

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**

**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES**



**“DESINFECCIÓN DE YEMAS AXILARES PARA SU ESTABLECIMIENTO *in vitro* DE LA CAPIRONA (*Calycophyllum spruceanum* Benth)”**

**Tesis**

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO EN RECURSOS NATURALES  
RENOVABLES MENCIÓN FORESTALES**

**ORLANDO OLIVAS ORTEGA**

**2014**

## DEDICATORIA

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

A mis queridos padres Félix y Natalia por la fuerza que me dan para salir adelante y por su gran amor incondicional.

A mis queridos hermanos por su apoyo y por todo su amor.

## **AGRADECIMIENTOS**

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

Al MSc. Vicente S. Pocomucha Poma, asesor y al Blgo. Julio A. Chia Wong.; por sus exigencias, orientaciones y confianza que me brindaron para la realización en el transcurso del presente trabajo, así como en el proceso de mi formación como profesional.

Al Ing. Walter Panduro, por su amistad y colaboración para poder realizar el presente trabajo.

A todas las personas que de una y otra forma me brindaron su apoyo moral.

## ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1.Características generales de la especie .....	3
2.1.1.Taxonomía de la especie .....	3
2.1.2.Descripción botánica .....	3
2.1.3.Distribución geográfica .....	4
2.2.Cultivo de tejidos vegetales.....	4
2.3.Etapas de la propagación <i>in vitro</i> .....	4
2.4.Micropropagación <i>in vitro</i> de especies forestales.....	5
2.4.1.Ventajas y desventajas del cultivo <i>in vitro</i> .....	6
2.4.1.1.Ventajas .....	6
2.4.1.2.Desventajas .....	7
2.4.2.Características que influye en la técnica de micropropagación.....	7
2.5.Aspectos generales sobre la desinfección.....	10
2.5.1.Desinfección .....	10
2.5.2.Desinfectante .....	10
2.6.Factores que influyen en el crecimiento de meristemas .....	12
2.6.1.Virus .....	12
2.6.2.Tamaño de explante.....	12
2.6.3.Tipo de explante.....	12
2.6.4.pH.....	13
2.6.5.Consistencia del medio de cultivo .....	13

2.7.Explante.....	13
2.8.Asepsia.....	15
2.9.Aspectos generales sobre medios de cultivo.....	18
2.9.1.Principios generales.....	18
2.9.2.Ingredientes.....	19
2.9.3.Reguladores de crecimiento vegetal.....	19
2.9.4.Las auxinas.....	21
2.9.5.Citoquininas.....	23
2.10.Algunos métodos de desinfección de yemas axilares para su establecimiento <i>in vitro</i> en leñosas.....	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1.Ubicación del área de trabajo.....	29
3.1.1.Lugar de ejecución.....	29
3.1.2.Ubicación política.....	29
3.2.Materiales y equipos.....	29
3.2.1.Materiales.....	29
3.2.2.Equipos.....	29
3.3.Metodología.....	30
3.3.1.Obtención de las yemas.....	30
3.3.2.Selección de las yemas.....	30
3.3.3.Extracción.....	30
3.3.4.Lavado.....	33
3.3.5.Preparación y esterilización del material.....	31
3.3.6.Medio de cultivo.....	31
3.3.7.Etapa de desinfección.....	32
3.3.7.1.Operaciones previas.....	32

3.3.7.2. Proceso de desinfección .....	32
3.3.8. Etapa de crecimiento.....	33
3.3.8.1. Preparación de reguladores de crecimiento.....	33
3.3.8.2. Repique de los explantes .....	33
3.3.9. Tratamientos del estudio .....	34
3.3.9.1. Etapa de desinfección (Etapa I) .....	34
3.3.9.2. Etapa de crecimiento (Etapa II).....	39
3.3.10. Diseño experimental.....	41
3.3.11. Evaluación.....	39
3.3.11.1. Contaminación .....	39
3.3.11.2. Respuesta oxidativa (fenolización).....	39
3.3.11.3. Días a la formación de brotes.....	39
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	41
4.1. Evaluación de la contaminación de las yemas por tratamiento .....	41
4.2. Evaluación de la finalización como respuesta del explante.....	49
4.3. Desarrollo de las yemas desinfectadas en la etapa de crecimiento Etapa II). .....	59
V. CONCLUSIONES .....	73
VI. RECOMENDACIONES.....	74
VII. ABSTRACT.....	75
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76
IX. ANEXO .....	79

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Tratamientos de desinfección aplicados a los brotes de las dos especies de pinos. ....	28
2. Combinaciones y diseño de tratamientos para la etapa de desinfección con hipoclorito de sodio. ....	37
3. Combinaciones y diseño de tratamientos para la etapa de desinfección con hipoclorito de calcio. ....	38
4. Combinaciones y diseño de tratamientos para la etapa de crecimiento. ....	40
5. Evaluación de la contaminación con hipoclorito de sodio ....	44
6. Evaluación de la contaminación con hipoclorito de calcio. ....	46
7. Resumen de comparación de contaminación entre el hipoclorito de sodio y calcio ....	47
8. ANVA de la contaminación del hipoclorito de sodio y calcio. ....	52
9. Evaluación de la fenolización con hipoclorito de sodio. ....	53
10. Evaluación de la fenolización con hipoclorito de calcio. ....	55
11. Resumen de comparación de fenolización entre el hipoclorito de sodio y calcio ....	56
12. ANVA de la fenolización del hipoclorito de sodio y calcio ....	61
13. Evaluación de la formación de callos ....	63
14. ANVA para la formación de callos. ....	64
15. Evaluación del diámetro de callos en (mm) ....	66
16. ANVA para el diámetro de callos. ....	67
17. Evaluación de número de brotes o embriones ....	69

18. ANVA para el número de brotes .....	71
19. Resumen de comportamiento del Bencilaminopurina (BAP) (mg/L) frente al Ácido naftalenacético (ANA) para formación y diámetro de callo y número de brotes.....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Comportamiento del nivel de contaminación a los 10 minutos.....	48
2. Comportamiento del nivel de contaminación a los 15 minutos.....	50
3. Comportamiento del nivel de contaminación a los 20 minutos.....	51
4. Comportamiento del nivel de fenolización a los 10 minutos.....	58
5. Comportamiento del nivel de fenolización a los 15 minutos.....	59
6. Comportamiento del nivel de fenolización a los 20 minutos.....	60
7. Comportamiento de la formación y diámetro del callo y número de brote de Bencilaminopurina (BAP) (mg/L) frente al Ácido naftalenacético (ANA) a 0.1 mg/L .....	73
8. Comportamiento de la formación y diámetro del callo y número de brote de Bencilaminopurina (BAP) (mg/L) frente al Ácido naftalenacético (ANA) a 0.5 mg/L. ....	74
9. Comportamiento de la formación y diámetro del callo y número de brote de Bencilaminopurina (BAP) (mg/L) frente al Ácido naftalenacético (ANA) a 1.0 mg/L. ....	75
10. Comportamiento de la formación y diámetro del callo y número de brote de Bencilaminopurina (BAP) (mg/L) frente al Ácido naftalenacético (ANA) a 1.5 mg/L.....	76
11. Desinfección de la cámara de flujo laminar.....	84
12. Siembra de un explante en el medio de cultivo MS .....	84
13. Muestras fenolizados y contaminada por bacterias y hongos. ....	85

14. Yemas de capirona ( <i>Calycophyllum spruceanum</i> Benth) in vitro en condiciones óptimas. ....	85
---	----

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación titulado “Desinfección de yemas axilares para su establecimiento *In vitro* de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth)” tuvo por objetivo: evaluar el comportamiento por contaminación y fenolización en la etapa de desinfección (Etapa I) y evaluar el desarrollo de yemas desinfectadas en la etapa de crecimiento (Etapa II) de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth).

Para determinar los métodos de desinfección para yemas axilares se tuvo presente la siguiente metodología; para la Etapa I: obtención, selección, extracción, lavado, preparación, esterilización y preparación del medio de cultivo de las yemas; Etapa II: operaciones previas, proceso de desinfección, preparación de reguladoras de crecimiento y repique de los explantes.

Los resultados obtenidos fueron: para los niveles óptimos para evitar la contaminación y fenolización de las yemas axilares de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth) Hipoclorito de sodio 2.0% + 15'; y/o Hipoclorito de calcio 2.5% + 10' y para fenolización Hipoclorito de calcio 2.5% + 15'; y se ha determinado que para aumentar la capacidad de enraizamiento de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth) se debe usar bencilaminopurina 2.0 mg/L + ácido naftalenacético 1.5 mg/L.

## I. INTRODUCCIÓN

La capirona es un árbol nativo de la región amazónica que crece en bosques primarios y secundarios inundables. Es un árbol de 15 a 35 m de alto, de alta resistencia en relación a su baja densidad, asimismo, acústico y fácil de trabajar de mucho interés económico, utilizado como madera (muebles, postes, durmientes), leña, etc. (CÁCERES, 2008). Pese a los grandes esfuerzos que se han hecho en el país para la conservación de la biodiversidad, durante muchos años ha estado sujeto a la explotación irracional y a la destrucción de los bosques. La base de esto es que a nivel nacional existe poco conocimiento de estas especies en el campo de métodos de propagación vegetativa eficientes para especies forestales nativas, producto de la falta de investigaciones científicas en estos campos. Se ha creado por tanto, una necesidad urgente de desarrollar métodos de desinfección para su propagación que permitan contar con material vegetativo de mejor calidad durante todo el año y de forma sistematizada para el establecimiento de plantaciones, de tal manera que se disminuya el efecto sobre estas especies en el bosque.

El problema ha sido más grave para especies maderables nativas donde no se previó su uso potencial y fueron extraídos los mejores árboles para la corta, quedando en el bosque árboles mal formados que se usan como

fuente semillero. Esto hace necesario tomar acciones inmediatas en la búsqueda de alternativas que mejoren sus sistemas de producción y la calidad del material de siembra. Las ventajas que ofrecen las técnicas *in vitro* contribuyen enormemente con un mayor conocimiento de éstas, incrementos en sus tasas de reproducción y una selección del material de siembra, son base para continuar en esa búsqueda de nuevas opciones para solventar problemas de calidad y propagación de especies forestales.

Baja este contexto, frente a la interrogante ¿Qué efecto tendrá el uso de hipocloritos en la desinfección de yemas axilares que puedan utilizarse para su establecimiento *in vitro* de *Calycophyllum spruceanum* Benth (capirona)?, se planteó la siguiente hipótesis: el uso de hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio a concentraciones de 2% por espacio de 10 minutos provee yemas utilizables en la etapa de crecimiento (Etapa II) para su establecimiento *in vitro* de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth). Se trabajó bajo el planteamiento de los siguientes objetivos:

- Evaluar el comportamiento de la contaminación y fenolización en la etapa de desinfección (Etapa I) de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth).
- Evaluar el desarrollo de yemas desinfectadas, en la etapa de crecimiento, (Etapa II) de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth).

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Características generales de la especie

#### 2.1.1. Taxonomía de la especie

Cronquist, citado por MOSTACERO (2002), describe la especie de la siguiente forma.

División	: MAGNOLIOPHYTA
Clase	: MAGNOLIOPSIDA (Dicotiledóneas)
Sub-clase	: Asteridae
Orden	: Rubiales
Familia	: RUBIACEAE
Género	: <i>Calycophyllum</i>
Especie	: <i>Calycophyllum spruceanum</i> Benth
Nombres comunes	: Capirona, palo mulato

#### 2.1.2. Descripción botánica

CÁCERES (2008) reporta que es un árbol de 15 a 35 metros de altura, tronco de 25 a 180 cm. de dap. Esta especie es inconfundible por su corteza de color marrón verdosa, que se descama en placas coreaceas y aspecto gigante.

### **2.1.3. Distribución geográfica**

Se encuentra en la Amazonía del Perú y Brasil. En el Perú se encuentra en los departamentos de Amazonas, San Martín, Huánuco, Loreto, Madre de Dios y Ucayali. Se encuentra en los bosques primarios y secundarios en terrenos periódicamente inundados en las formaciones ecológicas del bosque seco tropical (bs-T), bosque húmedo tropical (bh-T), o bosque muy húmedo tropical (bmh-T). a veces crecen en comunidades o “manchales”, de acuerdo a inventarios el volumen bruto de esta especie varía de 0.2m<sup>3</sup>/ha o más (CONFEDERACION NACIONAL DE LA MADERA, 1994).

## **2.2. Cultivo de tejidos vegetales**

DELGADO (1999) define que el cultivo aséptico de células, tejidos o 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 totipotencialidad, 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.

## **2.3. 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 funcionar la estrategia que se adopta.

**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.

#### **2.4. Micropropagación *in vitro* de especies forestales**

VARGAS (1982) manifiesta que esta técnica de propagación, fue realizada en un principio para la producción de especies herbáceas. Posteriormente, la experiencia acumulada perdió su adaptación para la producción de especies leñosas. Estas especies presentan, en su mayoría, resistencia al ser multiplicadas *in vitro*. Sin embargo, tienen gran expectativa de aplicación comercial. La aplicación del cultivo *in vitro* para la obtención de especies forestales ha sido más lenta, pudiendo citar a las coníferas en la producción de biomasa para pulpa como álamos y eucaliptus, y otras con valor

ornamental como arces y abedules. Las plantaciones forestales a partir de semilla presentan una gran variabilidad en cuanto a crecimiento, forma del árbol y volumen; debido a ello, la micro propagación es una técnica ampliamente aceptada por las empresas forestadoras, donde a partir de individuos selectos y su posterior clonación *in vitro* se obtienen grandes cantidades de plantas, que se emplean en plantaciones y ensayos clonales.

La clonación de individuos superiores se evita la considerable variación genética que las especies, con lo cual se logran diferencias significativas en diámetro, altura y volumen propiamente dicho, más el agregado de una notable uniformidad de crecimiento. La micro propagación *in vitro* permite reproducir a los individuos selectos, los que posteriormente se multiplican *ex vitro* por micro estacas; de esta manera las empresas estandarizan plantaciones con fines comerciales con plantas de similar calidad y aptitud tecnológica de la madera, incrementando así la productividad y rentabilidad por área plantada.

#### **2.4.1. Ventajas y desventajas del cultivo *in vitro* en especies forestales**

##### **2.4.1.1. Ventajas del cultivo *in vitro***

VARGAS (1982) conceptúa las siguientes ventajas:

- Permite la obtención de plantas sanas y de calidad. Para que esto se cumpla, con una de las etapas de la micro propagación deberán ser rigurosamente controladas.

- Facilita la realización de una propagación clonal masiva de plantas idénticas en un corto tiempo.
- Los clones pueden ser propagados en cualquier época del año. Porque se trabaja en condiciones ambientales controladas.
- El costo de mantenimiento de un banco de germoplasma, en condiciones de laboratorio, es mayor en comparación al mantenimiento en condiciones de campo, evitando el riesgo de pérdidas por factores climáticos.
- A veces es posible propagar especies *in vitro*, que no puede ser multiplicadas en forma tradicional; esto es posible al fenómeno de rejuvenecimiento, que solo es posible realizarlo *in vitro*.

