. Para facilitar la inserción de genes valiosos a genes comerciales (ingeniería genética).
- vii. Para la creación de nuevas variantes (variantes somaclonales) e híbridos e híbridos somáticos (fusión de protoplastos).
- viii. Para facilitar la inducción de mutantes físicos y químicos (mutagénesis *in vitro*).
- ix. Para la producción de semilla artificial (embriogénesis somática).

Todas estas modalidades se pueden resumir en dos tipos de cultivo:

- a) Cultivo para la conservación del estado diferenciado y continuación del desarrollo (cultivo de meristemas, yemas, órganos y embriones).
- b) Cultivo para modificar el estado de diferenciación (cultivo de callos, células en suspensión, anteras y protoplastos).

Rahman *et al*, (1993), manifiesta que en *Caesalpinia pulcherrima* la mejor respuesta de producción de brotes ocurre cuando ANA es utilizado en combinación con BAP o Kinetina y el máximo enraizamiento ocurre en AIA en combinación con BAP o Kinetina. El medio que contiene BAP más ANA produce el máximo número de brotes, mientras que Kinetina

más AIA produce el máximo número de raíces por explante. El porcentaje de enraizamiento es del 65% en 3 semanas, la inducción de raíces con AIA también ha sido reportado en otros árboles leguminosos como *Albizzia lebbbeck*. Un buen número de tallos se obtienen mediante subcultivos recurrentes, con una tasa promedio de multiplicación de 5 veces.

Thorpe (1978), menciona que es común elevar la concentración de citocininas, con lo que se logra un aumento en el número de los brotes debido a que se estimula su desarrollo.

Vieitez y Vieitez (1980), al utilizar BAP en concentraciones de 0.5 – 1.0 mg/L., encontraron que se promueve la formación de brotes axilares (10 a 20), mientras que al emplear zeatina se producen brotes más vigorosos pero en número reducido (2 a 4). A altas concentraciones de BA (10 mg) estimulan la proliferación de brotes, resultando en una excesiva formación de brotes, y concentraciones bajas (0.1 mg) se forman pocos brotes axilares.

E. Importancia del cultivo “in vitro”

El largo periodo de la vida de un árbol en una sola generación dificulta desarrollar programas de mejoramiento genético, ya que sólo se puede realizar selección de genotipos deseables en una población de individuos que estén en producción, especialmente aquellos que pueden ser el resultado de hibridaciones naturales. La micropropagación de especies forestales se pone de manifiesto con las ventajas que ésta

proporciona, entre las que se incluyen las siguientes:

- i. Relativa rapidez de propagación que permite reducir hasta un 75% el tiempo necesario para obtener plántulas mejoradas.
- ii. Obtener millones de ejemplares por propagación clonal a partir de plántulas madres seleccionadas por su constitución genética.
- iii. Eliminación de enfermedades, especialmente virales, por medio de termoterapia, usando antisueros o por el método de “micro – Injertación”, tal como se esta haciendo últimamente con los cítricos.
- iv. Propagar a partir de hibridaciones ajustadas en un programa de mejoramiento que permitiría conservar la información genética y por lo tanto el vigor del híbrido.

F. Cultivo *in vitro* de *Cedrelinga cateniformis* (Ducke) Ducke “tornillo”

Respecto a este acápite solo existe un antecedente de Salinas (1995), quién reporta la formación de callos de explantes de *Cedrelinga cateniformis* (Ducke) Ducke “tornillo”, luego de tratamientos de desinfección química.

III. MATERIALES Y METODOS

A. Ubicación y Muestras en Estudio.

La presente investigación se desarrolló en el Gabinete de Biotecnología de la Facultad de Recursos Naturales Renovables – Universidad Nacional Agraria de la Selva. Provincia de Leoncio Prado, Departamento de Huánuco, Región Andrés Avelino Cáceres, a una altitud de 670 m.s.n.m. con condiciones de temperatura anual de 23^o C, con precipitación anual de 3 200 mm y humedad relativa de 82%.

B. Materiales y Equipo.

1. Material vegetal.

El material vegetal estuvo constituido por plántones de *Cedrelinga cateniformis* (Ducke) Ducke “tornillo”, provinieron del Bosque Reservado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (BRUNAS) Tingo María, con coordenadas geográficas de 09^o 18' 43. 1" latitud sur, y 75^o 59' 24", en buen estado fitosanitario, de 7 – 9 meses de edad.

Para contar con material en forma permanente fue necesario realizar repique de regeneración natural en bolsas de polietileno en el vivero forestal de la Facultad de Recursos Naturales Renovables, continuándose con la selección de los mejores descartando los que presentaban algún daño tisular.

2. Equipos.

- Cámara de flujo laminar
- Cámara de incubación (condiciones controladas; temperatura de 24°C, y fotoperíodo de 16 horas luz / 8 oscuridad)
- Balanza analítica, Baush & Lomb
- Agitador ("shaker")
- Estereoscopio
- Autoclave, Clinical American
- Destilador de agua, L-MON
- Refrigerador, MORAVECO
- Potenciómetro
- Cámara fotográfica

3. Medios de Cultivo.

- Medio básico Murashigue y Skoog (1962) modificado (Sigma Lab.)
- Agar Citogel (Sigma Lab.)
- Sacarosa
- Vitaminas MS

4. Material de Vidrio.

- Frascos ámbar para soluciones de stock
- Pipetas volumétricas de 10 cc, 5 cc y 1 cc.
- Placas petri de 90mm de diámetro (20 x 100mm)
- Probetas de 1000 cc y 50 cc de capacidad
- Matraces de 1000 cc y 100 cc de capacidad
- Vasos de precipitación de 1000 cc y 100cc de capacidad.
- Mechero de alcohol
- Tubos de prueba de 150mm x 15 mm.

5. Materiales de desinfección.

- Hojas Bisturí (hojas de disección)
- Estiletes
- Pinzas
- Mangos de bisturís
- Tijeras

6. Material de loza.

- Fuentes.

7. Reactivos.

- Ácido clorhídrico (q.p., Merck)
- Hidróxido de sodio (q.p. Merck)
- Alcohol 96% (Riedel Lab.)

8. Desinfectantes.

- Alcohol 96% (Riedel Lab.)
- Benlate 2 %
- Detergentes, jabón.
- NaOCl (hipoclorito de sodio)

9. Otros.

- Cinta plástica
- Papel aluminio
- Plumones
- Mandil
- Mascarillas
- Guantes
- Etiquetas

C. Metodología.

1. Preparación de explante (Yemas)

Se obtuvieron yemas ~~axilares~~ y apicales de los plantones de *Cedrelinga cateniformis* (Ducke) Ducke "tornillo" de una edad aproximada de 7 – 9 meses, éstas fueron aisladas convenientemente minutos antes de iniciar el trabajo en el laboratorio y depositadas dentro de placas petri.

2. Preparación de medio

La formulación de los medios está especificada en el Anexo A. La preparación y esterilización de los medios de cultivo se llevó a cabo según la metodología ya conocida (Collins, 1996) para la mezcla de agua destilada, sales minerales, azúcar y agar, en tanto que para aminoácidos, vitaminas, hormonas, antibióticos, se utilizó esterilización por filtración (membranas de millipore de 0,22 μm . de diámetro), el pH se ajustó a 5.8 con potenciómetro. Inmediatamente después de la esterilización se sellaron y se guardaron los medios en refrigeración para su posterior utilización.

