

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

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



**DESINFECCIÓN DE YEMAS PARA LA MICROPROPAGACIÓN
DE SANGRE DE GRADO (*Croton lechleri* Muell Arg.)**

Tesis

Para Optar el título de:

**INGENIERO EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES
MENCIÓN FORESTALES**

JENNY ANICE VARGAS MARILUZ

PROMOCIÓN 2005 - II

Tingo María Perú

2007

F01

V28

Vargas Mariluz, Jenny Anice

Desinfección de Yemas para la Micropropagación de Sangre de Grado
(*Crotón lechleri* Muell Arg.). Tingo María, 2007

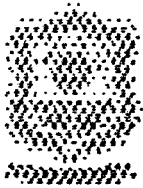
77 h.; 13 cuadros; 4 fgrs.; 37 ref.; 30 cm.

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

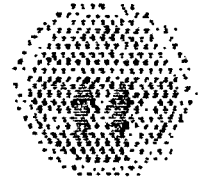
Crotón lechleri MUELL ARG. / DESINFECCIÓN / CULTIVO

MICROPROPAGACIÓN / SANGRE DE GRADO / CRECIMIENTO /

TINGO MARÍA / RUPA RUPA / LEONCIO PRADO / HUÁNUCO / PERÚ



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María - Perú



FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

Los que suscriben, Miembros del Jurado de Tesis, reunidos con fecha 21 de agosto de 2007, a horas 04:00 p.m. en la Sala de Conferencias de Facultad de Recursos Naturales Renovables, para calificar la tesis titulada:

**“DESINFECCION DE YEMAS PARA LA
MICROPROPAGACION DE SANGRE DE GRADO
(Croton lechleri Muell Arg).”**

Presentado por la Bachiller: **JENNY ANICE VARGAS MARILUZ**, después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las interrogantes formuladas por el Jurado, se declara aprobado con el calificativo de **“MUJ 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, 23 de agosto de 2007

.....
Bigo. M.Sc. **MANUEL NIQUE ALVAREZ**
Presidente

.....
Ing. **TANIA GUERRERO VEJARANO**
Vocal



.....
Ing. M.Sc. **LADISLAO RUIZ RENGIFO**
Vocal

.....
Bigo. **ARMANDO ENEQUE PUICON**
Asesor

.....
Mcbigo. M.Sc. **CESAR LOPEZ LOPEZ**
Co asesor

DEDICATORIA

A Dios:

**Por iluminar mi camino,
y permitirme vencer todos los obstáculos
para culminar mi carrera con éxito y por
las múltiples bendiciones que derrama
sobre mi familia.**

A mis Padres:

ANGELICA MARILUZ LLANOS

FRANKLIN VARGAS DÁVILA

**Por su inigualable amor, sabios consejos
y denodado esfuerzo para la culminación de
mi carrera profesional, cuyo aliento y abnegada
dedicación estimulan mi superación cada día.**

A mi hermano John Frank,

A mis tíos : Aurelia, Pedro,

Luz, Rubén y Abuelito Alejandro,

por todo su apoyo moral en la culminación

de mi carrera, mi cariño y respeto.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, por haberme forjado como profesional.

A todos mis profesores de la Facultad de Recursos Naturales Renovables, quienes contribuyeron en mi formación académica.

Al Mtblgo. MSc. César Samuel López López, amigo y patrocinador de la presente tesis, por su incondicional e inagotable apoyo en la conducción de la misma.

Al Blgo. Armando Martín Eneque Puicón, patrocinador de la misma, por su gran orientación profesional para la realización del presente trabajo.

A mis amigos y colegas, Jorge Ríos, Arnaldo Soto y Richard Sias, que de una u otra manera me alentaron y colaboraron significativamente en la realización y culminación de la tesis.

A todas aquellas personas que estuvieron brindándome continuo apoyo moral y material para poder concluir satisfactoriamente mis estudios universitarios.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Generalidades de la Sangre de Grado <i>Croton lechleri</i> Muell Arg.....	4
2.1.1 Clasificación taxonómica según CRONQUIST...	4
2.1.2 Distribución natural de la Sangre de Grado.....	5
2.1.3 Características generales de la especie en estudio.....	5
2.1.4 Propuesta de asociación.....	6
2.2 Información complementaria.....	7
2.2.1 Componentes químicos.....	7
2.3 Información general sobre cultivos de tejidos.....	7
2.3.1 Definición.....	7
2.3.2 Etapas de la propagación <i>in Vitro</i>	8
2.3.3 Características que influye en la técnica de Micropropagación.....	9
2.4 Factores que Influyen en el Crecimiento de Meristemas.....	12
2.4.1 Tipo de virus.....	13
2.4.2 Tamaño de explante.....	13
2.4.3 Tipo del explante.....	13

2.4.4	pH.....	14
2.4.5	Consistencia del medio de cultivo.....	14
2.5	Explantos.....	14
2.6.	Asepsia.....	17
2.7.	Aspectos generales sobre la desinfección.....	21
2.7.1	Desinfección.....	21
2.7.2	Desinfectantes.....	21
2.7.3	Desinfección del material vegetal.....	23
2.7.4	Algunos métodos de desinfectantes de explantos.....	24
2.8	Aspectos generales sobre medios de cultivo.....	26
2.8.1	Principios generales.....	26
2.8.2	Ingredientes.....	28
2.8.3	Reguladores de crecimiento vegetal.....	28
2.8.4	Las auxinas.....	30
2.9	Cultivo <i>In Vitro</i> en leñosas.....	33
III.	MATERIALES Y METODOS.....	36
3.1	Lugar de ejecución.....	36
3.2	Obtención de las muestras.....	36
3.2.1	Elección del explante.....	36
3.2.2	Extracción.....	37
3.2.3	Lavado.....	37
3.3	Material en estudio.....	37
3.4	Medio de cultivo.....	37

3.5	Preparación de material.....	39
3.6	Etapa de desinfección.....	39
3.6.1	Operaciones previas.....	39
3.6.2	Proceso de desinfección.....	40
3.7	Fase de Crecimiento.....	42
3.7.1	Preparación de reguladores de crecimiento.....	42
3.7.2	Repique de los explantes.....	42
3.8	Tratamientos del estudio.....	43
3.8.1	Fase de desinfección (Fase I).....	43
3.8.2	Fase de crecimiento (Fase II).....	47
3.9	Diseño experimental.....	49
IV.	RESULTADOS.....	50
4.1	Etapa desinfección.....	50
4.2	Ajuste estadístico de la etapa de desinfección.....	53
4.4	Fase de crecimiento.....	58
V.	DISCUSIÓN.....	63
5.1	Fase de desinfección.....	63
5.2	Fase de crecimiento.....	65
VI.	CONCLUSIONES.....	70
VII.	RECOMENDACIONES.....	71
VIII.	ABSTRACT.....	72
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
X.	ANEXO.....	78

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Diversos compuestos utilizados como desinfectantes superficiales del material vegetal.....	24
2.	Tratamientos a ensayar en la fase desinfección de explantes con hipoclorito de calcio.....	44
3.	Tratamientos a ensayar en la fase desinfección de explantes con hipoclorito de sodio.....	46
4.	Tratamientos a ensayar en la fase de crecimiento.....	48
5.	Resultado Porcentual de yemas desinfectadas con hipoclorito de calcio en los tratamientos aplicados.....	51
6.	Resultado Porcentual de yemas desinfectadas con hipoclorito de sodio en los tratamientos aplicados.....	52
7.	Análisis de varianza para la variable desinfectados.....	53
8.	Prueba de significación de Duncan para el efecto principal de la concentración en la desinfección.....	54

9.	Prueba de significación de Duncan para el efecto principal del tiempo en la desinfección.....	55
10.	Diferenciación morfológica en callos expresada en diámetro (mm) en la etapa de crecimiento.....	58
11.	Análisis de varianza para la variable diámetro de yemas.....	59
12.	Prueba de significación de Duncan para el efecto principal de concentraciones del ácido naftalenacético (ANA) correspondiente al diámetro de yemas.....	60
13.	Prueba de significación de Duncan para el efecto principal de concentraciones de bencilaminopurina (BAP) correspondiente al diámetro de yemas.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras		Página
1.	Flujograma del proceso de desinfección en la Fase I de la Micropropagación de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg.....	41
2	Efecto de la desinfección con hipoclorito de calcio [Ca(OCl) ₂] a seis concentraciones y cuatro tiempos.....	56
3.	Efecto de la desinfección con hipoclorito de calcio NaOCl a seis concentraciones y cuatro tiempos.....	57
4.	Efecto de la interacción de las dosis de bencilaminopurina (BAP) con el ácido naftalenacético (ANA) sobre el diámetro de las yemas.....	62

RESUMEN

Dado el creciente interés del uso medicinal de diversas especies vegetales, entre ellas *Croton lechleri* Muell Arg., su supervivencia está siendo amenazada, por lo que es imperativo establecer metodologías de micropropagación *In Vitro* que incrementen su número y enfrente la creciente demanda del mercado, evitando el deterioro de su ecosistema natural.

Se determinó el nuevo régimen protocolar para la etapa de desinfección (I) específico para sangre de grado (*Croton lechleri* Muell), a partir de yemas utilizando hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio a concentraciones de 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4% y 5 % (% peso) por 5, 10, 15 y 20 minutos de exposición, señalándose estadísticamente ($p < 0.05$) el resultado de que ambos hipocloritos a 3.5 % y por 5 minutos permiten un 100 % de desinfección.

En el estudio preliminar de la etapa de crecimiento (II), se utilizaron 0.1, 0.4, 0.8 y 1.2 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) y 0.5, 0.8, 1.1 y 1.4 mg/L de bencilaminopurina (BAP) en combinación estableciéndose que las sinergias entre las concentraciones 0.8 mg/L ANA-1.1 mg/L BAP, 1.2 mg/L ANA-0.8 mg/L BAP y 1.2 mg/L ANA-1.1 mg/L BAP favorecieron la proliferación de pequeños brotes en mayor diámetro.

I. INTRODUCCIÓN

La prolongada tradición de uso de productos de origen vegetal en medicina humana y la reacción contemporánea contra los múltiples efectos secundarios de los fármacos sintéticos, han llevado a un resurgimiento del herbalismo, a veces denominado medicina natural o *fitoterapia*.

En la Amazonia peruana existen numerosas especies arbóreas indiscutiblemente comprobadas de poseer propiedades de alto efecto curativo para diversas dolencias, destacando entre ellas sangre de grado (*Croton lechleri* Muell Arg), (SANDOVAL *et al.*, 2001). Así como esta especie, muchas otras con características medicinales científicamente identificadas y estudiadas sólo recientemente, proceden de biomas en creciente merma y amenazados, por lo que existe una preocupación no desdeñable frente al impacto que el acelerado crecimiento en el consumo de estas especies produzca sobre la supervivencia y el estudio del cultivo sostenible de las mismas es una inquietud importante (MEJIA y RENGIFO, 1995).

La "sangre de grado" se encuentra a lo largo de nuestra Amazonia (MOSTACERO *et al.*, 2002) en circunscritas áreas de crecimiento natural así como en viveros, sin embargo no existen instituciones o empresas dedicadas a la venta autorizada y certificada de las mismas, que mantengan el equilibrio poblacional y vigor genético.

La aplicación de metodologías de micropropagación *In Vitro* para una producción razonable permite solucionar inconvenientes imposibles de superar por los métodos tradicionales y enfrentar la creciente demanda del mercado, evitaría el deterioro de sus ecosistemas naturales, mas aún dados los beneficios que otorga esta técnica, como es la obtención de vegetales genéticamente óptimos de alto rendimiento, libres de patógenos y en espacios reducidos, se dispondría ventajosamente a gran escala de excelente material vegetativo durante todo el año.

Sin embargo una limitación para la introducción de este tipo de cultivos a la economía es que no se cuenta con metodologías para su aplicación en especies forestales, pues es necesario realizar análisis previos de las ventajas y desventajas de la utilización de las técnicas biotecnológicas de propagación *In Vitro* en relación a los sistemas tradicionales de multiplicación, debiéndose tener en cuenta no sólo las características fisiológicas sino también los aspectos que hacen el buen desarrollo del vegetal (BIDWELL ,1979).

Es por ello indispensable establecer la metodología adecuada, puesto que no se tiene la técnica de propagación de tejidos vegetales específica para ésta especie, por lo que en esta investigación se abordó la determinación del régimen de desinfección que provea muestras libres de contaminantes que puedan ser reactivas a la micropropagación.

Bajo este contexto, frente a la interrogante ¿qué efecto tendrá el uso de hipocloritos en la desinfección de yemas que puedan utilizarse en la micropropagación *In Vitro* de *Croton lechleri* Muell Arg.?, se planteó la hipótesis

de que el uso de Hipoclorito de Sodio e Hipoclorito de Calcio a concentraciones de 2.5 % por espacio de 10 minutos provee yemas utilizables en la fase de crecimiento (Fase II) de la micropropagación *In Vitro* de la sangre de grado (*Crotón lechleri* Muell Arg).