#### **2.4.1.2. Desventajas cultivo *in vitro***

VARGAS (1982) indica las siguientes desventajas:

- La aclimatación de las plántulas es un proceso difícil y puede que muchas veces los mayores porcentajes de la perdida se presentan en esta etapa.
- Alto costo de establecimiento de un laboratorio, lo que indica indirectamente en el precio final de la planta producida de esta manera.
- Escasa literatura relacionada al cultivo *in vitro* de especies forestales.

#### **2.4.2. 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.

La elección, aislamiento y desinfección del explante es el primer paso para el establecimiento *in vitro* de cualquier especie vegetal y el éxito de esta fase depende en gran medida de una serie de parámetros relacionados con el propágulo (estado fisiológico, edad, estado de desarrollo y estado sanitario) y con el sistema seguido para su manipulación y esterilización (SERRANO y PINOL, 1991). Las características principales de la técnica señaladas por BONGA (1985) y PIERIK (1990), son las 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, bacteria 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 morfogenético, (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 está 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<sup>-2</sup>, 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 – 40w.

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 satisfactorias 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.

Otro inconveniente que encontramos en la micro propagación 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 cultivos de tejidos vegetales 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.

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

### **2.5.1. Desinfección**

Es el proceso de destrucción de los microorganismos mediante métodos químicos; la esterilización se refiere a menudo al método físico para la destrucción de los microorganismos.

### 2.5.2. Desinfectante

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 (DOMINGUEZ, 1986).

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

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 (DOMINGUEZ, 1986).

## **2.6. Factores que influyen en el crecimiento de meristemos**

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

### **2.6.1. Virus**

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

### **2.6.2. 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.

### **2.6.3. Tipo de 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 el efecto de la dominancia apical ocurra una mayor concentración endógena de auxinas en la yema apical en relación a la yema axilar.

### **2.6.4. pH**

El pH usualmente ajustado en el medio de cultivo es de  $5.8 \pm 0.1$  y es conocido que este puede ser alterado durante el auto clavado y durante el proceso de cultivo, sea por la absorción de nutrientes por el explante como por la eliminación de sustancias metabólicas.

### **2.6.5. 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 meristemas ha sido alcanzado en medio líquido, con soporte 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.

### **2.7. Explante**

ROCA y MROGINSKI (1991) manifiesta que la elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. Si el objetivo final es la producción de callos, es factible de una 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 cotiledones herbáceos 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 ellos 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 explante muy pequeñas requiere el empleo de medios más complejos o de los denominados medios acondicionados (STREET, 1977).

## **2.8. 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 aun pudiese quedar, en las plantas o porciones de plantas con las que se trabaje. A continuación se debe realizar un lavado con agua, si la contaminación externa es fuerte. Luego el pelado eliminara toda la capa más exterior. Después de estos pasos se iniciará la esterilización, generalmente de la siguiente forma: se sumerge el órgano en alcohol de 70% durante algunos segundos, para eliminar las burbujas de aire. Luego se realiza una esterilización durante 10 a 30 minutos en hipoclorito de sodio 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 está estéril.
- Se permite el paso a la habitación de inoculación a más personas de la necesaria, produciéndose la infección del suelo y del aire.
- Generalmente se producen infecciones cuando se aíslan ápices del vástago de plantas en roseta, ya que estos son difíciles de esterilizar.
- Si las cámaras de crecimiento no se mantienen limpias, pueden producirse infecciones, en algunos casos debido 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.
- Algunas 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 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.

## **2.9. Aspectos generales sobre medios de cultivo**

### **2.9.1. Principios generales**

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 añaden en dos niveles: uno macro y otro micro. El éxito del cultivo de tejidos vegetales depende sustancialmente del medio de cultivo empleado. Para establecer el 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.

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 (ROCA y MROGINSKI, 1991).

### **2.9.2. Ingredientes**

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).

### **2.9.3. Reguladores de crecimiento vegetal**

Los reguladores del crecimiento son compuestos orgánicos que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben, o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas (HURTADO y MERINO, 1987). 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 (DEVLIN, 1980). Algunos reguladores pueden ser estimulantes a bajas dosis o inhibitorias a dosis altas; el umbral depende de la 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 (ROJAS y RAMIREZ, 1993)

Actualmente se reconocen cinco tipos básicos de sistemas químicos de reguladores de crecimiento vegetal, divididos en tres grupos principales.

- Promotores del crecimiento: Auxinas, Citoquininas y Giberelinas.
- Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico.
- Etileno.

El cultivo *in vitro* de plantas superiores, los reguladores especialmente las auxinas y citoquininas, 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 citoquinina, para conseguir la extensión y/o la división celular, es algo que depende del tipo de explante y de la especie vegetal (PIERIK, 1990).

#### **2.9.4. Las auxinas**

BIDWELL (1979) manifiesta que el término auxina (del griego auxeín, 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 en la estimulación como en la inhibición del crecimiento y la misma célula o estructura puede exhibir respuesta opuesta dependiendo de la concentración.

Se sintetiza principalmente en el ápice del tallo y ramas jóvenes, así como en las yemas y hojas. En general, se sintetizan 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. (ROCA y MROGINSKI, 1991).

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

- El AIA (ácido indol acético).
- El AIB (ácido indol butírico).
- El ANA (ácido naftalen acético).

El AIB (ácido indolbutílico) 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.

HARTMANIN Y KESTER (1990) mencionan que el ácido indolbutírico ha sido identificado como un producto natural en la cascara de la patata hace 40 años, todavía es referida 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 usarlos 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 tiene 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.

#### **2.9.5. Citoquininas**

Son reguladores de crecimiento, probablemente derivados de la adenina, una base nitrogenada de purina. Estas hormonas se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y la división celular, sobre todo si se van acompañado de las auxinas. En concentraciones elevadas (1-10 mg/l) pueden producir la formación de vástagos adventicios; sin embargo, inhibe generalmente la formación de raíces. Las citoquininas promueven la formación de vástagos axilares, porque disminuyen la dominancia apical; también retardan el envejecimiento (PIERIK, 1990).

#### **2.10. Algunos métodos de desinfección de yemas axilares para su establecimiento *in vitro* en leñosas**

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

- Realizar la desinfección, de los brotes epicómicos, con  $\text{HgCL}_2$  a 0.25% durante 10 minutos.
- Implantar los ápices de los brotes epicómicos en medios MS suplementado con 0.5 mg/l de BAP.
- Utilizar el medio MS suplementado con 1mg/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 micro propagación de cedro (*Cedrela odorata*) y la caoba (*Swietenia macrophylla* King) híbrida a partir de semillas de árboles seleccionadas, la cual consta de los siguientes pasos.

- Realizar la desinfección de las semillas de cedro y caoba con  $\text{HgCL}_2$  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.

SALINAS (1995) manifiesta que los tratamientos de desinfección con los que se obtuvo los más altos índices de desinfección y sobrevivencia, en los experimentos (desinfección de yemas, desinfección de hojas, desinfección de nudos), incluyeron al método de desinfección con tres tipos de hormonas y 14 balances hormonales (Detergente dos minutos, lejía al 2.5% cinco minutos, Benlate al 2% cinco minutos y alcohol al 96% un minuto), habiéndose logrado de esta forma el método de desinfección de explantes.

SUAREZ *et al.* (2006) indican que utilizaron brotes axilares de *Tabebuia rosea* (roble) con el fin de producir básicamente clones de esta 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 evaluados después de establecidos en medios  $1/2$  MS Murashige y Skoog (1962).

El hipoclorito de sodio al 4% durante 10 minutos fue el mejor tratamiento de esterilización superficial y a si mismo 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  $\mu$ M de BAP con 0.00, 1.35, 2.69, 4.03 y 5.37  $\mu$ M de ANA en el enraizamiento *In Vitro* de los brotes micro propagados, obteniendo la mejor tasa de multiplicación con 17.76  $\mu$ M BAP, mientras que el mayor enraizamiento ocurrió en presencia de 5.37  $\mu$ M 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.

VARGAS (2007) manifiesta que utilizó explantes de *Croton lechleri* Muell Arg (sangre de grado) con el objetivo determinar técnica de desinfección de yemas axilares para el establecimiento *in vitro*. Para determinar la mejor técnica de desinfección de seis 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) considerado cuatro tiempos diferentes (5, 10, 15 y 20 minutos) para cada concentración utilizada, para ser depositados en tubos de 20X200 mm contenido el medio Murashige y Skoog (MS) adicionado con sacarosa (20g/l) y agar (6g/l), a partir 3.5 % de ambos hipocloritos y 5 minutos de exposición se obtiene 100% de desinfección para ambos químicos y a si mismo establecer las mejores condiciones para la multiplicación, se utilizaron Acido Naftalenacético (ANA) y Bencilaminopurina (BAP) con las siguientes concentraciones: (0.1, 0.4, 0.8 y 1.2) y (0.5, 0.8, 1.1 y 1.4) considerando un foto periodo 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, obteniendo la mejor tasa de propagación con el ácido naftalenacético (ANA) a concentraciones 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.

Cuadro 1. Tratamientos de desinfección aplicados a los brotes de las dos especies de pinos.

Pruebas	Tratamientos			
	Alcohol	Tiempo	Hipoclorito de sodio (v/v)	Tiempo
Primera	70%	1 minuto	5%	10, 15 y 20 minutos
			10%	5, 10 y 15 minutos
Segunda	70%	30 seg.	5%	10 y 15 minutos
			10%	10 y 15 minutos
Tercera	50%	30 seg.	5%	15 minutos
			10%	15 minutos

Fuente: VARGAS, 2007.

REBOLLEDO *et al.* (2006) indica que el establecimiento asépticos de los explantes bajo condiciones de cultivo *in vitro* se realizó probando primeramente varios tratamientos de desinfección a los mismos, los cuales variaron en cuanto a los tiempos de aplicación y concentración de: hipoclorito de sodio comercial (Clorox) y alcohol etílico absoluto. Se establecieron 3 experimentos en los cuales se probaron los tratamientos de desinfección resumidos en la siguiente tabla:

REBOLLEDO *et al.* (2006) menciona que los brotes desinfectados se colocaron en una solución antioxidante compuesta por ácido ascórbico 100 mg/l, ácido cítrico 150 mg/l y plan preservative mixture 10 ml/l durante 20 minutos. Finalmente se sembraron en el medio woodyplant (McCown y Lloyd,

1981) preparado de acuerdo a su fórmula original adicionado con sacarosa al 3% 1 gr/l de carbón activado y 25 mg/l de cisteína. El pH se ajustó a 5.7 y el medio se solidificó utilizando phytigel "sigma" en concentración de 2.7 gr/l, esterilizados en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión durante 15 minutos. La aplicación de alcohol 50% durante 30 segundos, seguidos por la aplicación de hipoclorito de sodio al 10% v/v por 15 minutos es la mejor forma de desinfección para los explantes obtenidos de setos en las especies *Pinus pseudostrobus* y *P. jaliscana*. Así mismo se obtuvo la elongación de brotes axilares en la primera especie con la aplicación de 5 mg/l de BA y 2 mg/l de Cinetina. 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 y 6 – benciladenina, en un rango de 0-3 mg/L para ambas hormonas. Las condiciones de cultivo fueron 25 °C, 16 h de luz y 40-45µ moles. La superficie de respuestas resultante muestra un óptimo de alargamiento de yemas laterales en una relación 0.38 mg/L de ANA y 1.94 mg/L de 6 – benciladenina. 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 de 6-benciladenina.

SUAREZ *et al.* (2006) indican que utilizaron brotes axilares del roble (*Tabebuia rosea*) con el fin de producir masivamente clones de esta 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  $\mu\text{M}$  de BAP con 0.00, 1.35, 2.69, 4.03 y 5.37  $\mu\text{M}$  de ANA en el enraizamiento In Vitro de los brotes de micropropagados, obteniendo la mejor tasa de multiplicación con 17.76  $\mu\text{M}$  bencilaminopurina mientras que el mayor enraizamiento ocurrió en presencia de 5.37  $\mu\text{M}$  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. Ubicación del área de trabajo**

##### **3.1.1. Lugar de ejecución**

El presente proyecto de tesis se desarrolló en el Laboratorio de Micro propagación *In vitro* de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

##### **3.1.2. Ubicación política**

Región : Huánuco  
Provincia : Leoncio Prado  
Distrito : Rupa Rupa  
Localidad : Tingo María

#### **3.2. Materiales y equipos**

##### **3.2.1. Materiales**

Yemas axilares de capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth).

Pinzas

Tubos de ensayo

Placa Petri y mechero

### **3.2.2. Equipos**

- Cámara de flujo laminar.
- Estereoscopio.
- Timer (Regulador de fotoperiodo).

## **3.3. Metodología**

### **3.3.1. Obtención de las yemas**

Las yemas axilares de la especie de *Calycophyllum spruceanum* Benth (capirona), fueron extraídas de brotes aproximadamente de 6 meses de edad de árboles maduros seleccionado libres de enfermedades o daños por insectos y buena característica física; ubicado en el frontis del estadio de la Universidad Nacional Agraria de la Selva el cual está situado en la ciudad de Tingo María; luego fue llevado al laboratorio de Micro propagación *In vitro* de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

### **3.3.2. Selección de las yemas**

Se eligieron las yemas más jóvenes, tomando en cuenta las ramas que han emergido más recientemente; se consideraron las yemas a partir de los 8 a 20 cm tomando del ápice, ya que según (MEJÍA, 1994), se logra menos oxidación *in vitro*.

### **3.3.3. Extracción**

Antes de la extracción se hizo un pre tratamiento (fumigar) con Benomil al 4gr/L con la finalidad de controlar el ataque de hongos al explante

en campo por un lapso de 4 días luego se procedió a su extracción haciendo un corte con una tijera podadora de mano 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.

#### **3.3.4. Lavado**

Una vez en el laboratorio se retiraron los esquejes del frasco y se sumergieron en frascos con agua destilada estéril para enjuagarla por tres veces.

#### **3.3.5. Preparación y esterilización del material**

Una característica esencial del cultivo de tejidos es la conservación del material y el medio nutritivo sin contaminación, principalmente de microorganismos. El medio de cultivo, así como material de cristalería, instrumentos, agua y otros implementos se esterilizaron en autoclave.

El material de vidrio e instrumental de disección se envolvieron bien en papel aluminio o papel de envoltura y se esterilizaron a 15 libras de presión y 121 °C durante 20 minutos.

#### **3.3.6. Medio de cultivo**

Se utilizó el medio Murashige & Skoog (MS) adicionado con sacarosa y agar (Fitogel). Se preparó como a continuación se indica:

- El medio deshidratado contenido en sobre de aluminio de 4.4 g, se vertieron en matraces de 1 litro de capacidad.
- Se adicionaron 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 esterilizaron los medios en autoclave a 121 °C a 15 libras por pulgada cuadrado (15 psi) por 15 minutos, una vez esterilizadas se adicionó 400 mg/l de ceftriaxona con la finalidad de disminuir el porcentaje de contaminación por bacterias y se dispersó 30 ml en tubos de ensayo.
- Los tubos de ensayo que contiene el medio, se colocó en gradillas de madera y se guardaron en la refrigeradora entre 4 °C a 8 °C.