3. Excisión del explante.

a. Desinfección del explante

Para este efecto se han considerando los siguientes

procedimientos:

- La realización de la desinfección de la cámara flujo laminar con alcohol 96%, como de las superficies externas de materiales de vidrio y frascos que contenían medios de cultivo, lejía, alcohol y agua por separado, momentos previos a su introducción a la cámara.
- Flameado de los instrumentos de metal previamente al inicio del trabajo.
- Para los tratamientos de desinfección se tomó como referencia el reporte de Salinas, (1995) (Detergente 2' + lejía al 2.5 % durante 5' + benlate al 2% durante 5' + alcohol 96 % 1').

4. Siembra del explante.

Con ayuda de una pinza se tomó el explante y se colocó sobre el medio de cultivo, en cada tubo de ensayo, rotulándose con número específico. Los tubos se incubaron en la cámara de incubación entre 28°C a 30°C.

5. Diseño del estudio

a. Frecuencias

La frecuencia de cultivo fue mensual en función a la cantidad de material. La fase I y II se realizó para la

desinfección y proliferación de brotes. La fase III para obtención de subcultivos para inducción de raíces.

b. Diseño experimental

diseñara
Se diseño tres tratamientos, cada uno con cinco repeticiones por cada fase del trabajo, ajustándose al diseño experimental completamente al azar (DCA), prueba de Tukey con una nivel de 0.05 de significancia. ✓

Los tratamientos fueron los siguientes:

Fase I y II: Con MS completo, pH 5.8

✓ T₁: Sacarosa 3% + ANA (0.05g) + BAP (0.05g) + Agar 0.6%

— T₂: Sacarosa 3% + ^{ANA}Inositol (0.1g) + BAP (0.05g) + Agar 0.8%

— T₃: Sacarosa 3% + ^{ANA 0.5}Inositol (0.05g) + ^{BAP (0.05)}Agua de coco (100 ml) + Agar 0.5%

Fase III : Con MS a la mitad, pH 5.8

T₁: Sacarosa 3% + AIA (0.04g) + Cinetina (0.005g) + Agar 0.6%

T₂: Sacarosa 1.5% + Inositol (0.1g) + IBA (0.003g) + Agar 0.8%

T₃: Sacarosa 2% + BAP (0.001g) + Agar 0.5%

c. Evaluaciones

evaluara
Se ~~procedió a evaluar~~ el desarrollo proliferativo de callos de los explantes dentro del medio, de acuerdo a los tratamientos. Las observaciones de desarrollo se *harán* efectuaron cada tres días después de la siembra durante el primer mes, posteriormente se realizaron cada quince días, *evaluara* tomando datos de los siguientes parámetros:

Formación de callos, evidenciado por la formación de callos del explante por el aumento de tamaño de un estadio menor hacia otro mayor.

- Crecimiento, observado por el aumento de tamaño del callo.
- Mortandad, evidencia observada por la ausencia de crecimiento.

serán
Los datos ~~tomados~~ ~~fueron~~ anotados en una ficha de evaluación para su posterior procesamiento.

IV. RESULTADOS

Respecto a la evaluación de proliferación de callos a los 15 días del cultivo en la Fase I, los resultados del análisis de varianza se anota en el Cuadro 1, mostrándose en el Cuadro 2 la respectiva prueba estadística de Tukey donde se aprecia la diferencia significativa entre tratamientos. Este comportamiento se ilustra en figura 1.

CUADRO 1. Análisis de varianza del crecimiento diametral de callos a los 15 días Fase I.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	SIG.
Tratamiento	2	0.0467	0.0234	10.729	*
Error Experimental	12	0.0261	0.0022		
Total	14	0.0728			

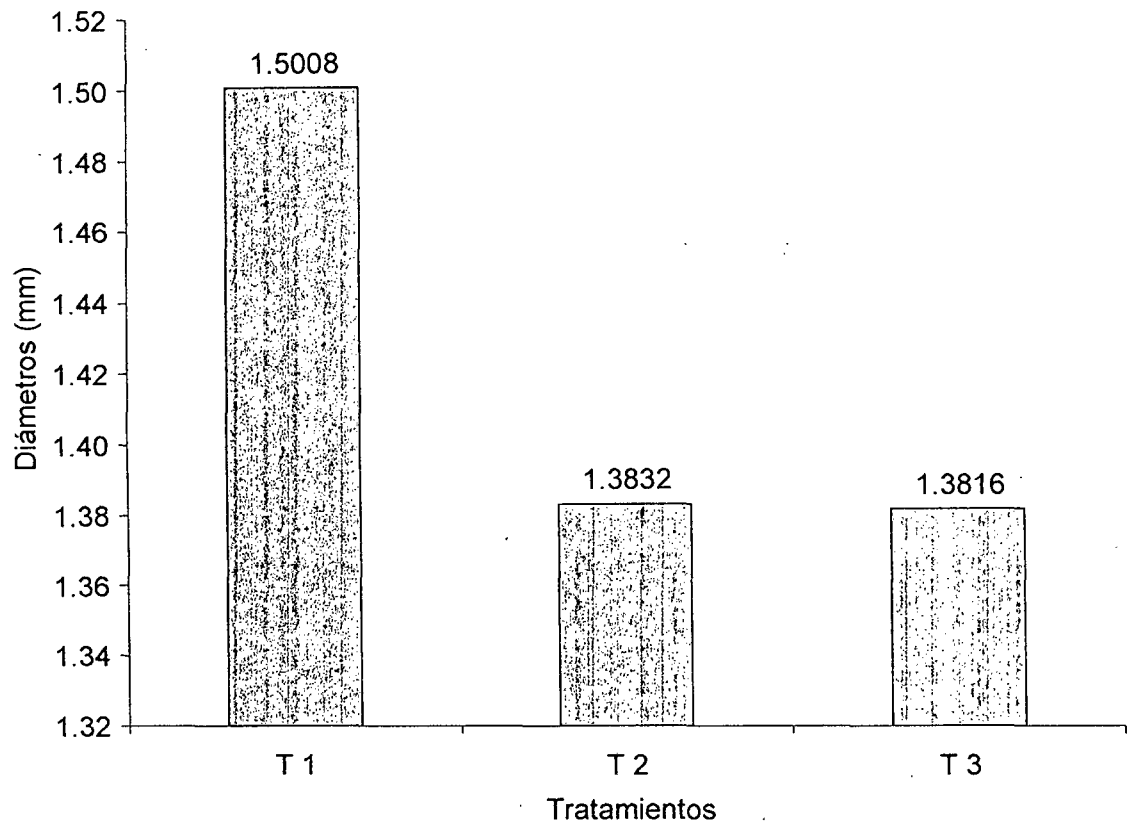
CV= 3. 28%

(*) Significación estadística al 5% de probabilidad

PRUEBA DE TUKEY

T₁: 1.5008 a
T₂: 1.3832 b
T₃: 1.3816 b

De acuerdo al análisis estadístico anterior, se observa que no se ha encontrado diferencias significativas entre los tratamientos T₂ y T₃; sin embargo el tratamiento T₁ supera a los tratamientos T₂ y T₃.



