

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS FORESTALES



**“DETERMINACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA
REGENERACIÓN IN VITRO DE YEMAS Y HOJAS DE TORNILLO
(*Cedrelinga cateniformis* Ducke (Ducke))”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL
DE INGENIERO FORESTAL**

PRESENTADO POR:

JORGE ALEX RIVERO FONSECA

Tingo María

2016

DEDICATORIA

A Dios, por el éxito y la satisfacción de esta investigación, por regalarme salud y bienestar en mi vida, por no dejarme solo en los momentos que más necesitaba y por regalarme el don de la sabiduría para enfrentar los retos y obstáculos que se me presentaron o que se me presenten.

A mis padres Jorge Rivero y Rosenda Fonseca, que fueron la fuerza y guía que me permitió salir adelante frente a las adversidades y malos momentos, por creer en mí y brindarme su apoyo incondicional, por sus sabios consejos que dieron una orientación positiva en mis metas, por sus regaños que día a día han hecho que pueda comprender circunstancias invisibles para mí y, por mostrarme el significado de la vida. Por todo lo mencionado viviré eternamente agradecido.

A mi hermano Frank Rivero, por confiar en mí, por brindarme más virtudes y consejos que un hermano o amigo puede dar, por ser cómplice en tantas circunstancias de mi vida y por ser el mejor hermano del mundo.

A Lleimy Montenegro, por brindarme su amor, por estar a mi lado en las buenas y en las malas, por su optimismo en el desarrollo de esta investigación, siempre apoyándome e impulsándome a salir adelante en cada paso que doy en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Agraria de la Selva y docentes de la Facultad de Recursos Naturales Renovables, por toda la contribución cultural, social y científica que me han brindado.

De manera muy especial al Blgo. Julio Alfonso Chia Wong, amigo y asesor en la presente investigación, por sus sabias contribuciones, dedicación constante, apoyo en el desarrollo práctico y por su confianza puesta en mi persona.

Al Ing. M Sc. Casiano Aguirre Escalante, por su gran apoyo incondicional, por los grandes valores que comparte y por su carácter que han dado origen a una mejor calidad de profesionales cada año.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Descripción de la especie tornillo.....	4
2.1.1. Taxonomía.....	4
2.1.2. Descripción botánica	4
2.1.3. Usos	6
2.1.4. Distribución.....	6
2.2. Reseña histórica	7
2.2.1. Célula totipotencial	7
2.2.2. Cultivo de tejidos aislados	8
2.2.3. Células autosuficientes.....	8
2.2.4. Cultivo de tejidos vegetales.....	9
2.2.5. Callo tisular.....	9
2.2.6. La biotecnología en el sector forestal	9
2.3. Micropropagación.....	10

2.3.1. Cultivo de tejidos vegetales.....	10
2.3.2. Medio de cultivo.....	15
2.3.3. Reguladores de crecimiento.....	16
2.3.4. Técnicas de propagación a partir de ápices y laterales.....	17
2.3.5. Meristemas apicales y laterales.....	18
2.3.6. Fases de propagación in vitro.....	18
2.3.7. Condiciones del cultivo in vitro.....	20
2.3.8. Ventajas del cultivo in vitro.....	23
2.3.9. Desventajas del cultivo in vitro.....	24
2.4. Cultivo de tejidos de especies forestales.....	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1. Lugar de ejecución.....	26
3.2. Materiales.....	26
3.2.1. Material vegetal.....	26
3.2.2. Materiales y equipos.....	26
3.2.3. Reactivos.....	27
3.2.4. Flujograma.....	27

3.3.	Metodología	28
3.3.1.	Fase de gabinete.....	29
3.3.2.	Fase de aislamiento	44
3.3.3.	Fase de laboratorio.....	44
3.3.4.	Fase de evaluación	51
IV.	RESULTADOS	53
4.1.	Ensayo 1: Multiplicación en yemas	53
4.1.1.	Presencia de callogénesis.....	53
4.1.2.	Porcentaje de contaminación	60
4.1.3.	Porcentaje de necrosamiento	64
4.2.	Ensayo 2: Callogénesis en hojas	65
4.2.1.	Presencia y porcentaje de callos	65
4.2.2.	Porcentaje de contaminación	68
4.2.3.	Porcentaje de necrosamiento	70
4.3.	Ensayo 3: Protocolo de desinfección combinatoria.....	71
4.3.1.	Porcentaje de contaminación y necrosamiento	71
4.4.	Ensayo 4. Callogénesis de hojas con medio basal con Fungicida	75

4.4.1. Presencia de callos	75
4.5. Ensayo 5. Calogénesis de yemas con medio basal con Fungicida	78
4.5.1. Presencia de callos	79
V. DISCUSIÓN.....	83
5.1. Medio de cultivo y balance hormonal para yemas de tornillo (<i>C. cateniformis</i> Ducke (Ducke))	83
5.2. Medio de cultivo y balance hormonal para hojas de tornillo (<i>C. cateniformis</i> Ducke (Ducke))	84
5.3. Protocolo de desinfección	85
VI. CONCLUSIONES	87
VII. RECOMENDACIONES.....	88
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXO	98

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Tratamientos en estudio E1.....	32
2. Tratamientos en estudio E2.....	33
3. Tratamientos en estudio E3.....	34
4. Tratamientos en estudio E4.....	35
5. Tratamientos en estudio E5.....	36
6. Análisis de varianza (ANVA) para ensayos 1 y 3.	43
7. Análisis de varianza (ANVA) para ensayos 2, 4 y 5.	44
8. Componentes para el medio de cultivo MS y WPM.....	45
9. Concentraciones de los stocks para el medio de cultivo.	46
10. Proporciones de hormonas para Ensayo 1.....	47
11. Proporciones de hormonas para Ensayo 2.....	48
12. Proporciones de hormonas para Ensayo 4.....	48
13. Proporciones de hormonas para Ensayo 5.....	48
14. Análisis de varianza para presencia de callos (E1) con datos transformados $\sqrt{(x + 1)}$	54

15. Prueba T de student ($\alpha=0.05$) para la presencia de callos por los efectos del medio de cultivo.	55
16. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para la presencia de callos por los efectos de la Combinación de hormonas.	57
17. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para la presencia de callos por los efectos de los tratamientos.....	59
18. Análisis de varianza para presencia de callos con datos transformados $\sqrt{(x + 1)}$	65
19. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para la presencia de callos por los efectos de los tratamientos.....	66
20. ANVA para presencia de hongos con datos transformado $\sqrt{(x + 1)}$	72
21. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para la presencia de hongos por los efectos de la Concentración de fungicidas en el medio MS.	72
22. ANVA para presencia de callos con datos transformados $\sqrt{(x + 1)}$	75
23. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para la presencia de callos por los efectos de los tratamientos.....	76
24. Análisis de varianza para presencia de callos con datos transformados $\sqrt{(x + 1)}$	79

25. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para la presencia de callos por los efectos de los tratamientos.....	80
26. Presencia de callos y contaminación para el ensayo 1.	99
27. Presencia de callos y contaminación para el ensayo 2.	101
28. Presencia de contaminación para el ensayo 3.	102
29. Presencia de callo para los ensayos 4 y 5.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Flujograma de fases por ensayo.	28
2. Porcentaje de aparición de callos para Murashige y Skoog (MS).	55
3. Porcentaje de aparición de callos para Woody Plant Media (WPM).	56
4. Gráfico de barras de error de medias para la presencia de callos por los efectos del medio de cultivo.	56
5. Comparación de medias para la presencia de callos por los efectos del balance de hormonas.....	57
6. Gráfico de barras de error de medias para la presencia de callos por los efectos del balance de hormonas.	58
7. Porcentaje de aparición de callos por efectos de tratamientos.....	60
8. Contaminación por hongos de forma global en el Ensayo 1.	60
9. Contaminación por bacterias de forma global en el Ensayo 1.....	61
10. Contaminación por hongos según el medio de cultivo en Ensayo 1.	61
11. Porcentaje de contaminación por bacterias según el medio de cultivo en el Ensayo 1.....	62

12. Contaminación por hongos según el balance hormonal en Ensayo 1.	63
13. Contaminación por bacteria según el balance hormonal en Ensayo 1.	63
14. Porcentaje de necrosamiento global en el Ensayo 1.	64
15. Comparación de medias para la presencia de callos por los efectos de los tratamientos.	67
16. Gráfico de barras de error de medias para la presencia de callos por los efectos de los tratamientos.	67
17. Porcentaje de aparición de callos por efectos de los tratamientos	68
18. Contaminación por hongos de forma global en el Ensayo 2 (Callogénesis en hojas de tornillo).	69
19. Contaminación por bacterias de forma global en el Ensayo 2 (Callogénesis en hojas de tornillo).	69
20. Contaminación por hongos según los tratamientos en el Ensayo 2 (Callogénesis en hojas de tornillo).	70
21. Porcentaje de necrosamiento global en el Ensayo 2.	70
22. Porcentaje de aparición de hongos según las concentraciones del fungicida en el medio MS.	73
23. Porcentaje de aparición de hongos según los tratamientos.	73

24. Porcentaje de necrosamiento según los tratamientos.	74
25. Comparación de medias para la presencia de callos por los efectos de los tratamientos.....	77
26. Gráfico de barras de error de medias para la presencia de callos por los efectos de los tratamientos.....	77
27. Porcentaje de aparición de callos por efectos de los tratamientos.....	78
28. Comparación de medias para la presencia de callos por los efectos de los tratamientos.....	81
29. Gráfico de barras de error de medias para la presencia de callos por los efectos de los tratamientos.....	81
30. Porcentaje de aparición de callos por efectos de los tratamientos.....	82
31. Fase de aislamiento (fumigación a los plantones de tornillo).	106
32. Fase de laboratorio (balance de hormonas por tratamientos).	106
33. Fase de laboratorio (medio de cultivo).	107
34. Fase de laboratorio (desinfección de hojas).	107
35. Fase de laboratorio (Desinfección de yemas).	108
36. Fase de laboratorio (siembra).....	108
37. Ensayo 1 instalado.	109

38. Ensayo 2 instalado.	109
39. Ensayo 3 instalado.	110
40. Ensayo 4 instalado.	110
41. Ensayo 5 instalado.	111
42. Fase de evaluación (formación de callo en yemas).....	111
43. Fase de evaluación (formación de brotes en yemas).	112

RESUMEN

El presente estudio busca determinar las mejores condiciones para la regeneración in vitro del tornillo (*Cedrelinga cateniformis* Ducke (Ducke)), motivo por el cual se plantearon como objetivos, determinar el medio de cultivo y el mejor balance hormonal que permitan una mejor respuesta vegetativa, así como determinar un protocolo de desinfección para los explantes de hojas y yemas de tornillo. Constituido por 5 ensayos: multiplicación de yemas, callogénesis en hojas, protocolo de desinfección combinada, callogénesis en hojas y yemas con medio fungicida. Se desarrollaron en 4 fases cada una: fase de gabinete, fase de aislamiento, fase de laboratorio y la fase de evaluación. Los resultados obtenidos indican que: 1) El mejor medio de cultivo es el Murashige & Skoog (MS) con un 86% de permanencia y callos viables. 2) Las mejores combinaciones de hormonas para la producción de callos en yemas fueron b₄ y b₅ que simbolizan el 80% y 90% del total. Asimismo, las mejores combinaciones de hormonas con interacción del medio de cultivo con fungicida Benomil fueron T₃ y T₅ que son el 100% cada uno. 3) Las mejores combinaciones de hormonas para la producción de callos en hojas fueron T₃, T₄ y T₅ que simbolizan el 90, 90 y 100% del total y, las mejores combinaciones de hormonas con interacción del medio de cultivo con fungicida Benomil fueron T₄ y T₅, con 100% cada uno. 4) El mejor protocolo de desinfección de hojas y yemas fue el Protocolo 2, además la mejor concentración de fungicida en el medio de cultivo fue 2 g/L porque permitió 0% de contaminación por hongos.

Palabras clave: *Cedrelinga cateniformis*, in vitro, hormona, callo, yemas, hojas.

I. INTRODUCCIÓN

La superficie total deforestada en la Amazonía, al año 2012, asciende a aproximadamente 7.9 millones de hectáreas, que representa el 10.97% de la superficie de los bosques amazónicos, de los cuales los departamentos de San Martín, Amazonas y Loreto son los que presentan mayor porcentaje de deforestación (MINAM, 2012).

El Mapa Forestal del Perú reporta que 4 500 000 ha de la Selva habían sido deforestadas en ese año y estaban siendo utilizadas para la agricultura y ganadería pero que, en su mayor parte, estaban recubiertas de vegetación secundaria (MALLEUX, 1975).

Tal situación, está provocando daños a los bosques nativos, y es reflejada la desaparición de muchas especies, entre ellas, el tornillo (*Cedrelinga cateniformis* Ducke (Ducke)), que es actualmente la especie forestal nativa más promisoría en la Amazonia peruana. Es una especie forestal con características maderables valiosas y tiene un uso muy difundido en el Perú. Esta especie presenta un problema y es que sus semillas además de producir en un ciclo de aproximadamente 3 años, pierden su capacidad de germinación pocos días después de la cosecha (recalcitrante), por lo que su regeneración natural es escasa y es necesaria su propagación en vivero por semillas; a pesar de ello, está considerado entre las cinco especies forestales

más apreciadas por el poblador amazónico desde el punto de vista económico y ambiental. (LABARTA & WEBER, 1998) y comercialmente es una de las maderas más utilizadas (INRENA-OIMT, 1995).

El cultivo de tejidos vegetales o cultivo in vitro, es una técnica de propagación en condiciones totalmente asépticas, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido, es posible regenerar en poco tiempo miles de plantas genéticamente iguales, utilizando variables físicas y químicas controladas como medio de cultivo. Esta poderosa herramienta permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo, así como el manejo de las mismas en espacios reducidos (REMACHE, 2011).

La micropropagación de especies arbóreas es una opción atractiva que ofrece una vía rápida de producir a nivel industrial o semi industrial plantas clonales para reforestación, producción de biomasa leñosa y conservación de germoplasma elite y raro. La biotecnología es una alternativa para la preservación de especies aumenta la de multiplicación de plántulas para suplir la demanda comercial (GONZALES *et al.*, 1998).

En tal sentido, se plantea la siguiente interrogante: ¿Cuáles son las mejores condiciones para la regeneración in vitro de tornillo (*Cedrelinga cateniformis* Ducke (Ducke))?, para lo cual con anteriores investigaciones al respecto se plantea la siguiente hipótesis: Las mejores condiciones para la regeneración in vitro de tornillo (*Cedrelinga cateniformis* Ducke (Ducke)) están determinadas por el mejor protocolo de desinfección, mejor medio de cultivo o medio basal y el mejor balance hormonal específicos para dicha especie.

Objetivo general:

- Determinar las mejores condiciones para la regeneración in vitro de tornillo (*Cedrelinga cateniformis* Ducke (Ducke)) a partir de hojas y yemas colectadas de vivero.

Objetivos específicos:

- Determinar el medio de cultivo y el mejor balance hormonal que permitan una mejor respuesta vegetativa del tornillo (*C. cateniformis* Ducke (Ducke)) a partir de yemas.
- Determinar el medio de cultivo y el mejor balance hormonal que permitan una mejor respuesta vegetativa del tornillo (*C. cateniformis* Ducke (Ducke)) a partir de hojas.
- Determinar un protocolo para la desinfección de hojas y yemas como explantes de tornillo (*C. cateniformis* Ducke (Ducke)).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Descripción de la especie tornillo

2.1.1. Taxonomía

MOSTACERO y MEJIA (1993) indica que:

Reino : PLANTAE

División : MAGNOLIOPHYTA

Clase : MAGNOLIOPSIDA

Orden : FABALES

Familia : MIMOSACEAE

Género : *Cedrelinga*

Nombre científico : *Cedrelinga cateniformis* Ducke (Ducke)

Nombres comunes : “tornillo“, huayra caspi (Per); achapo (Col); seique, seiqui (Ecu); cedro rana (Bra).

2.1.2. Descripción botánica

Árbol grande, alcanza la mayor altura entre los árboles amazónicos, pudiendo llegar a 50 m de alto y tronco de 2 m de diámetro, con

aletones basales imponentes. La corteza del tronco semeja a la de ciertas Meliaceas. Ramitas puberulentas. Habita suelos húmedos en bosque primario.

Hojas: alternas, glabras y bipinnadas. Pecíolo cilíndrico de 3 - 4 cm de largo, longitudinalmente estriado, con una glándula en su ápice. Raquis principal de 3.5-7 cm de longitud, tenuemente angulado y estriado, glandulado en el extremo distal. Raquis secundarios de base dilatada, 6 - 7 cm de longitud el primer par y de 8 - 10 cm de longitud el último par, con glándulas acopadas sobre los últimos pares de folíolos. Dos pares de pinnas opuestas. Por pinna 2 - 3 pares de folíolos de 5-10 x 3-6 cm, opuestos. Peciólulo de 0 - 5 cm. Limbos coriáceos, asimétricos, ligeramente curvados y punteados, de base desigual; ápice gradualmente acuminado; márgenes ondulados y revolutos; penninervados, con los nervios (principal, secundarios y terciarios) muy visibles y prominentes en ambas caras.

Inflorescencias: capítulos dispuestos en panículas terminales o subterminales. Eje florífero hasta 20 centímetros de longitud, cobrizo-puberulento. Pedúnculos de 1 - 3 centímetros de longitud. Capítulo globoso de 1 cm de diámetro Flores: sésiles. Cáliz cupuliforme de 1 mm de alto, brevemente 5dentado. Corola infundibulifome de 4-5 mm de alto, profundamente 5 dentada. Estambres exertos de 8 - 10 mm de alto, adnados en un tubo que alcanza más de la mitad del tubo corolino. Ovario subestipitado y claviforme de 3 mm de alto; estilo lateral más corto que los estambres (SPICHIGER *et al.*, 1990).

Fruto: lomento estipitado, tres o más segmentos monospermos y aplanados, oblongo-elípticos, cada uno de 15 - 18 X 3 - 5 cm (al madurar se desprenden en artejos). Semillas elípticas de 3 - 3.5 x 1.5 cm, ubicadas en la mitad central de cada artejo (SPICHIGER *et al.*, 1990).

2.1.3. Usos

La madera del tornillo es suave y liviana, de color café claro, y se denotan unas vetas rojo oscuras que emergen gradualmente. Es de densidad media y es usada en estructuras, carpintería, construcciones navales, carrocerías, muebles, láminas de enchape, puntales y juguetería. Se seca al aire con moderada rapidez, con leves defectos; las contracciones son bajas y uniformes y se considera como una madera noble para el secado convencional en horno (ICRAF, 2006).

2.1.4. Distribución

Su distribución en el Perú va desde los 120 hasta los 800 metros sobre el nivel del mar, con temperaturas promedio que varían de 22 °C hasta 27 °C y precipitaciones desde 2500 hasta 3800 milímetros. Se desarrolla en un amplio rango de suelos: ácidos, arcillosos, algunas veces con gran cantidad de piedras y generalmente con buen drenaje. No resiste inundaciones y su crecimiento se reduce en suelos muy delgados, con capas impermeables, con baja fertilidad, compactados o en arenas secas (ICRAF, 2006). REYNEL *et al.* (2003) afirman que la distribución es en la región amazónica, en altitudes de hasta 1200 msnm. Se le observa en áreas de pluviosidad elevada y constante;

es una especie con tendencia esciófita, presente en bosques primarios, en suelos arcillosos, usualmente ácidos, en zonas bien drenadas y con pedregosidad baja o nula; la floración mayormente a fines de la estación seca, entre Noviembre-Diciembre; fructificación a inicios de la estación de lluvias, entre Diciembre-Febrero. El tronco es generalmente recto, con una corteza que se asemeja a la de *Cedrela odorata* L. (VIDAURRE, 1994).