Se trabajo bajo el planteamiento de los siguientes objetivos:

- Determinar específicamente la técnica para la desinfección.
- Evaluar el desarrollo de yemas desinfectadas en la fase de crecimiento (Fase II) de la micropropagación *In Vitro* de sangre de grado (*C. lechleri* Muell Arg).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades de sangre de grado (*Croton lechleri* Muell. Arg)

2.1.1. Clasificación taxonómica. Según CRONQUIS (1988)

Reino	: Vegetal
Sub reino	: Fanerógama
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Sub clase	: Rosidae
Orden	: Euphorbiales
Familia	: Euphorbiaceae
Género	: Croton
Especie	: <i>Croton lechleri</i> Muell.Arg.

Nombres comunes o vulgares:

Sangre de Grado o Sangre de Drago (Perú)

Masikomboya (Amahuaca) palo de grado, pocure, racurana, sangre de grado (Ecuador).

2.1.2. Distribución natural de la sangre de grado

MEJIA y RENGIFO (1995) menciona que la familia Euphorbiaceae comprende 750 sp, con 290 géneros, casi cosmopolita, con mayor incidencia en los trópicos.

En el Perú comprende 57 géneros, 305 especies de las cuales 88 son endémicas (MOSTACERO *et al.*, 2002), para la amazonia peruana para esta familia se reportan 166 especies (VASQUEZ y ROJAS, 2006).

Derivado de varias especies de *Crotón* (*Crotón dracanoides*, *Crotón palanostigma*, *Crotón lechleri*, Muell Arg.), la Sangre de Grado está fácilmente disponible a lo largo de la Amazonia, con el material de calidad más alto que se origina en la selva superior de Perú y Ecuador (SANDOVAL, 2001).

En el Perú se encuentra en los departamentos de Loreto, San Martín, Huánuco, Amazonas, Cuzco, Madre de Dios (BRAKO y ZARUCCHI, 1993).

2.1.3. Características generales de la especie en estudio

MEJIA y RENGIFO (1995) indica que la etimología del *Crotón*, deriva de la palabra Kroton en alusión a lo parecido de la semilla de ciertas especies a la garrapata del perro en Europa. También menciona que presenta floración todos los años entre junio y octubre, durante la época seca; su diseminación ocurre por explosión violenta del fruto y tiene lugar en octubre a la

de la época lluviosa; la cosecha del látex, puede empezar a partir del octavo año o séptimo cuando el árbol mide 30 cm. de DAP, se recomienda tumbar el árbol para cosechar el látex al máximo del volumen. La cosecha se debe realizar generalmente a partir de las 5 ó 7 de la mañana o en días de luna llena. Los cortes se deben hacer con una herramienta en forme de anillos a través del árbol.

2.1.4. Propuesta de asociación

MEJIA y RENGIFO (1995) mencionan, que se puede establecer en purmas de áreas no inundables en restingas altas, compartiendo el espacio con especies forestales o frutales tales como caoba (*Swietenia macrophylla* G. King.), cedro (*Cedrela odorata* L.), tornillo (*Cedrelinga cateniformis* Ducke), cacao (*Theobroma cacao* L.), achiote (*Bixa orellana* L.) y otros. Los cultivos temporales al establecerse durante los 2 primeros años estos serán elegidos de acuerdo al criterio del interesado.

HUAMANI (2000) indica, que se puede producir sangre de grado como componente de un sistema integral de producción agrosilvopastoril, de allí es recomendable sembrar en suelos con vocación forestal; y cuando se quiere asociar con frutales, cultivos industriales como café (*Coffea arabica* L.), cacao (*Theobroma cacao* L.), pastos y otros cultivos, la sangre de grado se debe sembrar en los bordes o límites de las parcelas de tal manera que sirva como cortina rompevientos o entre otros casos como cerco vivo.

2.2. Información complementaria

2.2.1. Componentes químicos

Especies de la familia Euphorbiaceae presentan piridona, aporfina, quinoleína tropano, ácidos grasos insaturados, antraquinonas, triterpenoides, indol.

Del género *Croton* se han aislado 30 alcaloides, 22 con estructura conocida, siendo las principales: solufaridina, taspina, sinoacutina sparcilorina, también se encuentran ácidos benzóicos, pigmentos y taninos.

El alcaloide taspina actúa como cicatrizante, coadyuvado por proanticianidina oligomérica (SP 303) y 3'-4-O-dimetilcedrusina (Lignano) entre otras sustancias (UNIVERSOS, 1994 y PEREZ, 1989).

2.3. Aspectos generales sobre cultivos de tejidos

2.3.1. Definición

ROCA y MROGINSKI (1991), sostiene que el concepto de 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.

2.3.2. Etapas de la propagación *in vitro*

Se ha establecido según MURASHIGE (1974) las siguientes etapas para la propagación *In Vitro*:

Etapa 0: Etapa inicial que comprende la selección de la planta madre y la selección de una modalidad de pre tratamiento para volver funcional la estrategia que se adopte.

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

Etapa II: Es la etapa de multiplicación de brotes, o multiplicación simplemente.

Etapa III: Corresponde al enraizamiento o etapa de pre trasplante; tiene como objetivo producir una planta autotrófica que pueda sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo.

Etapa IV: Transferencia final a la etapa de medio ambiente.

Frecuentemente, las condiciones específicas del medio o del cultivo aséptico están asociadas con cada una de las etapas mencionadas.

2.3.3. Características que influye en la técnica de micropropagación

ROCA y MROGINSKI (1991) indica que 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.

SERRANO y PINOLL (1991) mencionan que 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.

Las características principales de la técnica señaladas por BONGA (1985) y PIERIK (1990), son lo siguientes:

- Empleo de explantes o propágulos vegetativos de dimensiones pequeñas. El tamaño promedio de los tejidos proporcionales utilizados es menor de 1cm; 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 más o menos completo. 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; 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.

DELGADO y ROJAS (1999) indican que el acontecimiento de los cultivos en incubación deben considerar el efecto de la temperatura, intensidad

de luz, fotoperiodo y humedad relativa, lo que esta en función con el sistema de cultivo utilizado; sin embargo la temperatura puede oscilar entre 24 y 28 °C, la iluminación entre 1 – 10W.m⁻², el fotoperiodo de 16/8 h y la humedad relativa de 70 – 80% . Como fuente luminosa es recomendable la utilización de lámparas fluorescentes de 30 – 40 w.

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. Por otro lado, las mismas características, vistas desde otro ángulo, también le imprimen 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 explantos, 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. Además, aunque el CTV permite una alta tasa de multiplicación en menor espacio en comparación con los métodos tradicionales de propagación vegetativa, la aplicación de la técnica consume mucho tiempo y es costosa debido a la labor intensiva necesaria.

Otro inconveniente que encontramos en la micropropagación de especies forestales es la falta de reproducibilidad de los protocolos descritos en la literatura. Varios de ellos son aplicables universalmente, pero deben realizarse modificaciones para adaptarlos a condiciones locales. Las técnicas de CTV implican una gran cantidad de variables, algunas de las cuales son aún desconocidas y es por eso que a veces los resultados que fueron alcanzados fácilmente en un laboratorio, no son reproducibles en otro.

2.4. Factores que influyen en el crecimiento de meristemas

BONGA (1985) y PIERIK (1990) indican que los factores estudiados que influyen en el cultivo de Meristemas, en la bibliografía se refieren a especies no leñosas, pero por generalidad pueden influenciar en leñosas.

2.4.1. Virus

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

2.4.2. Tamaño de explante

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

2.4.3. 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.

2.4.4. 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.

2.4.5. Consistencia del medio de cultivo

Aún 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 meristemo ha sido alcanzado en medio líquido, con soportes de papel filtro. Pero sin duda que los modernos tipos de agar disponibles, como fitagel, gelita y la misma azarosa, constituyen mejores sustratos, para el cultivo de meristemas, que el agar tradicionalmente utilizado.

2.5. Explantes

ROCA y MROGINSKI (1991) manifiestan que la elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección esta determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada.

Si el objetivo final es la producción de callos, es factible la utilización de una vasta gama de explantes que, cultivados en condiciones apropiadas, permiten la callogénesis. Cualquier explante que contenga células nucleadas vivas se puede emplear potencialmente para la obtención de callos; por ejemplo en el caso de cotiledóneas herbáceas se puede lograr la proliferación de callos con relativa facilidad mediante la utilización de explantes provenientes de diversas partes del vegetal. Es muy frecuente la utilización de ápices o meristemas caulinares, hojas, entrenudos, cotiledones, raíces, anteras e inclusive tejidos altamente diferenciados como los provenientes de frutos. Esta facilidad para la proliferación de callos puede hacerse extensiva a células protoplastos; con el empleo de técnicas y medios de cultivo más elaborados.

En el caso de vegetales en los cuales la obtención de callos no está limitada por el tipo de explante, éste se seleccionará por razones prácticas como disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad, baja contaminación con microorganismos, y rápida respuesta *In Vitro*; es probable que en estos casos se opte por explante provenientes de plantas jóvenes que crecen en invernaderos, y una alternativa interesante sería usar los provenientes de semillas germinadas en condiciones asépticas. Sin embargo, hay otros vegetales más recalcitrantes en lo que respecta a la obtención de callos, y en estos casos se hace necesario utilizar ciertos explantes; esto ocurre con muchas plantas leñosas y algunas gramíneas.

En relación con la especie vegetal utilizada, es importante tener en cuenta la variabilidad asociada con el genotipo de las plantas. Es muy frecuente que, en idénticas condiciones de medio y de ambiente, las respuestas *In Vitro* de cultivo de un determinado explante de una especie difieren con el cultivar empleado (REY y MROGINSKI, 1978).

MROGINSKI *et al* (1991) indica que ligeros cambios en la composición de los medios de cultivo, especialmente en lo que se refiere a reguladores de crecimiento, puede ser de utilidad para obviar este efecto del genotipo del material vegetal. Afirman que el tamaño del explante es otro aspecto que se debe tener en cuenta, cuanto más grande sea, mayores son las probabilidades de obtener proliferación de callos, aunque ello trae aparejadas mayores probabilidades de heterogeneidad y de contaminación con microorganismos.

El efecto del tamaño del explante puede apreciarse en cualquier sistema de cultivo independientemente de la fuente de donde proviene dicho explante; su importancia ha sido señalada en cultivos de meristemas (HU y WANG, 1983). En general, el cultivo de explantes muy pequeños requiere el empleo de medios más complejos o de los denominados medios acondicionados (STREET, 1977).

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 todas 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 aclara con agua corriente estéril, generalmente se hace tres aclarados, 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 escrupulosos (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 esta 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.

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 $[Ca(ClO)_2]$. Se utiliza durante 5 – 30 minutos. El hipoclorito de calcio penetra en los tejidos vegetales con más lentitud que el hipoclorito de sodio.

- **Detergentes.** Sustancia que rebaja la tensión superficial de una solución: se añade para mejorar el contacto entre las plantas y los agentes esterilizantes.
- **Algunos fungicidas, etc.**

La esterilización química puede hacerse más eficaz:

- **Lavando el material vegetal en forma intensiva, con agua muy limpia, antes de comenzar la esterilización, y cambiando el agua de forma regular.**
- **Colocando el material vegetal en alcohol de 70% durante algunos segundos, antes de la esterilización química, con los que se eliminan las burbujas de aire, permitiendo al líquido esterilizante un mejor contacto con el material vegetal.**
- **La adición de Tween 20 u 80 (un agente mojante), al líquido esterilizante. Los agentes mojantes disminuyen la tensión superficial, permitiendo un mejor contacto superficial.**
- **Agitando durante la utilización de lejía. La elección del tiempo de esterilización y la concentración de la lejía se puede hacer en**

función de las circunstancias particulares de cada caso. Depende en gran parte de si la superficie del explante que se utiliza se va a conservar o se va a cortar antes de la inoculación. 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.

2.7. Aspectos generales sobre la desinfección

2.7.1. Desinfección

ROCA y MROGINSKI (1991), PIERIK (1990) afirman que se limita generalmente al proceso de destrucción de los microorganismos mediante métodos químicos; la esterilización se refiere a menudo al método físico para la destrucción de los microorganismos.

2.7.2. Desinfectantes

DOMINGUEZ (1986) indica que la manera en que los desinfectantes químicos ejercen sus actividades germicidas, varían con el tipo de componente o compuesto. Los hipocloritos, cloroaminas 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, son 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 través de su capacidad para desnaturalizar proteínas.

Sykes en (1965) citado por DOMINGEZ (1986) menciona que se encuentra bastante soporte en observaciones paralelas, que las proteínas son desnaturalizadas más lentamente en ausencia de agua y que el alcohol absoluto es bactericida mucho menos efectivo que el alcohol conteniendo agua. De otro lado se debe considerar que todos los tipos, especies y variedades de microorganismos tienen sus propias características morfológicas, culturales, metabólicas y catabólicas. Es razonable entonces esperar que sus respuestas a sustancias en general, y a desinfectantes en particular, no sean las mismas.

Diversas experiencias demuestran que las mayores dificultades en lo referente a la desinfección han sido afrontadas con material vegetal de especies leñosas, habiéndose encontrado diversos procedimientos.

2.7.3. Desinfección del material vegetal

DELGADO y ROJAS (1999) indica que 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.

Cuadro 1. Diversos compuestos utilizados como desinfectantes superficiales del material vegetal.

Agente esterilizante	Concentración (%)	Duración (minutos)
Peróxido de hidrogeno	3 – 12	5 – 15
Hipoclorito de sodio	0.5 – 5	5 - 30
Hipoclorito de calcio	5 – 10	5 - 30
Nitrato de plata	1	5 - 30

Fuente: Bhojwani & Razdan(1983).