- T₁: Sacarosa 3%+ ANA (0.05g.) + BAP (0.05g .) + Agar 0.6%
 T₂: Sacarosa 3% + Inositol (0.1g.) + BAP (0.05g)+ Agar 0.8%
 T₃: Sacarosa 3% + Inositol (0.05g) + Agua de coco (100 ml) + Agar 0.5%

FIGURA 1. Promedio de Crecimiento Diametral de la Proliferación de Callos a los 15 días de cultivo en la Fase I

Resultado similar se observó en la proliferación de callos a los 30 días del cultivo en la Fase I, cuyo comportamiento se ilustra en la figura 2. En los cuadros 3 y 4, se anota el análisis de varianza y la prueba de Tukey respectivamente, donde se aprecia la diferencia significativa entre tratamientos.

CUADRO 2. Análisis de varianza del crecimiento diametral de callos a los 30 días Fase I.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	SIG.
Tratamiento	2	0.3972	0.0199	11.068	*
Error Experimental	12	0.0215	0.0018		
Total	14	0.0613			

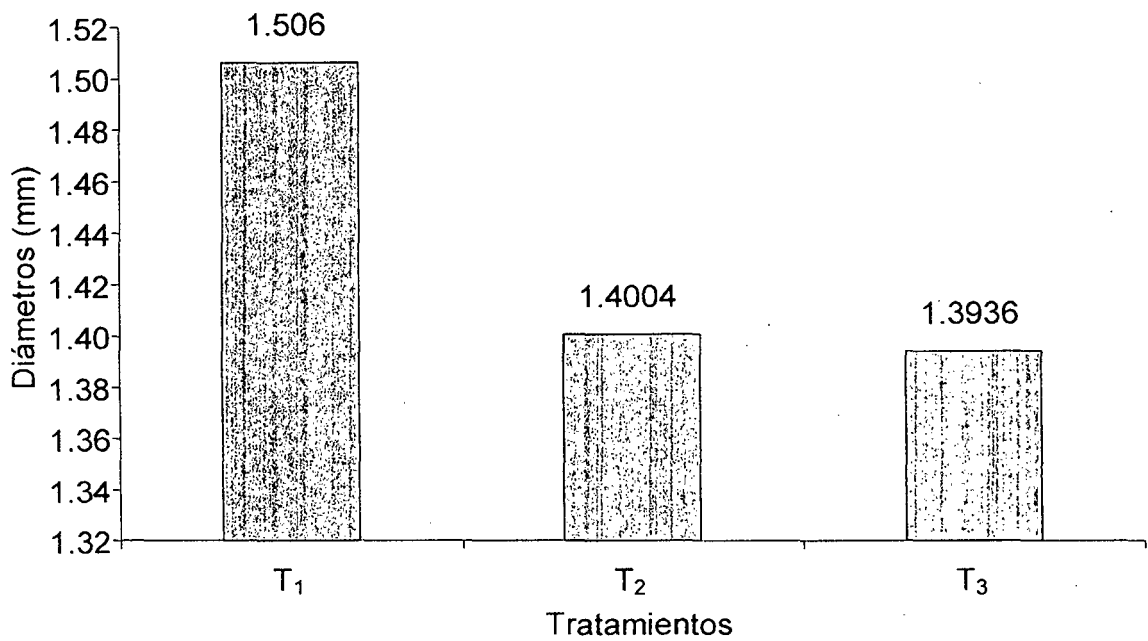
CV = 2.96 %

(*) Significación estadística al 5% de probabilidad

PRUEBA DE TUKEY

T₁: 1.506 a
 T₂: 1.4004 b
 T₃: 1.3936 b

De acuerdo al análisis estadístico anterior, se observa que no se ha encontrado diferencias significativas entre los tratamientos T₂ y T₃; sin embargo el tratamiento T₁ supera a los tratamientos T₂ y T₃.



- T₁: Sacarosa 3%+ ANA (0.05g.) + BAP (0.05g .) + Agar 0.6%
 T₂: Sacarosa 3% + Inositol (0.1g.) + BAP (0.05g)+ Agar 0.8%
 T₃: Sacarosa 3% + Inositol (0.05g) + Agua de coco (100 ml) + Agar 0.5%

FIGURA 2. Promedio de Crecimiento Diametral de la Proliferación de Callos a los 30 días de cultivo en la Fase I

Asimismo el análisis a los 60 días del cultivo en Fase I, se observa los resultados en el Cuadro 5 y, el Cuadro 6 se refiere a la prueba de Tukey, que sigue manteniendo diferencia significativa entre tratamientos. Este comportamiento se ilustra en el figura 3.

CUADRO 3. Análisis de varianza del crecimiento diametral de callos a los 60 días Fase I.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	SIG.
Tratamiento	2	0.0445	0.0222	16.060	*
Error Experimental	12	0.0166	0.0014		
Total	14	0.0611			