### **3.3.7. Etapa de desinfección**

#### **3.3.7.1. Operaciones previas**

Se desinfectaron la mesa y las paredes de la cámara con etanol 70% igualmente se desinfectaron la parte externa de los recipientes que contienen los medios de cultivo y el agua estéril, antes de introducirlos en la cámara. Las manos y los antebrazos del operador se desinfectaron con etanol 70%, 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.

### **3.3.7.2. Proceso de desinfección**

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

- Se depositaron en frascos que contenían benomil 4gr/L y se dejaron en inmersión por un lapso de 4 horas luego fueron sacados y enjuagados con agua estéril.
- Luego de la inmersión en benomil se introdujeron las yemas en un recipiente con alcohol etílico 70% por espacio de 1 minuto.
- Luego con la ayuda de una pinza recta de 6", se llevaron los explantes a frascos con 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3% y 4%, de concentraciones diferentes de hipoclorito de sodio y de calcio adicionados con Tween 20 (1 ml a 2 ml) considerando tres tiempos diferentes (10, 15 y 20 minutos) por cada concentración utilizada.
- Trascurrido los tiempos ensayados, los explantes se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril.
- Luego se depositaron en tubos de 20x200 mm conteniendo el medio Murashige y Skoog (MS), adicionando con sacarosa (20g/L) y agar (6g/L).

### **3.3.8. Etapa de crecimiento**

#### **3.3.8.1. Preparación de reguladores de crecimiento**

Se prepararon en matraces de 500 ml, soluciones madres (solución stock) citoquinina y de auxina en concentraciones de 500 mg/250 mL cada una

adicionadas con KHO 1N y HCL 1N respectivamente para ayudar a la disolución de los reguladores de crecimiento.

### **3.3.8.2. Repique de los explantes**

Una vez que las yemas superaron la fase de desinfección, fueron repicados con la ayuda de una pinza recta de 6" en tubos de ensayos 20 x 200 mm conteniendo el medio Murashige y Skoog mas sacarosa (20 g/L) y agar (6g/L) adicionando con las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, citoquinina y auxina, sembrándose un explante por tubo con seis repeticiones por tratamiento. 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 periodo 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 evaluaron el crecimiento de los explantes cada 72 horas.

### **3.3.9. Tratamientos del estudio**

Se basa en los trabajos de VARGAS (2007) y SUAREZ *et al.* (2006).

#### **3.3.9.1. Etapa de desinfección (Etapa I)**

##### **Desinfectantes:**

- Hipoclorito de calcio + Tween 20%
- Hipoclorito de sodio + Tween 20%

**Concentraciones: Factor (A)**

- Hipoclorito de calcio al 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 4% de concentración.
- Hipoclorito de sodio al 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 4% de concentración.

**Tiempos: Factor (B)**

10, 15, 20 minutos de inmersión en las concentraciones mencionadas de hipoclorito de sodio y de calcio.

**Tratamientos**

Los tratamientos de la asociación de hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones y diferentes tiempos, son dieciocho (Cuadro 2).

Cuadro 2. Combinaciones y diseño de tratamientos para la etapa de desinfección con hipoclorito de sodio.

<b>Tratamiento</b>	<b>Clave</b>	<b>Descripción</b>
T1	a1b1	Hipoclorito de sodio 1% + 10'
T2	a1b2	Hipoclorito de sodio 1% + 15'
T3	a1b3	Hipoclorito de sodio 1% + 20'
T4	a2b1	Hipoclorito de sodio 1.5% + 10'
T5	a2b2	Hipoclorito de sodio 1.5% + 15'
T6	a2b3	Hipoclorito de sodio 1.5% + 20'
T7	a3b1	Hipoclorito de sodio 2% + 10'
T8	a3b2	Hipoclorito de sodio 2% + 15'
T9	a3b3	Hipoclorito de sodio 2% + 20'

T10	a4b1	Hipoclorito de sodio 2.5% + 10'
T11	a4b2	Hipoclorito de sodio 2.5% + 15'
T12	a4b3	Hipoclorito de sodio 2.5% + 20'
T13	a5b1	Hipoclorito de sodio 3% + 10'
T14	a5b2	Hipoclorito de sodio 3% + 15'
T15	a5b3	Hipoclorito de sodio 3% + 20'
T16	a6b1	Hipoclorito de sodio 4% + 10'
T17	a6b2	Hipoclorito de sodio 4% + 15'
T18	a6b3	Hipoclorito de sodio 4% + 20'

---

a = concentraciones de hipoclorito de sodio      b = tiempo de desinfección

Los tratamientos que se realizaron para la prueba de desinfección con hipoclorito de calcio a diferentes concentraciones y diferentes tiempos de exposición son dieciocho (Cuadro 3).

Cuadro 3. Combinaciones y diseño de tratamientos para la etapa de desinfección con hipoclorito de calcio.

<b>Tratamiento</b>	<b>Clave</b>	<b>Descripción</b>
T1	a1b1	Hipoclorito de calcio 1% + 10'
T2	a1b2	Hipoclorito de calcio 1% + 15'
T3	a1b3	Hipoclorito de calcio 1% + 20'
T4	a2b1	Hipoclorito de calcio 1.5% + 10'
T5	a2b2	Hipoclorito de calcio 1.5% + 15'
T6	a2b3	Hipoclorito de calcio 1.5% + 20'
T7	a3b1	Hipoclorito de calcio 2% + 10'
T8	a3b2	Hipoclorito de calcio 2% + 15'

T9	a3b3	Hipoclorito de calcio 2% + 20'
T10	a4b1	Hipoclorito de calcio 2.5% + 10'
T11	a4b2	Hipoclorito de calcio 2.5% + 15'
T12	a4b3	Hipoclorito de calcio 2.5% + 20'
T13	a5b1	Hipoclorito de calcio 3% + 10'
T14	a5b2	Hipoclorito de calcio 3% + 15'
T15	a5b3	Hipoclorito de calcio 3% + 20'
T16	a6b1	Hipoclorito de calcio 4% + 10'
T17	a6b2	Hipoclorito de calcio 4% + 15'
T18	a6b3	Hipoclorito de calcio 4% + 20'

---

a = concentraciones de hipoclorito de sodio      b = tiempo de desinfección

### 3.3.9.2. Etapa de crecimiento (Etapa II)

Se utilizaron citoquinina (Bencilaminopurina) y auxina (Ácido naftalenacético) como reguladores de crecimiento en las siguientes concentraciones:

#### Bencilaminopurina (BAP): Factor A

a1= 0.5 mg/L

a2= 1.0 mg/L

a3= 1.5

a4= 2.0 mg/L

### Ácido naftalenacético (ANA): Factor B

b1= 0.1 mg/L

b1= 0.5 mg/L

b1= 1.0 mg/L

b1= 1.5 mg/L

### Tratamientos en estudio

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

Cuadro 4. Combinaciones y diseño de tratamientos para la etapa de crecimiento.

Tratamiento	Clave	BAP (A) <sub>1</sub> (mg/L)		ANA (B) <sub>2</sub> (mg/L)
T1	a1b1	0.5	+	0.1
T2	a1b2	0.5	+	0.5
T3	a1b3	0.5	+	1.0
T4	a1b4	0.5	+	1.5
T5	a2b1	1.0	+	0.1
T6	a2b2	1.0	+	0.5
T7	a2b3	1.0	+	1.0
T8	a2b4	1.0	+	1.5

T9	a3b1	1.5	+	0.1
T10	a3b2	1.5	+	0.5
T11	a3b3	1.5	+	1.0
T12	a3b4	1.5	+	1.5
T13	a4b1	2.0	+	0.1
T14	a4b2	2.0	+	0.5
T15	a4b3	2.0	+	1.0
T16	a4b4	2.0	+	1.5

---

1= Bencilaminopurina

2= Ácido naftalenacético

a= concentraciones de bencilaminopurina    b= concentraciones de Ácido naftalenacético

### 3.3.10. Diseño experimental

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

### 3.3.11. Evaluación

#### 3.3.11.1. Contaminación

Se calculó un ponderado de contaminación de yemas en base al total de repeticiones por tratamiento, utilizando una escala de valores:

0: sin contaminación.

1: contaminación total.

### **3.3.11.2. Respuesta oxidativa (fenolización)**

Se evaluó la respuesta del explante (sección nodal o nudo) si se produce una coloración parda en el medio de cultivo. Se asignó una escala a la fenolización según su diámetro de difusión relativa en el medio de cultivo y se determinó los días de inicio.

0: sin fenolización.

1: fenolización media.

2: fenolización total.

### **3.3.11.3. Días a la formación de brotes**

Se determinaron los días transcurridos desde la siembra de los explantes en el medio de cultivo hasta el inicio de formación de los brotes.

#### **A. Número de brotes**

Se contabilizó el número de brotes diferenciables por plántula; con evaluaciones cada cinco días en un periodo de dos meses.

#### **B. Longitud y/o diámetro de brotes**

Iniciada la aparición del brote, se midió la altura y/o diámetro de este, en lapsos de dos días, durante dos meses.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Evaluación de la contaminación de las yemas por tratamiento

De acuerdo al Cuadro 5 se aprecia que el tratamiento T1 (Hipoclorito de sodio 1.0% + 10'), T2 (Hipoclorito de sodio 1.0% + 15') y T4 (Hipoclorito de sodio 1.5% + 10') muestran una contaminación completa del explante; mientras que para los tratamientos T3 (Hipoclorito de sodio 1.0% + 20'), T5 (Hipoclorito de sodio 1.5% + 15'), T6 (Hipoclorito de sodio 1.5% + 20'), T7 (Hipoclorito de sodio 2.0% + 10'), muestran una contaminación media, observándose también que a medida se incrementa el tiempo, entonces disminuye la contaminación del explante; mientras que en los tratamientos T8 (Hipoclorito de sodio 2.0% + 15'), T9 (Hipoclorito de sodio 2.0% + 20'), T10 (Hipoclorito de sodio 2.5% + 10'), T11 (Hipoclorito de sodio 2.5% + 15'), T12 (Hipoclorito de sodio 2.5% + 20'), T13 (Hipoclorito de sodio 3.0% + 10'), T14 (Hipoclorito de sodio 3.0% + 15'), T15 (Hipoclorito de sodio 3.0% + 20'), T16 (Hipoclorito de sodio 3.5% + 10'), T17 (Hipoclorito de sodio 3.5% + 15') y T18 (Hipoclorito de sodio 3.5% + 20'), no muestran contaminación al explante de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth); pero también se aprecia que para el tratamiento T7 (Hipoclorito de sodio 2.0% + 10') existe un alto coeficiente de variación estadística (154.92), manifestando resultados dudosos con respecto a la dosis y/o tratamiento; por lo que a una concentración de 2.0% o superior a ella, con un tiempo de 15 minutos es óptimo para desinfectar las

yemas axilares de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth) con hipoclorito de sodio.

Cuadro 5. Evaluación de la contaminación con hipoclorito de sodio

Tratamiento	Descripción	X	S	CV (%)
T1	1% + 10'	1.00	0.00	0.00
T2	1% + 15'	1.00	0.00	0.00
T3	1% + 20'	0.83	0.41	48.99
T4	1.5% + 10'	1.00	0.00	0.00
T5	1.5% + 15'	0.83	0.41	48.99
T6	1.5% + 20'	0.67	0.52	77.46
T7	2% + 10'	0.33	0.52	154.92
T8	2% + 15'	0.00	0.00	0.00
T9	2% + 20'	0.00	0.00	0.00
T10	2.5% + 10'	0.00	0.00	0.00
T11	2.5% + 15'	0.00	0.00	0.00
T12	2.5% + 20'	0.00	0.00	0.00
T13	3% + 10'	0.00	0.00	0.00
T14	3% + 15'	0.00	0.00	0.00
T15	3% + 20'	0.00	0.00	0.00
T16	4% + 10'	0.00	0.00	0.00
T17	4% + 15'	0.00	0.00	0.00
T18	4% + 20'	0.00	0.00	0.00

T1 (Hipoclorito de sodio 1.0% + 10'), T2 (Hipoclorito de sodio 1.0% + 15'), T3 (Hipoclorito de sodio 1.0% + 20'), T4 (Hipoclorito de sodio 1.5% + 10'), T5 (Hipoclorito de sodio 1.5% + 15'), T6 (Hipoclorito de sodio 1.5% + 20'), T7 (Hipoclorito de sodio 2.0% + 10'), T8 (Hipoclorito de sodio 2.0% + 15'), T9 (Hipoclorito de sodio 2.0% + 20'), T10 (Hipoclorito de sodio 2.5% + 10'), T11 (Hipoclorito de sodio 2.5% + 15'), T12 (Hipoclorito de sodio 2.5% + 20'), T13 (Hipoclorito de sodio 3.0% + 10'), T14 (Hipoclorito de sodio 3.0% + 15'), T15 (Hipoclorito de sodio 3.0% + 20'), T16 (Hipoclorito de sodio 3.5% + 10'), T17 (Hipoclorito de sodio 3.5% + 15') y T18 (Hipoclorito de sodio 3.5% + 20').

En el Cuadro 6 se muestra se aprecia que el tratamiento T1 (Hipoclorito de calcio 1.0% + 10'), T2 (Hipoclorito de calcio 1.0% + 15'), T3 (Hipoclorito de calcio 1.0% + 20'), T4 (Hipoclorito de calcio 1.5% + 10'), T5 (Hipoclorito de calcio 1.5% + 15') muestran una contaminación completa del explante; mientras que para los tratamientos T6 (Hipoclorito de calcio 1.5% + 20'), T7 (Hipoclorito de calcio 2.0% + 10'), T8 (Hipoclorito de calcio 2.0% + 15'), T9 (Hipoclorito de calcio 2.0% + 20'), muestran una contaminación media, observándose también que a medida se incrementa el tiempo, entonces disminuye la contaminación del explante; mientras que en los tratamientos T10 (Hipoclorito de calcio 2.5% + 10'), T11 (Hipoclorito de calcio 2.5% + 15'), T12 (Hipoclorito de calcio 2.5% + 20'), T13 (Hipoclorito de calcio 3.0% + 10'), T14 (Hipoclorito de calcio 3.0% + 15'), T15 (Hipoclorito de calcio 3.0% + 20'), T16 (Hipoclorito de calcio 3.5% + 10'), T17 (Hipoclorito de calcio 3.5% + 15') y T18 (Hipoclorito de calcio 3.5% + 20'), no muestran contaminación al explante de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth); pero también se aprecia que para el tratamiento T9 (Hipoclorito de calcio 2.0% + 20') existe un alto coeficiente de variación estadística (244.95), manifestando resultados dudosos con respecto a la dosis y/o tratamiento; por lo que a una concentración de 2.5% o superior a ella, con un tiempo de 10 minutos es óptimo para desinfectar las yemas axilares de la capirona con hipoclorito de calcio.