LABARTA y WEBER (1998) indican que el 100% de los individuos de *C. cateniformis* Ducke (Ducke) son clasificados como vigorosos, es decir no presentan señales de plagas ni enfermedades, a pesar de las diferencias en altura y Dap entre los individuos.

2.2. Reseña histórica

2.2.1. Célula totipotencial

Del latín totuspotens: totus (todo) y potens (poder o habilidad), el término célula totipotencial, es utilizado en biología para referirse a células que poseen la capacidad de dar origen a diferentes tipos celulares, incluso pudiendo una sola de estas células dar origen a millones de células, tejidos, órganos e incluso embriones. Una planta al crecer va aumentando su población de células las cuales se especializan en sus funciones. El aumento de la población de células se realiza por medio de la división celular. Antes que una célula madre se divida en dos células hijas, hace una copia exacta de su primer genoma. Como resultado, las dos células hijas generalmente tienen exactamente la misma composición genética como la de su célula madre. Cada

célula viva de la planta debe contener todos los genes y por lo tanto tiene la capacidad de generar una planta completa (TOBAR, 2011).

2.2.2. Cultivo de tejidos aislados

Gottlieb Haberlandt (1854-1945), botánico austríaco, fue el primero en señalar la posibilidad del cultivo de tejidos aislados.

Desde las primeras afirmaciones de Haberlandt, los métodos de cultivo de células y tejidos se han desarrollado, dando lugar a importantes descubrimientos en Biología y Medicina (DESPOMMIER, 2009).

2.2.3. Células autosuficientes

La teoría propuesta por SCHLEIDEN Y SCHWANN (1938), establece que las células son autosuficientes y, que, en principio son capaces de regenerar una planta completa, lo anterior constituye el núcleo central del cual nace el cultivo de tejidos.

Los primeros intentos fueron realizados por Haberlandt en 1902; más tarde otros ensayos fueron realizados por Harrison, Burrows y Carrel entre 1907 y 1909. Nobécourt, Gautheret y White, consiguieron el primer cultivo de tejido auténtico en el año de 1939 (PIERIK, 1990).

Es decir, tuvieron que pasar 100 años para que la teoría de la totipotencia fuera comprobada. Desde el año de 1939 este tema ha venido en progreso, pero ha tenido un desarrollo extraordinario en los últimos 30 años.

2.2.4. Cultivo de tejidos vegetales

La ciencia del cultivo de tejidos vegetales debe su origen a la investigación sobre hormonas que controlan el crecimiento y el desarrollo vegetal. Este conocimiento se combinó con las técnicas básicas de microbiología por las cuales los microorganismos se hacen crecer en medios estériles para su producción e identificación (SALAZAR, 2010).

2.2.5. Callo tisular

El callo tisular puede propagarse indefinidamente por subdivisiones en un medio nutricional básico con fitohormonas (una auxina, una citoquinina y una giberelina, por ejemplo). El estado de diferenciación puede ser mantenido o alterado variando el tipo y concentración de fitohormonas en el medio: una concentración alta de auxinas frente a citoquininas inducirá la formación de raíces, mientras que concentraciones altas de citoquininas frente a auxinas induce la formación de tallos.

Las concentraciones de hormonas adecuadas varían de una planta a otra, por lo que hay que determinarlas en cada caso experimentalmente (IZQUIERDO, 1999).

2.2.6. La biotecnología en el sector forestal

La investigación y las aplicaciones de la biotecnología en el sector forestal avanzan rápidamente, pudiéndose identificar cuatro biotécnicas que se

utilizan principalmente: La micropropagación y el cultivo de tejidos, la biología molecular y los marcadores, la modificación genética, la genómica y la crioconservación.

Entre las 2700 actividades de biotecnología que se realizaron en el mundo en los últimos 10 años, la modificación genética representa alrededor del 19% solamente. El potencial de los rasgos de interés para los árboles genéticamente modificados (GM) son el aumento de la producción y calidad de madera, resistencia a insectos, enfermedades y herbicidas (FAO, 2004).

2.3. Micropropagación

2.3.1. Cultivo de tejidos vegetales

En su acepción amplia, el cultivo de tejidos vegetales se define como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante, o sea, unas partes separadas del vegetal, tales como protoplastos, células, tejidos u órganos- se cultivan asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuban en condiciones ambientales controladas. Cada fragmento origina una planta idéntica a aquella de donde se tomó el fragmento, aunque, también puede ser modificada genéticamente para tener variedades artificiales (MROGINSKI *et al.*, 2010).

Es el sistema de propagación vegetativa más recientemente implementada, pero por razones de costo no ha desplazado el uso de los sistemas tradicionales especialmente en árboles forestales; cuya reproducción

masiva en viveros es más ventajosa desde un punto de vista económico. Estas técnicas modernas son un buen complemento de la producción de plantas en vivero, al permitir producir un material de alta calidad genética que podrá ser reproducido en forma masal, por semilla (GONZALES *et al.*, 1998).

Estas técnicas pueden ser utilizadas en vegetales como herramientas para la micropropagación rápida de clones, eliminación de virus y enfermedades, producción de haploides, aislamiento y utilización de protoplastos, cultivo de embriones, producción de fitoquímicos, ingeniería genética, mutación y selección celular, producción de semillas sintéticas y estudios básicos de anatomía, desarrollo y fisiología (MROGINSKI *et al.*, 2010).

El cultivo de tejidos consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeños de ellas, como son los tejidos o células, cultivadas asépticamente en recipientes de vidrio en donde se pueden controlar estrictamente las condiciones ambientales, sanitarias y de nutrición.

La micropropagación de especies arbóreas ofrece una vía rápida de producir a nivel industrial o semiindustrial plantas clonales para reforestación, producción de biomasa leñosa y conservación de germoplasma elite y raro. La biotecnología es una alternativa para la preservación de especies aumenta la de multiplicación de plántulas para suplir la demanda comercial (GONZALES *et al.*, 1998).

El cultivo in vitro de plantas consiste en reproducir numerosos ejemplares a partir de pequeñas partes de tejido de una planta madre,

obteniendo plantas homogéneas, en grandes cantidades, libres de patógenos y en cualquier época del año. Esta técnica permite tener una mayor tasa de reproducción que en los cultivos tradicionales y es de gran ayuda para la conservación de especies que estén en peligro de extinción o en estado de vulnerabilidad. Existe una gran diferencia entre las plantas herbáceas y las plantas leñosas, debido a que estas últimas son difíciles de clonar porque tienen una capacidad regenerativa relativamente lenta (PIERIK, 1990).

Las arbóreas (recalcitrantes) han presentado mayores dificultades por su condición estructural y porque los procesos morfológicos fisiológicos y biológicos han sido menos estudiados (PEREA, 1990).

Las aplicaciones del cultivo in vitro de plantas son (SALAZAR, 2010):

- Multiplicación masiva de plantas para especies de difícil propagación por otros métodos.
- Rescate de especies en vías de extinción.
- Clonación de individuos de características agronómicas especiales.
- Producción de semillas sintéticas.
- Producción de plantas libres de enfermedades (obtención de plantas libres de virus).
- Producción de nuevos híbridos.

- Germinación de semillas.
- Generación de variabilidad en mejora genética (incluyendo la obtención de plantas transgénicas).
- Conservación de germoplasma (conjunto de individuos que representan la variabilidad genética de una población vegetal).
- Selección, cruzamiento, control de enfermedades y producción en masa de cultivos de cosecha e involucra diferentes plantas en agricultura, horticultura, forestales y frutales.
- Estudios fisiológicos diversos.
- Sistema modelo para estudios de fisiología vegetal.
- Producción de metabolitos secundarios.
- Lucha contra enfermedades.

La regeneración de plantas a partir de cultivo in vitro de ciertas especies leñosas, exige la búsqueda de técnicas complejas (PERUGORRÍA, 2005). Estas deben permitir a las plantas sobrevivir a los problemas de oxidación, heterogeneidad de respuesta y sobre todo a la ambientación cuando son trasplantadas a un sustrato y expuestas a las condiciones naturales. Los explantes cultivados in vitro pueden dar dos tipos de respuesta: una de diferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células denominada callo o una respuesta morfogénica por la cual o se forman órganos (organogénesis) o embriones como la embriogénesis somática (LÓPEZ, 1996).

La embriogénesis somática está ampliamente considerada como la mejor vía de regeneración que utilizan las técnicas de cultivo de tejidos vegetales en biotecnología forestal. Los avances actuales en biotecnología-genómica están teniendo un gran impacto en el uso de material selecto en muchos programas de mejora. La embriogénesis somática está contribuyendo a la producción de plantas transgénicas y a la consecución de la silvicultura clonal de alta productividad, con calidad de madera mejorada y menor impacto de enfermedades, en plantaciones forestales (CELESTINO, 2005). En la embriogénesis somática el enraizamiento es reemplazado por una etapa de maduración y germinación de los embriones para la diferenciación de los ápices caulinares y radicales.

Las plantas producidas asexualmente a través de organogénesis *in vitro*, son de calidad uniforme, y pueden ser reproducidas más rápidamente que a través de la sexual o por técnicas convencionales de propagación. Tales plantas crecen y maduran más rápido que las plantas propagadas por semillas (VASIL y VASIL, 1980).

La multiplicación *in vitro* de especies agroforestales puede lograrse por tres rutas diferentes: 1) por desarrollo de brotes preexistentes, 2) por formación de meristemas adventicios, y, 3) por diferenciación de embriones somáticos (AGUILAR *et al.*, 2010).

Hasta la fecha, la multiplicación de plantas por medio de ápices preexistentes es el método más común para la propagación clonal de maderas

duras, siendo el más utilizado en coníferas. En esta técnica se utilizan ápices de yemas terminales, axilares y nudos. Este sistema de propagación tiene la ventaja de que los brotes se multiplican directamente, sin una fase intermedia de callo (masa de células no diferenciadas) siendo en general, las plantas regeneradas, genéticamente estables; sin embargo, el número de plantas que se produce es limitado debido a que depende del número de brotes preexistentes en el explante. Si bien la tasa de multiplicación inicial es baja, ésta se incrementa durante los primeros subcultivos y eventualmente se puede alcanzar una tasa considerable de multiplicación (THORPE *et al.*, 1991).

2.3.2. Medio de cultivo

Es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua. Usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina medio basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y ocasionalmente con otras sustancias varias.

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta, sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir ni *in vitro* ni *in vivo*. También se debe añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas o sus fragmentos no son completamente autotróficos cuando se desarrollan en estas condiciones (SUÁREZ, 2003).

Los medios de cultivo más frecuentemente usados para la producción de brotes en angiospermas son WP Woody Plant, y MS Murashige & Skoog suplementado con BAP (bencilamino purina). Cambiando los

nutrientes del medio de cultivo se puede alterar el porcentaje de explantes que formen brotes adventicios y/o el número de brotes adventicios o vástagos. Medios con baja calidad de sales como el WP Woody Plant, 1970 y GD Gresshoff & Doy, 1972 incrementan algunas veces el porcentaje de enraizamiento de brotes axilares en árboles (THORPE, 1991).

2.3.3. Reguladores de crecimiento

Generalmente es necesario agregar una o más sustancias reguladoras; frecuentemente auxinas y/o citoquininas, pero a veces también giberilinas o ácido abscísico, para mejorar el desarrollo del cultivo in vitro de tejidos y órganos. Por otro lado, los requerimientos de estas sustancias varían considerablemente con los tipos de tejidos y los niveles endógenos de estos reguladores, así como con la finalidad del cultivo in vitro (PIERIK, 1990).

Auxinas

Se relacionan con la elongación, tropismo, dominancia apical, abscisión, enraizamiento y otros. En cultivo in vitro las auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción de callo. Las auxinas más utilizadas son: IBA (ácido indol-3-butírico), NAA (ácido naftalenacético), IAA (ácido indolacético) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). El IBA y el NAA son usados frecuentemente para enraizamiento. El 2,4-D es muy efectivo para la inducción de callos. Las auxinas se disuelven usualmente en etanol diluido o en una solución de hidróxido de sodio (PIERIK, 1990).

Citoquininas

Las citoquininas se asocian con los procesos de división celular. La producida artificialmente tiene propiedades análogas a las naturales. La zeatina es un citoquinina natural extraída de la semilla de maíz pero tiene un costo muy alto (GUTIÉRREZ *et al.*, 2003).

En los medios para cultivo *in vitro* se incorporan citoquininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Se usan estos compuestos para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical. Las citoquininas más usadas son: BAP (bencilamino purina), kinetina y 2-ip (isopentenil-adenina). Generalmente son diluidas con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio (PIERIK, 1990).

2.3.4. Técnicas de propagación a partir de ápices y laterales

Cultivo de meristemas

Técnica muy importante para la reproducción masiva de clones y de material vegetal genéticamente estable y para la reproducción de plantas libres de virus. También se utiliza la quimioterapia aplicando sustancias específicas para alterar el mecanismo de síntesis de los virus. La técnica se complementa y da mejores resultados si se aplica en plantas que van ser cultivadas en viveros donde hay un mejor control de las condiciones ambientales, lo que disminuye el riesgo de recontaminación (GUTIÉRREZ *et al.*, 2003).

2.3.5. Meristemas apicales y laterales

En el caso del alargamiento de las yemas axilares, este método utiliza ápices principales, brotes laterales y segmentos nodales, e involucra la multiplicación de brotes preformados, generalmente sin la formación de algún callo, produciendo en general, cultivos genéticamente estables. Este método genera el menor número de plantas, ya que el número de brotes producido es limitado por el número de brotes axilares sembrados en el medio de cultivo (MUÑOZ, 2003).

Se han usado los cultivos de puntas de brotes y de meristemas de muchas otras plantas, para obtener mantener y multiplicar los materiales genéticos de una punta de brotes o de un explante, en algunos casos, se regenera una planta y en otros casos se puede estimular la formación de brotes múltiples, en cada uno de estos casos se espera a menudo lograr la formación de ramas axilares que puedan separarse y enraizarse; teóricamente los brotes axilares o laterales pueden a su vez producir ramas axilares adicionales a perpetuidad, a medida que se sub cultiva cada brote recién formado o cada explante de nudo. Por lo tanto el método es bueno para poder obtener una rápida multiplicación clonal, y se aplicado a una gran variedad de especies, desde las herbáceas hasta las leñosas (STYER *et al.*, 1983).

2.3.6. Fases de propagación in vitro

Dentro del proceso de micropropagación se pueden diferenciar varias fases o etapas:

Fase 1 Desinfección de las yemas de la planta y/o desinfección de semillas

Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donante de yemas, durante un período que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas (ORTIZ *et al.*, 1998). En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y sanas (PIERIK, 1990).

Se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Los explantes pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces o semillas. Antes de extraer los explantes se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente.

Una vez desinfectado el material vegetal, se trabaja en cabinas de flujo laminar para extraer los explantes a partir del material vegetal. Estos explantes se introducirán en un tubo de cultivo conteniendo medio de cultivo para poder controlar la sanidad y la viabilidad (PIERIK, 1990).

La desinfección del material se realiza con hipoclorito de sodio, agua clorada comercial, peróxido de hidrogeno, nitrato de plata alcohol, pura o diluida durante diferentes períodos de 5 a 15 minutos, seguido por 3 a 4 enjuagues en agua esterilizada (MURASHIGE, 1974).

Fase 2 Introducción del material seleccionado in vitro

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo in vitro (PIERIK, 1990).

Fase 3 Multiplicación de brotes

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron de la fase 1 originen brotes de procedencia axilar o adventicia con varios entrenudos. Periódicamente estos nuevos brotes se deben sub cultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar. (PIERIK, 1990).

Los tubos son llevados al cuarto de incubación en condiciones ambientales controladas del cuarto de incubación, donde se obtiene yemas axilares, yemas apicales en promedio/micronudo (GONZALES *et al.*, 1998).

2.3.7. Condiciones del cultivo in vitro

En la cámara de flujo laminar no puede entrar material contaminado. El problema más importante en todo el proceso del cultivo in vitro son las contaminaciones. En el autoclave no se pueden meter determinadas

sustancias, como vitaminas, antibióticos, ácido giberélico, sacarosa, encimas, extractos vegetales, etc., ni tampoco recipientes que no soporten altas temperaturas. El vidrio ha de ser de muy buena calidad para que no suministre al medio, sustancias contaminantes para la planta. Normalmente se prepara el medio y se filtra directamente. El problema es que se absorben en el filtro determinadas sustancias (MORALES, 2002).

Los reguladores de crecimiento hormonas son imprescindibles, ya que sin ellos no se puede hacer el medio de cultivo. El pH ideal es 6, pero puede oscilar entre 5,5 y 6,5. Se necesita agar y medio sólido 0,6-0,9%. El medio de cultivo realmente sólo tiene que llevar agua, fuente de energía azúcares y reguladores de crecimiento (PIERIK, 1990).

El éxito de esta técnica de propagación también influyen determinadas características de la planta, como el tipo, genética e incluso el tipo de implante, parte más juvenil o más adulta (MORALES, 2002).

Temperatura

La temperatura a la que está expuesto el explante cultivado in vitro afecta a la mayoría de procesos fisiológicos y por consiguiente es un factor fundamental a controlar, cada especie tiene un intervalo de temperaturas en el que se produce el crecimiento óptimo. Este intervalo puede variar en función del genotipo, del órgano del que se ha obtenido el explante, de la época del año, de la edad de la planta madre, del fotoperiodo, etc. La temperatura de incubación que oscilan entre los ± 20 y 28° (MARÍN *et al.*, 1997).

Luz

Las cámaras de cultivo disponen de una serie de unidades productoras de luz situadas de tal forma que iluminen toda la superficie útil de la cámara. Las unidades productoras de luz acostumbran a ser fluorescentes y pueden estar situadas de formas distintas.

Horizontales

La batería de fluorescentes se coloca sobre el techo de cada área de cultivo. Este sistema tiene la ventaja de que consigue una distribución más uniforme de la luz en toda el área, pero tiene el inconveniente de que calienta el techo y éste suele ser, a la vez, la base de otro nivel de cultivo, por lo cual puede dar lugar a una distribución irregular de la temperatura.

Verticales

La batería de fluorescentes se coloca en los laterales de la cámara de cultivo de forma que producen una distribución más irregular de la luz en el área de cultivo pero generan menos problemas con la distribución del calor (MARÍN *et al.*, 1997).

La contaminación

Se puede definir como la introducción accidental de microorganismos (bacterias, hongos, algas), vectores y fuentes patogénicas indeseables, donde se incluyen contaminantes patógenos y no patógenos

(KUBOTA y TADOKORO, 1999). Sin embargo, las plantas in vitro se consideran como cultivos estériles por lo que la presencia de éstos microorganismos ha llevado a científicos a debatir ésta idea y definirlos más bien como cultivos asépticos (HERMAN, 1990).