CV = 3.55%

(*) Significación estadística al 5% de probabilidad

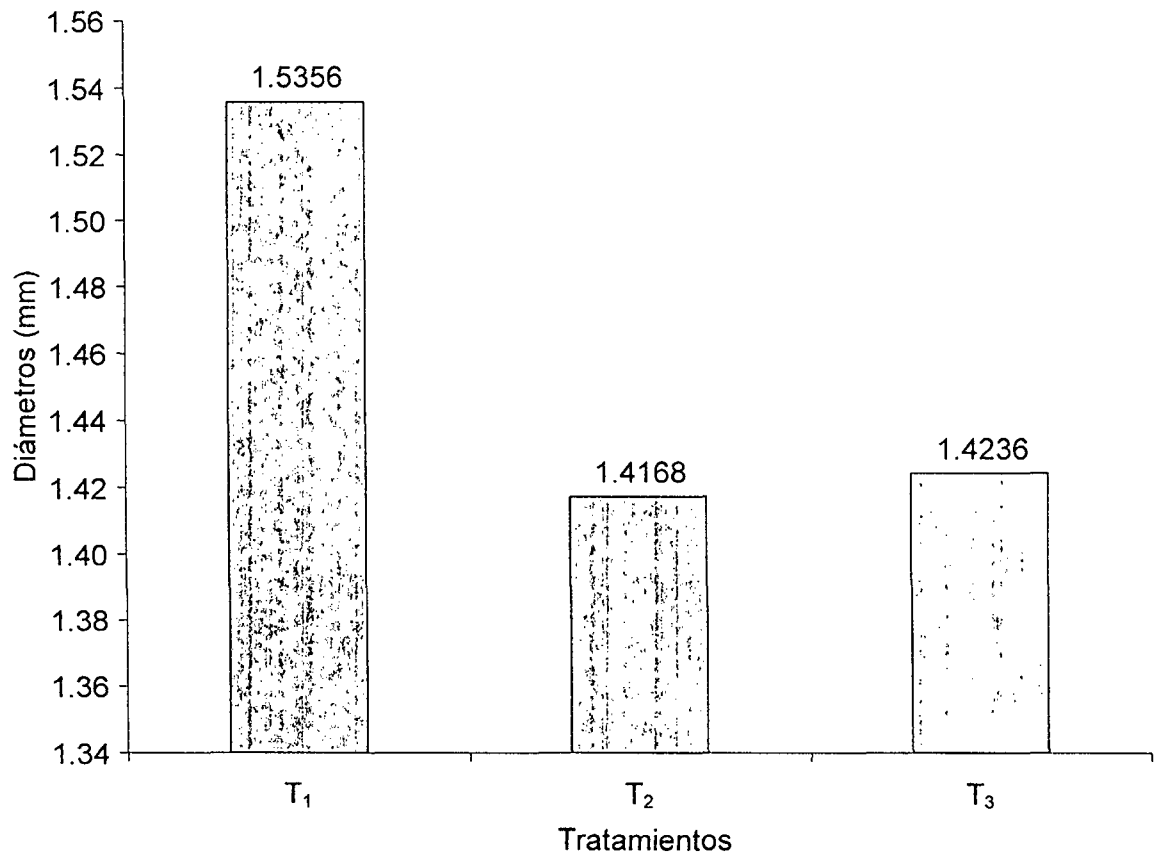
PRUEBA DE TUKEY

T₁: 1.5356 a

T₂: 1.4168 b

T₃: 1.4236 b

De acuerdo al análisis estadístico anterior, se observa que no se ha encontrado diferencias significativas entre los tratamientos T₂ y T₃; sin embargo el tratamiento T₁ supera a los tratamientos T₂ y T₃.



- T₁:** Sacarosa 3%+ ANA (0.05g.) + BAP (0.05g .) + Agar 0.6%
T₂: Sacarosa 3% + Inositol (0.1g.) + BAP (0.05g)+ Agar 0.8%
T₃: Sacarosa 3% + Inositol (0.05g) + Agua de coco (100 ml) + Agar 0.5%

FIGURA 3. Promedio de Crecimiento Diametral de la Proliferación de Callos a los 60 días de cultivo en la Fase I

Refiriéndonos a la evaluación realizada a los 15 días de iniciada la Fase II, los resultados estadísticos se hayan anotados en el Cuadro 7, manifestándose un diferencia estadística entre tratamientos mostrados en el Cuadro 8. Del mismo modo en la figura 4, se representan estos resultados.

CUADRO 4. Análisis de varianza del crecimiento diametral de callos a los 15 días Fase II.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	SIG.
Tratamiento	2	0.2669	0.1335	10.464	*
Error Experimental	12	0.1531	0.0128		
Total	14	0.4200			

CV = 6.75 %

(*) Significación estadística al 5% de probabilidad

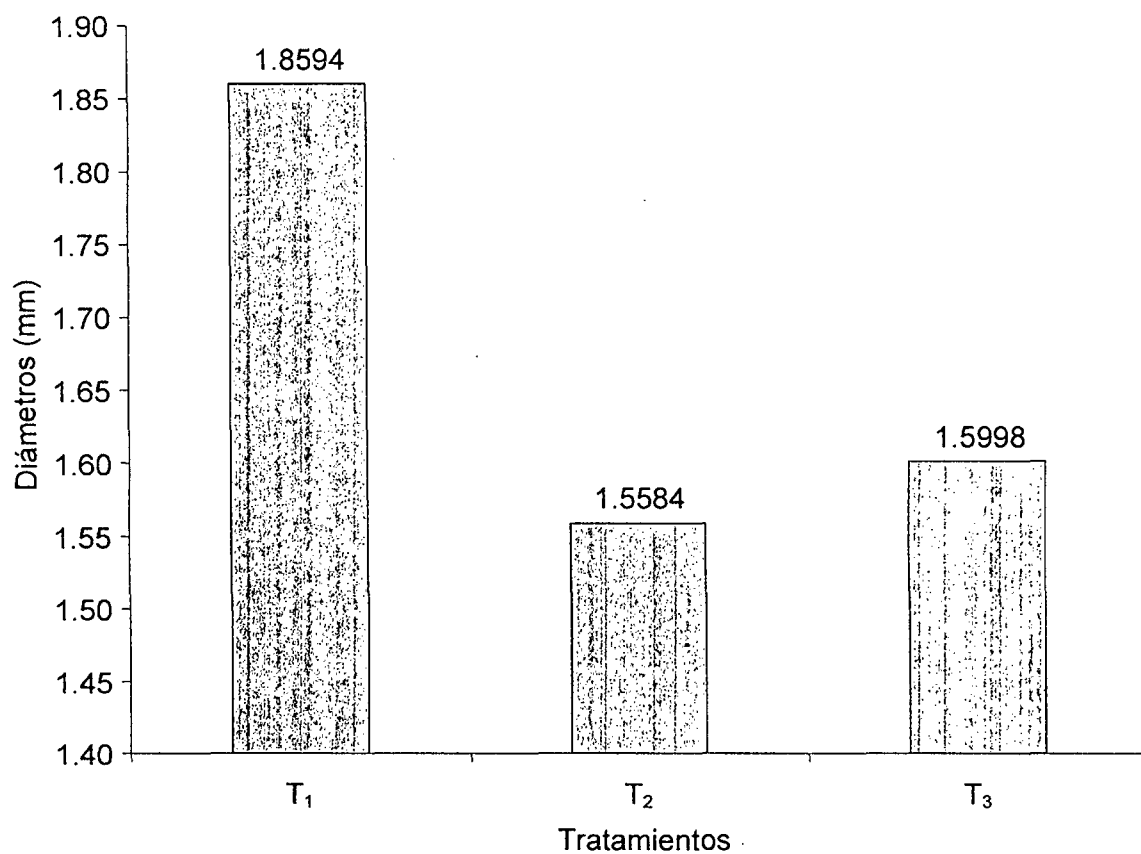
PRUEBA DE TUKEY

T₁: 1.8594 a

T₂: 1.5584 b

T₃: 1.5998 b

De acuerdo al análisis estadístico anterior, se observa que no se ha encontrado diferencias significativas entre los tratamientos T₂ y T₃; sin embargo el tratamiento T₁ supera a los tratamientos T₂ y T₃.



- T₁: Sacarosa 3%+ ANA (0.05g.) + BAP (0.05g .) + Agar 0.6%
 T₂: Sacarosa 3% + Inositol (0.1g.) + BAP (0.05g)+ Agar 0.8%
 T₃: Sacarosa 3% + Inositol (0.05g) + Agua de coco (100 ml) + Agar 0.5%

FIGURA 4. Promedio de Crecimiento Diametral de la Proliferación de Callos a los 15 días de cultivo en la Fase II

Considerando la proliferación de los callos a los 30 días dentro de la Fase II, se han registrado el análisis estadístico que se ubican en el Cuadro 9 y, en el Cuadro 10, la prueba de Tukey, en este último se hace referencia de la diferencia significativa entre los tratamientos. En la figura 5, se ilustra claramente lo antes mencionado.