2.7.4. Algunos métodos de desinfectantes de explantes

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 los mas pequeño posible, colocándolos rápidamente en el medio de cultivo.

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.

TABOADA *et al.* (2001) manifiestan que utilizaron yemas axilares de *Melia azedarach L.* que fueron desinfectados primero en alcohol etílico 70% durante 3 minutos, para luego pasarlos a una solución de hipoclorito de sodio (2% de cloro activo) + 0,1% de Tritón x 100 durante 20 minutos, luego son enjuagados con agua estéril destilada, como medio básico se utilizó el formulado de Murashige y Skoog (1962). El cultivo se realizó a $25^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$, con fotoperíodo de 16 horas suministrado por tubos fluorescentes de tipo luz-día, con irradiación de aproximadamente $2,5 \text{ W/m}^2$. El pH de los medios se ajustó a 5,7 y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos, se obtuvo el 85% de plantas viables.

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 efecto 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.

GONZALES (1989) menciona que utilizó secciones de rebrote de *Eucalyptus globulus*, de un metro de altura, obtenidas a los 6 meses de realizada la tala, fueron almacenados en bolsas de plásticas y colocadas en la nevera durante dos días. Para luego, cortar tallitos de 0.5 a 1 cm. de longitud con dos yemas y lavarlos Teepol y agua destilada. La desinfección se realizó con etanol al 70% por 30 segundos, luego fueron puestos en hipoclorito de sodio al 2,5% durante 10 minutos y enjuagados con agua destilada estéril. Siendo sembrados en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) MS/2.

2.8. Aspectos generales sobre medios de cultivo

2.8.1. Principios generales

ROCA y MROGINSKI (1991) manifiestan que para crecer las células requieren una variedad de nutrientes orgánicos e inorgánicos; estos requerimientos se demuestran fácilmente en órganos y tejidos extirpados de

plantas superiores e inferiores. Los nutrimentos orgánicos, al igual que los inorgánicos, se requieren en dos niveles: uno macro y otro micro.

El éxito del cultivo de tejidos vegetales depende sustancialmente del medio de cultivo empleado. Para establecer un sistema de cultivo de tejidos se elabora primero un medio de cultivo óptimo que se ajuste a los principales requerimientos nutricionales de la especie vegetal, al tipo de explante, al sistema de cultivo. La efectividad de un cultivo depende tanto de los ingredientes básicos, nutrimentos, azúcar hormonas, como el agente gelificador.

PIERIK (1990) indica que a menudo la necesidad de los factores orgánicos de crecimiento se hace evidente sólo cuando se considera un crecimiento largo y continuado o potencialmente indefinido. Aunque una planta verde intacta es autótrofa, las células de sus regiones de crecimiento pueden ser acentualmente heterótrofas y requerir la aplicación de un número de estimulantes orgánicos complejos que, en el caso de la planta intacta, generalmente se derivan de las células verdes.

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, bioquímicas 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).

2.8.2. Ingredientes

MURASHIGE y SKOOG (1962) manifiesta que el medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua. La fórmula de los ya mencionados, ha demostrado que es el medio adecuado para una gran variedad de especies, así como para diferentes partes de una planta; esta fórmula contiene macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, carbohidratos y reguladores, esenciales para el crecimiento del tejido vegetal (HURTADO y MERINO 1987).

2.8.3. Reguladores de crecimiento vegetal

HURTADO y MERINO (1987) indica que los reguladores del crecimiento son compuestos orgánicos que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben, o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas:

DEVLIN (1980) menciona que el desarrollo de las plantas tanto en crecimiento y diferenciación de órganos es regulado por la acción de sustancias químicas o reguladores del crecimiento, que activan o deprimen determinados procesos fisiológicos interactuando entre sí.

ROJAS y RAMIREZ (1975) señala que algunos reguladores pueden ser estimulantes a bajas dosis o inhibitorias a dosis altas; el umbral depende de especie de la planta. Todo esto dificulta la aplicación de un criterio.

Las concentraciones altas pueden producir anomalías en la formación de raíces y necrosis de los tejidos, observaciones de concentraciones altas de auxinas atrofian el crecimiento de raíces adventicias.

LEOPOLD y KRIEDEMANN (1977) mencionan que actualmente se reconocen cinco tipos básicos de sistemas químicos de reguladores de crecimiento vegetal, divididos en tres grupos principales:

- a). Promotores del crecimiento: Auxinas, Citokininas y Giberelinas.
- b). Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico.
- c). Etileno.

PIERIK (1990) indica que en el cultivo *In Vitro* de plantas superiores, los reguladores especialmente las auxinas y citokininas, juegan un papel muy importante. Se puede decir que el cultivo *In Vitro* es generalmente imposible sin reguladores. Si a un medio nutritivo se le debe añadir una auxina o una citokinina, para conseguir la extensión y/o la división celular, es algo que depende del tipo de explante y de la especie vegetal.

2.3.4. Las auxinas

BIDWELL (1979) manifiesta que el término auxina (del griego auxein, incrementar), fue utilizado por primera vez por Fritz Went, en Holanda en 1920, quien efectuó experimentos que probaron definitivamente la existencia de una sustancia difusible que estimula el alargamiento celular, en la década de 1930 se conoció la estructura y la identidad de la auxina: el ácido indolacético. Las actividades de las auxinas influyen tanto, estimulación como inhibición del crecimiento y la misma célula o estructura puede exhibir respuesta opuesta dependiendo de la concentración.

ROCA y MROGINSKI (1991) indica que se sintetiza principalmente en el ápice del tallo y ramas jóvenes, en las yemas y hojas y en general en los meristemas. Comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular, sin embargo se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos (ROJAS y RAMÍREZ 1993).

BEAULIEU (1973) indica que existen numerosas sustancias auxínicas pero tres han tomado gran importancia en lo que concierne al enraizamiento:

- El AIA (ácido indolacético).
- El AIB (ácido Índolbutírico).

- El ANA (ácido naftalenacético).

El AIB (ácido Índolbutírico), en su forma sintética es considerado como uno de los mejores productos para aumentar el enraizamiento en un gran número de especies; su actividad auxínica es débil y los sistemas de enzimas destructoras de auxinas lo destruyen relativamente lento, resulta muy eficaz como estimulante de las raíces, debido a que se desplaza muy poco y se retiene cerca del sitio de aplicación; su molécula es más estable y menos soluble, pasa menos rápido en los tejidos de la planta y permanece más tiempo en el punto de aplicación, produce un sistema de raíces más fuertes y fibrosas.

HARTMANN y KESTER (1990) mencionan que el ácido indolbutírico ha sido identificado como un producto natural en la cáscara de la patata hace 40 años, todavía es referido como una auxina sintética. Este ácido es comúnmente utilizado para promover la iniciación radicular tanto *In Vitro* como *Ex Vitro*.

BEAULIEU (1973) manifiesta que el ANA (ácido naftalenacético) es de un empleo más delicado, porque el margen entre el umbral de su actividad y el umbral de su toxicidad es muy pequeño; es mucho más activo pero mucho más fitotóxico; ocasiona usualmente el desarrollo de raíces cortas y gruesas. Deben evitarse las concentraciones excesivas con ANA por el peligro de provocar daños en las plantas; al usarlo en concentraciones muy altas tienden a producir raíces gruesas y atrofiadas.

SERRANO y PINOLL (1991) indican que todas las formas de crecimiento de la raíz inicial o en longitud, o en la forma de raíces cortas y gruesas, se desarrollan por un tratamiento hormonal apropiado. Muchas especies requieren las auxinas más fuertes como AIB o ANA para estimular la formación de raíces.

BEAULIEU (1973) menciona que una mezcla de hormonas ha tenido éxito donde, las hormonas empleadas solas no han dado más que poco o ningún resultado; ANA y AIB, no tienen la misma acción sobre la rizogénesis y la causa radica en las prioridades secundarias de su molécula: facilidad de penetración y rapidez de conducción dentro de la planta.

DELGADO y ROJAS (1999) mencionan que la utilización de auxinas utilizadas en cultivo de tejidos es variable. Por lo general el ANA es utilizado entre 1 – 10 mg/. Con un óptimo de 2 mg/L.

DEVLIN (1980) señala que las bases fisiológicas para la iniciación de los primordios radicales parecen estar correlacionados con el nivel de auxina y otros constituyentes. En algunos casos se ha observado que concentraciones relativamente altas de auxina podrían estar relacionadas con deficiencias en la absorción, transporte o modo de acumulación de la auxina o un proceso rápido de cambios metabólicos hacia compuestos no auxínicos

Hay evidencias substanciales que indican que la luz modifica los niveles endógenos de las hormonas o alteran la sensibilidad de las células a

éstas; el ácido naftalenacético y el ácido indolbutírico son completamente activos en tejidos irradiados.

La auxina (ANA) causa la inhibición del potencial caulogénico de los meristemas a concentraciones altas (TREWARRAS, 1991)

2.9. Cultivo *In Vitro* en leñosas

DAQUINTA *et al.* (2005) manifiesta que se estableció una metodología para la micropropagación de la Teca (*Tectona grandis* .L) que consiste:

- Realizar la desinfección, de los brotes epicórmicos, con HgCl_2 a 0.25% durante 10 minutos.
- Implantar los ápices de los brotes epicórmicos en medio MS suplementado con 0.5 mg/L de BAP.
- Utilizar el medio MS suplementado con 1 mg/L de BAP para la multiplicación de segmentos provenientes de plántulas obtenidas de semillas y para los segmentos de árboles adultos, enriquecer este medio con 0.5 mg/L de Kinetina.
- Realizar el enraizamiento directamente *Ex Vitro*, bajo condiciones

Controladas, con polvos enraizadores a 1000 mg/L de ANA y 1000 mg/L de AIB.

DAQUINTA *et al.* (2005) asimismo manifiesta que se estableció una metodología para la micropropagación del Cedro (*Cedrela odorata*) y la Caoba (*Swietenia macrophylla* King) híbrida a partir de semillas de árboles seleccionados, la cual consta de los siguientes pasos.

- Realizar la desinfección de las semillas de cedro y caoba con HgCl_2 a 0.25% durante 5 minutos.
- La multiplicación de los brotes se realiza en medio de cultivo MS Suplementado con 0.25 mg/L de BAP.
- El enraizamiento de los brotes se logró con 0.5 mg/L de AIB.

TACORONTE *et al.* (2004) planteó la propagación en masa por cultivo *In Vitro* de la Caoba (*Swietenia macrophylla* King) para ello cultivaron segmentos nodales con un solo nudo, se extrajeron de plántulas de 4 semanas obtenidas por germinación *In Vitro* en medio MS a la mitad de su fuerza iónica, complementado con diferentes relaciones de ácido naftalenacético (ANA) y 6-benciladenina (BA), en un rango de 0-3 mg/L para ambas hormonas. Las condiciones de cultivo fueron 25 °C, 16 h de luz y 40-45 μmoles . La superficie de respuesta resultante muestra un óptimo de alargamiento de yemas laterales en una relación 0,38 mg/L de ANA y 1,94 mg/L de BA. No hubo diferencias significativas en los vástagos de caoba cultivados en los diferentes medios de

enraizamiento estudiados. El mayor porcentaje de brotes (100%) y vástagos (95,83) fue en la relación 0 mg/L de ANA y 1,5 mg/ L BA.

SUÁREZ *et al.* (2006) indican que utilizaron brotes axilares del Roble (*Tabebuia rosea*) con el fin de producir masivamente clones de ésta especie y establecer las mejores condiciones para la multiplicación, se utilizó el medio MS/2 de establecimiento, y 0.00, 2.22, 4.44, 8.88, 17.76 μM de BAP con 0.00, 1.35, 2.69, 4.03 y 5.37 μM de ANA en el enraizamiento *In Vitro* de los brotes micropropagados, obteniendo la mejor tasa de multiplicación con 17.76 μM BAP mientras que el mayor enraizamiento ocurrió en presencia de 5.37 μM ANA. El enraizamiento *In Vitro* fue necesario para la recuperación de plantas *Ex Vitro* donde se debe seguir trabajando para aumentar los porcentajes de recuperación mostrados.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

Este trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Microbiología General de la Facultad de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, Departamento de Huanuco, entre los meses de Noviembre del 2006 a Mayo del 2007.

3.2. Obtención de las muestras

Las muestras procesadas se obtuvieron a partir de individuos de *Croton lechleri* Muell Arg, obtenidos de regeneración natural en la zona de Tulumayo, de los cuales se obtuvo 200 explantes.

3.2.1. Elección del explante

Para la obtención de yemas, los explantes se eligieron teniendo en cuenta lo siguiente:

- libres de enfermedades o daños por insectos.
- buenas características físicas.

3.2.2. Extracción

Una vez elegido el explante se procedió a su extracción haciendo un corte con una tijera curva estéril, luego se procedió a cortar pequeños esquejes con una yema y colocados dentro de un frasco con suero fisiológico y se trasladaron al laboratorio.

3.2.3. Lavado

Una vez en el laboratorio se retiraron los esquejes del frasco y se sumergieron en agua destilada estéril para enjuagarlos.