Existen entradas de contaminantes en las diferentes etapas en el proceso como en el caso de la introducción del material de campo donde la contaminación es propia de la planta. A la vez también existen introducciones accidentales como en la preparación de medios, o en el subcultivo de plantas los cuales son los momentos en que se abren los frascos y quedan expuestos, a su vez que una ineficiente técnica aséptica por parte de los operadores puede introducir los contaminantes. Los cultivos más viejos almacenados en el cuarto de crecimiento sufren contaminaciones de hongos.

2.3.8. Ventajas del cultivo in vitro

Es el único método conocido actualmente para erradicar virus, viroides, micoplasmas y otros patógenos a partir de material enfermo, propagación clonal masiva de plantas libres de enfermedades en corto tiempo, mantiene el cultivo libre de plagas enfermedades, porque se requiere mucha asepsia (GONZALES *et al.*, 1998).

Reduce costos de labores agronómicas en el mantenimiento de germoplasma en el campo, multiplicación en cualquier época del año porque se trabaja en condiciones ambientales controladas, conservación de material genético en vías de extinción (MEJÍA, 1994).

2.3.9. Desventajas del cultivo in vitro

Requiere de personal especializado, requiere infraestructura y equipos especiales, La adquisición de productos químicos es costosa y difícil especialmente en países con pocos recursos, Difícil de instalar laboratorios “in vitro” donde no exista fluido eléctrico, La escasa literatura relacionada al cultivo “in vitro” de especies forestales, Difícil respuesta inicial de algunas especies o genotipos (MEJÍA, 1994).

Generalmente se requiere de 1 a 1.5 años para adecuar las condiciones a cada especie o genotipo. Los problemas que presenta el cultivo in vitro es: la contaminación es grave y vitrificación es una reacción de las plantas que las hace adquirir apariencia de vidrio. La única solución es hacer un subcultivo de material sano, es decir, se saca y se cortan los trocitos que estén bien (GONZALES *et al.*, 1998).

2.4. Cultivo de tejidos de especies forestales

Dentro de las especies leñosas, las más extensivamente estudiadas en los últimos años han sido las forestales, especialmente los maderables por su gran valor comercial (ROCA *et al.*, 1991).

Los programas de mejoramiento genético tradicionales en especies forestales no han tenido repercusiones trascendentales en la urgente necesidad de reforestación o de acortar el tiempo de obtener rentabilidad en las producciones comerciales, debido principalmente al largo ciclo de estas

especies desde la siembra de la semilla hasta la floración. Las técnicas de micropropagación han demostrado ser una importante alternativa para la solución de algunos de los problemas anteriormente referidos. El método de diferenciación de brotes adventicios es más común que la embriogénesis somática, y tiene mayor potencialidad para una propagación masiva que el estímulo de las yemas axilares. Actualmente son pocos los antecedentes que muestren un éxito de la embriogénesis somática en especies forestales (ROCA *et al.*, 1991).

Con respecto a la producción de brotes adventicios, el proceso involucra la inducción de tejido meristemático localizado por tratamiento con fitohormonas, determinándose la diferenciación del primordio y el desarrollo de los brotes. Usualmente involucra la formación de un callo, respondiendo al efecto de las citoquininas en tejido meristemático como el cambium. Es posible la producción de brotes adventicios en especies leñosas a partir de callos, pero es extremadamente difícil en las coníferas. La ruta mayormente utilizada para la regeneración *in vitro* de especies arbóreas, es un proceso que consiste en el establecimiento del cultivo y/o inducción, desarrollo, multiplicación, enraizamiento de los brotes.

Los explantes juveniles como los embriones cigóticos, cotiledones, hipocótilos o yemas de plántulas y hojas juveniles tienen mejor respuesta al cultivo *in vitro* que otros tejidos de árboles adultos. Por esta razón los explantes juveniles han sido exitosamente empleadas para la clonación forestal (THORPE, 1991).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Micropropagación in vitro de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), ubicado en el Km 1,5 carretera Tingo María-Huánuco, distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, cuyas coordenadas geográficas son:

Longitud : 75° 57' 00"

Latitud sur : 09° 09' 08"

Altitud : 670 msnm

3.2. Materiales

3.2.1. Material vegetal

25 plántones de 5 - 7 meses de edad por ensayo, germinadas en vivero y desinfectadas previamente de forma aislada.

3.2.2. Materiales y equipos

- Cámara de flujo laminar.

- Cuarto de incubación bajo condiciones controladas de temperatura 21 ± 2 °C, humedad 70 - 80% y fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.
- Autoclave.
- Microondas.
- Balanza analítica.
- Refrigerador.
- Destilador de agua.

3.2.3. Reactivos

- Medio basal Murashige & Skoog mixture (MS).
- Medio Basal de Woody PlantMedia (WPM), marca Sigma.
- Reguladores de crecimiento: ácido naftalenacético (ANA), marca Sigma, Kinetina, marca Sigma, 2,4D marca Sigma.
- Alcohol medicinal 70° y 96°, hipoclorito de sodio al 2%.
- Tween 20.

3.2.4. Flujoograma

Se muestra las fases de la investigación de forma resumida y simple, de tal manera que nos permita dar un amplio conocimiento de lo que se hizo y diferenciar mejor los ensayos ejecutados (Figura 1).

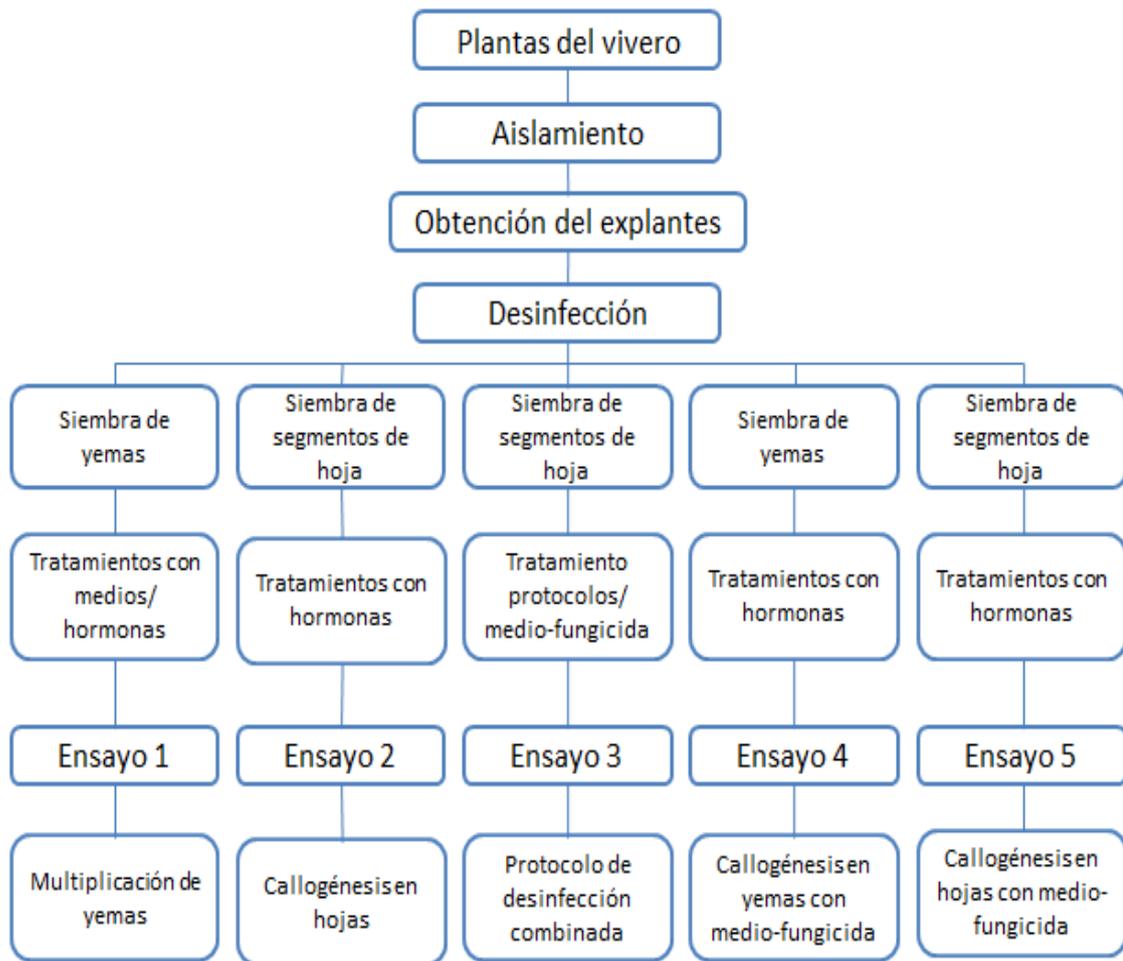


Figura 1. Flujograma de fases por ensayo.

3.3. Metodología

La presente investigación consta de 5 ensayos:

Ensayo 1: Multiplicación de yemas

Ensayo 2: Calogénesis en hojas

Ensayo 3: Protocolo de desinfección combinada

Ensayo 4: Calogénesis en hojas con medio fungicida

Ensayo 5: Calogénesis en yemas con medio fungicida

Y se desarrollaron en 4 fases cada una: Fase de gabinete, fase de aislamiento, fase de laboratorio y la fase de evaluación.

3.3.1. Fase de gabinete

3.3.1.1. Identificación de los factores en estudio

Para el Ensayo 1

Factor A. Medio de cultivo basal

a₁: MS

a₂: WPM

Factor B. Balance hormonal

b₁: balance: 0.35 mg/L de Kinetina y 0 mg/L de ANA

b₂: balance: 0.7 mg/L de Kinetina y 0.35 mg/L de ANA

b₃: balance: 1.05 mg/L de Kinetina y 0.7 mg/L de ANA

b₄: balance: 1.4 mg/L de Kinetina y 1.05 mg/L de ANA

b₅: balance: 1.75 mg/L de Kinetina y 1.75 mg/L de ANA

Para el Ensayo 2

Factor A. Balance hormonal

a₁: balance: 0 mg/L de Kinetina y 0.35 mg/L de 2,4D

a₂: balance: 0.88 mg/L de Kinetina y 0.88 mg/L de 2,4D

a₃: balance: 1.05 mg/L de Kinetina y 0.1 mg/L de 2,4D

a₄: balance: 1.23 mg/L de Kinetina y 1.4 mg/L de 2,4D

a₅: balance: 0.7 mg/L de Kinetina y 1.4 mg/L de 2,4D

Para el Ensayo 3

Factor A. Protocolo de desinfección

a₁: Protocolo 1

a₂: Protocolo 2

Factor B. Medio de cultivo con fungicida sistémico

b₁: MS + 0 g/1000 ml de Benomil

b₂: MS + 2 g/1000 ml de Benomil

b₃: MS + 5 g/1000 ml de Benomil

Para el Ensayo 4

Factor A. Balance hormonal

a₁: balance: 0 mg/L de 2,4D y 0 mg/L de Kinetina

a₂: balance: 0.7 mg/L de 2,4D y 0.18 mg/L de Kinetina

a₃: balance: 1.05 mg/L de 2,4D y 0.35 mg/L de Kinetina

a₄: balance: 1.05 mg/L de 2,4D y 1.05 mg/L de Kinetina

a₅: balance: 2.45 mg/L de 2,4D y 1.05 mg/L de Kinetina

a₆: balance: 2.45 mg/L de 2,4D y 1.75 mg/L de Kinetina

Para el Ensayo 5

Factor A. Balance hormonal

a₁: balance: 0 mg/L de Kinetina y 0 mg/L de ANA

a₂: balance: 0.7 mg/L de Kinetina y 0.18 mg/L de ANA

a₃: balance: 1.05 mg/L de Kinetina y 0.35 mg/L de ANA

a₄: balance: 1.05 mg/L de Kinetina y 1.05 mg/L de ANA

a₅: balance: 2.45 mg/L de Kinetina y 1.05 mg/L de ANA

a₆: balance: 2.45 mg/L de Kinetina y 1.75 mg/L de ANA

3.3.1.2. Tratamientos en estudio

Para el Ensayo 1

Los tratamientos resultaron de la combinación de los factores en considerados para el estudio, siendo 10 tratamientos que corresponden a yemas de tornillo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos en estudio E₁.

Tratamiento	Código	Descripción
T ₁	a ₁ b ₁	Yema en medio de cultivo MS y con balance de 0.35 mg/L de Kinetina y 0 mg/L de ANA
T ₂	a ₁ b ₂	Yema en medio de cultivo MS y con balance de 0.7 mg/L de Kinetina y 0.35 mg/L de ANA
T ₃	a ₁ b ₃	Yema en medio de cultivo MS y con balance de 1.05 mg/L de Kinetina y 0.7 mg/L de ANA
T ₄	a ₁ b ₄	Yema en medio de cultivo MS y con balance de 1.4 mg/L de Kinetina y 1.05 mg/L de ANA
T ₅	a ₁ b ₅	Yema en medio de cultivo MS y con balance de 1.75 mg/L de Kinetina y 1.75 mg/L de ANA
T ₆	a ₂ b ₁	Yema en medio de cultivo WPM y con balance de 0.35 mg/L de Kinetina y 0 mg/L de ANA
T ₇	a ₂ b ₂	Yema en medio de cultivo WPM y con balance de 0.7 mg/L de Kinetina y 0.35 mg/L de ANA
T ₈	a ₂ b ₃	Yema en medio de cultivo WPM y con balance de 1.05 mg/L de Kinetina y 0.7 mg/L de ANA
T ₉	a ₂ b ₄	Yema en medio de cultivo WPM y con balance de 1.4 mg/L de Kinetina y 1.05 mg/L de ANA
T ₁₀	a ₂ b ₅	Yema en medio de cultivo WPM y con balance de 1.75 mg/L de Kinetina y 1.75 mg/L de ANA

Para el Ensayo 2

Los tratamientos resultaron del factor en estudio, siendo cinco (05) los tratamientos que correspondieron a explantes de hojas de tornillo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos en estudio E₂.

Tratamiento	Código	Descripción
T ₁	a ₁	Fracción de hoja en medio de cultivo MS y con balance de 0 mg/L de Kinetina y 0.35 mg/L de 2,4D
T ₂	a ₁	Fracción de hoja en medio de cultivo MS y con balance de 0.88 mg/L de Kinetina y 0.88 mg/L de 2,4D
T ₃	a ₁	Fracción de hoja en medio de cultivo MS y con balance de 1.05 mg/L de Kinetina y 0.35 mg/L de 2,4D
T ₄	a ₁	Fracción de hoja en medio de cultivo MS y con balance de 1.23 mg/L de Kinetina y 1.4 mg/L de 2,4D
T ₅	a ₁	Fracción de hoja en medio de cultivo MS y con balance de 0.7 mg/L de Kinetina y 1.4 mg/L de 2,4D

Para el Ensayo 3

Los tratamientos resultan de la combinación de los factores en estudio, serán 6 tratamientos que corresponden a segmento de hojas de tornillo (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos en estudio E₃.

Tratamiento	Código	Descripción
T ₁	a ₁ b ₁	Protocolo 1, medio de cultivo MS y 0 g de Benomil
T ₂	a ₁ b ₂	Protocolo 1, medio de cultivo MS y 2 g de Benomil
T ₃	a ₁ b ₃	Protocolo 1, medio de cultivo MS y 5 g de Benomil
T ₄	a ₁ b ₄	Protocolo 2, medio de cultivo MS y 0 g de Benomil
T ₅	a ₁ b ₅	Protocolo 2, medio de cultivo MS y 2 g de Benomil
T ₆	a ₂ b ₁	Protocolo 2, medio de cultivo MS y 5 g de Benomil

Para el Ensayo 4

A partir de este ensayo, se aplicará los ensayos anteriores, es decir, que será la aplicación del mejor medio de cultivo con el mejor protocolo de desinfección tanto en segmentos de hojas como en segmentos de yemas y, el uso de fungicida Benomil en el medio de cultivo, así como determinar la eficiencia de cada uno de ellos.

Los tratamientos resultan del factor en estudio, serán 6 tratamientos que corresponden a segmento de hojas de tornillo con su respectivo código de factor y su descripción de cada uno de los tratamientos (Cuadro 4).

Cada tratamiento se designó para determinar la interacción de los ensayos anteriores con su respectivo balance de hormonas.

Cuadro 4. Tratamientos en estudio E₄.

Tratamiento	Código	Descripción
T ₁	a ₁	Segmento de hoja en medio de cultivo (MS + 2 g/1000 ml fungicida) y con balance de 0 mg/L de 2,4D y 0 mg/L de Kinetina
T ₂	a ₁	Segmento de hoja en medio de cultivo (MS + 2 g/1000 ml fungicida) y con balance de 0.7 mg/L de 2,4D y 0.18 mg/L de Kinetina
T ₃	a ₁	Segmento de hoja en medio de cultivo (MS + 2 g/1000 ml fungicida) y con balance de 1.05 mg/L de 2,4D y 0.35 mg/L de Kinetina
T ₄	a ₁	Segmento de hoja en medio de cultivo (MS + 2 g/1000 ml fungicida) y con balance de 1.05 mg/L de 2,4D y 1.05 mg/L de Kinetina
T ₅	a ₁	Segmento de hoja en medio de cultivo (MS + 2 g/1000 ml fungicida) y con balance de 2.45 mg/L de 2,4D y 1.05 mg/L de Kinetina
T ₆	a ₁	Segmento de hoja en medio de cultivo (MS + 2 g/1000 ml fungicida) y con balance de 2.45 mg/L de 2,4D y 1.75 mg/L de Kinetina

Para el Ensayo 5

Los tratamientos resulta el factor en estudio, entonces serán 6 tratamientos que corresponden a yemas de tornillo (Cuadro 5).

Cuadro 5. Tratamientos en estudio E₅.

Tratamiento	Código	Descripción
T ₁	a ₁	Yema en medio de cultivo (MS + 2 g/1000 ml fungicida) y con balance de 0 mg/L de Kinetina y 0 mg/L de ANA
T ₂	a ₁	Yema en medio de cultivo (MS + 2 g/1000 ml fungicida) y con balance de 0.7 mg/L de Kinetina y 0.18 mg/L de ANA
T ₃	a ₁	Yema en medio de cultivo (MS + 2 g/1000 ml fungicida) y con balance de 1.05 mg/L de Kinetina y 0.35 mg/L de ANA
T ₄	a ₁	Yema en medio de cultivo (MS + 2 g/1000 ml fungicida) y con balance de 1.05 mg/L de Kinetina y 1.05 mg/L de ANA
T ₅	a ₁	Yema en medio de cultivo (MS + 2 g/1000 ml fungicida) y con balance de 2.45 mg/L de Kinetina y 1.05 mg/L de ANA
T ₆	a ₂	Yema en medio de cultivo (MS + 2 g/1000 ml fungicida) y con balance de 2.45 mg/L de Kinetina y 1.75 mg/L de ANA

3.3.1.3. Unidad de observación

La unidad de observación está constituida por un tubo de ensayo de 150 mm x 15 mm, conteniendo 7 ml de medio de cultivo en donde se sembró el explante (yema o segmento de hoja según el ensayo).

3.3.1.4. Análisis estadístico.

Para el Ensayo 1

Para la investigación experimental se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo combinatorio bifactorial 2 X 5 para los cuales se utilizó 10 tratamientos con 10 repeticiones. El modelo aditivo lineal de la presente investigación es:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta) + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Es la respuesta obtenida en la k-ésima repetición, a la cual se aplicó el i-ésimo medio de cultivo con la j-ésima combinación de hormonas.