CUADRO 5. Análisis de varianza del crecimiento diametral de callos a los 30 días Fase II

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	SIG.
Tratamiento	2	0.1833	0.0916	5.745	*
Error Experimental	12	0.1915	0.0159		
Total	14	0.3748			

CV = 5.82%

(*) Significación estadística al 5% de probabilidad

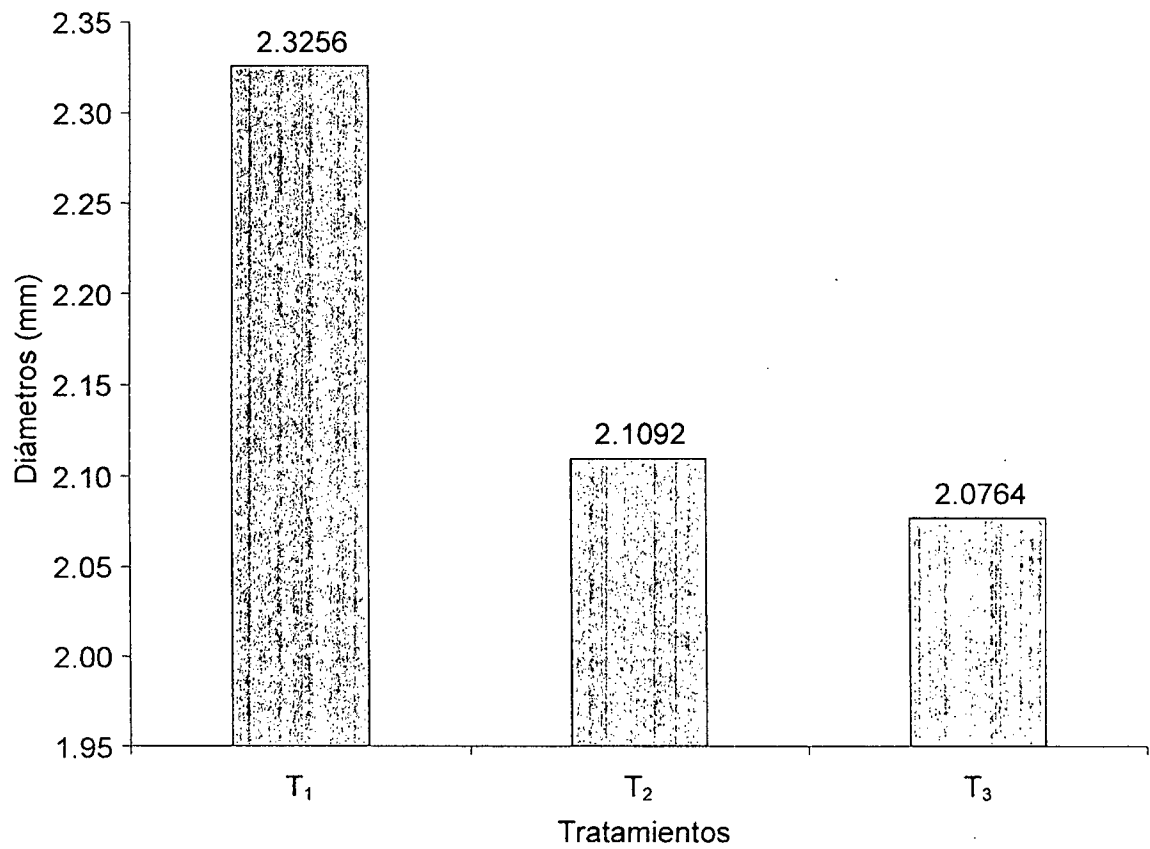
PRUEBA DE TUKEY

T₁: 2.3256 a

T₂: 2.1092 b

T₃: 2.0764 b

De acuerdo al análisis estadístico anterior, se observa que no se ha encontrado diferencias significativas entre los tratamientos T₂ y T₃; sin embargo el tratamiento T₁ supera a los tratamientos T₂ y T₃.



- T₁: Sacarosa 3%+ ANA (0.05g.) + BAP (0.05g .) + Agar 0.6%
 T₂: Sacarosa 3% + Inositol (0.1g.) + BAP (0.05g)+ Agar 0.8%
 T₃: Sacarosa 3% + Inositol (0.05g) + Agua de coco (100 ml) + Agar 0.5%

FIGURA 5. Promedio de Crecimiento Diametral de la Proliferación de Callos a los 30 días de cultivo en la Fase II

En las evaluaciones realizadas a los 60 días del cultivo en la Fase II se encontraron los resultados que se anotan en el Cuadro 11 y en el Cuadro 12, donde se aprecian diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos efectuados y, de igual manera se encuentran representados en el figura 6.

CUADRO 6. Análisis de varianza del crecimiento diametral de callos a los 60 días Fase II.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	SIG.
Tratamiento	2	0.2755	0.1377	6.470	*
Error Experimental	12	0.2555	0.0213		
Total	14	0.5310			

CV = 4.57%

(*) Significación estadística al 5% de probabilidad

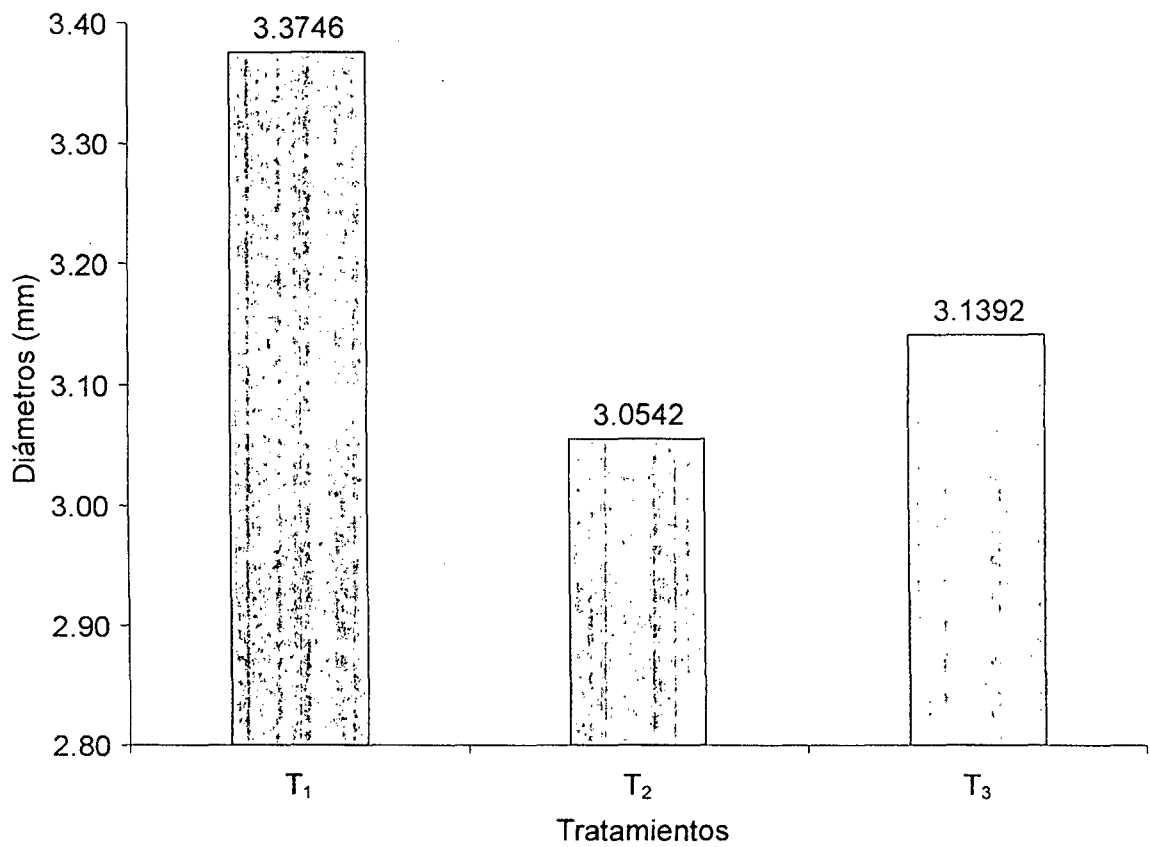
PRUEBA DE TUKEY

T₁: 3.3746 a

T₂: 3.0542 b

T₃: 3.1392 b

De acuerdo a análisis estadístico anterior, se observa que no se ha encontrado diferencias significativas entre los tratamientos T₂ y T₃; sin embargo el tratamiento T₁ supera a los tratamientos T₂ y T₃.