3.3. Material en estudio

El material vegetal en estudio estuvo constituido por 144 yemas de *Croton lechleri* Muell Arg, provenientes de los esquejes procesados.

3.4. Medio de cultivo

Se utilizó el medio Murashige & Skoog (MS) adicionado con Sacarosa y Agar (Fitogel). La formulación del medio esta especificado en el Cuadro 1 del Anexo A se preparó como a continuación se indica:

- El medio deshidratado contenido en sobres de aluminio de 4.4 g, se vertieron en matraces de 1 litro de capacidad.
- Se adicionó 20 g/L de sacarosa y 6 g/L de agar (Fitogel).
- Se agregaron 600 mL de agua destilada, poniendo esta solución en Termorregulador de Agua (Baño María) para disolver, una vez disuelto se agregó 400 mL de agua destilada.
- Se prepararon 5 litros de medio de cultivo MS.
- Se esterilizaron los medios en autoclave a 121°C a 15 libras por pulgada cuadrada (15 psi) por 15 minutos, para posteriormente una vez estériles adicionar 100 mg/L de Ceftriaxona, 100 mg/L de Ketoconazol y 50 mg/L de Benlate y dispensar 30 mL en tubos de ensayo.
- Los tubos de ensayo conteniendo el medio se colocaron en gradillas de madera y guardados en la refrigeradora entre 4°C a 8°C.

3.5. Preparación de material

El material de vidrio como tubos y cajas petri, instrumentos y otros implementos se esterilizaron en autoclave y posteriormente se llevaron a 120°C por 20 minutos para el secado.

3.6. Etapa de desinfección

3.6.1. Operaciones previas

Se desinfectó la mesa y las paredes de la cámara con etanol 70 % igualmente se desinfectó la parte externa de los recipientes que contienen los medios de cultivo o el agua estéril, antes de introducirlos en la cámara.

Las manos y los antebrazos del operador se desinfectaron con etanol 70%, al igual se utilizaron mascarillas y guantes para reducir la contaminación al operar dentro de la cámara de aire estéril.

Las pinzas y el asa de siembra se sumergieron previamente en etanol 70% y luego flameadas al mechero a gas; se utilizaron como soporte para las disecciones de los esquejes placas petri de 60 x 200 mm esterilizados.

3.6.2. Proceso de desinfección

Para la eliminación de residuos y de microorganismos contaminantes presentes sobre las yemas que se procedió a la desinfección de las mismas de la siguiente manera:

- Se introdujeron las yemas en un recipiente conteniendo alcohol etílico 70 % por espacio de 1 minuto.
- Luego con la ayuda de una pinza recta de 6", se llevaron los explantes a recipientes con las siguientes 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 utilizada.
- Trascurrido los tiempos ensayados, los explantes se enjuagaron por tres veces en agua destilada estéril.
- Luego se depositaron en tubos de 20 x 200 mm conteniendo el medio Murashige y Skoog (MS), adicionado con sacarosa (20g/L) y agar (6g/L).

Todo el procedimiento se indica en el flujograma de la Figura 1.

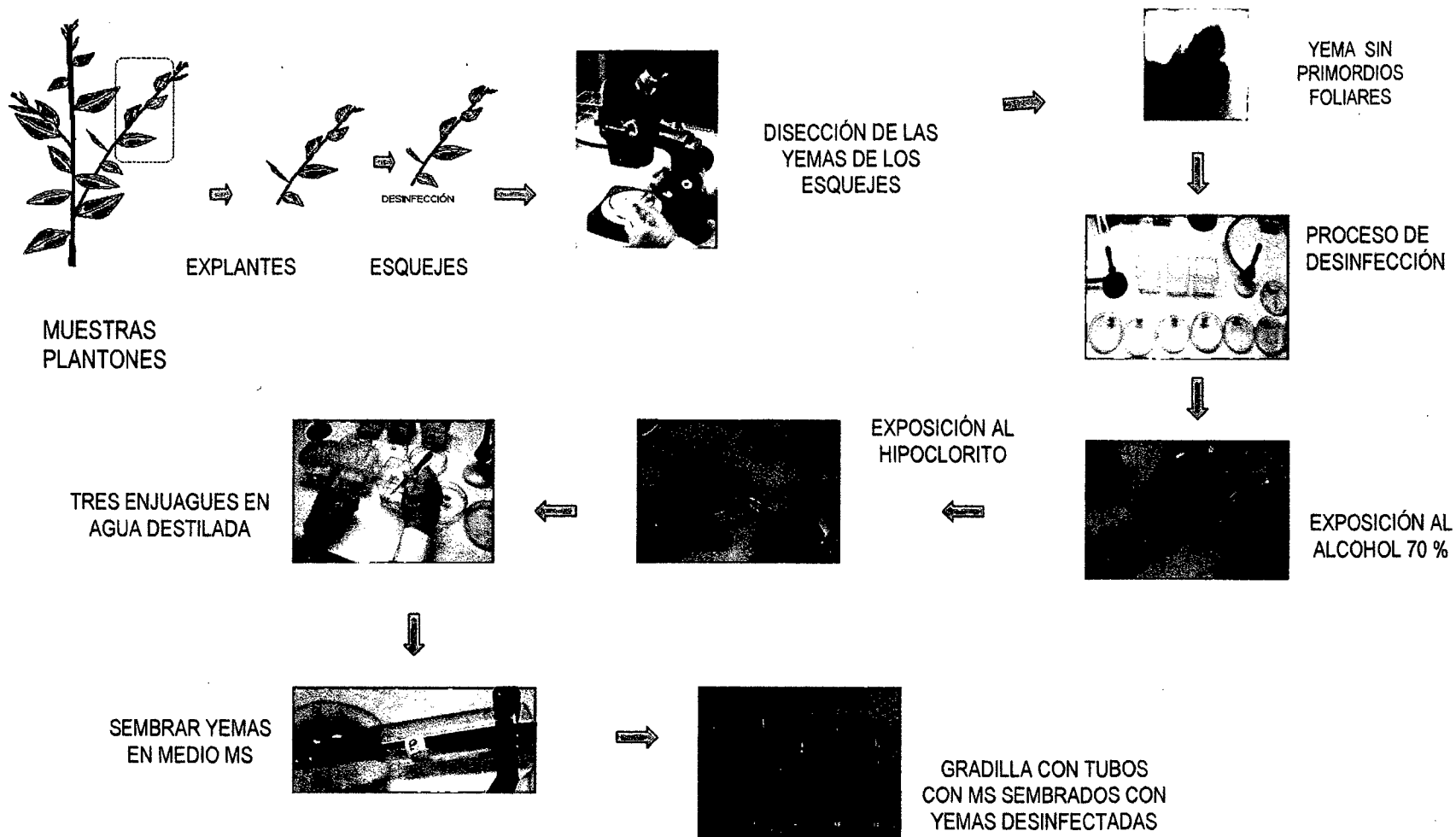


Figura 1. Flujograma del proceso de desinfección en la Fase I de la Micropropagación de *Croton lechleri* Muell Arg.

3.7. Fase de Crecimiento

3.7.1. Preparación de reguladores de crecimiento

Se prepararon en matraces de 500 mL, soluciones madres (Solución Stock) de Acido Naftalenacético (ANA) y de Bencilaminopurina (BAP) en concentraciones de 500 mg/250 mL cada una adicionados con KOH 1N y HCl 1N respectivamente para ayudar a la disolución de los reguladores de crecimiento.

Se utilizaron diferentes volúmenes para cada uno de las concentraciones tomadas a partir de las soluciones shocks preparados (cuadro 2, anexo A)

3.7.2. Repique de los explantes

Una vez que los explantes superaron la fase de desinfección, fueron repicados con ayuda de una pinza recta de 6" en tubos de ensayos 20 x 200 mm conteniendo el medio Murashige y Skoog mas sacarosa (20g/L) y agar (6g/L) adicionado con las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, Acido Naftalenacético (ANA) y Bencilaminopurina (BAP), sembrándose un explante por tubo con tres repeticiones por tratamiento (Cuadro 4).

Después de la siembra los tubos fueron sellados utilizando parafilm para asegurar la esterilidad dentro del tubo.

Se colocaron las gradillas con los tubos sembrados en andamio proveído con iluminación (fluorescentes de 40 Watts) considerando un foto período de 16/8 (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad), un sistema de aire acondicionado, con una humedad relativa de 65 % y 24 °C.

Se evaluó el crecimiento de los explantes cada 72 horas.

3.8. Tratamientos del estudio

3.8.1. Fase de desinfección (Fase I):

- **Desinfectantes: Factor (A)**

- Hipoclorito de calcio +Tween 80%

- Hipoclorito de sodio +Tween 80%

- **Concentraciones: Factor (B)**

- Hipoclorito de calcio al 2%, 2.5%, 3 %, 3.5%, 4%, 5%

- Hipoclorito de sodio al 2%, 2.5%, 3 %, 3.5%, 4%, 5%

- **Tiempos: Factor (C)**

- 5', 10', 15', 20' minutos

- Tratamientos

Los tratamientos de la asociación de hipoclorito de calcio en diferentes concentraciones y diferentes tiempos, fueron veinticuatro (cuadro 2)

Cuadro 2. Tratamientos a ensayar en la fase desinfección de explantes con hipoclorito de calcio.

Tratamiento	Clave	Descripción
T1	a1b1	Hipoclorito de calcio 2% + 5'
T2	a1b2	Hipoclorito de calcio 2% + 10'
T3	a1b3	Hipoclorito de calcio 2% + 15'
T4	a1b4	Hipoclorito de calcio 2% + 20'
T5	a2b1	Hipoclorito de calcio 2.5% + 5'
T6	a2b2	Hipoclorito de calcio 2.5% +10'
T7	a2b3	Hipoclorito de calcio 2.5% + 15'
T8	a2b4	Hipoclorito de calcio 2.5% + 20'
T9	a3b1	Hipoclorito de calcio 3% + 5'
T10	a3b2	Hipoclorito de calcio 3% + 10'
T11	a3b3	Hipoclorito de calcio 3% + 15'
T12	a3b4	Hipoclorito de calcio 3% + 20'
T13	a4b1	Hipoclorito de calcio 3.5% + 5'
T14	a4b2	Hipoclorito de calcio 3.5% + 10'

T15	a4b3	Hipoclorito de calcio 3.5%	+ 15'
T16	a4b4	Hipoclorito de calcio 3.5%	+ 20'
T17	a5b1	Hipoclorito de calcio 4%	+ 5'
T18	a5b2	Hipoclorito de calcio 4%	+ 10'
T19	a5b3	Hipoclorito de calcio 4%	+ 15'
T20	a5b4	Hipoclorito de calcio 4%	+ 20'
T21	a6b1	Hipoclorito de calcio 5%	+ 5'
T22	a6b2	Hipoclorito de calcio 5%	+ 10'
T23	a6b3	Hipoclorito de calcio 5%	+ 15'
T24	a6b4	Hipoclorito de calcio 5%	+ 20'

- Medio de cultivo: Murashige & Skoog (MS) 1962(4.4g/L)

- Otros agregados: 20g/ L de azúcar, 06g/L de agar, pH: 5,8

Los tratamientos realizados para la prueba de desinfección con hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones y diferentes tiempos de exposición, fueron veinticuatro (cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos a ensayar en la fase desinfección de explantes con hipoclorito de sodio.

Tratamiento	Clave	Descripción
T1	a1b1	Hipoclorito de sodio 2% + 5'
T2	a1b2	Hipoclorito de sodio 2% + 10'
T3	a1b3	Hipoclorito de sodio 2% + 15'
T4	a1b4	Hipoclorito de sodio 2% + 20'
T5	a2b1	Hipoclorito de sodio 2.5% + 5'
T6	a2b2	Hipoclorito de sodio 2.5% + 10'
T7	a2b3	Hipoclorito de sodio 2.5% + 15'
T8	a2b4	Hipoclorito de sodio 2.5% + 20'
T9	a3b1	Hipoclorito de sodio 3% + 5'
T10	a3b2	Hipoclorito de sodio 3% + 10'
T11	a3b3	Hipoclorito de sodio 3% + 15'
T12	a3b4	Hipoclorito de sodio 3% + 20'
T13	a4b1	Hipoclorito de sodio 3.5% + 5'
T14	a4b2	Hipoclorito de sodio 3.5% + 10'
T15	a4b3	Hipoclorito de sodio 3.5% + 15'
T16	a4b4	Hipoclorito de sodio 3.5% + 20'
T17	a5b1	Hipoclorito de sodio 4% + 5'
T18	a5b2	Hipoclorito de sodio 4% + 10'
T19	a5b3	Hipoclorito de sodio 4% + 15'

T20	a5b4	Hipoclorito de sodio 4%	+ 20'
T21	a6b1	Hipoclorito de sodio 5%	+ 5'
T22	a6b2	Hipoclorito de sodio 5%	+ 10'
T23	a6b3	Hipoclorito de sodio 5%	+ 15'
T24	a6b4	Hipoclorito de sodio 5%	+ 20'

- Medio de cultivo: Murashige & Skoog (MS) 1962(4.4g/L)

- Otros agregados: 20g/ L de azúcar, 06g/L de agar; pH: 5,8

3.8.2. Fase de crecimiento (Fase II)

Se utilizaron Ácido Naftalenacético (ANA) y Bencilaminopurina (BAP) como reguladores de crecimiento en las siguientes concentraciones:

- **Ácido naftalenacético (ANA): Factor A**

a₁ = 0,1 mg/L

a₂ = 0.4 mg/L

a₃ = 0.8 mg/L

a₄ = 1.2 mg/L

- **Bencilaminopurina (BAP): Factor B**

b₁ = 0,5 mg/L

b₂ = 0,8 mg/L

b₃ = 1,1 mg/L

b₄ = 1,4 mg/L

- Tratamientos en estudio

La combinación de las concentraciones de los factores antes mencionados dio lugar a los tratamientos que se indican en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Tratamientos a ensayar en la fase de crecimiento

Tratamiento	Clave	ANA(A)₁ (mg/L)	BAP(B)₂ (mg/L)
T1	a1b1	0,1	+ 0,5
T2	a1b2	0,1	+ 0,8
T3	a1b3	0,1	+ 1,1
T4	a1b4	0,1	+ 1,4
T5	a2b1	0,4	+ 0,5
T6	a2b2	0,4	+ 0,8
T7	a2b3	0,4	+ 1,1
T8	a2b4	0,4	+ 1,4
T9	a3b1	0,8	+ 0,5
T10	a3b2	0,8	+ 0,8
T11	a3b3	0,8	+ 1,1
T12	a3b4	0,8	+ 1,4
T13	a4b1	1,2	+ 0,5
T14	a4b2	1,2	+ 0,8

T15	a4b3	1,2	+	1,1
T16	a4b4	1,2	+	1,4

1: Ácido naftalenacético

2: Bencilaminopurina

- Medio de cultivo: Murashige & Skoog (MS)

- Otros agregados: 20g/L de azúcar, 6g/L de agar; pH: 5,8

3.9. Diseño experimental

El trabajo se adecuó a un diseño completamente al azar, con arreglo factorial 2A x 6B x 4C con 3 repeticiones por tratamiento para la fase de desinfección (Fase I), y arreglo factorial 4A x 4B con 3 repeticiones por tratamiento para la fase de crecimiento (Fase II).