μ = Es el efecto de la media general.

α_i = Es el efecto del i-ésimo medio de cultivo.

β_j = Es el efecto de la j-ésima combinación de hormonas

$(\alpha\beta)$ = Es el efecto de la interacción entre el i-ésimo medio de cultivo con la j-ésima combinación de hormonas.

E_{ijk} = Es el efecto aleatorio del error experimental obtenida en la k-ésima repetición, a la cual se aplicó el i-ésimo medio de cultivo con la j-ésima combinación de hormonas.

Para:

$i = 1, 2$ Medio de cultivo

$j = 1, 2, 3, 4, 5$ Combinación de hormonas

$k = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ Repeticiones

Especificaciones

Tratamientos : 10

Repeticiones : 10

Unidades experimentales : 100

Ensayo 2

Para la investigación experimental se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) para los cuales se utilizaron 5 tratamientos con 10 repeticiones que representa el número de repeticiones confiable para determinar sin mucho error un buen resultado, además de favorecer para futuros análisis estadísticos.

El modelo aditivo lineal de la presente investigación es:

$$Y_{ik} = \mu + \alpha_i + E_{ik}$$

Donde:

Y_{ik} = Es la respuesta obtenida en la k-ésima repetición, a la cual se aplicó la i-ésima combinación de hormonas.

μ = Es el efecto de la media general.

α_i = Es el efecto de la i-ésima combinación de hormonas.

E_{ik} = Es el efecto aleatorio del error experimental obtenida en la k-ésima repetición, a la cual se aplicó la i-ésima combinación de hormonas.

Para:

$i = 1, 2, 3, 4, 5$ Combinación de hormonas

$k = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ Repeticiones

Especificaciones

Tratamientos : 5

Repeticiones : 10

Unidades experimentales : 50

Ensayo 3

Para la investigación experimental se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo combinatorio bifactorial 2 X 3 para los cuales se utilizó 6 tratamientos (combinándolos con esquema del árbol) con 10 repeticiones.

El modelo aditivo lineal de la presente investigación es:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta) + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Es la respuesta obtenida en la k-ésima repetición, a la cual se aplicó el i-ésimo protocolo de desinfección con el j-ésimo medio de cultivo con fungicida.

μ = Es el efecto de la media general.

α_i = Es el efecto del i-ésimo protocolo de desinfección.

β_j = Es el efecto de la j-ésimo medio de cultivo con fungicida

$(\alpha\beta)$ = Es el efecto de la interacción entre el i-ésimo protocolo de desinfección con el j-ésimo medio de cultivo con fungicida.

E_{ijk} = Es el efecto aleatorio del error experimental obtenida en la k-ésima repetición, a la cual se aplicó el i-ésimo protocolo de desinfección con la j-ésimo medio de cultivo con fungicida.

Para:

$i = 1, 2$ protocolo de desinfección

$j = 1, 2, 3$ medio de cultivo con fungicida

$k = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ Repeticiones

Especificaciones

Tratamientos : 6

Repeticiones : 10

Unidades experimentales : 60

Ensayo 4

Para la investigación experimental se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) para los cuales se utilizó 6 tratamientos con 10 repeticiones.

El modelo aditivo lineal de la presente investigación es:

$$Y_{ik} = \mu + T_i + E_{ik}$$

Donde:

Y_{ik} = Es la respuesta obtenida en la k-ésima repetición, a la cual se aplicó la i-ésima combinación de hormonas.

μ = Es el efecto de la media general.

T_i = Es el efecto de la i-ésima combinación de hormonas.

E_{ik} = Es el efecto aleatorio del error experimental obtenida en la k-ésima repetición, a la cual se aplicó la i-ésima combinación de hormonas.

Para:

$i = 1, 2, 3, 4, 5, 6$ Combinación de hormonas

$k = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ Repeticiones

Especificaciones

Tratamientos	: 6
Repeticiones	: 10
Unidades experimentales	: 60

Ensayo 5

Para la investigación experimental se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) para los cuales se utilizó 6 tratamientos con 10 repeticiones, siempre tomando este número de repeticiones porque es uno aceptable y confiable para futuros análisis estadísticos, además de minimizar el error. El modelo aditivo lineal de la presente investigación es:

$$Y_{ik} = \mu + T_i + E_{ik}$$

Donde:

Y_{ik} = Es la respuesta obtenida en la k-ésima repetición, al cual se aplicó la i-ésima combinación de hormonas.

μ = Es el efecto de la media general.

T_i = Es el efecto de la i-ésima combinación de hormonas.

E_{ik} = Es el efecto aleatorio del error experimental obtenida en la k-ésima repetición, al cual se aplicó la i-ésima combinación de hormonas.

Para:

$i = 1, 2, 3, 4, 5, 6$ Combinación de hormonas

$k = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ Repeticiones

- Especificaciones

Tratamientos : 6

Repeticiones : 10

Unidades experimentales : 60

3.3.1.5. Análisis de varianza

Se hizo el análisis de varianza para cada ensayo en la investigación (Cuadro 6 y Cuadro 7).

Cuadro 6. Análisis de varianza (ANVA) para ensayos 1 y 3.

Fuente de variación	Grados de libertad
Factor A	$a-1$
Factor B	$b-1$
A x B	$(a-1)x(b-1)$
Error	$axb(r-1)$
Total	$(axb)r - 1$

Cuadro 7. Análisis de varianza (ANVA) para ensayos 2, 4 y 5.

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamientos	a-1
Error	ax(r-1)
Total	(axr) – 1

3.3.1.6. Análisis funcional

Se realizó la prueba de Tukey al 5% para todas las variables en estudio que presentaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) y el cálculo de coeficiente de variación se expresó en porcentaje con la finalidad de determinar la homogeneidad o heterogeneidad de los datos, y la prueba T de student para los factores en estudio con menos de tres grupos.

3.3.2. Fase de aislamiento

Se aisló los plántones de tornillo previamente con fungicidas de contacto (Mancozeb) y sistémicos (Benomil) dos veces por semana por un mes, antes de ingresar al laboratorio.

3.3.3. Fase de laboratorio

3.3.3.1. Composición del medio de cultivo

Todos los nutrientes, minerales y otros que posee el medio de cultivo se agregaron de acuerdo al Cuadro 8.

Cuadro 8. Componentes para el medio de cultivo MS y WPM

Componentes /MS		Componentes/WPM	
Mayor sales	mg ^l ⁻¹	Macronutrientes	mg ^l ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650	NH ₄ NO ₃	400
KNO ₂	1900	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	556
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	K ₂ SO ₄	990
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170	KH ₂ PO ₂	170
-	-	CaCl ₂ ·2H ₂ O	96
Menor sales	mg ^l ⁻¹	Micronutrientes	mg ^l ⁻¹
KI	0.83	H ₃ BO ₃	6.2
H ₃ BO ₃	6.2	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	NiSO ₄ ·6H ₂ O	-
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
Na ₂ -EDTA	37.3	Na ₂ -EDTA	37.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	-	-
Vitaminas y orgánicos		Vitaminas y orgánicos	

<i>Myo</i> -Inositol	100	Thiamine HCl	1.6
Acido nicotínico	0.5	Pyridoxina HCl	-
Pyridoxina HCl	0.5	Acido nicotínico	0.5
Thiamine HCl	0.1	<i>Myo</i> -Inositol	100
Glycina	2.0	Glycina	-

Fuente: GAMBORG y PHILLIPS (1995).

3.3.3.2. Preparación del medio de cultivo

Se preparó 700 ml (Ensayo 1), 350 ml (Ensayo 2), 420 ml (Ensayos 3, 4 y 5), del medio de cultivo con tratamientos, que se determina de la multiplicación de sus tratamientos, repeticiones y contenido del tubo de ensayo (T x R x 7 ml), los cuales se especifican en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Concentraciones de los stocks para el medio de cultivo.

	Stock	1000 ml	700 ml	350 ml	420 ml
Macronutrientes	10x	100	70	35	42
Micronutrientes	100x	10	7	3.5	4.2
FeEDTA	100x	10	7	3.5	4.2
Mioinositol	100x	10	7	3.5	4.2
Ac. Nicotínico	100x	10	7	3.5	4.2

Piridoxina	100x	10	7	3.5	4.2
Tiamina	100x	10	7	3.5	4.2
Glicina	100x	10	7	3.5	4.2
Sacarosa		30 g/L			
Agar		4 g/L			
Benomil	Diferentes composiciones				

* Ensayo 1: lo mismo para los medios MS y WPM.

** Ensayos 2, 3, 4 y 5: Sólo medio MS

*** Sólo para Ensayo 3: Tratamientos con tres concentraciones de fungicida Benomil (0, 2 y 5 g/L) en el medio MS

**** Sólo para ensayos 4 y 5: 2 g/L de fungicida en el medio MS

Por otro lado, en la fase de laboratorio se ha preparado las hormonas con las proporciones especificadas en los diferentes Cuadros 10, 11, 12 y 13.

Cuadro 10. Proporciones de hormonas para Ensayo 1.

Balance hormonal	Citoquinina (Kinetina)	Auxina (ANA)
1	1 = 0.35 mg/L	0 = 0 mg/L
2	2 = 0.7 mg/L	1 = 0.35 mg/L
3	3 = 1.05 mg/L	2 = 0.7 mg/L
4	4 = 1.4 mg/L	3 = 1.05 mg/L
5	5 = 1.75 mg/L	5 = 1.75 mg/L

Cuadro 11. Proporciones de hormonas para Ensayo 2.

Balance hormonal	Citoquinina (Kinetina)	Auxina (2,4D)
1	0 = 0 mg/L	1 = 0.35 mg/L
2	2.5 = 0.88 mg/L	2.5 = 0.88 mg/L
3	3 = 1.05 mg/L	1 = 0.35 mg/L
4	3.5 = 1.23 mg/L	4 = 1.4 mg/L
5	2 = 0.7 mg/L	4 = 1.4 mg/L

Cuadro 12. Proporciones de hormonas para Ensayo 4.

Balance hormonal	Auxina (2,4D)	Citoquinina (Kinetina)
1	0 = 0 mg/L	0 = 0 mg/L
2	2 = 0.7 mg/L	0.5 = 0.18 mg/L
3	3 = 1.05 mg/L	1 = 0.35 mg/L
4	3 = 1.05 mg/L	3 = 1.05 mg/L
5	7 = 2.45 mg/L	3 = 1.05 mg/L
6	7 = 2.45 mg/L	5 = 1.75 mg/L

Cuadro 13. Proporciones de hormonas para Ensayo 5.

Balance hormonal	Citoquinina (Kinetina)	Auxina (ANA)
1	0 = 0 mg/L	0 = 0 mg/L
2	2 = 0.7 mg/L	0.5 = 0.18 mg/L
3	3 = 1.05 mg/L	1 = 0.35 mg/L
4	3 = 1.05 mg/L	3 = 1.05 mg/L
5	7 = 2.45 mg/L	3 = 1.05 mg/L
6	7 = 2.45 mg/L	5 = 1.75 mg/L

Luego de mezclar todos los componentes líquidos, se procedió a combinar el medio con las hormonas, conteniendo el respectivo tratamiento.

Posteriormente se adhirió el agar y la sacarosa (y el fungicida en el caso de los ensayos 3, 4 y 5) para mezclarlos bien, después se puso al horno microondas con el propósito de activar y mezclar el agar.

Después de ello, se repartió 7 ml en cada tubo, cada 10 de ellos representa un tratamiento (10 repeticiones).

Luego se taparon con papel aluminio y se puso al Autoclave para esterilizarlos a aproximadamente 15 Psi por 15 min, y por último se puso al refrigerador para comenzar a gelificar y conservar el medio hasta la siembra.

3.3.3.3. Desinfección

Luego de trasladar los plántones de tornillo al laboratorio, se procedió a cortar la parte aérea de cada planta junto con 1/3 de cada foliolo con una tijera de podar (En el caso de los ensayos 2, 3 y 5 se conservaron los foliolos).

- **Para los ensayos 1 y 2:** Se sumergió en agua con detergente al 2% por 10 min, luego en solución de 2 litros de agua con fungicida Mancosept, Benomil y un bactericida Ceftriaxona (2 g, 2 g y 0.5 g respectivamente) por 1 hora máximo. Después se desinfectaron con etanol al 70% por 2min, siguiendo con Hipoclorito de sodio (lejía) al 1% por 15 min, más 7 gotas de Tween 20

para romper la tensión superficial de las ceras y el agua. En el proceso de enjuague se expondrá a agua esterilizada 3 veces por 5 min cada uno.

- **Para el Ensayo 3:** se aplicaron los protocolos de desafección:

Protocolo 1: Se sumergió en agua con detergente al 2% por 10 min, luego en solución de 2 litros de agua con fungicida Mancosept, Benomil y un bactericida Ceftriaxona (2 g, 2 g y 0.5 g respectivamente) por 1 hora máximo. Después se desinfectaron con etanol al 70° por 2min, siguiendo con Hipoclorito de sodio (lejía) al 1% por 15 min, más 7 gotas de Tween para romper la tensión superficial de las ceras y el agua. En el proceso de enjuague se expondrá a agua esterilizada 3 veces por 5 min cada uno.

Protocolo 2: Se sumergió en agua con detergente al 2% por 1 min, luego en solución de 2 litros de agua con fungicida Mancosept, Benomil y un bactericida Ceftriaxona (2 g, 2 g y 0.5 g respectivamente) por 5 min. Después se desinfectaron con etanol al 96° por 1min, siguiendo con Hipoclorito de sodio (lejía) al 2.5% por 5 min, más 5 gotas de Tween para romper la tensión superficial de las ceras y el agua. En el proceso de enjuague se expondrá a agua esterilizada 3 veces por 3 min cada uno.

Para los ensayos 4 y 5: Se sumergió en agua con detergente al 2% por 1 min, luego en solución de 2 litros de agua con fungicida Mancosept, Benomil y un bactericida Ceftriaxona (2 g, 2 g y 0.5 g respectivamente) por 5 min. Después se desinfectaron con etanol al 96° por 1min, siguiendo con Hipoclorito de sodio (lejía) al 2.5% por 5 min, más 5 gotas de Tween para

romper la tensión superficial de las ceras y el agua. En el proceso de enjuague se expondrá a agua esterilizada 3 veces por 3 min cada uno.

3.3.3.4. Siembra

La siembra se realizó dentro de la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, los cortes de los explantes se realizó con la ayuda de una pinza y bisturí estéril, se eliminó la parte deteriorada durante el proceso de desinfección (1 - 2 mm).

La longitud de los explantes fue de 18 a 20 mm para el caso de yemas, y segmentos circulares de 100 mm² con nervaduras para el caso de hojas; se sembraron en cada tubo con el respectivo tratamiento, se taparon y con una tira de Parafilm para evitar el ingreso de patógenos e insectos muy pequeños que puedan contaminar la unidad de observación. Luego se llevó a la cámara de cultivo bajo condiciones controladas de temperatura 21 ± 2 °C, humedad 70 - 80% y fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

3.3.4. Fase de evaluación

Las evaluaciones durante las 5 semanas (Ensayo 1) y 4 semanas (Ensayos 2, 3, 4 y 5) se realizaron diariamente con el fin de notar y apreciar el cambio o respuesta a cada tratamiento en cada explante de *C. cateniformis* para posteriormente poder analizarlos y compararlos estadísticamente teniendo en cuenta el error en los calculos.

3.3.4.1. Presencia de organogénesis

Se evaluó la posible presencia de órganos en algunos tratamientos, contabilizándolos en tiempo (días), forma (caracterización), número de brotes, número de raíces, longitud de brotes y longitud de raíces.

3.3.4.2. Presencia de callogénesis

Se evaluaron la posible presencia de callos, el tiempo que demora su aparición y contabilizándolos por días.

3.3.4.3. Porcentaje de contaminación

Se evaluó la contaminación con la observación de hongos y/o bacterias en todos los explantes.

$$\% H = \frac{\# \text{ explantes contaminados con hongos } \times 100}{\text{total de explantes}}$$

$$\% B = \frac{\# \text{ explantes contaminados con bacterias } \times 100}{\text{total de explantes}}$$

3.3.4.4. Porcentaje de necrosamiento

Se determinó la oxidación por compuestos fenólicos o necrosamiento contabilizando los explantes dañados entre el total de explantes.

IV. RESULTADOS

4.1. Ensayo 1: Multiplicación en yemas

El presente ensayo se basó en la multiplicación de yemas de tornillo, pero a pesar de las condiciones asépticas, los dos distintos medios de cultivo y el balance de hormonas, no se pudo sacar brotes a nivel significativo (2 brotes que viene a ser el 2% de 100 explantes o muestras) esto se debe a que el tornillo como especie no encontró las condiciones y requerimientos necesarios para la producción organogénica (brotes y raíces). A cambio de eso, se obtuvo una buena respuesta a la callogénesis que es también muy importante en la micropropagación in vitro de especies.

4.1.1. Presencia de callogénesis

Para determinar la diferencia estadística entre los tratamientos en estudio con respecto al número de callos presentes al término de la evaluación (5 semanas) se realizó el análisis de varianza utilizando datos transformados $\sqrt{(x + 1)}$ para determinar la ausencia y presencia.

El modelo propuesto resulta significativo, indicando rechazo de la hipótesis nula. La interacción de factores resulta no significativa, permitiendo sólo analizar los efectos principales independientemente (Cuadro 14).

Cuadro 14. Análisis de varianza para presencia de callos (E_1) con datos transformados $\sqrt{(x + 1)}$.

Fuente de variación	GL	SC	CM	
Tratamiento	9	0.508	0.049	S
A (Medio de cultivo)	1	0.203	0.203	S
B (Comb. Hormonas)	4	0.370	0.092	S
A x B	4	0.014	0.004	NS
Error	90	2.572	0.029	
Total	99	3.152		
CV% = 13.18				

S: Significación estadística al 5% de probabilidad.

NS: No existe significación estadística.

Para el factor A (Medio de cultivo) resultó significativo, lo cual indica que existe influencia del medio de cultivo sobre los resultados y que son estadísticamente diferentes medios; así mismo para el factor B (Combinación de hormonas) resulta altamente significativo el cual indica que existe diferencias entre combinaciones de hormonas. Cabe así mismo indicar que el modelo presenta 13.18% de coeficiente de variabilidad (CV%), indicando una buena homogeneidad de los resultados experimentales. Se realizó la prueba de comparación de medias a través del T de student para el factor A (por tener menos de tres grupos) (Cuadro 15).

Cuadro 15. Prueba T de student ($\alpha=0.05$) para la presencia de callos por los efectos del medio de cultivo.

Código	Medio de cultivo	Medias (Número de callos)	
a ₁	MS	1.353 (43)	a
a ₂	WPM	1.262 (32)	b

Las columnas agrupadas por la misma letra agrupan tratamientos que no presentan diferencia estadística.

En el porcentaje de aparición de callos en los dos medios de cultivo (MS y WPM), se observa una ventaja notoria del medio de cultivo MS hacia el WPM (Figura 2 y Figura 3). Se hace la comparación de medias con el gráfico de barras de error, lo cual muestra que el tornillo posee un mejor acoplamiento al medio de cultivo MS (Figura 4).