- T₁: Sacarosa 3% + ANA (0.05g.) + BAP (0.05g .) + Agar 0.6%
 T₂: Sacarosa 3% + Inositol (0.1g.) + BAP (0.05g)+ Agar 0.8%
 T₃: Sacarosa 3% + Inositol (0.05g) + Agua de coco (100 ml) + Agar 0.5%

FIGURA 6. Promedio de Crecimiento Diametral de la Proliferación de Callos a los 60 días de cultivo en la Fase II

V. DISCUSION

Considerando la proliferación de callos en todos los tratamientos a partir de las primeras semanas de cultivo en la Fase I. se ha determinado estadísticamente que desde los 15 días de cultivo existe diferencias significativas entre los tratamientos T_1 con T_2 y T_1 con T_3 , incrementándose esta diferencia estadística en cultivos con proliferación de callos de días de la Fase I y en toda la Fase II lo que podría deberse a la adaptación de los tejidos meristemáticos a los diferentes substratos encontrados en los tratamientos que permitieron una ligera diferenciación morfogénica en agregados irregulares que ostentaron promedios similares.

Respecto a la proliferación precoz de tejidos o morfogénesis, que no es más que la iniciación de la forma del tejido en crecimiento está fundamentado en procesos moleculares, bioquímicos y fisiológicos que permiten la aparición de nuevas estructuras organizadas, y que puede sufrir una ligera inactivación en el transcurso de la diferenciación que podría incluso anular la totipotencia celular (Halperin 1986) en la ruta alternativa de la organogénesis que conduce a la diferenciación de meristemas caulinares y/o radicales, por lo que el tejido meristemático al no encontrar los reguladores específicos de crecimiento no formaría callos o se inactivaría irreversiblemente. En el caso del presente trabajo, si bien se ha verificado presencia de masa celular sin diferenciar en todos los tratamientos durante las primeras semanas de cultivo, se puede afirmar que los mecanismos de acción de los reguladores de crecimiento presente en los tratamientos van mermando sus niveles hasta actuar como

moduladores de la respuesta morfogénica (Ammirato, 1986).

Los resultados obtenidos entre el tratamiento 2 y tratamiento 3 estadísticamente similares podría explicarse por la presencia, en ambos tratamientos, de inositol que estaría condicionado la proliferación de callo en igual medida a pesar de que los otros ingredientes de los tratamientos han sido dísimiles, por otro lado, es posible suponer que el BAP y el agua de coco podrían mostrar similar mecanismo de acción frente a la proliferación de masa celular indiferenciada (callo).

Era de esperar que en la Fase I se presentaría proliferación de brotes, no obstante en nuestro trabajo no se manifestó esta situación, sino sólo la presencia de callo, quizá por la presencia de ANA (auxina) en el Tratamientos 1, que fue el de mejor rendimiento en relación al crecimiento diametral de los callos, esta auxina sería la causa de la inhibición del potencial caulogénico de los meristemas debido a la concentración que suponemos sería elevada para el tipo de vegetal en estudio (Trewaras, 1991). En la actualidad no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de estos compuestos (fitohormonas) en la morfogénesis.

Nuestro resultado respecto al rendimiento del medio adecuado con fitoreguladores (ANA + BAP – Tratamiento 1 es coincidente con el reportado por Rahnman *et al* (1993) quien manifestó que una mejor respuesta de producción de brotes en *Caesalpinacea pulccheiriana* ocurrió al utilizar ANA mas BAP o Cinetina.

Se observa que el tratamiento 1 es en donde mejor proliferan callos, y ostenta

una clara ventaja, estadísticamente confrontada, con respecto a la otra combinación de fitoreguladores probados, como es el caso de Inositol mas BAP. De igual manera, puede afirmarse que la sacarosa, es importante como agente osmótico y posiblemente como elemento nutricional. La concentración de sacarosa utilizada en nuestro trabajo es coincidente con los reportes realizados para la micropropagación in vitro, incluso de especies no leñosas (Delgado, 1999).

La no proliferación de brotes se debería a la poca actividad demostrada de la diferenciación celular y posiblemente por la influencia de algunos compuestos inherentes al vegetal en estudio que inhiben la eficiencia de los primeros. Sugerimos la posibilidad de la existencia de factores que inhiben la proliferación celular, como son los compuestos fenólicos, catecol y otros.

El no enraizamiento en la Fase III, puede deberse a que la concentración de AIA no resultó quizá ser la mas adecuada. En el caso de nuestro reporte es disímil con el Rahman *et al* (1993) quien refiere la producción de un máximo número de raíces al utilizar AIA mas Kinetina.

VI. CONCLUSIONES

1. La proliferación de callos se manifiesta notoriamente a partir de los primeros 15 días del cultivo en el medio de cultivo.
2. El tratamiento T_1 : Sacarosa 3%+ ANA (0.05g.) + BAP (0.05g .) + Agar 0.6% resultó ser el mejor medio de cultivo que ostenta clara ventaja respecto a la proliferación de masa celular indiferenciada.
3. Los tratamientos T_2 y T_3 , son similares estadísticamente con respecto a proliferación de callos, debido a la presencia de inositol que los condiciona.
4. No se registró proliferación de brotes por la inhibición del potencial caulogénico de los meristemas debido a la concentración del fitoregulador.
5. No se observó enraizamiento al utilizar (AIA) en concentraciones de (0.05 ug/mL) debido a que la concentración no fue la adecuada.

VII. RECOMENDACIONES

1. En futuros trabajos de micropropagación *in vitro* con esta especie se deberá aumentar el número de tratamientos considerando mayores combinaciones de las fitohormonas y regulares de crecimiento.
2. Utilizar inhibidores de compuestos fenólicos con la finalidad de producir respuesta al AIA.
3. En lo posible llevar a cabo ensayos en los cuales varíen las condiciones ambientales, específicamente el intervalo de luz (fotoperíodo) incrementando el periodo de oscuridad.

VIII. RESUMEN

Cedrelinga cateniformis (Ducke) Ducke "tornillo" especie forestal puede ser producida con fines de propagación a gran escala aplicando métodos de micropagación biotecnológica. Se determinó el medio de cultivo óptimo respecto a la concentración de reguladores de crecimiento para la obtención de callos diferenciados o plántulas a partir de yemas de esta especie.