Cuadro 6. Evaluación de la contaminación con hipoclorito de calcio

Tratamiento	Descripción	X	S	CV (%)
T1	1% + 10'	1.00	0.00	0.00
T2	1% + 15'	1.00	0.00	0.00
T3	1% + 20'	1.00	0.00	0.00
T4	1.5% + 10'	1.00	0.00	0.00
T5	1.5% + 15'	1.00	0.00	0.00
T6	1.5% + 20'	0.83	0.41	48.99
T7	2% + 10'	0.83	0.41	48.99
T8	2% + 15'	0.50	0.55	109.54
T9	2% + 20'	0.17	0.41	244.95
T10	2.5% + 10'	0.00	0.00	0.00
T11	2.5% + 15'	0.00	0.00	0.00
T12	2.5% + 20'	0.00	0.00	0.00
T13	3% + 10'	0.00	0.00	0.00
T14	3% + 15'	0.00	0.00	0.00
T15	3% + 20'	0.00	0.00	0.00
T16	4% + 10'	0.00	0.00	0.00
T17	4% + 15'	0.00	0.00	0.00
T18	4% + 20'	0.00	0.00	0.00

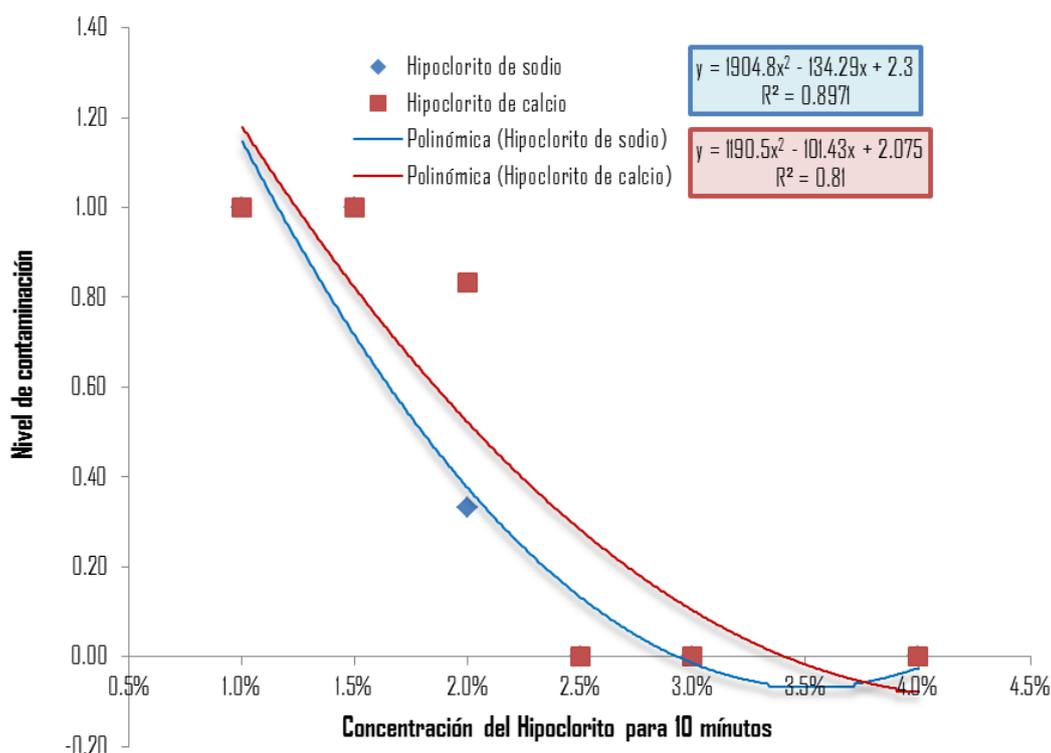
T1 (Hipoclorito de calcio 1.0% + 10'), T2 (Hipoclorito de calcio 1.0% + 15'), T3 (Hipoclorito de calcio 1.0% + 20'), T4 (Hipoclorito de calcio 1.5% + 10'), T5 (Hipoclorito de calcio 1.5% + 15'), T6 (Hipoclorito de calcio 1.5% + 20'), T7 (Hipoclorito de calcio 2.0% + 10'), T8 (Hipoclorito de calcio 2.0% + 15'), T9 (Hipoclorito de calcio 2.0% + 20'), T10 (Hipoclorito de calcio 2.5% + 10'), T11 (Hipoclorito de calcio 2.5% + 15'), T12 (Hipoclorito de calcio 2.5% + 20'), T13 (Hipoclorito de calcio 3.0% + 10'), T14 (Hipoclorito de calcio 3.0% + 15'), T15 (Hipoclorito de calcio 3.0% + 20'), T16 (Hipoclorito de calcio 3.5% + 10'), T17 (Hipoclorito de calcio 3.5% + 15') y T18 (Hipoclorito de calcio 3.5% + 20').

Cuadro 7. Resumen de comparación de contaminación entre el hipoclorito de sodio y calcio

Tiempo (minutos)	Porcentaje (%)	Hipoclorito	
		Sodio	Calcio
10	1.0%	1.00	1.00
	1.5%	1.00	1.00
	2.0%	0.33	0.83
	2.5%	0.00	0.00
	3.0%	0.00	0.00
	4.0%	0.00	0.00
15	1.0%	1.00	1.00
	1.5%	0.83	1.00
	2.0%	0.00	0.50
	2.5%	0.00	0.00
	3.0%	0.00	0.00
	4.0%	0.00	0.00
20	1.0%	0.83	1.00
	1.5%	0.67	0.83
	2.0%	0.00	0.17
	2.5%	0.00	0.00
	3.0%	0.00	0.00
	4.0%	0.00	0.00

Por lo que en el Cuadro 7 se muestra el resumen del comportamiento del hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio con respecto a la contaminación, donde a los 10 minutos a los 2.5% de concentración del hipoclorito de sodio y/o calcio ya no existe contaminación, también a los 15 minutos a una concentración de 2.0% de hipoclorito de sodio no existe contaminación, pero todavía a una concentración de 2.5% de hipoclorito de calcio no existe contaminación, teniendo los mismos resultados a un tiempo de

20 minutos de desinfección. DOMINGUEZ (1986) menciona que este fungicida y bactericida es importante tener las dosis adecuadas de concentración; quiere decir que a menores concentraciones se mantendrá las yemas en un buen estado, ya que estos oxidantes queman el material vegetativo (DELGADO y ROJAS, 1999).



**Figura 1. Comportamiento del nivel de contaminación a los 10 minutos.**

En la Figura 1 se muestra el comportamiento del nivel de contaminación en función de las concentraciones el hipoclorito de sodio y calcio a 10 minutos de desinfección, la cual describe para el desinfectante hipoclorito de sodio una ecuación polinómica, de la forma  $y = 1904.8x^2 - 134.29x + 2.3$ , con un coeficiente de determinación de 0.8971; y el desinfectante hipoclorito de calcio describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 1190.5x^2 - 101.43x + 2.075$ , con un coeficiente de determinación de 0.81. Una de las posibles

explicaciones es que el hipoclorito de sodio tiene una mayor eficiencia al hipoclorito de calcio, por lo que muestra mejores resultados en cuanto a desinfección de los explantes (BONGA, 1985), además también ayudó su efecto de oxidante (MROGINSKI *et al.*, 1991), y también por su acción bactericida excelente (PIERICK, 1990), las dosis empleadas ayudan a tener mejores resultados, pero en exceso no es favorable para el explante (ROCA y MROGINSKI, 1991).

PIERICK (1990) menciona que para las para las plantas sensibles a la lejía (hipoclorito de sodio) mejor es usar el hipoclorito de calcio ya que este si se puede usar a concentraciones mayores de 1%,

En la Figura 2 se muestra el comportamiento del nivel de contaminación en función de las concentraciones el hipoclorito de sodio y calcio a 15 minutos de desinfección, la cual describe para el desinfectante hipoclorito de sodio una ecuación polinómica, de la forma  $y = 2381.0x^2 - 158.81x + 2.3667$ , con un coeficiente de determinación de 0.8838; y el desinfectante hipoclorito de calcio describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 1666.7x^2 - 123.33x + 2.225$ , con un coeficiente de determinación de 0.8931. También muestra un comportamiento similar a una desinfección de 10 minutos, por lo que el hipoclorito de sodio también tiene una mayor eficiencia al hipoclorito de calcio, mostrando mejores resultados en cuanto a desinfección de los explantes (BONGA, 1985), además también ayudó su efecto de oxidante ( $\text{NaClO}$  y  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) (MROGINSKI *et al.*, 1991), y también por su acción

bactericida y fúngica excelente (PIERICK, 1990), las dosis empleadas ayudan a tener mejores resultados, pero en exceso no es favorable para el explante (ROCA y MROGINSKI, 1991).

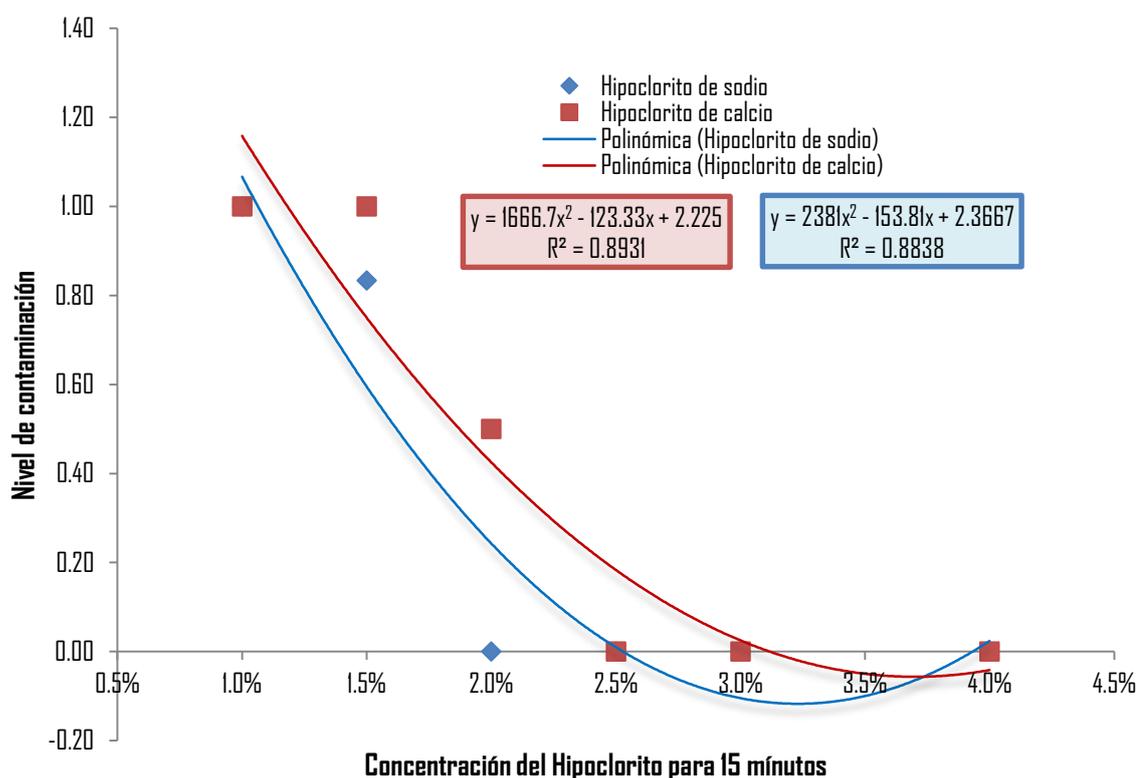


Figura 2. Comportamiento del nivel de contaminación a los 15 minutos.

En la Figura 3 se muestra el comportamiento del nivel de contaminación en función de las concentraciones el hipoclorito de sodio y calcio a 20 minutos de desinfección, la cual describe para el desinfectante hipoclorito de sodio una ecuación polinómica, de la forma  $y = 1984.1x^2 - 127.78x + 1.9583$ , con un coeficiente de determinación de 0.8939; y el desinfectante hipoclorito de calcio describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 2142.9x^2 - 142.86x + 2.2917$ , con un coeficiente de determinación de 0.9333.

DELGADO (1999) menciona que es importante para tener buenos resultados, el control de las variables óptimamente (concentración y tiempo de desinfección), porque si no VARGAS (1982) menciona que la micro propagación *In vitro* sería un fracaso; es por ello que tener 20 minutos sumergidos al explante en el desinfectante puede ocasionar resultados no favorables.

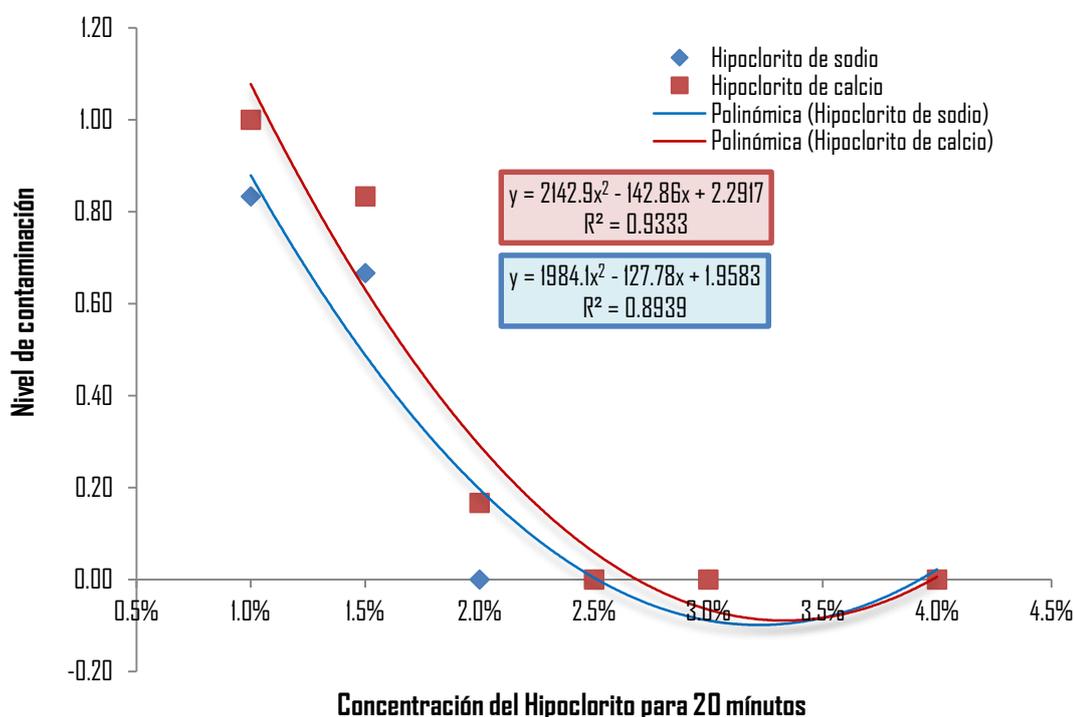


Figura 3. Comportamiento del nivel de contaminación a los 20 minutos.