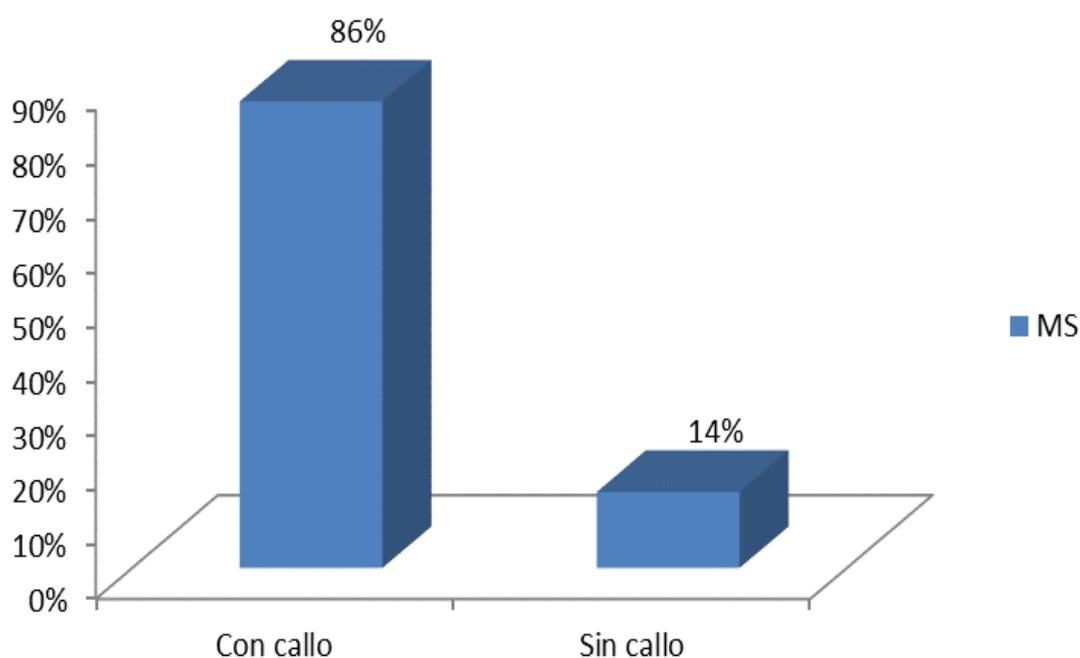


Figura 2. Porcentaje de aparición de callos para Murashige y Skoog (MS).

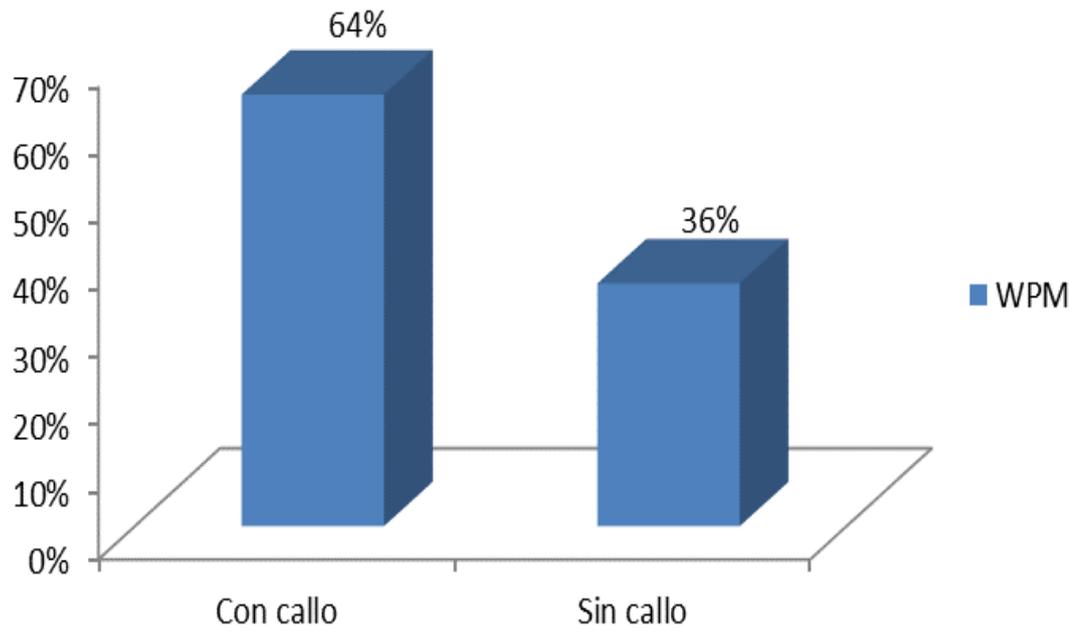


Figura 3. Porcentaje de aparición de callos para Woody Plant Media (WPM).

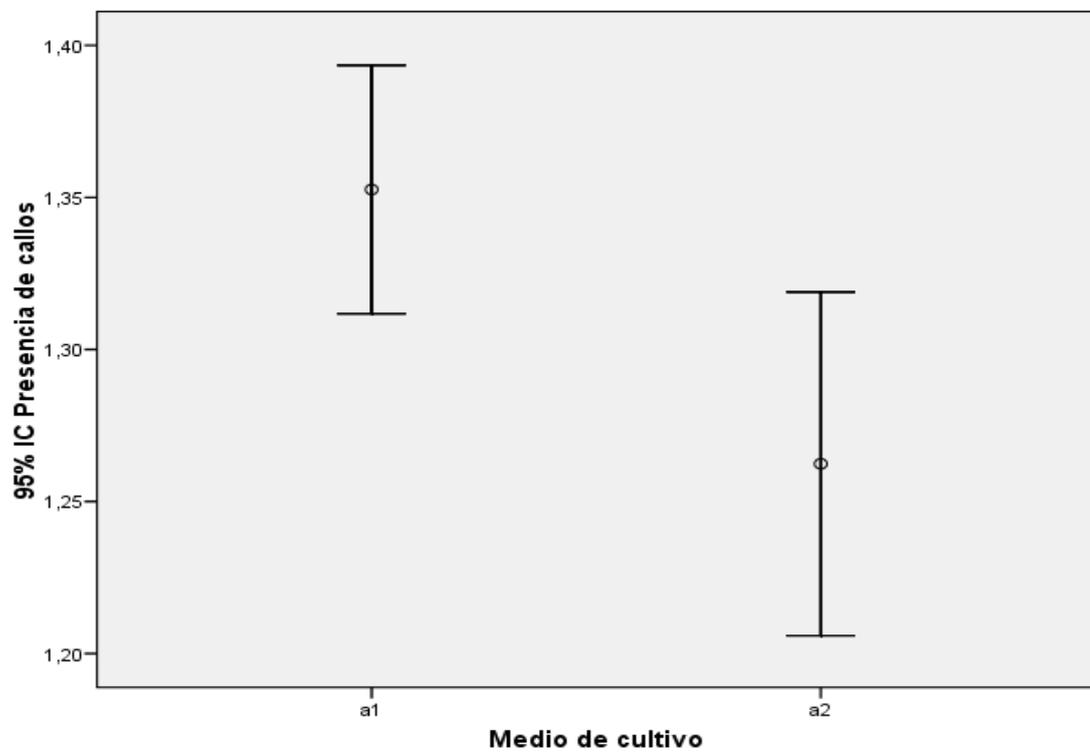


Figura 4. Gráfico de barras de error de medias para la presencia de callos por los efectos del medio de cultivo.

Según la prueba de T de student, existen dos grupos bien definidos (Cuadro 16). Además de la comparación de medias con barras (Figuras 5 y 6)

Cuadro 16. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para la presencia de callos por los efectos de la Combinación de hormonas.

Combinaciones de hormonas	Presencia de callos
b ₁ Balance: 0.35 mg/L de Kinetina y 0 mg/L de ANA	1.226 (11) a
b ₂ Balance: 0.7 mg/L de Kinetina y 0.35 mg/L de ANA	1.256 (12) a
b ₃ Balance: 1.05 mg/L de Kinetina y 0.7 mg/L de ANA	1.328 (16) a b
b ₄ Balance: 1.4 mg/L de Kinetina y 1.05 mg/L de ANA	1.369 (18) b
b ₅ Balance: 1.75 mg/L de Kinetina y 1.75 mg/L de ANA	1.369 (18) b

Las columnas agrupadas por la misma letra agrupan tratamientos que no presentan diferencia estadística

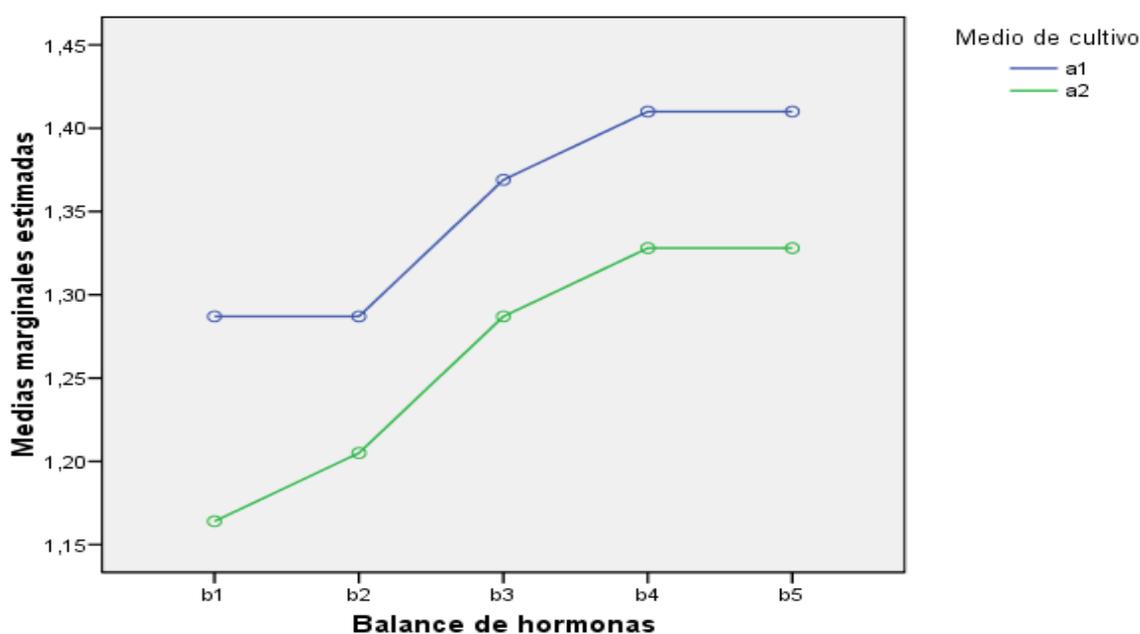


Figura 5. Comparación de medias para la presencia de callos por los efectos del balance de hormonas.

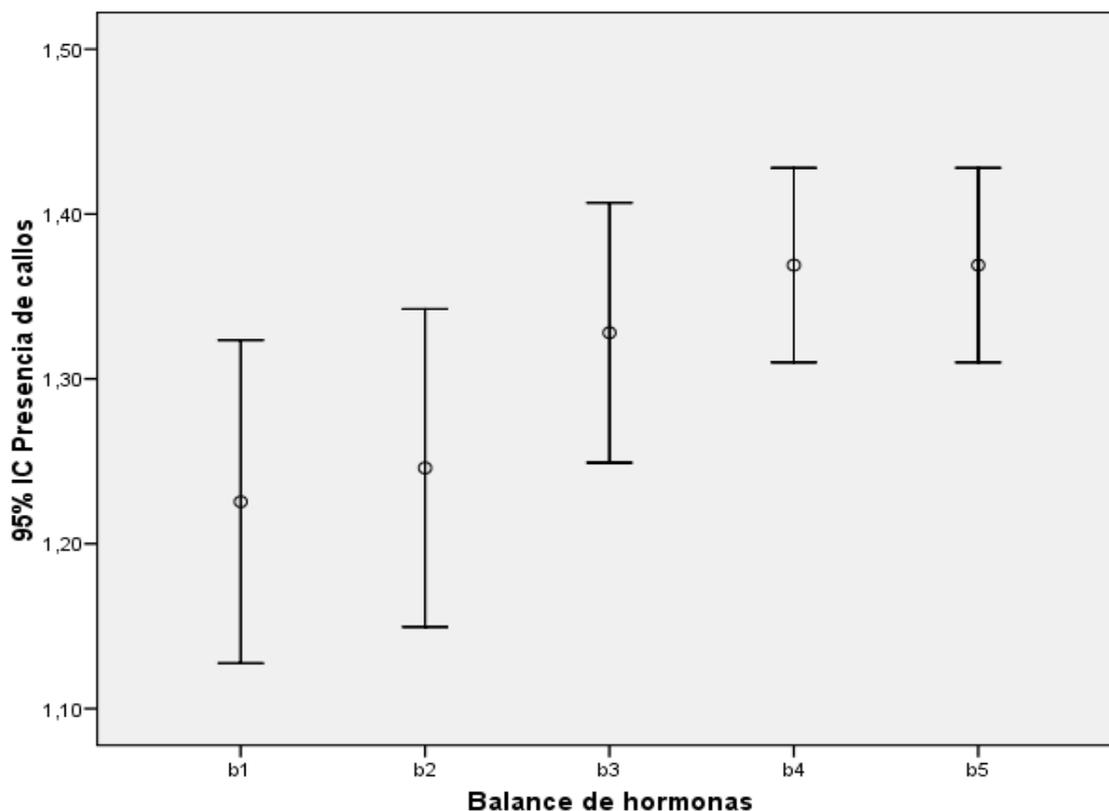


Figura 6. Gráfico de barras de error de medias para la presencia de callos por los efectos del balance de hormonas.

El Cuadro 16, muestra que existen 2 grupos bien definidos con una combinación de hormonas en común (b_3).

Por otro lado, analizando los resultados obtenidos, se puede decir que las mejores combinaciones son b_3 , b_4 y b_5 , los cuales pertenecen a los balances: 1.05 mg/L de Kinetina con 0.7 mg/L de ANA, 1.4 mg/L de Kinetina con 1.05 mg/L de ANA, y 1.75 mg/L de Kinetina con 1.75 mg/L de ANA respectivamente con 16, 18 y 18 callos cada uno, que simbolizan el 80%, 90% y 90% del total por tratamiento, simbolizando los mayores porcentajes de callosidad. Se compara las medias con la prueba de Tukey (Cuadro 17).

Cuadro 17. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para la presencia de callos por los efectos de los tratamientos.

Tratamientos		Presencia de callos		
T ₆	WPM con 0.35 mg/L de Kinetina y 0 mg/L de ANA	1.164 (4)	a	
T ₇	WPM con 0.7 mg/L de Kinetina y 0.35 mg/L de ANA	1.205 (5)	a	b
T ₁	MS con 0.35 mg/L de Kinetina y 0 mg/L de ANA	1.287 (7)	a	b c
T ₂	MS con 0.7 mg/L de Kinetina y 0.35 mg/L de ANA	1.287 (7)	a	b c
T ₈	WPM con 1.05 mg/L de Kinetina y 0.7 mg/L de ANA	1.287 (7)	a	b c
T ₁₀	WPM con 1.75 mg/L de Kinetina y 1.75 mg/L de ANA	1.328 (8)	a	b c
T ₉	WPM con 1.4 mg/L de Kinetina y 1.05 mg/L de ANA	1.328 (8)		b c
T ₃	MS con 1.05 mg/L de Kinetina y 0.7 mg/L de ANA	1.369 (9)		b c
T ₄	MS con 1.4 mg/L de Kinetina y 1.05 mg/L de ANA	1.410 (10)		c
T ₅	MS con 1.75 mg/L de Kinetina y 1.75 mg/L de ANA	1.410 (10)		c

Las columnas agrupadas por la misma letra agrupan tratamientos que no presentan diferencia estadística

Existen 3 grupos bien definidos estadísticamente diferentes (Cuadro 17). Por otro lado, analizando la Figura 7, los mejores tratamientos son T₃, T₄ y T₅, los cuales pertenecen al medio MS con balances: 1.05 mg/L de Kinetina con 0.7 mg/L de ANA, 1.4 mg/L de Kinetina con 1.05 mg/L de ANA, y 1.75 mg/L de Kinetina con 1.75 mg/L de ANA respectivamente con 9, 10 y 10 callos cada uno, que son el 90%, 100% y 100% del total por tratamiento, simbolizando los mayores porcentajes de callosidad.

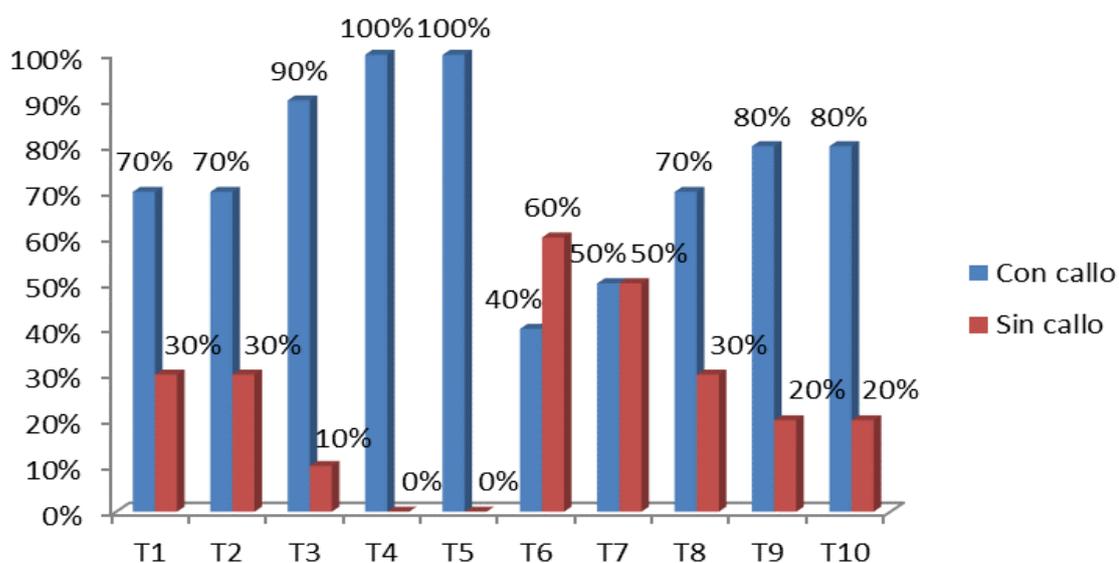


Figura 7. Porcentaje de aparición de callos por efectos de tratamientos.

4.1.2. Porcentaje de contaminación

Se evaluaron las muestras que no presentaron callo viable ni oxidación por compuestos fenólicos (Necrosamiento), determinándose callos contaminados por hongos y bacterias en los tratamientos, en cada medio de cultivo y en cada combinación de hormonas (Figuras 8, 9 y 10).