Se probaron los siguientes tratamientos T₁ : Sacarosa 3 % + ANA (0.05 g.) + BAP (0.05g) + Agar 0.6 % con T₂ : Sacarosa 3 % + Inositol (0.1g.) + BAP (0.05g)+ Agar 0.8 % y, con T₃: Sacarosa 3 % + Inositol (0.05g) + Agua de coco (100 ml) + Agar 0.5 %; obteniéndose diferencias significativas estadísticamente que se incrementan en cultivos con proliferación de callos de la Fase I y en toda la Fase II permitiendo una ligera diferenciación morfogénica en agregados irregulares que ostentaron promedios similares. El tratamiento T₁ es en donde mejor proliferan callos, y ostenta una clara ventaja, estadísticamente confrontada, con respecto a la otra combinación de fitoreguladores probados. No se verifica proliferación de brotes por la poca diferenciación celular y la posible influencia de factores que inhiben la proliferación celular, como son los compuestos fenólicos, catecol y otros. No se observó enraizamiento en la Fase III, debido a que la concentración de AIA no resultó ser la mas adecuada.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. AMMIRATO, P.V. 1986. Control and expresion of morphogenesis in culture. In Plant Tissue Culture and its Agricultural applications. Witters y P.G. Adderson eds. Butter Worths, Londres. p. 23 – 45.
2. ARIAS, E. 1995. Cultivo in vitro del nogal *Junglas neotropica* Tesis Ing. For. UNALM, Lima Perú. 105 p.
3. AROSTEGUI, A. 1968. Estudio de la Dendrología y propiedades físico – mecánicas de las especies forestales mas importantes del bosque tropical en Tingo María. Tesis, Ing. Agron. ENA. 203 p.
4. BONGA, J. M. , DURZAN, D. J. 1986. Tissue culture in forestry Martinus Nijhoff Publisher. Dordrecht. The Netherlands. 416 p.
5. BURGOS, J. A. 1954. Estudio de la silvicultura de algunas especies forestales en Tingo María. Perú. The Caribbean Forester. p. 4 – 33.
6. CASTILLO, Q. , DUALLE, P. 1992. Cultivo de tejidos en árboles de importancia forestal. Instituto de Ciencias Naturales, ISCN. Universidad INCCA. Colombia. 12 p.
7. DELGADO, P. G. , ROJAS, I. 1999. Cultivo de Vegetales I: Aplicaciones y Procedimientos, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú. 59 p.
8. DUCKE, A. 1949. La leguminosa de la Amazonía Brasileña. Notas sobre la flora neotrópica. II Boletín Técnico del Instituto del Norte Brasil. N° 18: 248 p.

9. DUCKE, A. 1949. Las leguminosa de la Amazonía Brasileña. Instituto Agronómico del Norte. Belem – Pará. Brasil. 40 p.
10. GUATHERET, R. 1940. Nouvelles Reserches Sur Le bouregenonement du tissu cambial *ulmus campestris* cultive in vitro CR.ACAD.SCL. Paris. 746 p.
11. HALPERIN, W. 1986. Attainment and retention of morphogenetic capacity in vitro. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. 3, I.K. Vasil ed. Academic Press, Orlando, USA. 47 p.
12. INIAA – JICA. 1991. Manual silvicultural. Informe final del Proyecto de Estudio sobre Investigación y Experimentación en Regeneración de Bosques en la Zona Amazonica de la República del Perú. INIAA – JICA Japón. 270 p.
13. JONES, J. 1987. Sistemática Vegetal. 1^{ra} edición. Editora Fuentes Impresoras S . A. México. 536 p.
14. JONES, O.P. AND s.g.s. haffield. 1976. root initiation in apple shoots cultured in vitro with auxins and phenolic compounds. J. Hort. Sci. 51. p. 495 – 499.
15. JORDAN, M. , PEDRAZA, J. , GOREAUX, A. 1985. In vitro Propagation studies of tree Prosopis species. Through shoot tip cultures. Gartenbauwissenschaft 50. p. 265 – 267 .
16. LIMASSET, P. , CORNUET, P. 1949. Recherche de virus de la mosaique du tabac (Marmor Tabaci, Holmes) dnas les méristemes des plantes infectees. Compt. Rend. 313 p.

17. LOPEZ, R. 1970. Estudio silvicultural de la especie *Cedrelinga cateniformis* Ducke, Ducke. Tesis Ing. Forestal. UNA la Molina. Lima, Perú. 89 p.
18. MAINIERI, C. 1962. Madeiras leves da Amazonia empregadas con calxotaria. Studio anatomico macro y microscopico. Sao Paulo Instituto des Pesquisas Tecnológicas. I.P.T. 87 p.
19. MATHES, M. C. 1974. The in vitro formation plantlets from aspen tissues. Pitón. p. 137 – 141.
20. MOREL, G., MARTIN, C. 1952. Guérison de dahlias atteints dune maladie a virus. Compt. Ren. 1325 p.
21. NAGMANI, R., VENKETESWARAN, S. 1983. In vitro culture of hipocotyl and cotyledonary segments of *Leucaena*. Res. Rep. p. 88 – 89.
22. NEMETH, G. 1981. Adventitious root induction by substituted 2 – chloro – 3 phenyl – propionitriles in apple rootstock cultured in vitro. *Scientia Horticulturae*. p. 253 – 259.
23. PIERIK, R. L. 1990. Cultivo in vitro de plantas superiores. Ediciones Mundi – Prensa, Madrid. 325 p.
24. PITIER, *et al.* , 1945. Catálogo de la flora venezolana, Tomo 1, Caracas, 450 p.
25. QUAK, F. 1977. Meristen culture and virus – free plants. En: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. J Reinert & Y.P.S. Bajaj . Berlin. 635 p.

26. RAHMAN, S. M. , HOSSAIN, B. K. , BISWAS, O. I. , JOARDER, AND ISLAM. 1993. Micropropagation of *Caesalpinia pulcherrima* through nodal bud culture of nature tree. Plant. Cell. Tiss. Org. Cult. 32. p. 363 – 365.
27. ROCA, W. , MROGINSKI, L. 1991. Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Colombia. 970 p.
28. ROCA, W. M. 1982. El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de Yuca. Guía de estudio. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 45 p.
29. SMITH, D. R. , HOREAN K. , AITKEN, J. 1980. Micropropagation. A new ald en tree improvement. What is new in forest. Research N^o 87. Forest Research Institute of New Zeland. 4 p.
30. SRISKANDARAJAH and MULLINS. 1981. Micropropagation of granny smith apple. Factors affecting root formation in vitro. J. Hort. Sci. 71 – 76 p.
31. SUASNABAR, L. T. 1985. Comportamiento de plántulas de *Cedrelinga cateniformis* (Ducke) Ducke “tornillo” bajo diferentes tratamientos en una plantación a campo abierto, Pichanaki, Perené, San Ramón. CENFOR VIII. 111 p.
32. THORPE, T. A. 1978. Frontiers of plants. T. Culture. Calgary, Alberta Int. Association for P.T.C. 556 p.
33. TOSI, J.A. 1960. Zonas da Vida natural del Perú. Instituto de ciencia agrícolas, Zona Andina. IICA Boletín Técnico N^o 5. 271 p.