En el Cuadro 8 se muestra que el factor A (concentraciones de hipoclorito de calcio y sodio) es altamente significativo para niveles de confianza del 95% y 99% para el hipoclorito de sodio así como para el hipoclorito de calcio, lo que indica que existe diferencia estadística en cuanto al uso de diferentes concentraciones; para el factor B (tiempo de evaluación) también existe una diferencia estadística significativa para niveles de confianza

del 95%, por lo que indica que también hay diferencia en el tiempo de desinfección. También se muestra que la interacción para el hipoclorito de sodio no es significativa, pero para el hipoclorito de calcio si son significativos, mostrando mejores resultados que en la desinfección para el hipoclorito de sodio.

Cuadro 8. ANVA de la contaminación del hipoclorito de sodio y calcio.

ANVA	GL	contaminación hipoclorito de sodio		contaminación hipoclorito de calcio	
		CM	SIG	CM	SIG
A	5	3.61481481	**	4.12592593	**
B	2	0.17592593	*	0.17592593	*
A*B	10	0.05370370	NS	0.10925926	*
ERROR	90	0.04814815		0.04444444	
TOTAL	107				

A = concentraciones de hipoclorito de sodio y B = tiempo de desinfección

#### 4.2. Evaluación de la finalización como respuesta del explante

De acuerdo al Cuadro 9 se aprecia que el tratamiento T1 (Hipoclorito de sodio 1.0% + 10'), T2 (Hipoclorito de sodio 1.0% + 15'), T3 (Hipoclorito de sodio 1.0% + 20'), T4 (Hipoclorito de sodio 1.5% + 10'), T5 (Hipoclorito de sodio 1.5% + 15'), T6 (Hipoclorito de sodio 1.5% + 20'), T7 (Hipoclorito de sodio 2.0% + 10'), T8 (Hipoclorito de sodio 2.0% + 15') se muestra como respuesta del explante sin fenolización (no muestra coloración); mientras que para los tratamientos T9 (Hipoclorito de sodio 2.0% + 20'), T10 (Hipoclorito de sodio 2.5% + 10'), T11 (Hipoclorito de sodio 2.5% + 15'), T12 (Hipoclorito de sodio 2.5% + 20'), muestra como respuesta del explante una fenolización media (muestra coloración opaca); mientras que en los

tratamientos T13 (Hipoclorito de sodio 3.0% + 10'), T14 (Hipoclorito de sodio 3.0% + 15'), T15 (Hipoclorito de sodio 3.0% + 20'), T16 (Hipoclorito de sodio 3.5% + 10'), T17 (Hipoclorito de sodio 3.5% + 15') y T18 (Hipoclorito de sodio 3.5% + 20'), muestran una fenolización completa o total (muestra coloración total) al explante de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth); pero también se aprecia que para el tratamiento T9 (Hipoclorito de sodio 2.0% + 20') existe un alto coeficiente de variación estadística (244.95%), manifestando resultados dudosos con respecto a la dosis y/o tratamiento; por lo que a una concentración de 3.0% o superior a ella, con un tiempo de 10 minutos se maximiza las coloraciones (fenolizaciones) de las yemas axilares de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth) con hipoclorito de sodio.

Cuadro 9. Evaluación de la fenolización con hipoclorito de sodio.

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>	<b>X</b>	<b>S</b>	<b>CV (%)</b>
T1	1% + 10'	0.00	0.00	0.00
T2	1% + 15'	0.00	0.00	0.00
T3	1% + 20'	0.00	0.00	0.00
T4	1.5% + 10'	0.00	0.00	0.00
T5	1.5% + 15'	0.00	0.00	0.00
T6	1.5% + 20'	0.00	0.00	0.00
T7	2% + 10'	0.00	0.00	0.00
T8	2% + 15'	0.00	0.00	0.00
T9	2% + 20'	0.17	0.41	244.95
T10	2.5% + 10'	1.67	0.52	30.98
T11	2.5% + 15'	1.67	0.52	30.98

T12	2.5% + 20'	1.83	0.41	22.27
T13	3% + 10'	2.00	0.00	0.00
T14	3% + 15'	2.00	0.00	0.00
T15	3% + 20'	2.00	0.00	0.00
T16	4% + 10'	2.00	0.00	0.00
T17	4% + 15'	2.00	0.00	0.00
T18	4% + 20'	2.00	0.00	0.00

T1 (Hipoclorito de sodio 1.0% + 10'), T2 (Hipoclorito de sodio 1.0% + 15'), T3 (Hipoclorito de sodio 1.0% + 20'), T4 (Hipoclorito de sodio 1.5% + 10'), T5 (Hipoclorito de sodio 1.5% + 15'), T6 (Hipoclorito de sodio 1.5% + 20'), T7 (Hipoclorito de sodio 2.0% + 10'), T8 (Hipoclorito de sodio 2.0% + 15'), T9 (Hipoclorito de sodio 2.0% + 20'), T10 (Hipoclorito de sodio 2.5% + 10'), T11 (Hipoclorito de sodio 2.5% + 15'), T12 (Hipoclorito de sodio 2.5% + 20'), T13 (Hipoclorito de sodio 3.0% + 10'), T14 (Hipoclorito de sodio 3.0% + 15'), T15 (Hipoclorito de sodio 3.0% + 20'), T16 (Hipoclorito de sodio 3.5% + 10'), T17 (Hipoclorito de sodio 3.5% + 15') y T18 (Hipoclorito de sodio 3.5% + 20').

De acuerdo al Cuadro 10 se aprecia que el tratamiento T1 (Hipoclorito de calcio 1.0% + 10'), T2 (Hipoclorito de calcio 1.0% + 15'), T3 (Hipoclorito de calcio 1.0% + 20'), T4 (Hipoclorito de calcio 1.5% + 10'), T5 (Hipoclorito de calcio 1.5% + 15'), T6 (Hipoclorito de calcio 1.5% + 20'), T7 (Hipoclorito de calcio 2.0% + 10'), T8 (Hipoclorito de calcio 2.0% + 15'), T9 (Hipoclorito de calcio 2.0% + 20'), T10 (Hipoclorito de calcio 2.5% + 10'), T11 (Hipoclorito de calcio 2.5% + 15') se muestra como respuesta del explante sin fenolización (no muestra coloración); mientras que para los tratamientos T12 (Hipoclorito de calcio 2.5% + 20'), T13 (Hipoclorito de calcio 3.0% + 10'), T14 (Hipoclorito de calcio 3.0% + 15'), muestra como respuesta del explante una fenolización media (muestra coloración opaca); mientras que en los tratamientos T15 (Hipoclorito de calcio 3.0% + 20'), T16 (Hipoclorito de calcio 3.5% + 10'), T17 (Hipoclorito de calcio 3.5% + 15') y T18 (Hipoclorito de calcio

3.5% + 20'), muestran una fenolización completa o total (muestra coloración total) al explante de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth).

Cuadro 10. Evaluación de la fenolización con hipoclorito de calcio.

Tratamiento	Descripción	X	S	CV (%)
T1	1% + 10'	0.00	0.00	0.00
T2	1% + 15'	0.00	0.00	0.00
T3	1% + 20'	0.00	0.00	0.00
T4	1.5% + 10'	0.00	0.00	0.00
T5	1.5% + 15'	0.00	0.00	0.00
T6	1.5% + 20'	0.00	0.00	0.00
T7	2% + 10'	0.00	0.00	0.00
T8	2% + 15'	0.00	0.00	0.00
T9	2% + 20'	0.00	0.00	0.00
T10	2.5% + 10'	0.00	0.00	0.00
T11	2.5% + 15'	0.00	0.00	0.00
T12	2.5% + 20'	0.17	0.41	244.95
T13	3% + 10'	1.33	0.52	38.73
T14	3% + 15'	1.67	0.52	30.98
T15	3% + 20'	2.00	0.00	0.00
T16	4% + 10'	2.00	0.00	0.00
T17	4% + 15'	2.00	0.00	0.00
T18	4% + 20'	2.00	0.00	0.00

T1 (Hipoclorito de calcio 1.0% + 10'), T2 (Hipoclorito de calcio 1.0% + 15'), T3 (Hipoclorito de calcio 1.0% + 20'), T4 (Hipoclorito de calcio 1.5% + 10'), T5 (Hipoclorito de calcio 1.5% + 15'), T6 (Hipoclorito de calcio 1.5% + 20'), T7 (Hipoclorito de calcio 2.0% + 10'), T8 (Hipoclorito de calcio 2.0% + 15'), T9 (Hipoclorito de calcio 2.0% + 20'), T10 (Hipoclorito de calcio 2.5% + 10'), T11 (Hipoclorito de calcio 2.5% + 15'), T12 (Hipoclorito de calcio 2.5% + 20'), T13 (Hipoclorito de calcio 3.0% + 10'), T14 (Hipoclorito de calcio 3.0% + 15'), T15 (Hipoclorito de calcio 3.0% + 20'), T16 (Hipoclorito de calcio 3.5% + 10'), T17 (Hipoclorito de calcio 3.5% + 15') y T18 (Hipoclorito de calcio 3.5% + 20').

Pero también se aprecia que para el tratamiento T12 (Hipoclorito de calcio 2.5% + 20') existe un alto coeficiente de variación estadística (244.95%), manifestando resultados dudosos con respecto a la dosis y/o tratamiento; por lo que a una concentración de 3.0% o superior a ella, con un tiempo de 20

minutos se maximiza las coloraciones (fenalizaciones) de las yemas axilares de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth) con hipoclorito de calcio.

Cuadro 11. Resumen de comparación de fenolización entre el hipoclorito de sodio y calcio

Tiempo (minutos)	Porcentaje (%)	HIPOCLORITO	
		SODIO	CALCIO
10	1.0%	0.00	0.00
	1.5%	0.00	0.00
	2.0%	0.00	0.00
	2.5%	1.67	0.00
	3.0%	2.00	1.33
	4.0%	2.00	2.00
15	1.0%	0.00	0.00
	1.5%	0.00	0.00
	2.0%	0.00	0.00
	2.5%	1.67	0.00
	3.0%	2.00	1.67
	4.0%	2.00	2.00
20	1.0%	0.00	0.00
	1.5%	0.00	0.00
	2.0%	0.17	0.00
	2.5%	1.83	0.17
	3.0%	2.00	2.00
	4.0%	2.00	2.00

En el Cuadro 11 se muestra el resumen del comportamiento del hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio con respecto a la fenolización, donde a los 10 minutos, hasta los 2.0% de concentración del hipoclorito de sodio y 2.5% del hipoclorito de calcio no existe fenolización, de 2.5% de hipoclorito de sodio y 3.0% de hipoclorito de calcio una fenolización media y de 3.0% de

hipoclorito de sodio y 4.0 de hipoclorito de calcio muestra una fenolización total, también a los 15 minutos hasta los 2.0% de concentración del hipoclorito de sodio y 2.5% del hipoclorito de calcio no existe fenolización, de 2.5% de hipoclorito de sodio y 3.0% de hipoclorito de calcio una fenolización media y de 3.0% de hipoclorito de sodio y 4.0 de hipoclorito de calcio muestra una fenolización total, y a los 20 minutos hasta los 1.5% de concentración del hipoclorito de sodio y 2.0% del hipoclorito de calcio no existe fenolización, de 2.0% de hipoclorito de sodio y 2.5% de hipoclorito de calcio una fenolización media y de 3.0% de hipoclorito de sodio y de hipoclorito de calcio muestra una fenolización total. DOMINGUEZ (1986) menciona a que este fungicida y bactericida es importante controlar la concentración, ya que como oxidante tiende a colorear intensamente los tejidos vegetales afectando directamente los cultivos *In vitro* (DELGADO y ROJAS, 1999).

En la Figura 4 se muestra el comportamiento del nivel de fenolización en función de las concentraciones el hipoclorito de sodio y calcio a 10 minutos de desinfección, la cual describe para el desinfectante hipoclorito de sodio una ecuación polinómica, de la forma  $y = -1269.8x^2 + 148.25x - 1.7$ , con un coeficiente de determinación de 0.788; y el desinfectante hipoclorito de calcio describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 2857.1x^2 - 70.476x + 0.3667$ , con un coeficiente de determinación de 0.8876. Una de las posibles explicaciones es que el hipoclorito de sodio por ser mejor oxidante tiene una mayor eficiencia al hipoclorito de calcio, al reaccionar con el oxígeno del aire, por lo que muestra resultados más notorios en cuanto a fenolización de los

explantes (BONGA, 1985 y MROGINSKI *et al.*, 1991), las dosis empleadas ayudan a tener mejores resultados, pero en exceso no es favorable para el explante (ROCA y MROGINSKI, 1991).

PEREZ (1993) menciona que en la práctica se usan yemas axilares de ramas más jóvenes que tengan un rápido y vigoroso crecimiento, de esta manera evitar la fenolización de estas, además PIERICK (1990) menciona una alta o total fenolización de los explantes impide un buen enraizamiento de las especies vegetativas.

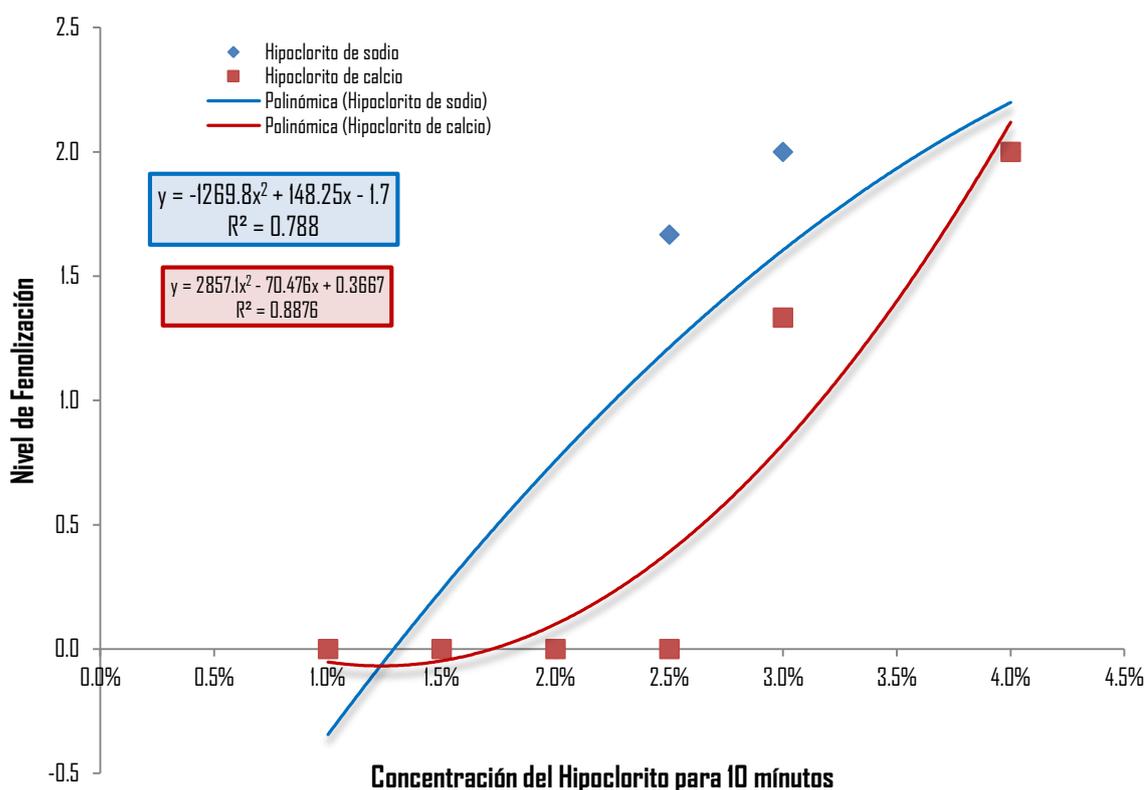


Figura 4. Comportamiento del nivel de fenolización a los 10 minutos.