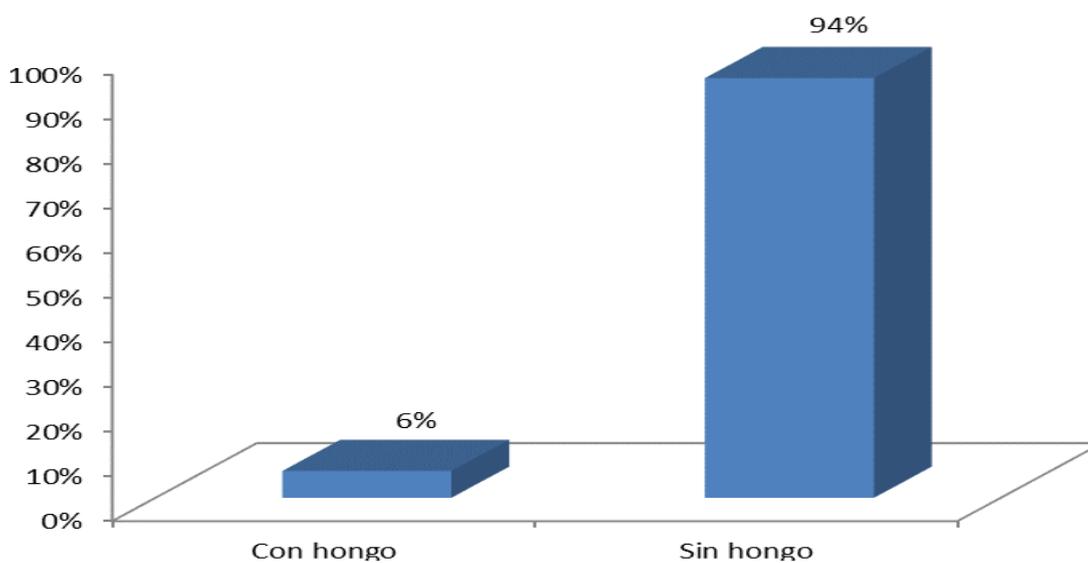


Figura 8. Contaminación por hongos de forma global en el Ensayo 1.

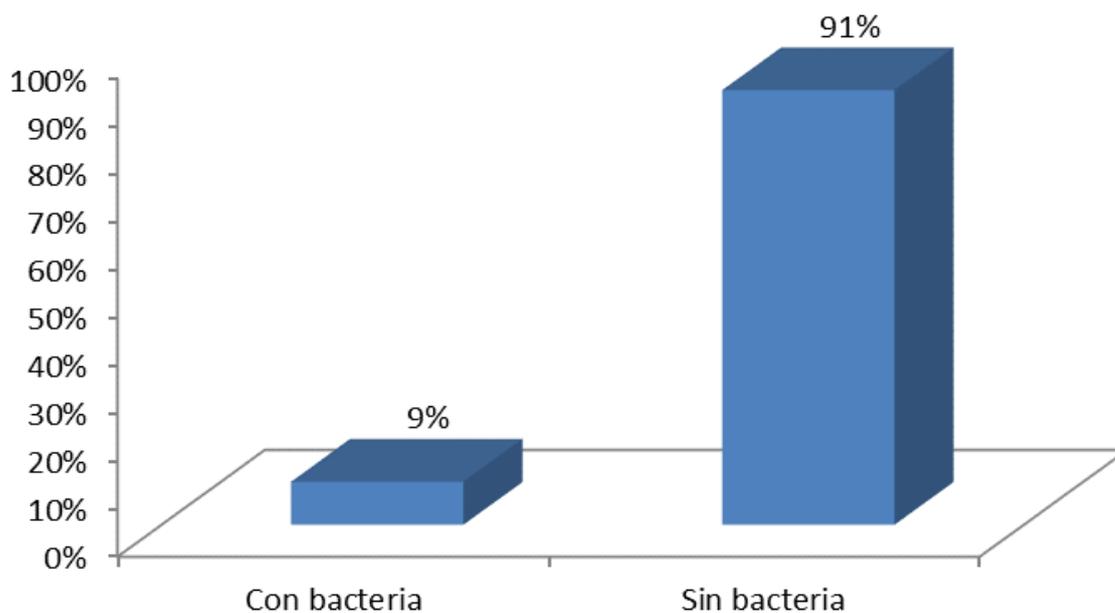


Figura 9. Contaminación por bacterias de forma global en el Ensayo 1.

Se obtuvo un porcentaje de supervivencia a hongos del 94% de un total de 100 explantes de tornillo (Figura 8 y 9), esta alta tasa de supervivencia se debe a una buena calidad de plantas de tornillo, así como de las condiciones asépticas en las que se trabajaron y al protocolo de desinfección.

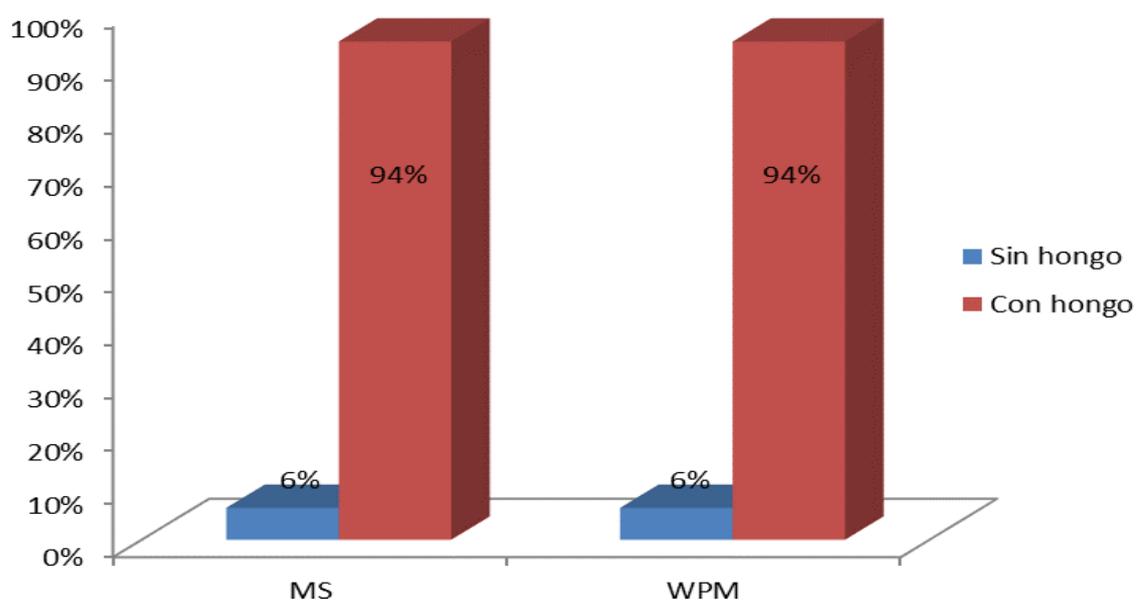


Figura 10. Contaminación por hongos según el medio de cultivo en Ensayo 1.

Se puede afirmar que los dos medios de cultivos no tienen diferencias con respecto a la formación de hongos, esto puede deberse a la buena estabilidad de los mismos con respecto a la asepsia de los explantes (Figura 10).

Asimismo, se puede apreciar y determinar que existen diferencias mínimas entre los medios de cultivos para la contaminación con bacterias, haciendo énfasis en el medio WPM como el más atractivo para las bacterias (Figura 11).

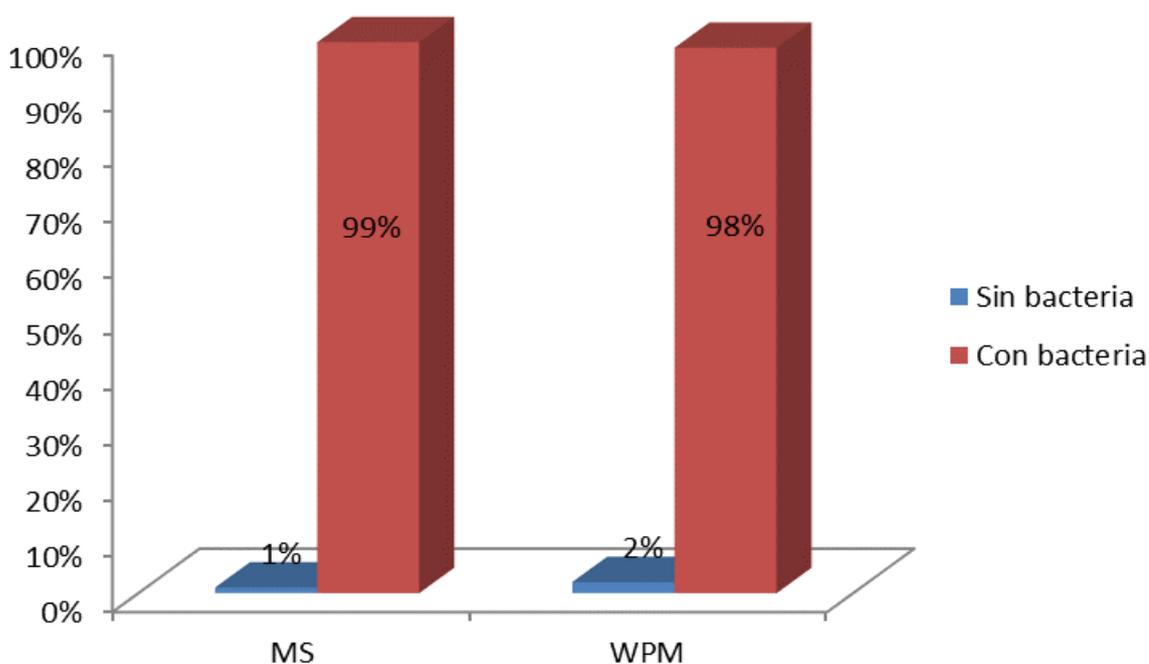


Figura 11. Porcentaje de contaminación por bacterias según el medio de cultivo en el Ensayo 1.

Se observa que el balance hormonal b_5 (1.75 mg/L de Kinetina con 1.75 mg/L de ANA) es la de mayor incidencia de hongos con un 15% de 20 explantes o repeticiones, esto puede deberse a la elevada concentración de

hormonas que posee, siendo más vulnerable a la proliferación de hongos y bacterias (Figuras 12 y 13).

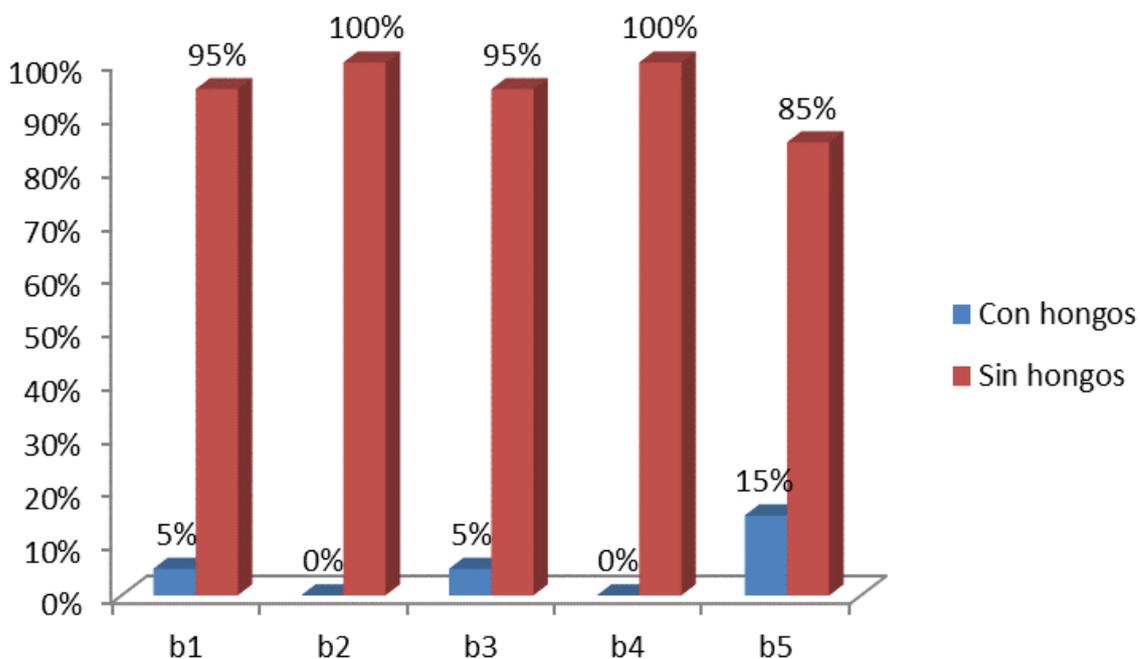


Figura 12. Contaminación por hongos según el balance hormonal en Ensayo 1.

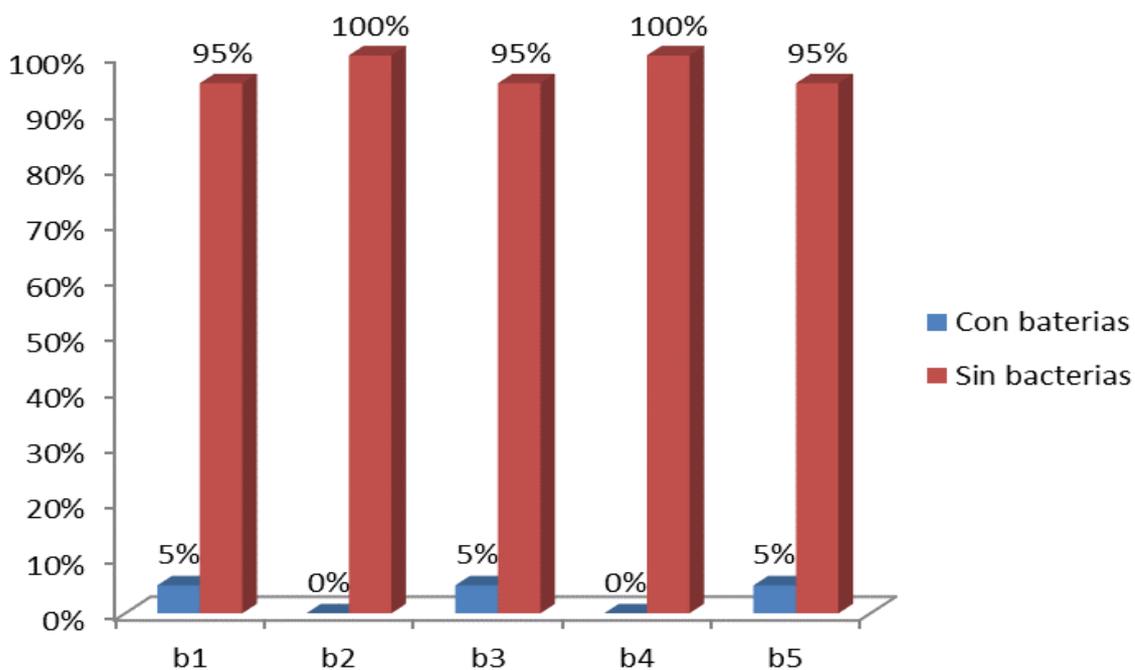


Figura 13. Contaminación por bacteria según el balance hormonal en Ensayo 1.

Se puede decir que existe un mayor porcentaje en los balances hormonales b_1 , b_3 y b_5 con 5% de contaminación por bacterias, lo cual indica que es muy poco probable que las bacterias dependan de la concentración de hormonas (Figura 13).

4.1.3. Porcentaje de necrosamiento

Se evaluó el nivel de oxidación por compuestos fenólicos o necrosamiento de los explantes que no presentaron callos viables, así como de los que no tenían callos (Figura 14).

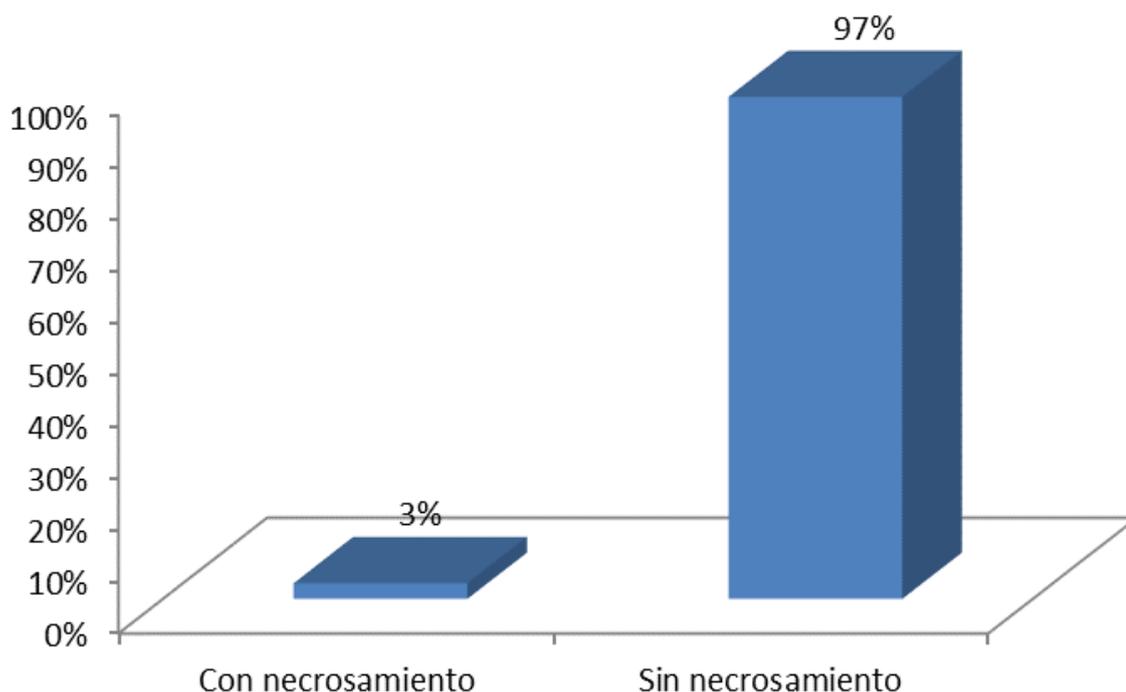


Figura 14. Porcentaje de necrosamiento global en el Ensayo 1.

El necrosamiento presentado no es significativo, numéricamente podemos afirmar que existe un 3% de 100 explantes que se oxidaron con compuestos fenólicos, este porcentaje es muy bajo y por lo tanto casi excluible.

4.2. Ensayo 2: Callogénesis en hojas

El presente ensayo se basó en producción de callos a partir de hojas de tornillo, los resultados mostrados de acuerdo a los parámetros de evaluación.

4.2.1. Presencia y porcentaje de callos

Para determinar la diferencia estadística entre los tratamientos en estudio con respecto al número de callos presentes al término de la evaluación (4 semanas) se realizó el análisis de varianza utilizando datos transformados $\sqrt{(x + 1)}$ para determinar la ausencia y presencia (Cuadro 18).

Cuadro 18. Análisis de varianza para presencia de callos con datos transformados $\sqrt{(x + 1)}$.

Fuente de variación	GL	SC	CM	
Tratamiento	4	0.269	0.063	S
Error	45	1.076	0.024	
Total	49	1.345		
CV% = 12.47				

S: Significación estadística al 5% de probabilidad. NS: No existe significación estadística

Como puede observarse, el modelo propuesto resulta significativo, indicando rechazo de la hipótesis nula, los tratamientos son estadísticamente diferentes (Cuadro 18).

Cabe así mismo indicar que el modelo presenta 12.47% de coeficiente de variabilidad (CV%), indicando una buena homogeneidad de los resultados experimentales. Se realizó la prueba de comparación de medias a través de la prueba Tukey (Cuadro 19).

Cuadro 19. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para la presencia de callos por los efectos de los tratamientos.