34. TRAYWICK, V. O. 1959. Mechanical and related properties of *Cedrelinga cateniformis* Ducke "tornillo" Tesis MSc. Faculty of North Caroline, stage College. 106 p.
35. TREWARAS, A. 1991. How do plant growth substances work . Plant Cell North Caroline, Stage College. 106 p.
36. VARGAS H., J. 1982. Aplicación de cultivo de tejidos en la programación vegetativa de especies forestales. Revista Ciencia Forestal N° 39 Vol. 7. Chile. p. 44 – 63 .
37. VIEITEZ, A. M. and M. L. , VIEITEZ. 1980. Culture of chestnut shoots from buds in vitro. J Hort. Sci. p. 83 – 84.
38. VILLALOBOS A, M. 1.984. The early events associated with organogenesis in cultured radiata pine cotyledons. Tesis Doctoral U. De Calgary, Alta, Canada. 112 p.
39. VILLALOBOS, V. M., THORPE, T.A. , YEUNG, E. C. 1983. Aplicaciones de cultivo de tejidos en especies forestales. Ciencia y desarrollo. CONACYT. Mexico, Vol. 61. p. 43 – 59.
40. VILLEGAS M. A. , CATILLO A. 1982. Propagación de cultivares de manzano *Malus pumila* (Mill) in vitro Tesis MSc. Colegio de Postgraduados, Chapingo, Mexico. 96 p.
41. VON A. S., WALDIN, A. 1988. Tissue culture methods for clonal propagation of forest trees. International association for plant tissue culture. Newsletter N° 56. 85 p.

42. WHITE, P. R. 1943. A Handbook of plant tissue culture. Lancastre Pa. Jacques Cattell Press. 594 p.
43. WILKINS, C. P. , CABRERA, J. L. , DODDS, J.H. 1985 . Tissue culture propagation of trees. In: Outlook on agriculture. Vol. 14 N° 1. 33p.
44. WINTON, L. L. , HUHTINEN, O. 1978. Tissue culture or trees. In: Modern methods in forest genetics. (J: P Milksche Ed.) Springer – verlog, Berlin. p. 243 – 264.
45. ZIMMERMAN, R. H. And OLIVA, C. 1981. Phloroglucinol and in vitro rooting of apple cultivar cuttings. J, Amer, Soc, Hort. Sci. p. 652.
46. ZUÑIGA, M. 1993. Propagación por cultivo de tejidos de *Prosopis juliflora*, *P. pallida*. Tesis. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque. 169 p.

X. ANEXO

A. Medio de Murashigue Skoog (MS).

Macronutrientes	mg/l
NH ₄ NO ₃	1,650
KNO ₃	1,900
Ca Cl ₂ · 2H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
 Micronutrientes	
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.3
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8.3
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.25
Na ₂ EDTA	37.0
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.0
Sacarosa	3,000
Agar	500
pH	5.7 – 5.8
 Vitaminas	
Mio – inositol	100
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina – CHL	0.5
Tiamina – HCl	0.1
Glicina	2.0
Kinetina	0.04 – 10
AIA	1.0 – 30

B. Fotos con resultados obtenidos por la proliferación de callos en la Fase I y II

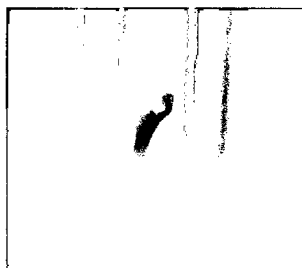


FIGURA 7. Proliferación de callo a los 15 días de la Fase I.



FIGURA 8. Proliferación de callo a los 15 días de la Fase I.



FIGURA 9. Proliferación de callo a los 30 días de la Fase I.

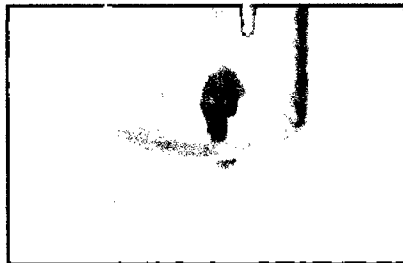


FIGURA 10. Proliferación de callo a los 60 días de la Fase I.



FIGURA 11. Proliferación de callo a los 15 días de la Fase II.



FIGURA 12. Proliferación de callo a los 30 días de la Fase II.



FIGURA 13. Proliferación de callo a los 60 días de la Fase II



FIGURA 14. Diferenciación del callo, luego del termino de la presente investigación.

C. Datos con los promedios del crecimiento diametral de la proliferación de callos, obtenidos en las Fases I y II

CUADRO 7. Evaluación a los 15 días Fase I.

N° de repeticiones	Diámetro (mm)		
	T ₁	T ₂	T ₃
1	1.525	1.326	1.478
2	1.488	1.425	1.378
3	1.450	1.380	1.358
4	1.516	1.385	1.394
5	1.525	1.400	1.300
Suma	7.504	6.916	6.908
Promedio	1.5008	1.3832	1.3816

CUADRO 8. Evaluaciones a los 30 días Fase I.

N° de repeticiones	Diámetro (mm)		
	T ₁	T ₂	T ₃
1	1.53	1.337	1.479
2	1.49	1.44	1.38
3	1.46	1.425	1.368
4	1.52	1.39	1.42
5	1.53	1.41	1.33
Suma	7.53	7.002	6.968
Promedio	1.506	1.4004	1.3936

CUADRO 9. Evaluaciones a los 60 días Fase I.

N° de repeticiones	Diámetro (mm)		
	T ₁	T ₂	T ₃
1	1.542	1.346	1.48
2	1.576	1.445	1.436
3	1.500	1.430	1.458
4	1.528	1.425	1.435
5	1.532	1.438	1.350
Suma	7.678	7.084	7.118
Promedio	1.5356	1.4168	1.4236

CUADRO 10. Evaluaciones a los 15 días Fase II.

N° de repeticiones	Diámetro (mm)		
	T ₁	T ₂	T ₃
1	2.005	1.500	1.657
2	1.970	1.590	1.555
3	2.000	1.600	1.657
4	1.678	1.578	1.590
5	1.644	1.524	1.535
Suma	9.297	7.792	7.994
Promedio	1.8594	1.5584	1.5998

CUADRO 11. Evaluaciones a los 30 días Fase II.

N° de repeticiones	Diámetro (mm)		
	T ₁	T ₂	T ₃
1	2.600	2.188	2.107
2	2.160	2.115	2.098
3	2.188	2.100	2.000
4	2.500	2.099	2.088
5	2.180	2.044	2.089
Suma	11.628	10.546	10.382
Promedio	2.3256	2.1092	2.0764

CUADRO 12. Evaluaciones a los 60 días Fase II.

N° de repeticiones	Diámetro (mm)		
	T ₁	T ₂	T ₃
1	3.400	2.800	3.270
2	3.369	3.077	3.300
3	3.344	3.120	2.910
4	3.200	3.074	3.093
5	3.560	3.200	3.123
Suma	16.873	15.270	15.696
Promedio	3.3746	3.0542	3.1392