En la Figura 5 se muestra el comportamiento del nivel de fenolización en función de las concentraciones el hipoclorito de sodio y calcio a

15 minutos de desinfección, la cual describe el desinfectante hipoclorito de sodio una ecuación polinómica, de la forma  $y = -1269.8x^2 + 148.25x - 1.7$ , con un coeficiente de determinación de 0.788; y el desinfectante hipoclorito de calcio describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 2381.0x^2 - 42.857x + 0.0833$ , con un coeficiente de determinación de 0.812. También muestra un comportamiento similar a una desinfección de 10 minutos, por lo que el hipoclorito de sodio también tiene una mayor oxidación al hipoclorito de calcio, mostrando resultados no favorables en cuanto a fenolización de los explantes (BONGA, 1985), su efecto oxidante ( $\text{NaClO}$  y  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) (MROGINSKI *et al.*, 1991 y PIERICK, 1990) produce resultados desfavorables para el cultivo *In vitro*, por lo que debe realizar una buena selección del material vegetativo y controlar las concentraciones de los desinfectantes (ROCA y MROGINSKI, 1991).

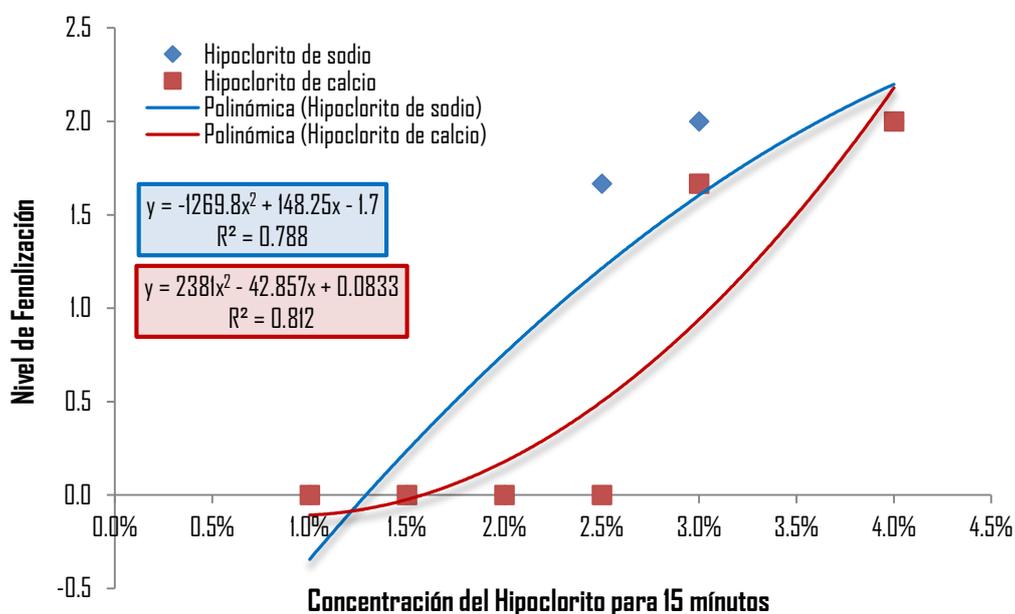


Figura 5. Comportamiento del nivel de fenolización a los 15 minutos.

En la Figura 6 también se muestra el comportamiento del nivel de fenolización en función de las concentraciones el hipoclorito de sodio y calcio a 20 minutos de desinfección, la cual describe para el desinfectante hipoclorito de sodio una ecuación polinómica, de la forma  $y = -1825.4x^2 + 175.56x - 1.925$ , con un coeficiente de determinación de 0.8015; y el desinfectante hipoclorito de calcio describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 1587.3x^2 + 1.111x - 0.35$ , con un coeficiente de determinación de 0.7616. También muestra un comportamiento similar a una desinfección de 10 y 15 minutos, mostrando que el hipoclorito de sodio también tiene una mayor oxidación al hipoclorito de calcio, por lo que ocasiona resultados no favorables en cuanto a fenolización de los explantes (BONGA, 1985).

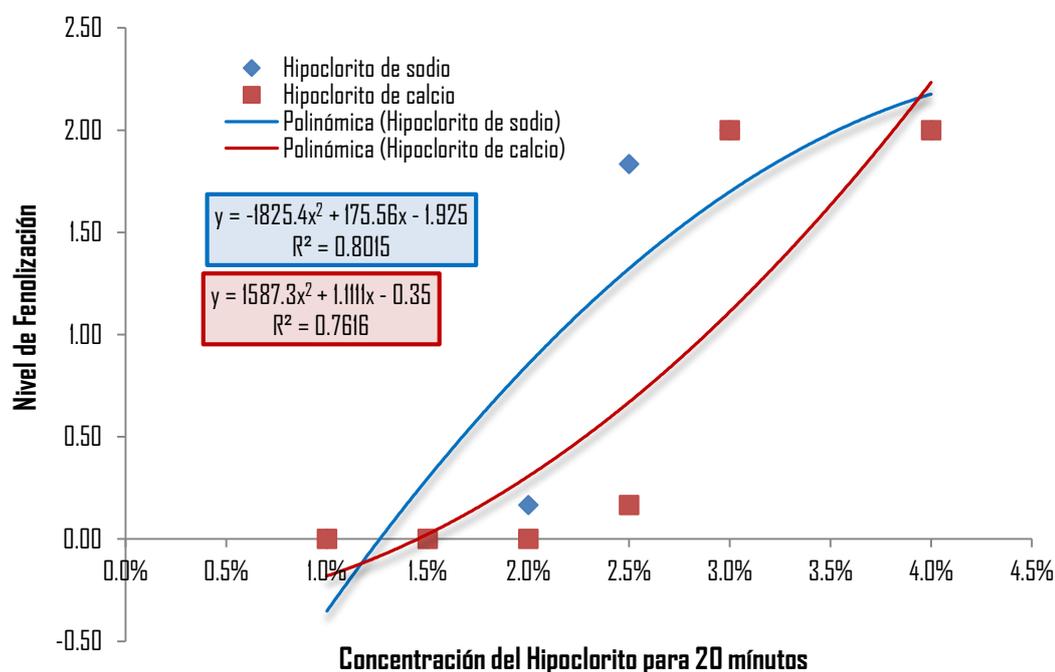


Figura 6. Comportamiento del nivel de fenolización a los 20 minutos

De acuerdo a los resultados el hipoclorito de calcio ha mostrado mejores cualidades en cuanto a la protección del explante de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth) por la contaminación que ofrece el medio ambiente, además inactivando a una baja concentración los riesgos de fenolización de los tejidos del material biológico, lo cual sería un problema para su propagación en campo definitivo.

Cuadro 12. ANVA de la fenolización del hipoclorito de sodio y calcio

ANVA	GL	Fenolizacion con hipoclorito de sodio		Fenolizacionhipo con clorito de calcio	
		CM	SIG	CM	SIG
A	5	19.45926	**	16.09815	**
B	2	0.037037	NS	0.175926	*
A*B	10	0.014815	NS	0.109259	**
ERROR	90	0.048148		0.038889	
TOTAL	107				

A = concentraciones de hipoclorito de sodio y B = tiempo de desinfección

En el Cuadro 12 se muestra que el factor A (concentraciones de hipoclorito de calcio y sodio) es altamente significativo para niveles de confianza del 95% y 99% para el hipoclorito de sodio así como para el hipoclorito de calcio, lo que indica que existe diferencia estadística en cuanto al uso de diferentes concentraciones; para el factor B (tiempo de evaluación) no existe una diferencia estadística significativa para el hipoclorito de sodio, por lo que indica que no hay diferencia en el tiempo de desinfección; mientras que para el hipoclorito de calcio si existe una diferencia significativa estadísticamente a un nivel de confianza del 95%, por lo que indica que hay

diferencia en el tiempo de desinfección. También se muestra que la interacción para el hipoclorito de sodio no es significativa, pero para el hipoclorito de calcio si son altamente significativos estadísticamente, mostrando mejores resultados que en la desinfección para el hipoclorito de sodio.

#### **4.3. Desarrollo de las yemas desinfectadas en la etapa de crecimiento (Etapa II).**

En el Cuadro 13 se muestra la formación de callo donde los tratamientos T1 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T2 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T3 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L), T4 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L), T5 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T6 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T7 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L), T8 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L) no muestran formación de callos, mientras que para los tratamientos T9 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T10 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T11 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L), T12 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L), T13 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T14 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T15 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L) y T16 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido

naftalenacético 1.5 mg/L) muestran formación de callos los explantes de capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth), además se observa que a medida que se aumenta la concentración de Bencilaminopurina (BAP) y Ácido naftalenacético (ANA), ya que son reguladoras de crecimiento, aumenta la formación de callos; además se muestra que desde el tratamiento T14 al T16 disminuye el coeficiente de variación estadística de 244.95% a 109.54%.

Cuadro 13. Evaluación de la formación de callos

Tratamiento	Descripción	BAP (mg/L)	ANA (mg/L)	X	S	CV
T1	0.5 + 0.1	0.5	0.1	0.00	0.00	0.00
T2	0.5 + 0.5	0.5	0.5	0.00	0.00	0.00
T3	0.5 + 1	0.5	1.0	0.00	0.00	0.00
T4	0.5 + 1.5	0.5	1.5	0.00	0.00	0.00
T5	1 + 0.1	1.0	0.1	0.00	0.00	0.00
T6	1 + 0.5	1.0	0.5	0.00	0.00	0.00
T7	1 + 1	1.0	1.0	0.00	0.00	0.00
T8	1 + 1.5	1.0	1.5	0.00	0.00	0.00
T9	1.5 + 0.1	1.5	0.1	0.17	0.41	244.95
T10	1.5 + 0.5	1.5	0.5	0.17	0.41	244.95
T11	1.5 + 1	1.5	1.0	0.33	0.52	154.92
T12	1.5 + 1.5	1.5	1.5	0.17	0.41	244.95
T13	2 + 0.1	2.0	0.1	0.33	0.52	154.92
T14	2 + 0.5	2.0	0.5	0.50	0.55	109.54
T15	2 + 1	2.0	1.0	0.50	0.55	109.54
T16	2 + 1.5	2.0	1.5	0.50	0.55	109.54

T1 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T2 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T3 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L), T4 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L), T5 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T6 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T7 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L), T8 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L), T9 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T10 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T11 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L), T12 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L), T13 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T14 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T15 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L) y T16 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L).

Según GLOVAK y GREATBACH (1982) y VILLALOBOS y THORPE (1991), las citoquininas son fundamentalmente reguladores del crecimiento para la formación de callos, es por ello que a medida que se aumentó la concentración del BAP, como resultado se observó la formación de callos. La citoquinona empleada en el presente trabajo fue la 6-bencilaminopurina (6-BAP), siendo la más efectiva (ORELLANA 1998) en la inducción de yemas axilares de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth). MELLA *et al.* (1997), señala que el ácido indol acético también son hormonas que promueven el crecimiento de las plantas, por lo que corroboro con los resultados obtenidos.

Cuadro 14. ANVA para la formación de callos

ANVA	GL	Formación de callos	
		CM	SIG
A	3	1.138889	**
B	3	0.027826	NS
A*B	9	0.018502	NS
ERROR	80	0.120833	
TOTAL	95		

A= concentraciones de bencilaminopurina y B= concentraciones de Ácido naftalenacético

En el Cuadro 14 se observa el análisis de varianza de la formación de callos, por lo que el factor A es altamente significativo estadísticamente, indicando la diferencia entre las concentraciones del bencilaminopurina a niveles de confianza del 95% y 99%; pero el factor B no es significativo

estadísticamente, indicando que no hay diferencia estadística en el uso del ácido naftalenacético; lo mismo sucede con la interacción del factor AXB. HURTADO y MERINO (1987) mencionan que los reguladores de crecimientos efectivos son las bencilaminopurina, mientras que DEVLIN (1980), manifiesta que algunos reguladores de crecimiento activan o deprimen determinados procesos fisiológicos, corroborando con los resultados obtenidos.

En el Cuadro 15 se muestra como resultado los diámetros y/o longitudes de las formaciones de callo, donde los tratamientos T1 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T2 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T3 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L), T4 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L), T5 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T6 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T7 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L), T8 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L) no presentan ningún diámetro y/o longitud, debido a que no hay formación de callos, mientras que para los tratamientos T9 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T10 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T11 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L), T12 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L), T13 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T14 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido

naftalenacético 0.5 mg/L), T15 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L) y T16 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L) muestran diámetros y/o longitud debido a que con estos tratamientos si existen formación de callos los explantes de capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth), además se observa que a medida que aumenta la concentración de Bencilaminopurina (BAP) y Ácido naftalenacético (ANA), ya que son reguladoras de crecimiento, aumenta la longitud o diámetro de los callos; además se observa que desde el tratamiento T14 al T16 disminuye el coeficiente de variación estadística de 244.95% a 109.88%., de esta manera mejorando los resultados.

Cuadro 15. Evaluación del diámetro de callos en (mm)

Tratamiento	Descripción	BAP (mg/L)	ANA (mg/L)	X	S	CV
T1	0.5 + 0.1	0.5	0.1	0.00	0.00	0.00
T2	0.5 + 0.5	0.5	0.5	0.00	0.00	0.00
T3	0.5 + 1	0.5	1.0	0.00	0.00	0.00
T4	0.5 + 1.5	0.5	1.5	0.00	0.00	0.00
T5	1 + 0.1	1.0	0.1	0.00	0.00	0.00
T6	1 + 0.5	1.0	0.5	0.00	0.00	0.00
T7	1 + 1	1.0	1.0	0.00	0.00	0.00
T8	1 + 1.5	1.0	1.5	0.00	0.00	0.00
T9	1.5 + 0.1	1.5	0.1	0.88	2.16	244.95
T10	1.5 + 0.5	1.5	0.5	0.83	2.04	244.95
T11	1.5 + 1	1.5	1.0	1.70	2.64	155.32
T12	1.5 + 1.5	1.5	1.5	0.88	2.16	244.95

T13	2 + 0.1	2.0	0.1	1.88	2.92	155.00
T14	2 + 0.5	2.0	0.5	2.92	3.20	109.59
T15	2 + 1	2.0	1.0	3.02	3.31	109.59
T16	2 + 1.5	2.0	1.5	3.08	3.39	109.88

T1 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T2 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T3 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L), T4 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L), T5 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T6 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T7 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L), T8 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L), T9 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T10 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T11 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L), T12 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L), T13 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T14 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T15 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L) y T16 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L).