Combinaciones de hormonas		Presencia de callos	
T ₂	Balance: 0.88 mg/L de Kinetina y 0.88 mg/L de 2,4D	1.205 (7)	a
T ₁	Balance: 0 mg/L de Kinetina y 0.35 mg/L de 2,4D	1.287 (5)	a b
T ₃	Balance: 1.05 mg/L de Kinetina y 0.1 mg/L de 2,4D	1.369 (9)	b
T ₄	Balance: 1.23 mg/L de Kinetina y 1.4 mg/L de 2,4D	1.369 (9)	b
T ₅	Balance: 0.7 mg/L de Kinetina y 1.4 mg/L de 2,4D	1.410 (10)	b

Las columnas agrupadas por la misma letra agrupan tratamientos que no presentan diferencia estadística.

Existen 2 grupos bien definidos con una combinación de hormonas en común (T₁) (Cuadro 19).

Por otro lado, los mejores tratamientos fueron T₃, T₄ y T₅, los cuales pertenecen a los balances de hormonas: 1.05 mg/L de Kinetina con 0.1 mg/L de 2,4D, 1.23 mg/L de Kinetina con 1.4 mg/L de 2,4D, y 0.7 mg/L de Kinetina con 1.4 mg/L de 2,4D respectivamente con 9, 9 y 10 callos cada uno, que son el 90%, 90% y 100% del total por tratamiento, simbolizando los mayores porcentajes de callosidad (Figuras 15, 16 y 17).

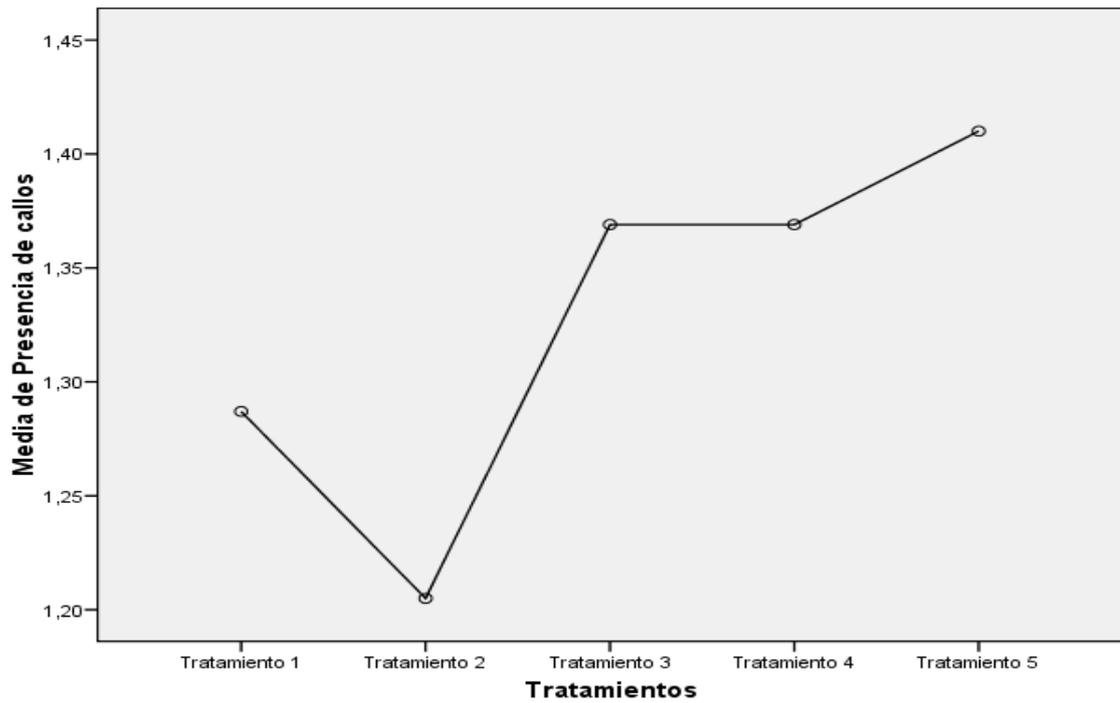


Figura 15. Comparación de medias para la presencia de callos por los efectos de los tratamientos

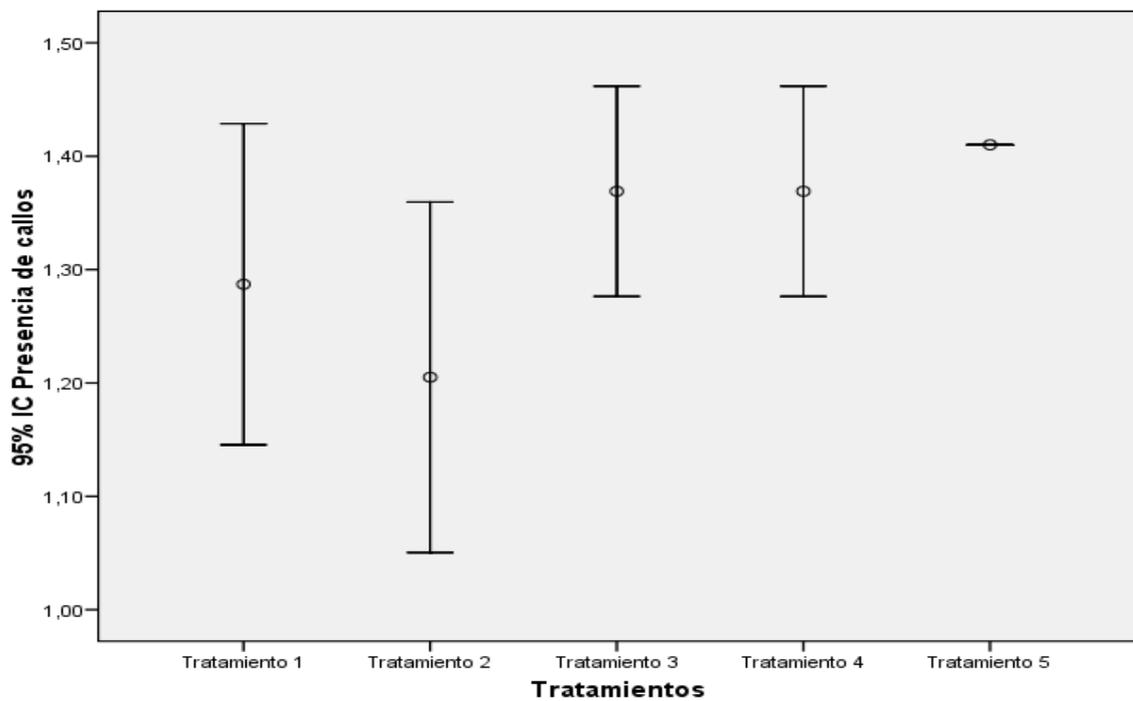


Figura 16. Gráfico de barras de error de medias para la presencia de callos por los efectos de los tratamientos.

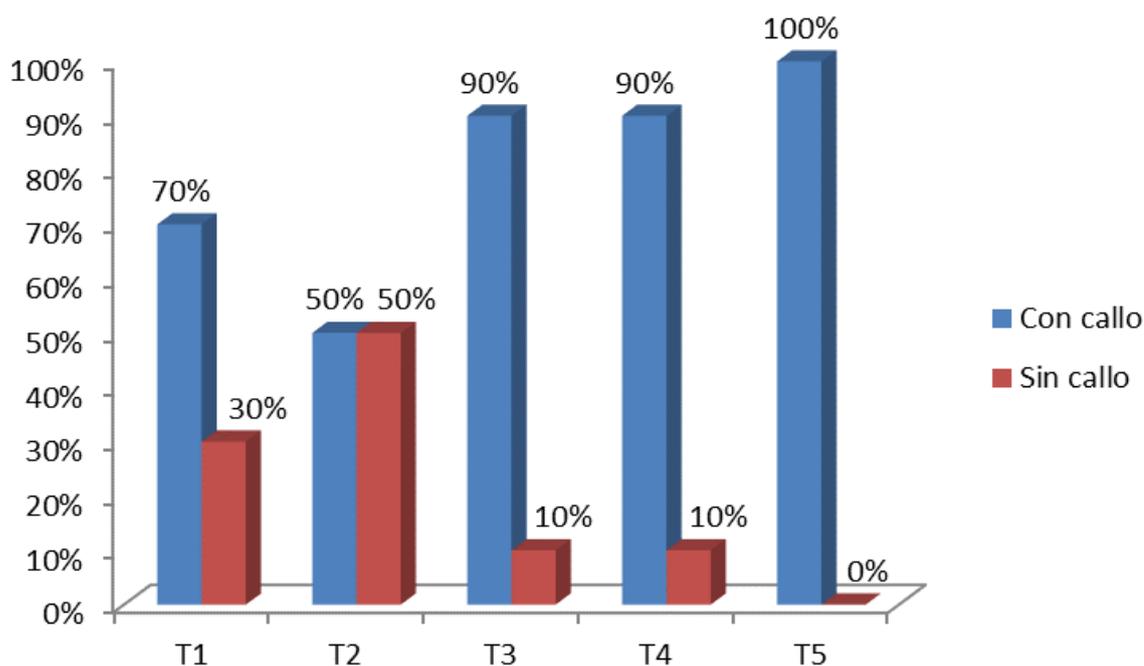


Figura 17. Porcentaje de aparición de callos por efectos de los tratamientos

4.2.2. Porcentaje de contaminación

Se evaluaron las muestras que no presentaron callo viable ni las que presentaron oxidación por compuestos fenólicos (Necrosamiento), determinándose callos contaminados por hongos y bacterias en los tratamientos en estudio.

Los porcentajes de contaminación por hongos y bacterias de forma global (Figura 18 y 19), por lo que podemos afirmar que existe un 12% de contaminación por hongos que equivalen a sólo 6 explantes contaminados y un 2% de contaminación por bacterias que equivale a 1 explante contaminado (Pertenece al T₂). Asimismo en la Figura 20, que podemos observar que el tratamiento 5 (T₅) está libre de contaminación, caso contrario del tratamiento 1 (T₁) que presentó 20% de contaminación por hongos.

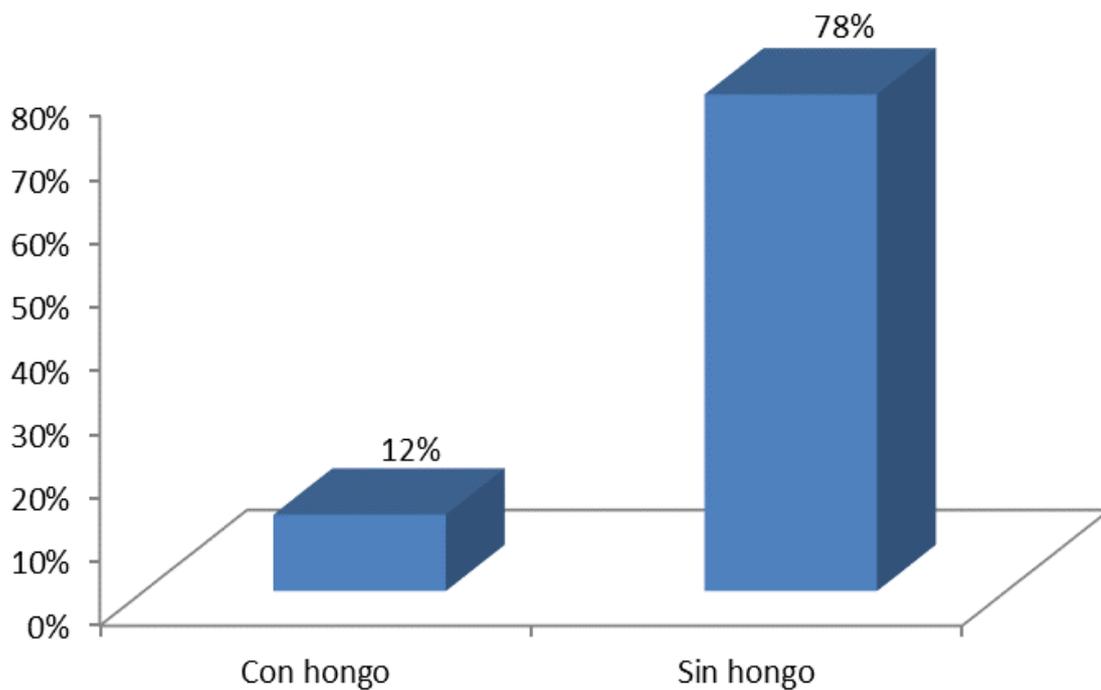


Figura 18. Contaminación por hongos de forma global en el Ensayo 2 (Calogénesis en hojas de tornillo).

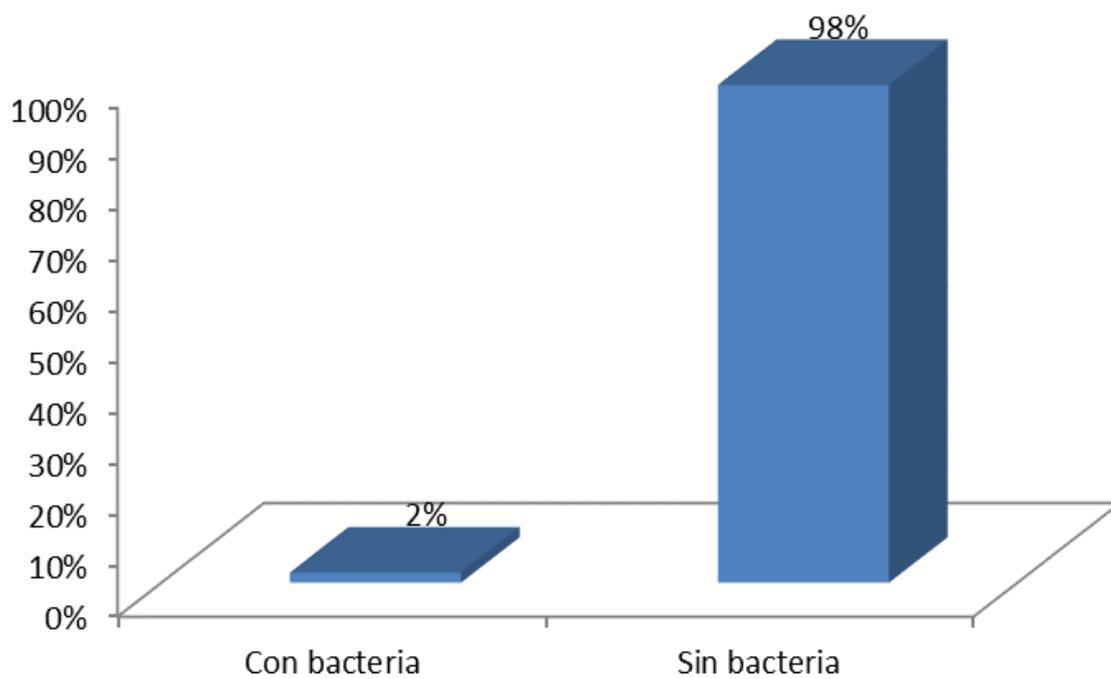


Figura 19. Contaminación por bacterias de forma global en el Ensayo 2 (Calogénesis en hojas de tornillo).

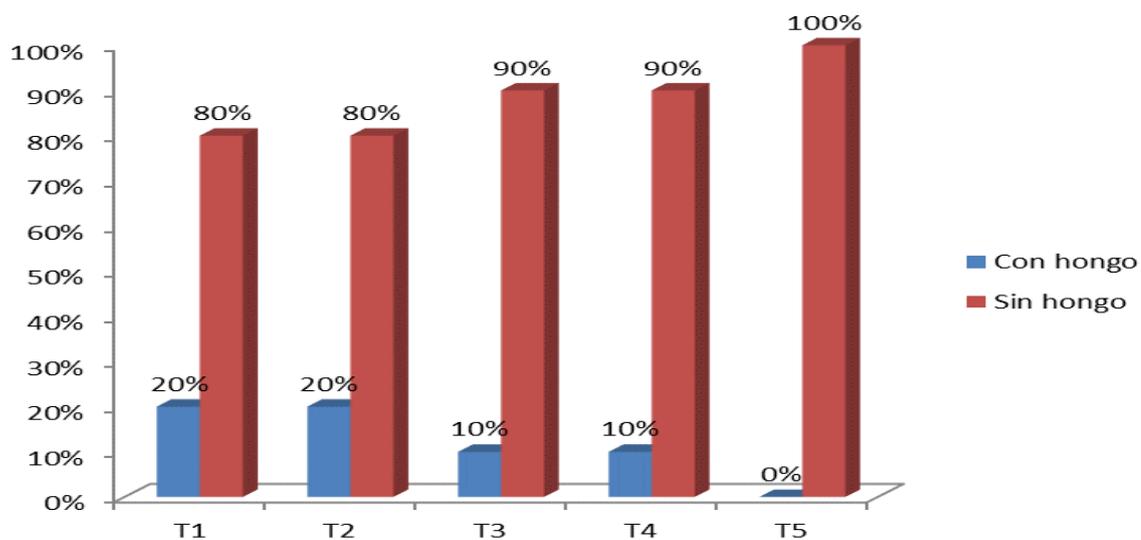


Figura 20. Contaminación por hongos según los tratamientos en el Ensayo 2 (Callogénesis en hojas de tornillo).

4.2.3. Porcentaje de necrosamiento

Se evaluó el nivel de oxidación por compuestos fenólicos o necrosamiento de los explantes que no presentaron callos viables, así como de los que no tenían callos (Figura 21).

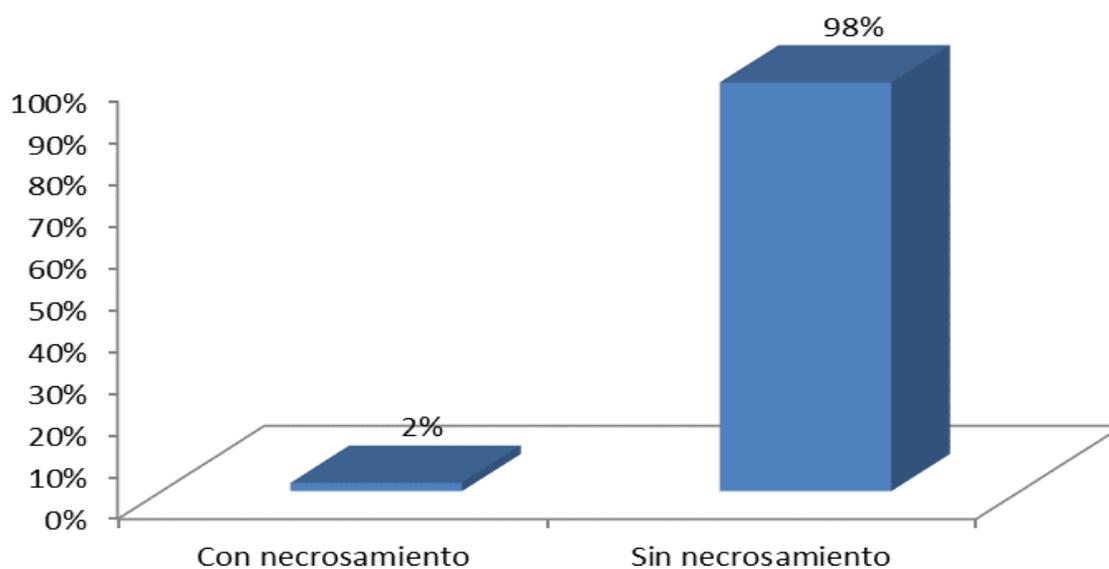


Figura 21. Porcentaje de necrosamiento global en el Ensayo 2.