IV. RESULTADOS

4.1. Etapa de desinfección (I)

Luego del procesamiento de las yemas frente a la solución deshidratante y desinfectante se les trasladó a tres series de tubos con el medio Murashige y Skoog (MS) (Cuadro 5).

De similar manera, las yemas desinfectadas en hipoclorito de sodio (NaOCl) en seis diferentes concentraciones y cuatro distintos tiempos sembradas en tres series de tubos conteniendo medio Murashige y Skoog, dieron los resultados (Cuadro 6).

Cuadro 5. Resultado porcentual de yemas desinfectadas con hipoclorito de calcio en los tratamientos aplicados.

Tratamientos	Descripción	Clave	R1	R2	R3	Yemas	% de Yemas
						Desinfectadas	Desinfectadas
T1	2% + 5'	a1b1	0	0	1	1	33.33%
T2	2% + 10'	a1b2	1	0	0	1	33.33%
T3	2% + 15'	a1b3	0	0	1	1	33.33%
T4	2% + 20'	a1b4	0	0	1	1	33.33%
T5	2.5% + 5'	a2b1	0	1	0	1	33.33%
T6	2.5% + 10'	a2b2	0	1	1	2	33.33%
T7	2.5% + 15'	a2b3	0	1	1	2	66.67%
T8	2.5% + 20'	a2b4	0	1	1	2	66.67%
T9	3% + 5'	a3b1	1	0	1	2	66.67%
T10	3% + 10'	a3b2	0	1	1	2	66.67%
T11	3% + 15'	a3b3	0	1	1	2	66.67%
T12	3% + 20'	a3b4	0	1	1	2	66.67%
T13	3.5% + 5'	a4b1	1	1	1	3	100%
T14	3.5% + 10'	a4b2	1	1	1	3	100%
T15	3.5% + 15'	a4b3	1	1	1	3	100%
T16	3.5% + 20'	a4b4	1	1	1	3	100%
T17	4% + 5'	a5b1	1	1	1	3	100%
T18	4% + 10'	a5b2	1	1	1	3	100%
T19	4% + 15'	a5b3	1	1	1	3	100%
T20	4% + 20'	a5b4	1	1	1	3	100%
T21	5% + 5'	a6b1	1	1	1	3	100%
T22	5% + 10'	a6b2	1	1	1	3	100%
T23	5% + 15'	a6b3	1	1	1	3	100%
T24	5% + 20'	a6b4	1	1	1	3	100%

a = concentraciones de hipoclorito de calcio

b = tiempo de desinfección

Cuadro 6. Resultado Porcentual de yemas desinfectadas con hipoclorito de sodio en los tratamientos aplicados.

Tratamientos	Descripción	Clave	R1	R2	R3	Yemas	% de Yemas
						Desinfectadas	Desinfectadas
T1	2% + 5'	a1b1	0	0	1	1	33.33%
T2	2% + 10'	a1b2	1	0	0	1	33.33%
T3	2% + 15'	a1b3	0	1	1	2	66.67%
T4	2% + 20'	a1b4	1	0	1	2	66.67%
T5	2.5% + 5'	a2b1	0	1	1	2	66.67%
T6	2.5% + 10'	a2b2	1	0	1	2	66.67%
T7	2.5% + 15'	a2b3	0	1	1	2	66.67%
T8	2.5% + 20'	a2b4	0	1	1	2	66.67%
T9	3% + 5'	a3b1	1	0	1	2	66.67%
T10	3% + 10'	a3b2	0	1	1	2	66.67%
T11	3% + 15'	a3b3	1	1	1	3	100%
T12	3% + 20'	a3b4	1	1	1	3	100%
T13	3.5% + 5'	a4b1	1	1	1	3	100%
T14	3.5% + 10'	a4b2	1	1	1	3	100%
T15	3.5% + 15'	a4b3	1	1	1	3	100%
T16	3.5% + 20'	a4b4	1	1	1	3	100%
T17	4% + 5'	a5b1	1	1	1	3	100%
T18	4% + 10'	a5b2	1	1	1	3	100%
T19	4% + 15'	a5b3	1	1	1	3	100%
T20	4% + 20'	a5b4	1	1	1	3	100%
T21	5% + 5'	a6b1	1	1	1	3	100%
T22	5% + 10'	a6b2	1	1	1	3	100%
T23	5% + 15'	a6b3	1	1	1	3	100%
T24	5% + 20'	a6b4	1	1	1	3	100%

a = concentraciones de hipoclorito de sodio

b = tiempo de desinfección

1.2. Ajuste estadístico de la etapa de desinfección

Del análisis de variancia para la variable desinfección se deduce que existe significación estadística para el efecto de los químicos, al igual que para el efecto de concentraciones, sin embargo para el efecto tiempo y para las interacciones químico:concentraciones:tiempo no existe significación estadística (Cuadro 7). Se calculó el coeficiente de variabilidad en 12.36%.

Cuadro 7. Análisis de varianza para la variable desinfectados

Fuente	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Sig
Químico	1	1.021	1.021	11.66	*
Concentración	5	22.604	4.52	51.66	*
Tiempo	3	0.563	0.188	2.143	NS
Químico * Concen	5	1.104	2.524	2.524	NS
Químico * Tiempo	3	0.062	0.021	0.238	NS
Concen * Tiempo	15	0.813	0.054	0.619	NS
Error	15	1.313	0.088	—	—
Total	47				

NS = no significativo

* = significativo a un nivel de 5% de probabilidad

La prueba según Duncan (Cuadro 8) permite verificar que existen diferencias estadísticas entre las concentraciones de desinfectantes, siendo las concentraciones 5%, 4%, 3.5% que mejores efectos de desinfección causaron en los explantes, superando estadísticamente a las concentraciones 3%, 2.5%, 2%; que tuvieron menores efectos de desinfección.

Cuadro 8. Prueba de significación de Duncan para el efecto principal de la concentración en la desinfección.

Concentración	Promedios	Significación			
		1	2	3	4
5%	3,00	a			
4%	3,00	a			
3.5%	3,00	a			
3%	2,38		b		
2.5%	1,75			c	
2%	1,25				d

Con respecto a la prueba según Duncan para el efecto principal tiempo en la desinfección, se establecen que en los tiempos de desinfección, no hay diferencia y el efecto de todos los tiempos son iguales (Cuadro 9).

Cuadro 9. Prueba de significación de Duncan para el efecto principal del tiempo en la desinfección.

Tiempo	Promedios	Significación
		1
5'	2.25	a
10'	2.33	a
15'	2.50	a
20'	2.50	a

El efecto de la acción del hipoclorito de calcio $[\text{Ca}(\text{OCl})_2]$ e hipoclorito de sodio (NaOCl) a seis concentraciones y cuatro tiempos de exposición (Figura 2 y 3).

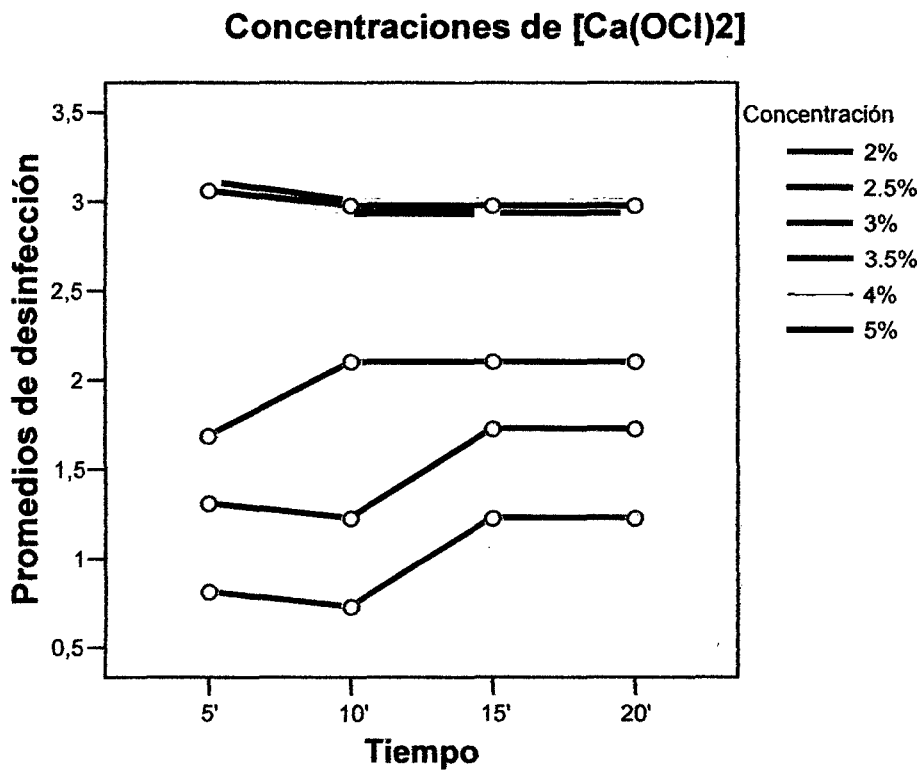


Figura 2. Efecto de la desinfección con hipoclorito de calcio $[\text{Ca}(\text{OCI})_2]$ a seis concentraciones y cuatro tiempos.

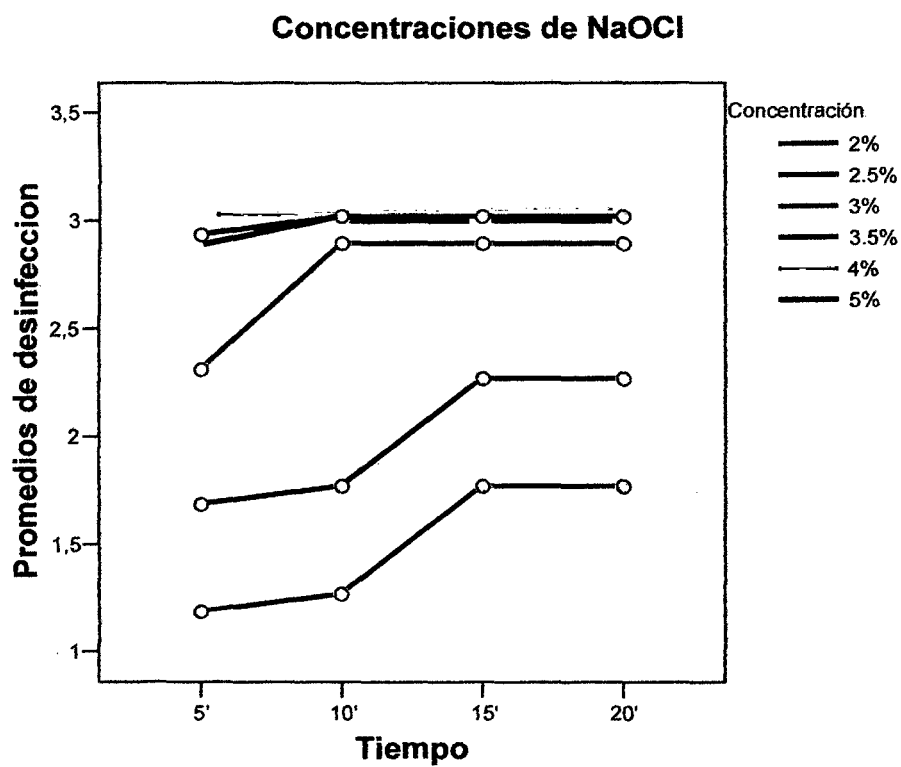


Figura 3. Efecto de la desinfección con hipoclorito de calcio NaOCl a seis concentraciones y cuatro tiempos.