ROJAS y RAMIREZ (1993) mencionan que a altas concentraciones de estos reguladores de crecimientos pueden ocasionar anomalías en la formación de raíces y necrosis de los tejidos, por lo que en los resultados no se presentó ninguno de estos efectos, una explicación posible es que las concentraciones usadas no fueron muy altas. BIDWELL (1979) indica que las auxinas influyen en la estimulación como en la inhibición del crecimiento, mostrando las estructuras de las células respuestas opuestas dependiendo de la concentración, por lo que también corrobora los resultados obtenidos.

Cuadro 16. ANVA para el diámetro de callos.

ANVA	GL	Diámetro de callos	
		CM	SIG
A	3	39.770000	**
B	3	0.971029	NS
A*B	9	0.663731	NS
ERROR	80	3.853042	
TOTAL	95		

A= concentraciones de bencilaminopurina y B= concentraciones de Ácido naftalenacético

En el Cuadro 16 se observa el análisis de varianza de la longitud y/o diámetro de las formaciones de callos, por lo que el factor A es altamente significativo estadísticamente, indicando la diferencia entre las concentraciones del bencilaminopurina a niveles de confianza del 95% y 99%; pero el factor B no es significativo estadísticamente, indicando que no hay diferencia estadística en el uso del ácido naftalenacético; lo mismo sucede con la interacción del factor AXB. PIERIK (1990) mencionan que los reguladores de crecimientos efectivos son las bencilaminopurina, pero a determinadas concentraciones; mientras que BEAULIEU (1973), manifiesta que las auxinas (ANA) activan o deprimen determinados procesos fisiológicos, corroborando con los resultados obtenidos, y estas a elevadas concentraciones son fitotóxicos, ocasionando raíces cortas y gruesas y daños a la planta; pero como las concentraciones usadas no fueron muy altas para las yemas axilares, entonces no se presentó problemas en el explante de la capirona.

En el Cuadro 17 se muestra como resultado las formaciones de brotes o embriones, donde los tratamientos T1 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T2 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T3 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L), T4 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L), T5 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T6 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T7 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L), T8 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido

naftalenacético 1.5 mg/L) T9 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T10 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T11 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L), no presentan ningún brote o embrión, debido a que no hay formación de callos, mientras que para los tratamientos T12 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L), T13 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T14 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T15 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L) y T16 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L) muestran formación de brotes o embriones debido a que con estos tratamientos si existen formación de callos en los explantes de capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth). También se puede apreciar que disminuye el coeficiente de variación estadística desde los tratamientos 10 (244.95%) hasta el tratamiento 16 (122.47%).

Cuadro 17. Evaluación de número de brotes o embriones

Tratamiento	Descripción	BAP (mg/L)	ANA (mg/L)	X	S	CV (%)
T1	0.5 + 0.1	0.5	0.1	0.00	0.00	0.00
T2	0.5 + 0.5	0.5	0.5	0.00	0.00	0.00
T3	0.5 + 1	0.5	1.0	0.00	0.00	0.00
T4	0.5 + 1.5	0.5	1.5	0.00	0.00	0.00
T5	1 + 0.1	1.0	0.1	0.00	0.00	0.00

T6	1 + 0.5	1.0	0.5	0.00	0.00	0.00
T7	1 + 1	1.0	1.0	0.00	0.00	0.00
T8	1 + 1.5	1.0	1.5	0.00	0.00	0.00
T9	1.5 + 0.1	1.5	0.1	0.00	0.00	0.00
T10	1.5 + 0.5	1.5	0.5	0.33	0.82	244.95
T11	1.5 + 1	1.5	1.0	0.00	0.00	0.00
T12	1.5 + 1.5	1.5	1.5	0.17	0.41	244.95
T13	2 + 0.1	2.0	0.1	0.50	0.84	167.33
T14	2 + 0.5	2.0	0.5	0.83	1.17	140.29
T15	2 + 1	2.0	1.0	0.67	1.03	154.92
T16	2 + 1.5	2.0	1.5	0.67	0.82	122.47

T1 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T2 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T3 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L), T4 (Bencilaminopurina 0.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L), T5 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T6 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T7 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L), T8 (Bencilaminopurina 1.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L), T9 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T10 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T11 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L), T12 (Bencilaminopurina 1.5 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L), T13 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.1 mg/L), T14 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 0.5 mg/L), T15 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.0 mg/L) y T16 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L).

En el Cuadro 18 se observa el análisis de varianza de la formación de número de brotes o embriones, por lo que el factor A es altamente significativo estadísticamente, indicando la diferencia entre las concentraciones del bencilaminopurina a niveles de confianza del 95% y 99%; pero el factor B no es significativo estadísticamente, indicando que no hay diferencia estadística en el uso del ácido naftalenacético; lo mismo sucede con la interacción del factor AXB.

Cuadro 18. ANVA para el número de brotes

ANVA	GL	Numero de brotes	
		CM	SIG
A	3	2.427083	**
B	3	0.121676	NS
A*B	9	0.047404	NS
ERROR	80	0.289583	
TOTAL	95		

A= concentraciones de bencilaminopurina y B= concentraciones de Ácido naftalenacético

En el Cuadro 19 se puede apreciar el resumen de los resultados obtenidos entre la formación de callo, diámetro y los número de brotes por lo que puede observarse que a 0.10 mg/L, 0.50 mg/L, 1.00 mg/L, 1.50 mg/L de ANA, recién combinado a una concentración de 1.5 mg/L de BAP o superior se observa formación y brotes en el explante de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth), SERRANO y PINOLL (1991) manifiestan que los crecimientos iniciales se desarrollan debido a un tratamiento hormonal apropiado, por lo que corrobora a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación.

Cuadro 19. Resumen de comportamiento del Bencilaminopurina (BAP) (mg/L) frente al Ácido naftalenacético (ANA) para formación y diámetro de callo y número de brotes.

ANA (mg/L)	BAP (mg/L)	Formación de callos	Diámetro de callo	Numero brotes
0.10	0.50	0.00	0.00	0.00
	1.00	0.00	0.00	0.00
	1.50	0.17	0.88	0.00
	2.00	0.33	1.88	0.50
0.50	0.50	0.00	0.00	0.00
	1.00	0.00	0.00	0.00
	1.50	0.17	0.83	0.33
	2.00	0.50	2.92	0.83
1.00	0.50	0.00	0.00	0.00
	1.00	0.00	0.00	0.00
	1.50	0.33	1.70	0.00
	2.00	0.50	3.02	0.67
1.50	0.50	0.00	0.00	0.00
	1.00	0.00	0.00	0.00
	1.50	0.17	0.88	0.17
	2.00	0.50	3.08	0.67

BAP: concentraciones de bencilaminopurina y ANA: concentraciones de Ácido naftalenacético

En la Figura 7 se muestra el comportamiento del nivel de formación de callos, diámetro y/o longitud de callos y el número de brotes o embriones a 0.10 mg/L de ANA (ácido naftalenacético), la cual describe la formación de callo una ecuación polinómica, de la forma  $y = 0.1667x^2 - 0.1833x + 0.0417$ , con un coeficiente de determinación de 0.9818; el diámetro o longitud del callo describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 1.10x^2 - 1.1933x + 0.3083$ ,

con un coeficiente de determinación de 0.9878; y el número de brotes o embriones describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 0.50x^2 - 0.950x + 0.375$ , con un coeficiente de determinación de 0.933. Una de las posibles explicaciones es a medida que aumenta las concentraciones del BAP (Bencilaminopurina), entonces también aumenta la formación de callo y número de brotes; ya que tiene efectos benéficos para el desarrollo fisiológico de los explantes (TACORONTE *et al.*, 2004) de capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth).

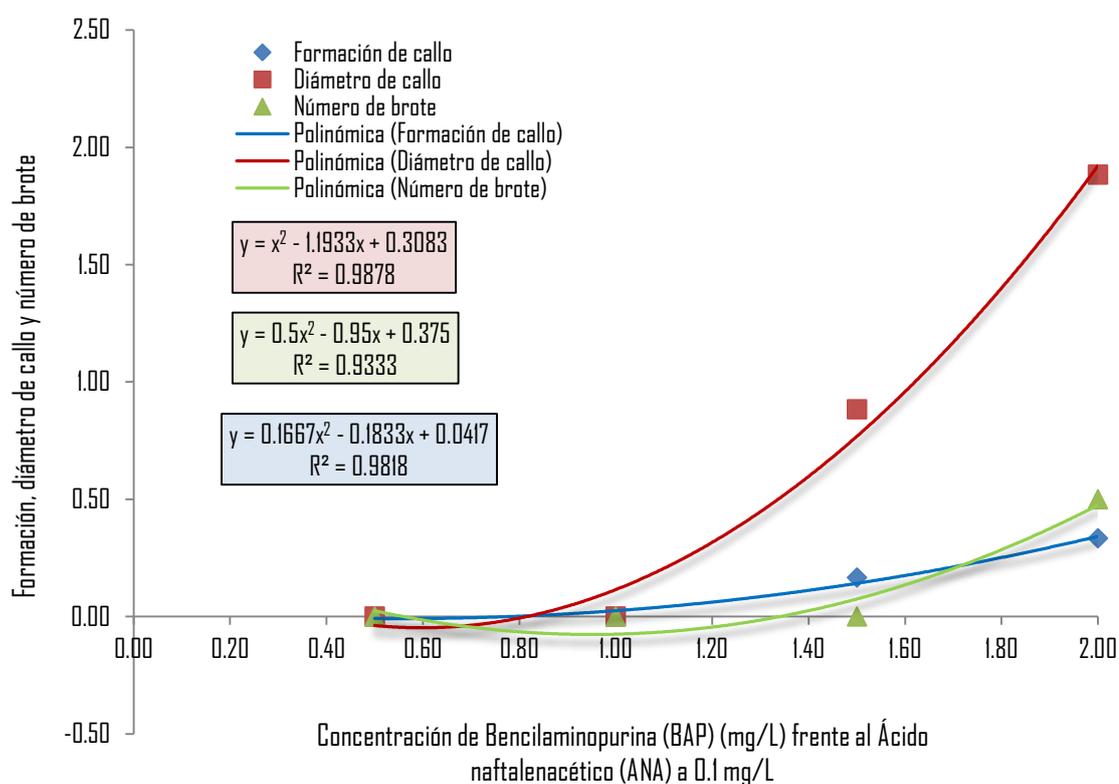


Figura 7. Comportamiento de la formación y diámetro del callo y número de brote de Bencilaminopurina (BAP) (mg/L) frente al Ácido naftalenacético (ANA) a 0.1 mg/L

En la Figura 8 se muestra el comportamiento del nivel de formación de callos, diámetro y/o longitud de callos y el número de brotes o embriones a 0.50 mg/L de ANA (ácido naftalenacético), la cual describe la formación de callo una ecuación polinómica, de la forma  $y = 0.3333x^2 - 0.50x + 0.1667$ , con un coeficiente de determinación de 1.000; el diámetro o longitud del callo describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 2.0833x^2 - 3.2917x + 1.1458$ , con un coeficiente de determinación de 0.99985; y el número de brotes o embriones describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 0.50x^2 - 0.6833x + 0.2083$ , con un coeficiente de determinación de 0.997.

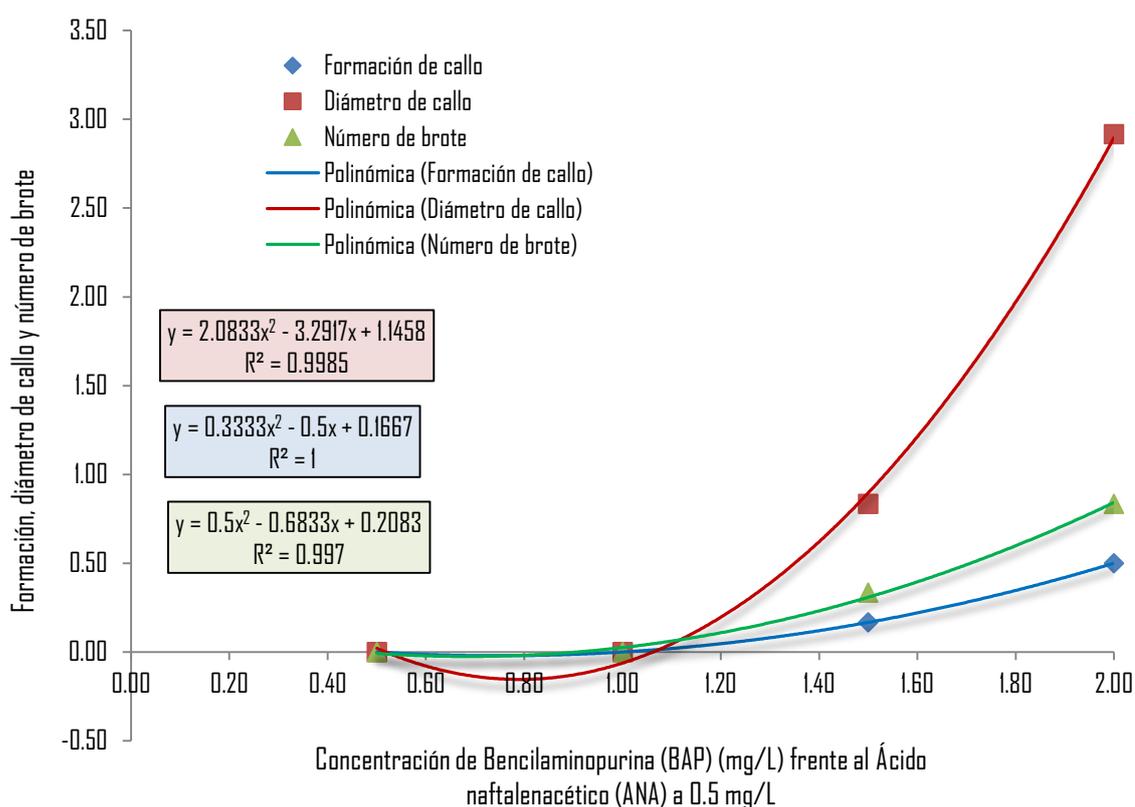


Figura 8. Comportamiento de la formación y diámetro del callo y número de brote de Bencilaminopurina (BAP) (mg/L) frente al Ácido naftalenacético (ANA) a 0.5 mg/L.

En la Figura 9 se muestra el comportamiento del nivel de formación de callos, diámetro y/o longitud de callos y el número de brotes o embriones a 1.00 mg/L de ANA (ácido naftalenacético), la cual describe la formación de callo una ecuación polinómica, de la forma  $y = 0.1667x^2 - 0.050x + 0.0417$ , con un coeficiente de determinación de 0.933; el diámetro o longitud del callo describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 1.3167x^2 - 1.1417x + 0.1375$ , con un coeficiente de determinación de 0.9662; y el número de brotes o embriones describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 0.6667x^2 - 1.2667x + 0.5$ , con un coeficiente de determinación de 0.9333.