4.4. Fase de crecimiento

El crecimiento propagativo en callo se verificó luego del procedimiento de repique en medio de Murashige y Skoog adicionado con hormonas BAP y ANA, y con un fotoperíodo de 16/8 horas con una iluminación de 290 lux, para las tres series de recipientes de cultivo según los tratamientos realizados (Cuadro 10).

Cuadro 10. Diferenciación morfológica en callos expresada en diámetro (mm) en la etapa de crecimiento.

Tratamientos	Descripción	Clave	Diámetro de callos en (mm)		
			Rep 1	Rep 2	Rep 3
T1	0.1 + 0.5	a1b1	0.29	0.33	0.31
T2	0.1 + 0.8	a1b2	0.18	0.21	0.19
T3	0.1 + 1.1	a1b3	0.36	0.21	0.29
T4	0.1 + 1.2	a1b4	0.39	0.33	0.28
T5	0.4 + 0.5	a2b1	0.19	0.22	0.20
T6	0.4 + 0.8	a2b2	0.28	0.47	0.32
T7	0.4 + 1.1	a2b3	0.36	0.53	0.76
T8	0.4 + 1.2	a2b4	0.47	0.52	0.42
T9	0.8 + 0.5	a3b1	0.23	0.25	0.22
T10	0.8 + 0.8	a3b2	0.28	0.30	0.29
T11	0.8 + 1.1	a3b3	1.22	0.88	0.97
T12	0.8 + 1.2	a3b4	0.32	0.29	0.45
T13	1.2 + 0.5	a4b1	0.61	0.63	0.62
T14	1.2 + 0.8	a4b2	1.06	0.94	1.00
T15	1.2 + 1.1	a4b3	0.85	1.05	0.97
T16	1.2 + 1.2	a4b4	0.75	0.68	0.53

a = concentraciones de ácido naftalenacético. b = concentraciones de bencilaminopurina.

Del análisis de variancia para la variable diámetro de yemas, se deduce que existe significación estadística para el efecto de concentraciones del bencilaminopurina (BAP), para el efecto de las concentraciones de ácido naftalenacético (ANA), así como para la interacción BAP x ANA existe significación estadística. Se encontró un coeficiente de variabilidad de 10.6% (Cuadro 11).

Cuadro 11. Análisis de varianza para la variable diámetro de yemas.

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F	Significación
ANA	3	2.116	0.705	229.24	*
BAP	3	0.711	0.237	77.029	*
BAP * ANA	9	1.154	0.128	41.678	*
Error	32	0.098	0.003		
Total	47	4.142			

* = significativo a un nivel de 5% de probabilidad

De la misma manera existen diferencias estadísticas entre las concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) (Cuadro 12) siendo la concentración [1.2] la que mejor efecto causó en el crecimiento en diámetro de las yemas, en promedio, superando estadísticamente a las concentraciones [0.8],[0.1],[0.4], mientras que la concentración [0.4] es el que obtuvo menor diámetros de yemas en promedio.

Cuadro 12. Prueba de significación de Duncan para el efecto principal de concentraciones del ácido naftalenacético (ANA) correspondiente al diámetro de yemas.

Concentración	Promedios	Significación			
		1	2	3	4
[1.2]	0.855	a			
[0.8]	0.486		b		
[0.1]	0.424			c	
[0.4]	0.280				d

Con los resultados de la prueba según Duncan anotadas existen diferencias estadísticas entre las concentraciones de bencilaminopurina (BAP), siendo la concentración [1.1] el que mejor efecto causó en el diámetro de las yemas en promedio, superando estadísticamente a las concentraciones [1.4],[0.8],[0.5], mientras que la concentración [0.5] es el que obtuvo menor diámetros de yemas en promedio (Cuadro 13).

Cuadro 13. Prueba de significación de Duncan para el efecto principal de concentraciones de bencilaminopurina (BAP) correspondiente al diámetro de yemas.

Concentración	Promedios	Significación			
		1	2	3	4
[1.1]	0.672	a			
[1.4]	0.555		b		
[0.8]	0.498			c	
[0.5]	0.336				d

El efecto de la interacción de las dosis de bencilaminopurina (BAP) con el ácido naftalenacético (ANA) sobre el diámetro del crecimiento en promedio de las yemas (Figura 4).

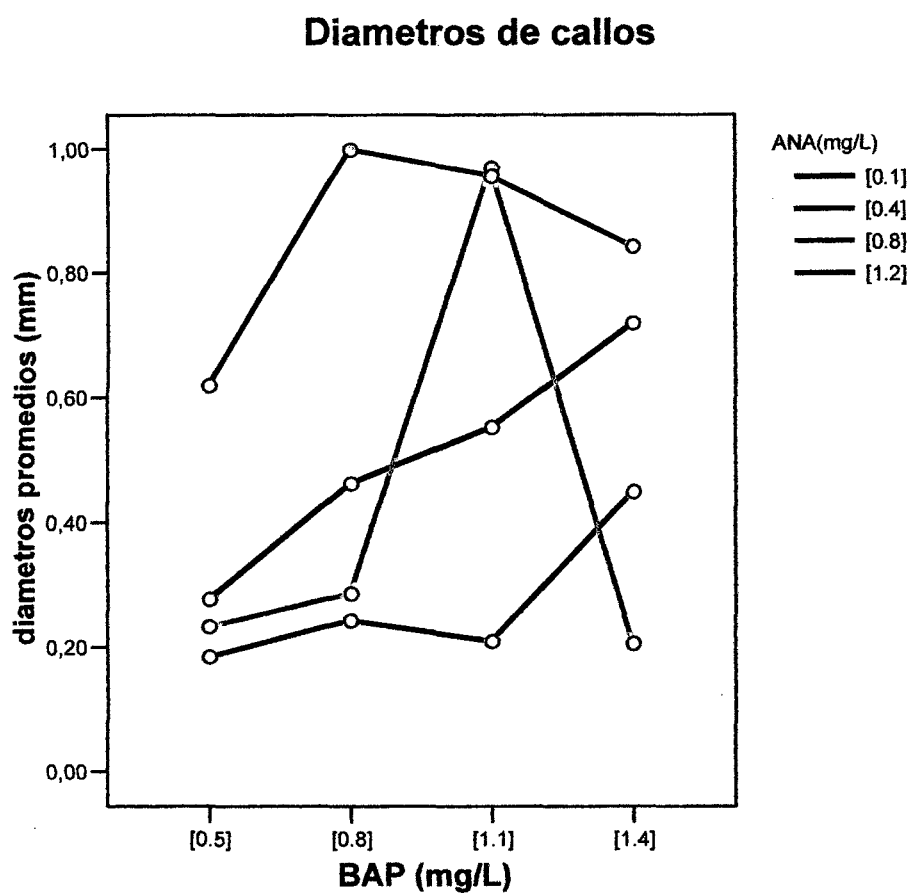


Figura 4. Efecto de la interacción de las dosis de bencilaminopurina (BAP) con el ácido naftalenacético (ANA) sobre el diámetro de las yemas.

V. DISCUSIÓN

5.1. Fase de desinfección

Los resultados registrados muestran que la acción de las concentraciones de hipoclorito de calcio $[Ca(OCl)_2]$ e hipoclorito de sodio (NaOCl) fue variada, posiblemente debido a que la especie en estudio es leñosa y asimismo al tipo de microorganismos adsorbidos en ella (Cuadro 5 y 5), lo expresado concuerda con lo indicado por DOMINGEZ (1986) quién manifiesta que las mayores dificultades en lo referente a desinfección han sido afrontados con material vegetal de este tipo de especies, demostrando que la manera en que los desinfectantes ejercen sus actividades microbicidas, varían con el tipo de componente o compuesto, y por las características morfológicas, culturales y metabólicas de los microorganismos lo tanto es importante encontrar el equilibrio entre la concentración-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 máxima supervivencia de los tejidos, tal como lo consideran DELGADO y ROJAS (1999).

Estadísticamente en el análisis de varianza (ANVA) se puede confirmar que la desinfección de yemas presentaron diferentes comportamientos frente a los químicos, según lo discutido en el párrafo anterior (Cuadro 7).

Las concentraciones 5%, 4% y 3.5% fueron las que presentaron el mayor efecto de desinfección y además, estadísticamente iguales (Cuadro 8). Los resultados obtenidos se asemejan a lo reportado por GONZALES (1989) quién manifiesta que las yemas de *Eucalyptus globulus* fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de calcio al 3.5 % adicionando Tween 80% durante 10 minutos. Asimismo existe similitud con lo reportado SUÁREZ *et al.* (2006), quienes en la producción de clones a partir de brotes del roble colombiano o tahuari (*Tabebuia rosea*) desinfectaron con hipoclorito de sodio al 4% durante 10 minutos. Igualmente, Bhojwani y Razdan (1990) citado por DELGADO y ROJAS (1999), indican que se puede utilizar al hipoclorito de sodio en una concentración de 0.5 – 5 % por 5 a 30 minutos, y asimismo a hipoclorito de calcio en una concentración de 5 – 10 % por el mismo tiempo.

Refiriéndonos a los tiempos de exposición utilizados en la desinfección, los resultados manifiestan que estos estarían en relación al incremento del nivel de concentración de los químicos (Figuras 1 y 2), que los tratamientos 20, 15 y 10 minutos presentan mayor número de desinfección de yemas en las concentraciones 5%, 4% y 3.5%, de hipoclorito de calcio y sodio,

mientras que en 5 minutos de exposición la desinfección fue menor, tanto en las diferentes concentraciones de hipoclorito de calcio y sodio, sin ser estadísticamente inferior por ser pequeña la diferencia, no obstante los tiempos de exposición en los cuáles se incrementó la desinfección no son significativos (Cuadro 7) siendo todos estadísticamente iguales (Cuadro 9).

5.2. Fase de crecimiento

Según los resultados de esta etapa, los diferentes comportamientos observados en el crecimiento de las yemas a tejido indiferenciado (callo), han estado influenciados por el efecto individual de ácido naftalenacético (ANA) y de bencilaminopurina (BAP) como también de la interacción de ambos reguladores de crecimiento, siendo estas combinaciones responsables del crecimiento estadísticamente diferentes (Cuadro 11).

La utilización de las hormonas y su efecto sobre el desarrollo o producción de tejido vegetal se fundamenta en lo argumentado por HURTADO y MERINO (1987), quienes indican que los reguladores del crecimiento son compuestos orgánicos que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en los vegetales. Asimismo DEVLIN (1980) menciona que el desarrollo de los vegetales tanto en crecimiento y diferenciación de órganos es regulado por la acción de reguladores del crecimiento, que activan o deprimen determinados procesos fisiológicos interactuando entre sí.

Con respecto a la obtención sólo de callos y pequeños brotes debemos considerar que la proliferación precoz de tejidos o morfogénesis, que no es más que la iniciación de la forma del tejido en crecimiento y está fundamentado en procesos moleculares, bioquímicas 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 radiculares, por lo que el tejido meristemático al no encontrar los reguladores específicos de crecimiento no formaría callos o se inactivaría irreversiblemente.

Si discutimos respecto al efecto de las hormonas utilizadas independientemente una de la otra, los resultados ajustados estadísticamente según Duncan (Cuadro 12) señalan que las dosis de ácido naftalenacético (ANA) presentaron diferentes comportamientos, sin embargo la concentración 1.2 mg/L fue la que facilitó el mayor diámetro de crecimiento en promedio. Al respecto BIDWELL (1979) argumenta que las actividades de las auxinas influyen tanto en la estimulación como inhibición del crecimiento y la misma célula o estructura puede exhibir respuesta opuesta dependiendo de la concentración, generalmente una simple adición de auxina constituye un estímulo hormonal suficiente para inducción de callo, esta sería la causante de la inhibición del potencial caulogénico de los meristemas debido a las concentraciones.

En nuestra investigación se utilizaron concentraciones moderadas del regulador de crecimiento ANA, coincidiendo con BEAULIEU (1973) quién indica que deben evitarse las concentraciones excesivas de ANA ya que pueden provocar daños en los vegetales al usarlos en concentraciones muy altas y generalmente tienden atrofiarse; y asimismo coincidimos con TREWARAS (1991) quién reportó que la auxina sería la causante de la inhibición del potencial caulogénico de los meristemas debido a las concentraciones altas. Por lo general el ácido naftalenacético (ANA) es utilizado entre 1 – 10 mg /L con un óptimo de 2mg / L, según lo declarado por DELGADO y ROJAS (1999), encontrándose nuestro resultado (1.2 mg/L de ANA) dentro de este rango.

Refiriéndonos a la micropropagación de especies forestales, aunque no de la familia de la especie de nuestro trabajo, podemos mencionar a TACORONTE *et al.* (2004), quienes plantearon la propagación en masa por cultivo *In Vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla*) utilizando segmentos nodales con un solo nudo, obteniendo un óptimo crecimiento de yemas laterales con una concentración de 0.38 mg/L de ANA, mientras que en el presente trabajo fue totalmente diferente ya que la concentración 0.4 mg/L fue el que obtuvo un menor crecimiento de yemas, tal hallazgo es compatible con lo indicado por ROJAS y RAMIREZ (1975) en el sentido de que algunos reguladores pueden ser estimulantes a bajas dosis o inhibidores a dosis altas, en tal caso la dosis

adecuada depende de la especie, dificultando esto la aplicación de un criterio absoluto.

La concentración 1.1mg/L de la citocinina sintética bencilaminopurina (BAP) fue la que facilitó un mayor diámetro del crecimiento en promedio de yemas, tal como se puede observar en los resultados validados estadísticamente según Duncan (Cuadro 13). Al respecto, ROCHA y NIELLA (2005) manifiestan que para la micropropagación de la especie *Tectona grandis* (teca) se debe utilizar una concentración de 0.5 mg/L de bencilaminopurina (BAP) en medio Murashige & Skoog, así como para la multiplicación de la misma una concentración de 1 mg /L de BAP; en la presente investigación los valores fueron totalmente opuestos ya que con la concentración 0.5 mg /L de BAP se obtuvo el mas bajo crecimiento en promedio de diámetro, corroborándose nuevamente lo mencionado por ROJAS y RAMIREZ (1975).

La utilización de los reguladores de crecimiento en combinación esta basado en lo manifestado por PIERIK (1990) quién indica que en el cultivo *In Vitro* de vegetales superiores, los reguladores especialmente las auxinas y citocininas, juegan un papel muy importante, considerando que el cultivo *In Vitro* es generalmente imposible sin reguladores, y además que si a un medio nutritivo se le debe añadir una auxina o una citocinina, para conseguir la extensión y/o la división celular, es algo que depende del tipo de explante y de la especie vegetal.

En nuestra investigación, considerando la sinergia de los reguladores de crecimiento empleados, podemos observar que los resultados de la interacción de ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP) presentaron significación estadística, corroborándose gráficamente con la Figura 4 que muestra la concentración 1.2 mg /L de ANA con 0.8 de BAP como el tratamiento que mostró mayor diámetro del crecimiento promedio.

Al considerar que nuestra hipótesis de trabajo no fue contrastada, no significa la imposibilidad de la realización de este tipo de trabajos con la especie en estudio, muy por el contrario los resultados por primera vez esgrimidos de esta especie forestal aún no procesada para su micropropagación señalan el principio del cultivo de tejidos y de la investigación biotecnológica de ella en nuestro medio, y en este sentido DELGADO y ROJAS (1999), fundamentan que las técnicas de cultivos de tejidos *In Vitro* implican una gran cantidad de variables, algunos de los cuales son aún desconocidas y es por eso que a veces los resultados que fueron alcanzados fácilmente en un laboratorio, no son reproducibles en otro.

VI. CONCLUSIONES

- 1. A partir 3.5 % de ambos hipocloritos y 5 minutos de exposición se obtiene 100 % de desinfección para ambos químicos.**
- 2. El ácido naftalenacético (ANA) a concentración de 1.2 mg/L e independientemente la concentración 1.1 mg /L de bencilaminopurina (BAP) fueron las concentraciones que facilitaron el mayor diámetro del crecimiento.**
- 3. Los tratamientos 11, 14 y 15, en la fase de crecimiento fueron los que permitieron mayor incremento del diámetro en promedio de yemas a diferencia de los otros tratamientos.**
- 4. Se determina un nuevo régimen protocolar de desinfección específico para sangre de grado (*Croton lechleri* Muell Arg) y asimismo los pasos iniciales para la proliferación en fase de crecimiento del cultivo *In Vitro* de la misma especie.**

VII. RECOMENDACIONES

1. La concentración 4% de hipoclorito de sodio (NaOCl) o calcio [Ca(OCl)₂] con 15 minutos de exposición por representar los valores medios de desinfección de yemas de sangre de grado (*Croton lechleri* Muell Arg), podrían utilizarse en los protocolos de desinfección en nuevos estudios.
2. Continuar con los estudios de la micropropagación *In Vitro* de tejidos de esta especie, utilizando diferentes tipos de explantes, medios de cultivos y reguladores de crecimiento.
3. Aumentar el número de tratamientos considerando otras combinaciones de los reguladores de crecimiento, vitaminas y sustancias nutritivas.
4. Probar explantes (microestacas) provenientes de semillas germinadas en condiciones asépticas.
5. Evaluar los efectos de iluminación en la cámara de incubación.

VIII. ABSTRACT

Growing interest exists of the medicinal use of diverse vegetable species, among them *Croton lechleri* Muell Arg., unfortunately this species is being threatened in their natural survival by the increment use intensive, becoming imperative to establish micropropagation methodologies *In Vitro* that increase its number and to face the growing demand of the market, avoiding the deterioration of its natural ecosystems.

New protocol methodology settled down for the disinfection stage (I) specific for *Croton lechleri* Muell Arg., starting from buds using sodium hypochlorite and calcium hypochlorite to concentrations of 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4% (weight) and 5% for 5, 10, 15 and 20 minutes of exhibition, being pointed out statistically significant ($p < 0.05$) the result that 3.5% and for 5 minutes both allow hundred disinfection percent.

In the preliminary study of the stage of growth (II), 0.1, 0.4, 0.8 and 1.2 mg/L of naphthaleneacetic acid (NAA) and 0.5, 0.8, 1.1 and 1.4 mg/L of bencylaminepurine (BAP) in combination were used, settling down that the synergy 0.8 mg/L NAA-1.1 mg/L BAP and 1.2 mg/L NAA-0.8 mg/L BAP and 1.2 mg/L NAA-1.1 mg/L BAP favored the proliferation of small buds in the biggest diameter.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **BEAULIEU, R. 1973. Reguladores de crecimiento. Ed. Oikos-Tau S.A. Barcelona, España. 235p.**
2. **BIDWELL, R. 1979. Fisiología vegetal. 2 ed. A.G.T Editor S.A. México. 173 p.**
3. **BONGA, J. 1985. Plants propagation through tissue culture. Plant cell cultures: results and perspectives. Ámsterdam, Holanda. 264p.**
4. **BRAKO, L., ZARUCCHI, J. 1993. Catalogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. Missouri Botanical Garden. St. Lois, Missouri, USA. 1286 p.**
5. **CRONQUIST, A. 1988. The Evolution and classification of flowering plants. 2 ed. Edit. The New York Botanical Garden. New York, USA .**
6. **DAQUINTA, M., RODRIGUEZ, R., CASTRO, D. Manejo in vitro de especies forestales de interés económico. V CONGRESO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGIA, 7 al 11 de Febrero, La Habana, Cuba. 2005.**
7. **DELGADO, G., ROJAS, I. 1999. Cultivos de vegetales I: Aplicaciones y procedimientos, Universidad Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú. 184p.**

8. DEVLIN, R. M. 1980. Fisiología vegetal. 3 ed. OMEGA S.A. Barcelona, España. 516 p.
9. DOMINGEZ, T.1986. Cultivos de tejidos de árboles de importancia forestal. Instituto Superior de Ciencias Naturales ISCN. Colombia. 12p.
10. ESCALANTE, Z.1984. Cultivos de meristemas para la producción de plantas madres de papa (*Solanum tuberosum*).Tesis. Ing. Agrónomo. Cajamarca, Perú. Universidad Nacional de Cajamarca.70p.
11. GONZALES, O. 1989. Contribución de amélioration génétique de *Eucaliptos globulus*. Labill Á Cajamarca, Perú. Université Catholique de Louvain. Bélgica.95p.
12. HALPERIN, W. 1986. Attainment and retention of morphogetic capacity in Vitro. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Orlando, USA. 3(5):8-47p.
13. HARTMANN, M., KESTER, D.1990. Propagación de plantas; principios y prácticas. 3 ed. Continental S.A. México. 814p.
14. HUAMANI, H.1998. Suelos degradados. Publicación Pura Selva. 167ed. Tingo Maria, Perú. 54p.
15. HU, C., WANG, P.1983. Meristems, Shoot tip, and bud Cultures: Handbook of plant cell culture.Macmillan Publishing. Nueva York. p. 177-227.
16. HURTADO, M., MERINO, M. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Ed. TRILLAS S.A. México. 232p.

17. LEOPOLD, C., KRIEDEMANN, N. 1977. Plant growth and development. Ed. Graw-Hill. U.S.A. 640p.
18. MEJIA, K., RENGIFO, E. 1995. Plantas medicinales de uso popular en el Perú. Agencia española de cooperación internacional .249 p.
19. MOSTACERO, J., MEJIA, F., GAMARRA, O. 2002. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. Trujillo – Perú. 667p.
20. MROGINSKI, L. 1991. Inoculation density in the culture of barley anthers. Calgary. p. 243-246.
21. MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann Rev. Plant Physiol 25.p. 135 – 166.
22. MURASHIGE, T., SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol. p.473-497.
23. PEREZ, I. 1989. Estudio botánico, químico, farmacológico de nueve especies con actividad cicatrizante. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
24. PIERIK, R. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ed. Mundi - Prensa. Madrid, España. 326 p.
25. REY, H., MROGINSKI, L. 1978. Cultivo In Vitro de ápices caulinares de mandioca (*Manihot esculenta* Grantz). Phytol. p. 171-176.
26. ROCA, W., MROGINSKI, L. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura (Fundamentos y Aplicaciones). CIAT. Colombia. p. 20- 36.

27. ROCHA, P., NIELLA, F. 2005. Producción de semilla de alta calidad genética de teca (*tectona grandis*). [En línea]: FACTOR, (<http://www.factor.unam.edu.ar/eventos/manseltr/propagac>, 14 Mayo 2007).
28. ROJAS, G., RAMIREZ, H. 1993. Control hormonal del desarrollo de las plantas. Ed. Limusa, S.A. México. p. 13-87.
29. SANDOVAL, M. 2001. Sangre de Grado el *Croton palanostigma* Induce el apoptosis en las células de cáncer gastrointestinales humanas. Universidad Nacional Agraria del la Selva, Tingo María, Perú. Rainforest Phytoceuticals , Delmar, NY, EE.UU. 19p.
30. SERRANO, M., PINOL, T. 1991. Biotecnología vegetal. Ed. síntesis S.A. España. p. 50- 70.
31. STREET, H. 1977. Cell (suspension) cultures techniques. University of California Press, Beerkeley. California. E. U.102p.
32. SUÁREZ, I., JARMA A., ÁVILA M. 2006. Desarrollo de un protocolo para propagacion in vitro de roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). Temas Agrarios, Montería, Colombia. Vol. 11:(2): 52 - 62.
33. TABOADA L., GULOTTA M., LÓPEZ ,C. 2001. Resultados preliminares del cultivo *in vitro* de Paraíso gigante (*Melia azedarach* L. Var. Gigantea) Mediante yemas axilares. Quebracho, Buenos Aires , Argentina, (3): 43 - 48
34. TACORANTE, E., MORA, V., VALECILLOS, C. 2004. Propagación In Vitro de Caoba (*Swietenia macrophylla* KING) a partir de yemas axilares. Venezuela. 125p.

35. TREWARAS, A. 1991. How do plant growth substances work? Plant Cell North Caroline, Stage College. 106p.
36. VASQUEZ, R., ROJAS R. 2006. Plantas de la Amazonia Peruana, Arnaldoa, Trujillo, Perú, 13(1) : 09-258.
37. UNIVERSOS, B. 1994. Monografía de etnobotanica de Sangre de Grado. Rendifor Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú. 15p.

ANEXO

Anexo A

Cuadro1. Medio Murashigue Skoog (MS) (1962).

Macronutrientes	mg/L
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄ .7H ₂ O	370

Micronutrientes	
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.30
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ .4H ₂ O	8.60
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl. 6H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA	37.00
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27.00

Vitaminas	
Mio – inositol	100
Ácido nicotínico	0.5
Pirotixina – HCl	0.5
Tiamina – HCl	0.1
Glicina	2.0

Cuadro 2. Concentraciones de reguladores de crecimiento.