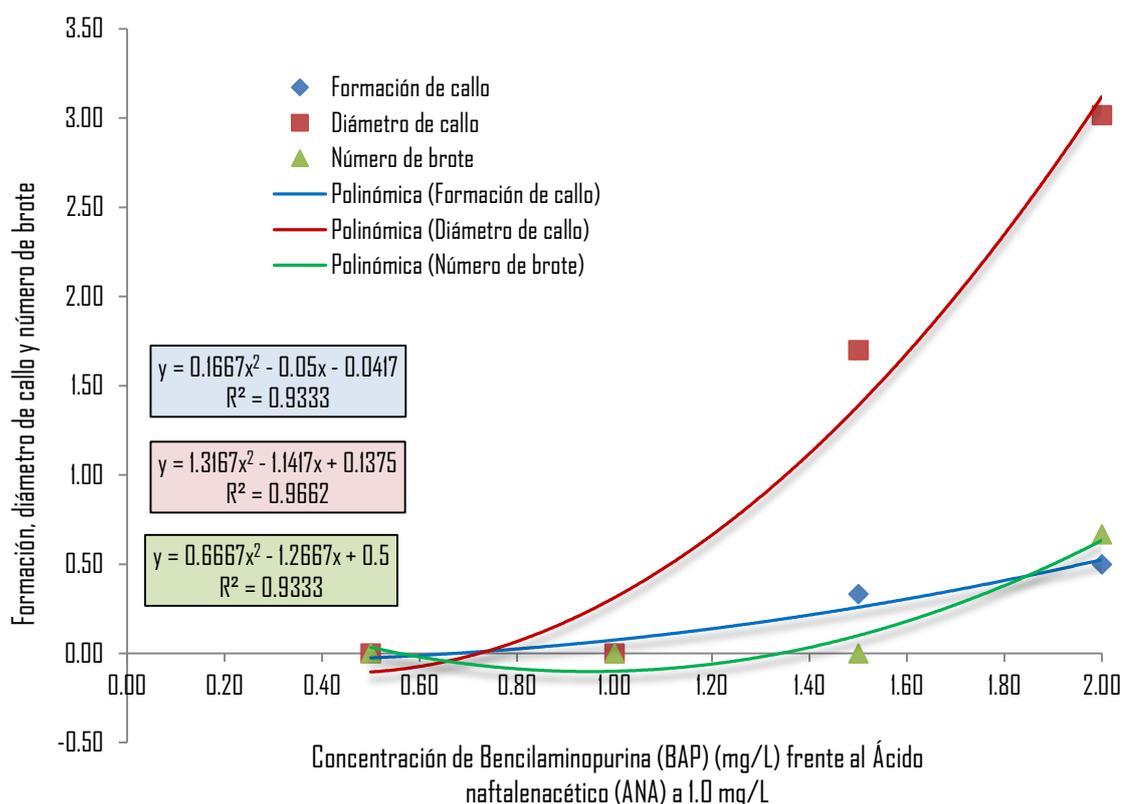


Figura 9. Comportamiento de la formación y diámetro del callo y número de brote de Bencilaminopurina (BAP) (mg/L) frente al Ácido naftalenacético (ANA) a 1.0 mg/L.

En la Figura 10 se muestra el comportamiento del nivel de formación de callos, diámetro y/o longitud de callos y el número de brotes o embriones a 1.50 mg/L de ANA (ácido naftalenacético), la cual describe la formación de callo una ecuación polinómica, de la forma  $y = 0.3333x^2 - 0.50x + 0.1667$ , con un coeficiente de determinación de 1.000; el diámetro o longitud del callo describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 2.200x^2 - 3.4733x + 1.2083$ , con un coeficiente de determinación de 0.9985; y el número de brotes o embriones describe una ecuación polinómica, de la forma  $y = 0.500x^2 - 0.8167x + 0.2917$ , con un coeficiente de determinación de 0.9953.

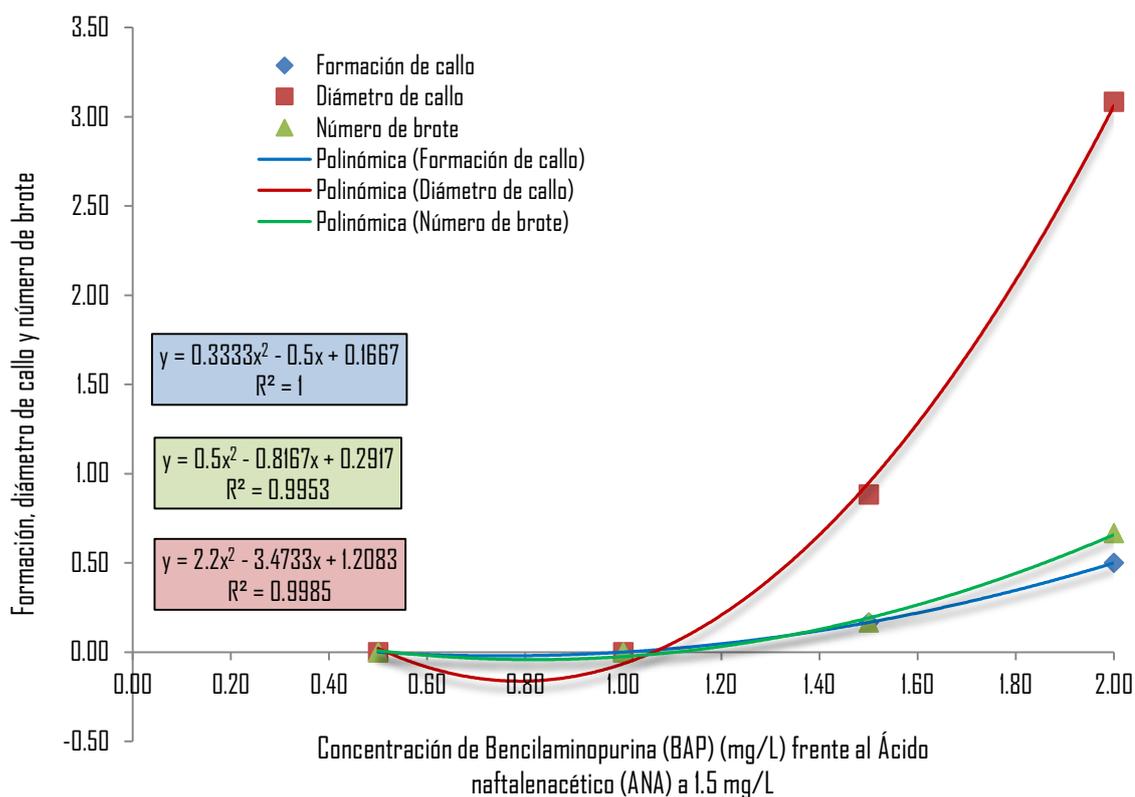


Figura 10. Comportamiento de la formación y diámetro del callo y número de brote de Bencilaminopurina (BAP) (mg/L) frente al Ácido naftalenacético (ANA) a 1.5 mg/L.

## V. CONCLUSIONES

1. Se ha determinado que los niveles óptimos, para evitar la contaminación de las yemas axilares de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth), le corresponde al tratamiento T8 (Hipoclorito de sodio 2.0% + 15'), lo que también corresponde para niveles óptimos de fenolización.
2. Se ha determinado que para los niveles óptimos, para evitar la contaminación de las yemas axilares de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth), le corresponde al tratamiento T10 (Hipoclorito de calcio 2.5% + 10') y para niveles óptimos de fenolización le corresponde al tratamiento T11 (Hipoclorito de calcio 2.5% + 15').
3. Se ha determinado que para aumentar la capacidad de enraizamiento (formación de callos, diámetro de callos y número de brotes) de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth) le corresponde al tratamiento T16 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L).

## VI. RECOMENDACIONES

1. Para el mejor tratamiento de desinfección para las bacterias y los hongos usar la Inmersión en Hipoclorito de calcio 2.5% + 10', para las yemas axilares de la especie forestal de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth).
2. Ensayar tratamientos de inmersión en fungicidas y desinfectantes en las yemas axilares de las muestras vegetales de la familia de las RUBIACEAE, para optimizar su propagación *In vitro*.
3. Para mejorar el enraizamiento de los cultivos *In vitro* de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth) usar Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L.
4. Realizar estudios concentraciones mayores a 2mg/L de bencilaminopurina (BAP) en la micropropagación *In vitro* de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth).
5. Realizar estudios concentraciones mayores a 1.5 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) en la micropropagación *In vitro* de la capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth).

DISINFECTION OF AXILLARY BUDS IN VITRO FOR ESTABLISHMENT OF  
CAPIRONA (*Calycophyllum spruceanum* Benth)

**VII. ABSTRACT**

In the present research work entitled "Disinfection of axillary buds for In vitro establishment capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth)" was to evaluate the behavior of pollution and phenolization in the disinfection stage (Stage I) and evaluate the development of yolks disinfected in the growth stage (Stage II) capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth).

To determine disinfection methods for axillary buds was present the following methodology for Phase I: collection, selection, extraction, cleaning, preparation, sterilization and preparation of culture medium yolks; Stage II: previous operations, disinfection, growth regulatory preparation of the explants and ringing.

The results were that to optimal levels and to avoid contamination of the axillary buds phenolization the capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth) 2.0% Sodium hypochlorite + 15', and/or calcium hypochlorite 2.5% + 10' and phenolization calcium hypochlorite 2.5% + 15', and determined that to increase rooting capacity of capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth) to use Bencylaminopurine 2.0 mg/L naphthaleneacetic acid + 1.5 mg/L.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CÁCERES, N. 2008. Especies forestales [En línea]: ([http://www.cites.pe/uploads/Descargas/20100323tomo1\\_32\\_ESPECIES.pdf](http://www.cites.pe/uploads/Descargas/20100323tomo1_32_ESPECIES.pdf), 11 de octubre de 2010).
- CONFEDERACION NACIONAL DE LA MADERA. 1994. Compendio de informática técnica de 325 especies forestales. Primera edición, Lima – Perú, 120 p.
- 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.
- DELGADO, G. y ROJAS, C. 1999. Cultivos de tejidos vegetales I. Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo. Lambayeque – Perú, 262 p
- DEVLIN, R. M. 1980. Fisiología vegetal. 3ed. OMEGA S.A. Barcelona, España. 416 p.
- DOMINGEZ, T. 1986. Cultivos de tejidos de árboles de importancia forestal. Instituto Superior de Ciencia Naturales ISCN. Colombia. 12 p.

- GLOVAK, N. & GREATBATCH, L. 1982. *Leucaena*. Res. Report 3:81.
- HURTADO, M. y MERINO, M. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Ed. TRILLAS S.A. México. 232 p.
- MELLA, R. A.; DAHAL, H. P. YANG, K. J. y BRADFORD. 1997. Quantification of GA3 regulated in RNA abundance in Tomato seeds using tissue printing. In: Ruthland (ed). *Encyclopaedia of Plant Physiology*. P 292-295.
- MOSTACERO, J. y MEJIA, C. 2002. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. Vol. I. Ed. Normas Legales S.A.C. 667 p.
- ORELLANA, P. A. 1998. Propagación vía organogénesis. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. P. 151.
- PIERIK, R. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ed. Mundi – Prensa. Madrid, España. 326 p.
- REBOLLEDO, C., APARICIO, R., CRUZ, G. 2006. Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de dos especies de pinos. [En línea]: Redalyc, (<http://redalyc.uaemex.mx/pdf/497/49780205.pdf>, 25 abril 2011).
- ROCA, W. y MROGINSKI, L. (eds.) 1991. Cultivo de tejidos en la Agricultura (fundamentos y Aplicaciones). CIAT. Colombia. P. 20-36.
- ROJAS, G. y RAMIREZ, H. 1993. Control hormonal del desarrollo de las plantas. Ed. Limusa, S.A. México. P. 13-87.

- SALINAS, A. 1995. Desinfección y determinación de explantes para la propagación *In Vitro* de *Cedrelinga cateniformis* Ducke. Tesis. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María – Perú. 106 p.
- SERRANO, M. y PINOL, T. 1991. Biotecnología vegetal. Ed. Síntesis S.A. España. P. 50-70.
- SUAREZ, I., JARMA, A., AVILA, M. 2006. Desarrollo de un protocolo para propagación *in vitro* de *Tabebuia rosea* Bertol DC (roble). Temas Agrarias, Montería, Colombia. Vol. 11(2): P 52 – 62.
- VARGAS, H. 1982. Aplicación de cultivo de tejidos en la propagación vegetativa de especies forestales. Revista científica forestal N° 39. Chile. 63 p.
- VARGAS, J. 2007. Desinfección de yemas para la micropropagación de *Croton lechleri* Muell Arg (sangre de grado). Tesis. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María – Perú. 77 p.
- VILLALOBOS, U. M. & THORPE, T. A. 1991. Clonal propagation development in crop science. Plant Tissue Culture Theory and Practice. Ed. Elsevier Sciences Publishers. Amsterdam. 3 p.

**ANEXO**

Anexo A. Panel fotográficos del trabajo de investigación en el laboratorio de micro propagación *In Vitro*.



Figura 11. Desinfección de la cámara de flujo laminar.



Figura 12. Siembra de un explante en el medio de cultivo MS



Figura 13. Muestras fenolizados y contaminada por bacterias y hongos.

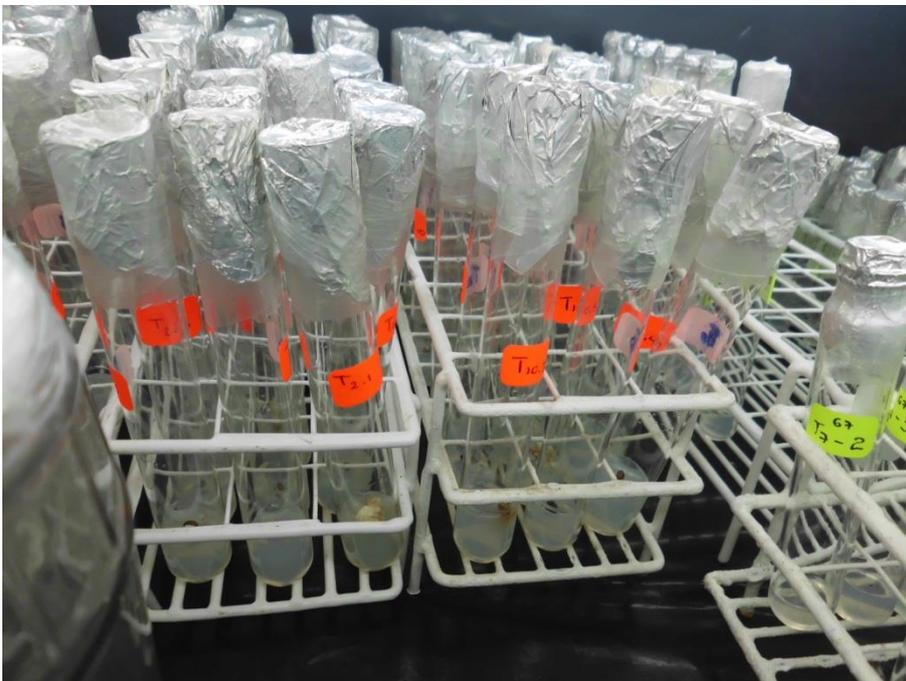


Figura 14. Yemas de capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth) in vitro en condiciones óptimas.