Tratamientos	ANA	BAP
	mg. (sol.Madre.mL)	mg. (sol. Madre. mL)
T1	[0.1] (0.15)	[0.5] (0.75)
T2	[0.1] (0.15)	[0.8] (1.2)
T3	[0.1] (0.15)	[1.1] (1.65)
T4	[0.1] (0.15)	[1.4] (2.1)
T5	[0.4] (0.6)	[0.5] (0.75)
T6	[0.4] (0.6)	[0.8] (1.2)
T7	[0.4] (0.6)	[1.1] (1.65)
T8	[0.4] (0.6)	[1.4] (2.1)
T9	[0.8] (1.2)	[0.5] (0.75)
T10	[0.8] (1.2)	[0.8] (1.2)
T11	[0.8] (1.2)	[1,1] (1.62)
T12	[0.8] (1.2)	[1.4] (2.1)
T13	[1.2] (1.8)	[0.5] (0.75)
T14	[1.2] (1.8)	[0.8] (1.2)
T15	[1.2] (1.8)	[1.1] (1.65)
T16	[1.2] (1.8)	[1.4] (2.1)

Anexo B

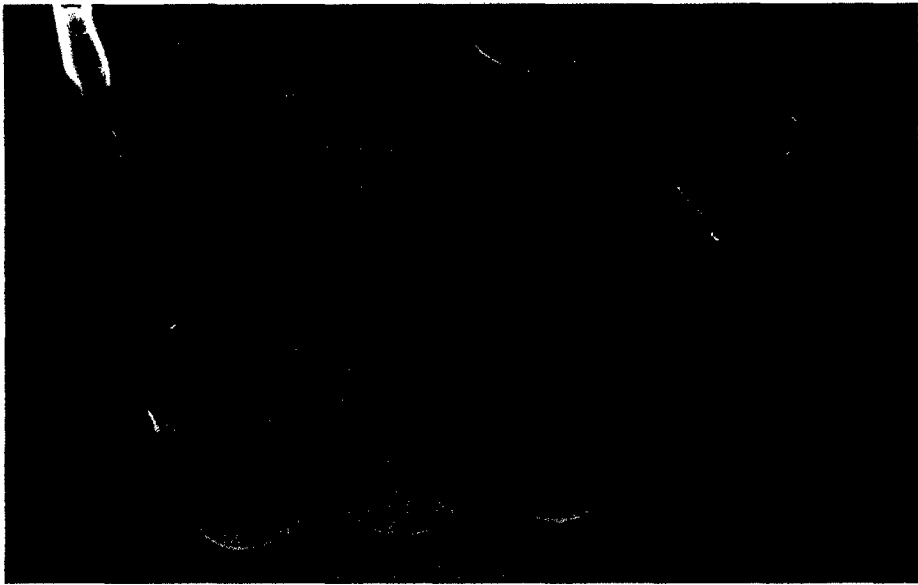


Figura 1. Material con las sustancias utilizadas en la fase de desinfección

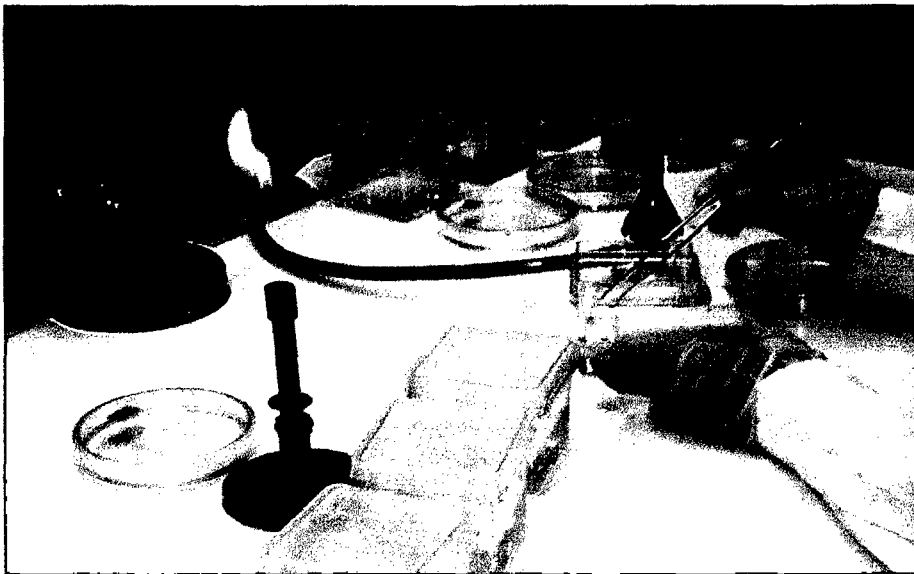


Figura 2. Traslado de las yemas elegidas a placa Petri con alcohol 70 %



Figura 3. Yemas elegidas en la placa Petri con alcohol 70 % al terminar tiempo de exposición.

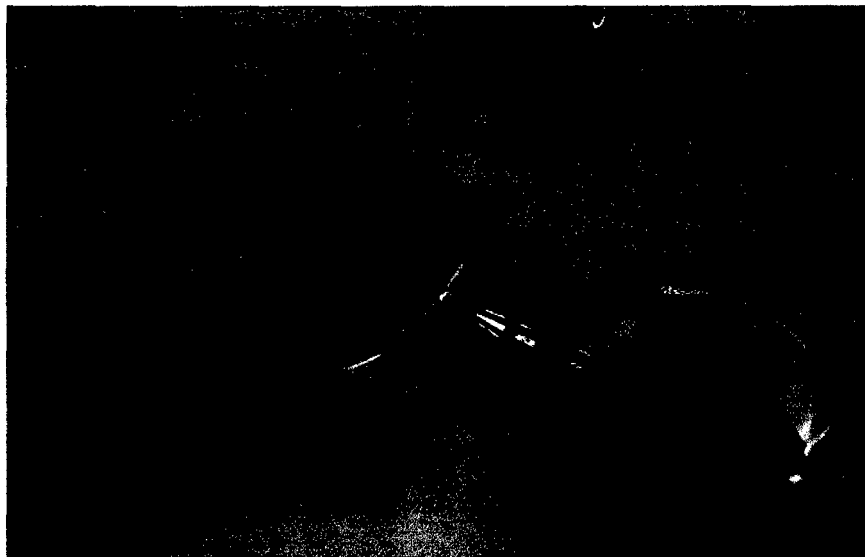


Figura 4. Traslado de las yemas tratadas con alcohol a placa Petri con hipoclorito.

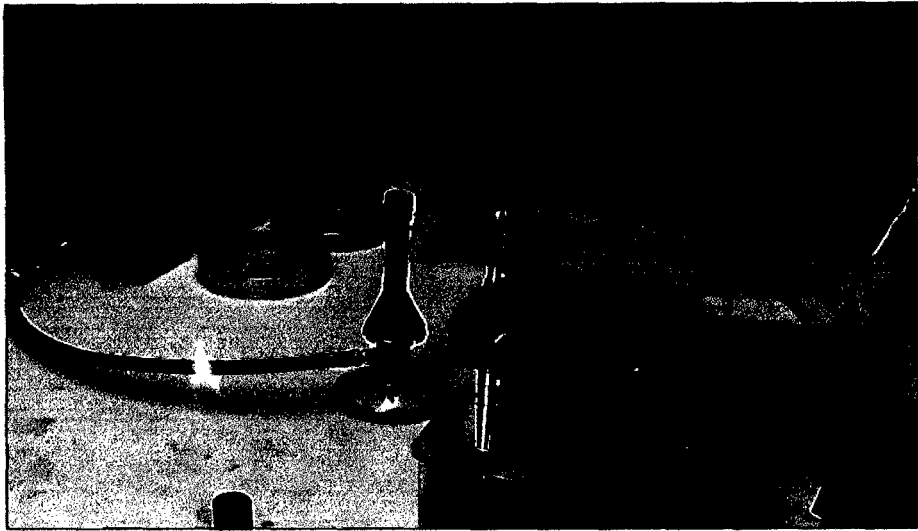


Figura 5. Traslado de las yemas tratadas con hipoclorito a recipientes de enjuague.

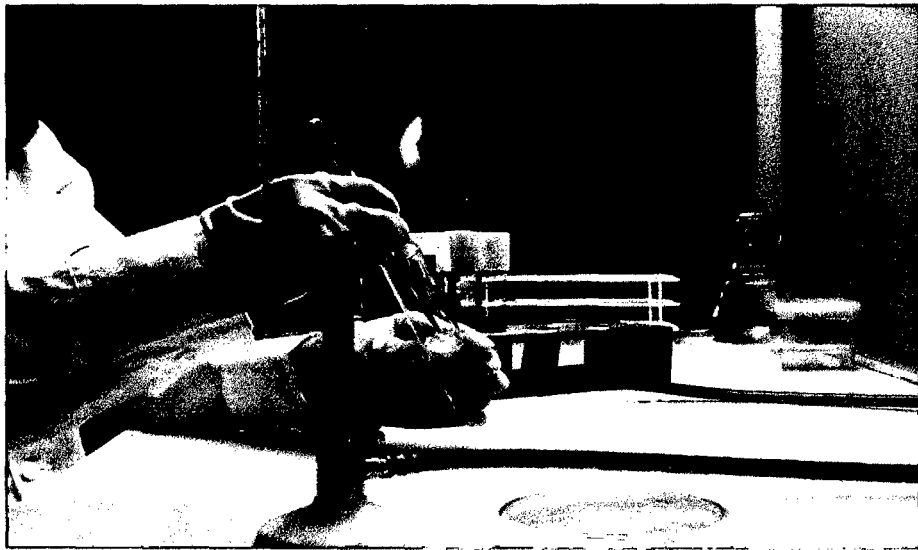


Figura 6. Depósito de yemas desinfectadas en tubos conteniendo medio MS.



Figura 7. Vista de una yema desinfectada colocada en medio MS contenido en tubo.



Figura 8. Medios de MS en tubos sembrados con yemas tratadas en la fase de desinfección (I).

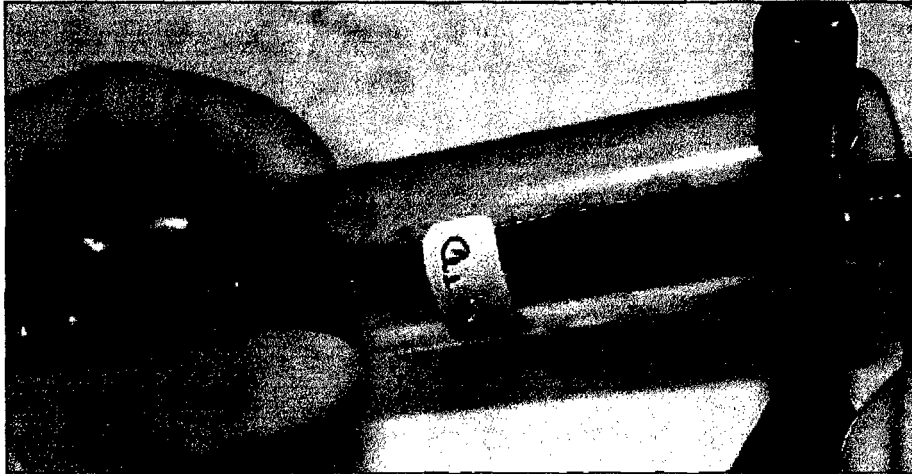


Figura 9. Repique de las yemas desinfectadas en tubos conteniendo medio MS para la fase de crecimiento (II).

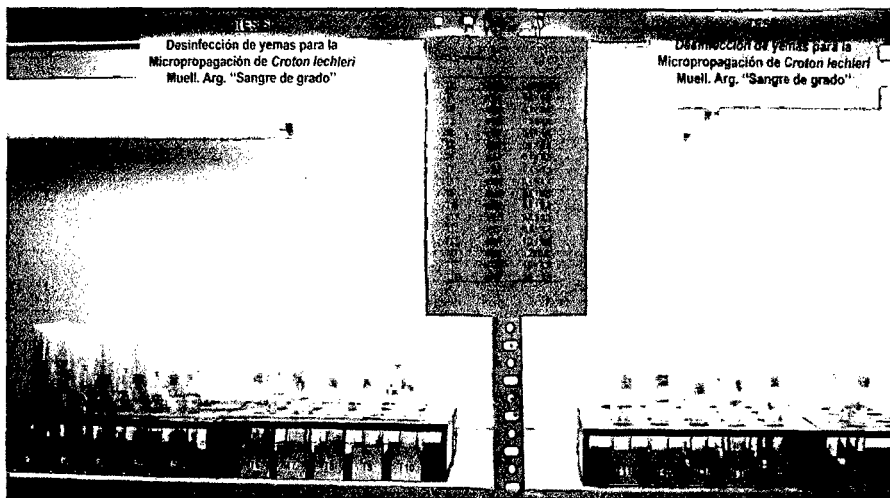


Figura 10. Tubos con Medio MS adicionados con hormonas ANA y BAP sembrados con yemas desinfectadas en la fase de crecimiento (II).



Figura 11. Desarrollo de callos y brotes en la fase de crecimiento (II).

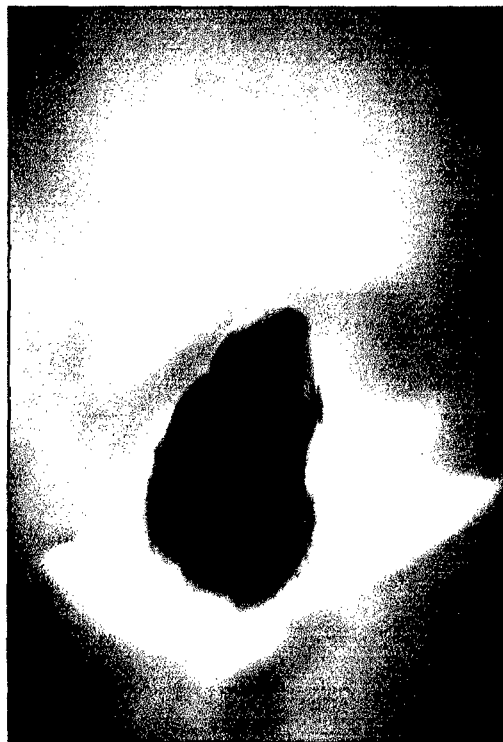


Figura 12. Desarrollo de callo sobre medio MS adicionado con hormonas ANA y BAP.



Figura 13. Desarrollo de callo sobre medio MS adicionado con hormonas ANA y BAP.



Figura 14. Proliferación de brotes sobre medio MS adicionado con hormonas ANA y BAP.



Figura 15. Proliferación de brote sobre medio MS adicionado con hormonas ANA y BAP.



Figura 16. Proliferación de brote sobre medio MS adicionado con hormonas ANA y BAP.