En el porcentaje de necrosamiento, podemos afirmar que existe un 2% de 50 explantes que se oxidaron con compuestos fenólicos, este porcentaje es muy bajo y por lo tanto casi excluible.

4.3. Ensayo 3: Protocolo de desinfección combinatoria

El presente ensayo se basó en la propuesta de un protocolo de desinfección que nos permita la no contaminación de nuestros explantes o muestras de tornillo (segmento de hojas), además de exponer ciertas concentraciones de un fungicida sistémico (Benomil) al medio de cultivo (MS).

4.3.1. Porcentaje de contaminación y necrosamiento

Para determinar la diferencia estadística entre los tratamientos en estudio con respecto al número de hongos presentes al término de la evaluación (4 semanas) se realizó el análisis de varianza utilizando datos transformados $\sqrt{(x + 1)}$ para determinar la ausencia y presencia (Cuadro 20).

El modelo propuesto resulta significativo, indicando rechazo de la hipótesis nula. La interacción de factores resulta no significativa, permitiendo sólo analizar los factores o efectos principales independientemente.

Para el factor A (Protocolo) resultó no significativo, lo cual indica son estadísticamente iguales; caso contrario para el factor B (Medio con fungicidas) resulta altamente significativo el cual indica que existe diferencias entre las concentraciones del fungicida con medio MS.

Cuadro 20. ANVA para presencia de hongos con datos transformado $\sqrt{(x + 1)}$.

Fuente de variación	GL	SC	CM	
Tratamiento	5	0.148	0.030	S
A (Protocolo)	1	0.003	0.003	NS
B (Medio con fungicida)	2	0.370	0.092	S
A x B	2	0.006	0.003	NS
Error	54	0.622	0.012	
Total	59	0.770		
CV% = 6.14				

S: Significación estadística al 5% de probabilidad

NS: No existe significación estadística

Cabe así mismo indicar que el modelo presenta 6.14% de coeficiente de variabilidad (CV%), indicando una muy buena homogeneidad de los resultados experimentales. Se realizó Tukey para el factor B (Cuadro 21) para determinar cuál es la mejor concentración de fungicida. Además se analizó la presencia de contaminación (Figuras 22, 23 y 24).

Cuadro 21. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para la presencia de hongos por los efectos de la Concentración de fungicidas en el medio MS.

Concentración de fungicidas en medio MS		Presencia de hongos	
b ₁	MS + 0 g/L000 ml de Benomil	1.308 (5)	a
b ₂	MS + 2 g/1000 ml de Benomil	1.410 (0)	b
b ₃	MS + 5 g/1000 ml de Benomil	1.410 (0)	b

Las columnas agrupadas por la misma letra agrupan tratamientos que no presentan diferencia estadística

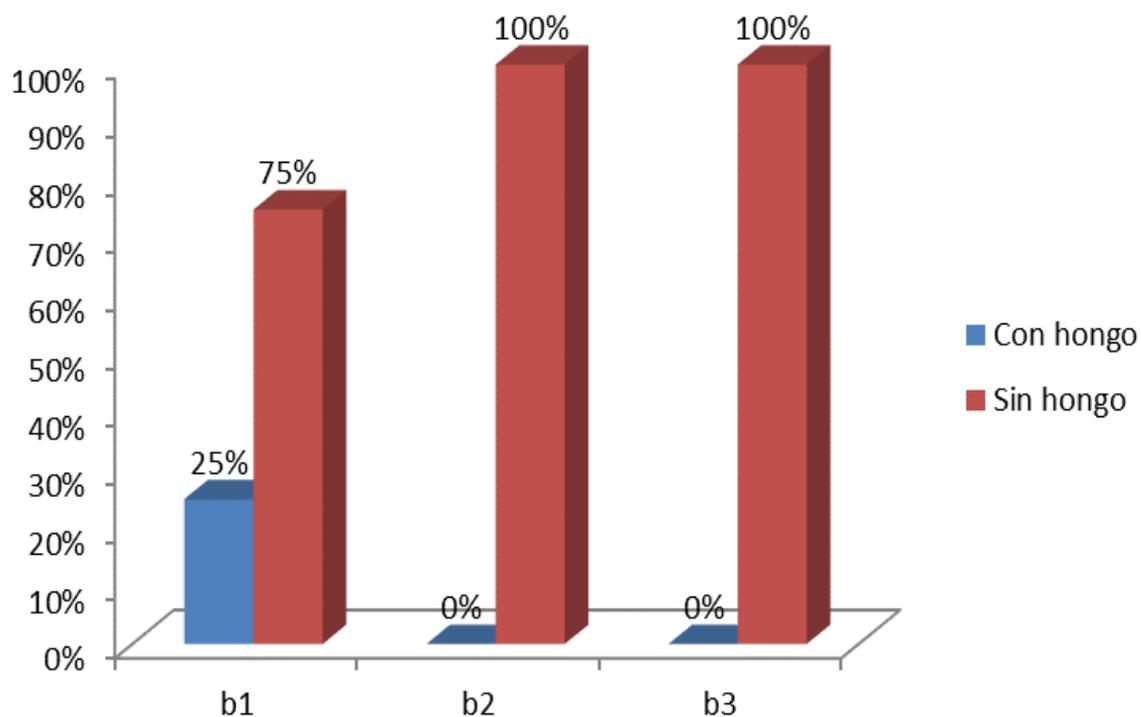


Figura 22. Porcentaje de aparición de hongos según las concentraciones del fungicida en el medio MS.

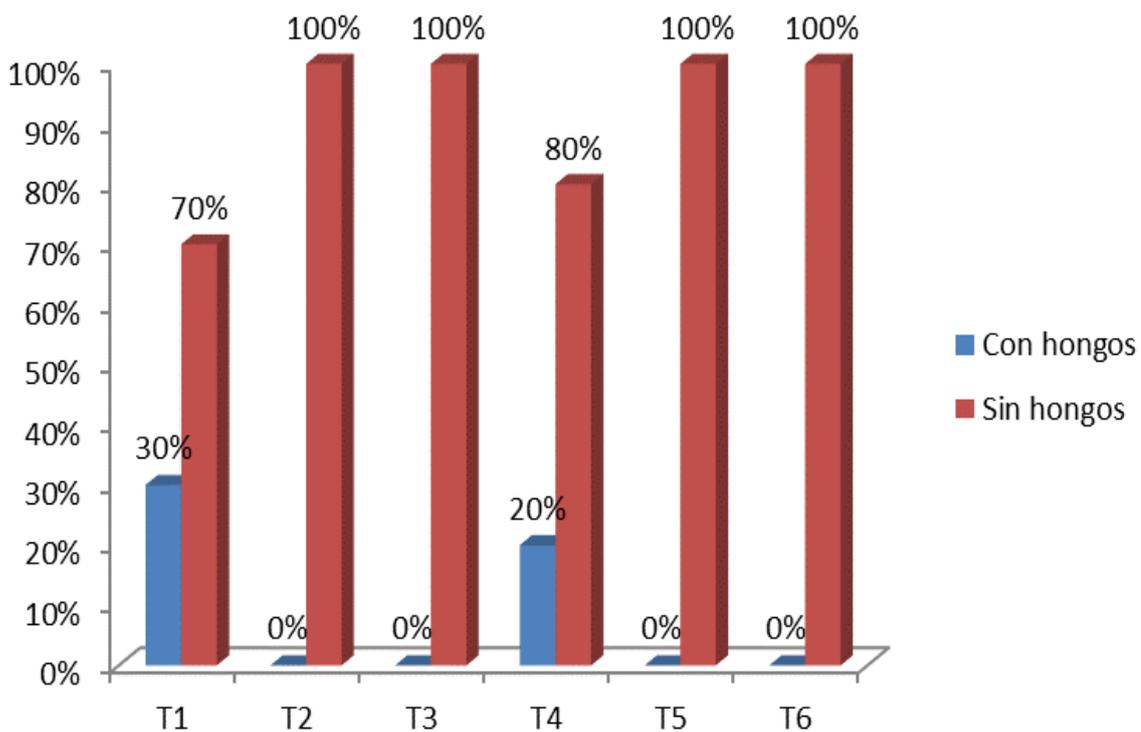


Figura 23. Porcentaje de aparición de hongos según los tratamientos.

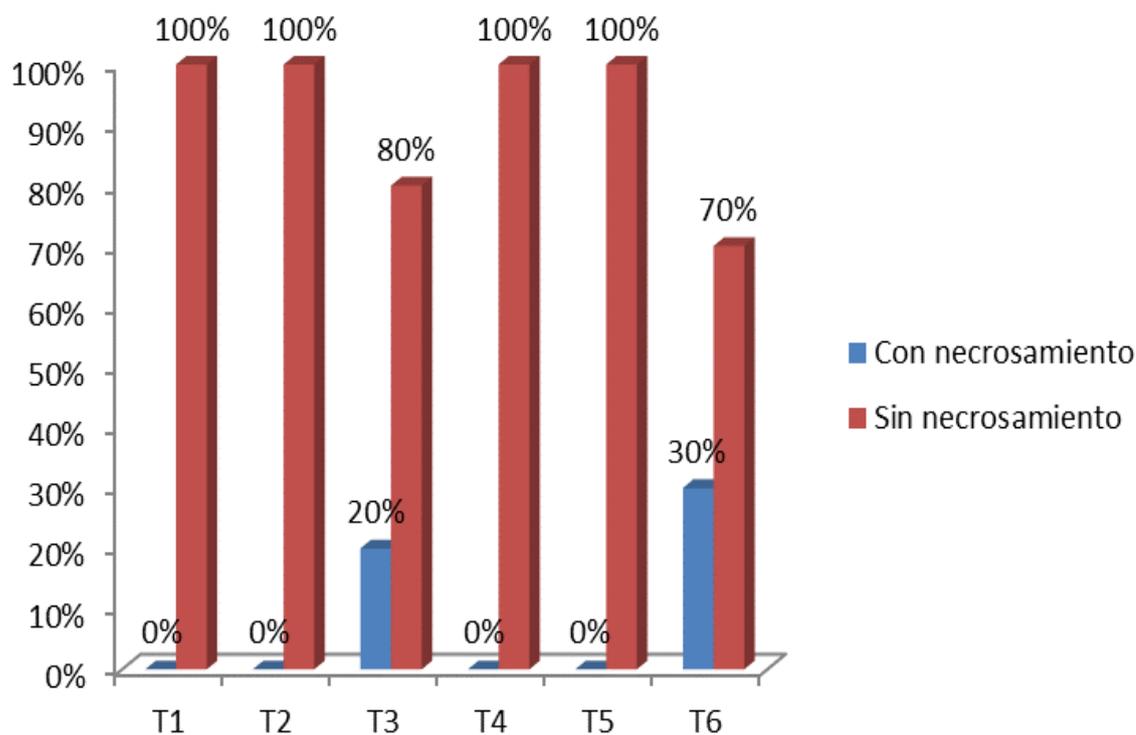


Figura 24. Porcentaje de necrosamiento según los tratamientos.

Existen 2 grupos bien definidos. Asimismo, analizando las figuras 22 y 23, se puede decir que los tratamientos que tenían concentraciones del fungicida tuvieron un nivel de contaminación del 0% a comparación de los que no tenían: T₁ y T₄ con 30% y 20% de contaminación respectivamente que equivale 3 y 2 explantes con hongos (Cuadro 21).

Asimismo podemos mencionar que el nivel de necrosamiento se encuentra en los tratamientos T₃ y T₆ con un 20% y 30% respectivamente (Figura 24), haciendo énfasis que estos tratamientos son los que tienen mayores concentraciones del fungicida Benomil, por lo tanto se puede decir que los explantes de tornillo no soportan muchas concentraciones del fungicida.

4.4. Ensayo 4. Calogénesis de hojas con medio basal con Fungicida

El presente ensayo se basó en la inducción al proceso de calogénesis in vitro a partir de segmentos de hojas de tornillo mediante un balance de hormonas y un medio de cultivo (MS) con fungicida sistémico (Benomil), los resultados obtenidos, aparte de tener 0% de contaminación por hongos, fueron los siguientes:

4.4.1. Presencia de callos

Para determinar la diferencia estadística entre los tratamientos en estudio con respecto al número de callos presentes al término de la evaluación (4 semanas) se realizó el análisis de varianza utilizando datos transformados $\sqrt{(x + 1)}$ para determinar la ausencia y presencia. Como puede observarse el modelo propuesto resulta significativo, indicando rechazo de la hipótesis nula, los tratamientos son estadísticamente diferentes (Cuadro 22).

Cuadro 22. ANVA para presencia de callos con datos transformados $\sqrt{(x + 1)}$.

Fuente de variación	GL	SC	CM	
Tratamiento	5	0.821	0.164	S
Error	54	1.227	0.023	
Total	59	2.048		
CV% = 14.40				

S: Significación estadística al 5% de probabilidad. NS: No existe significación estadística.

Cabe así mismo indicar que el modelo presenta 14.40% de coeficiente de variabilidad (CV%), indicando una homogeneidad media de los resultados experimentales. Se realizó la prueba de comparación de medias a través de la prueba Tukey (Cuadro 23) y barras (Figuras 25, 26 y 27).

Cuadro 23. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para la presencia de callos por los efectos de los tratamientos.

Tratamientos		Presencia de callos	
T ₁	Segmento de hoja en medio de cultivo con balance de 0 mg/L de 2,4D y 0 mg/L de Kinetina	1.082 (2)	a
T ₃	Segmento de hoja en medio de cultivo con balance de 1.05 mg/L de 2,4D y 1.05 mg/L de Kinetina	1.205 (5)	a b
T ₂	Segmento de hoja en medio de cultivo con balance de 0.7 mg/L de 2,4D y 0.18 mg/L de Kinetina	1.328 (8)	b c
T ₆	Segmento de hoja en medio de cultivo con balance de 2.45 mg/L de 2,4D y 1.75 mg/L de Kinetina	1.328 (8)	b c
T ₄	Segmento de hoja en medio de cultivo con balance de 1.05 mg/L de 2,4D y 1.05 mg/L de Kinetina	1.410 (10)	c
T ₅	Segmento de hoja en medio de cultivo con balance de 2.45 mg/L de 2,4D y 1.05 mg/L de Kinetina	1.410 (10)	c

Las columnas agrupadas por la misma letra agrupan tratamientos que no presentan diferencia estadística

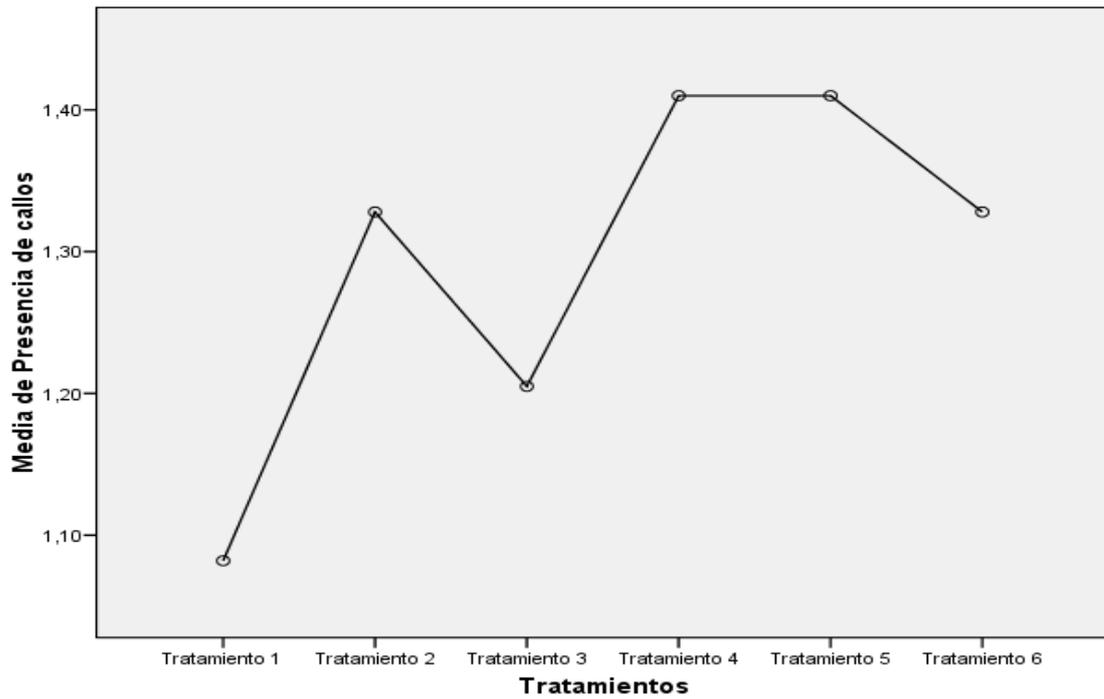


Figura 25. Comparación de medias para la presencia de callos por los efectos de los tratamientos.

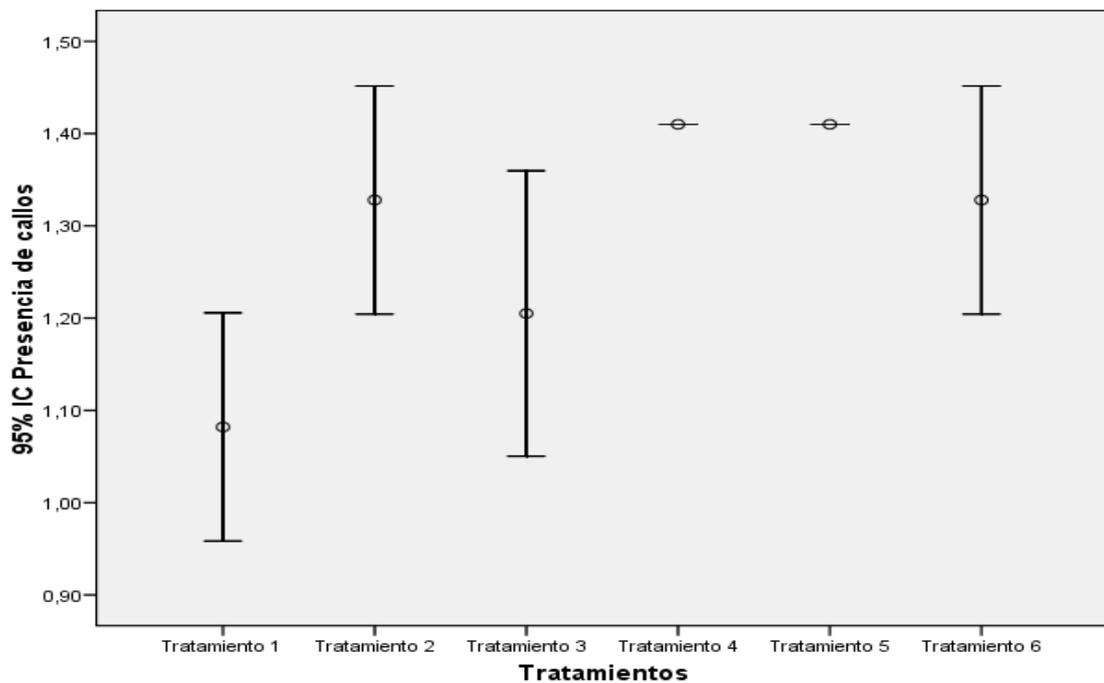


Figura 26. Gráfico de barras de error de medias para la presencia de callos por los efectos de los tratamientos.

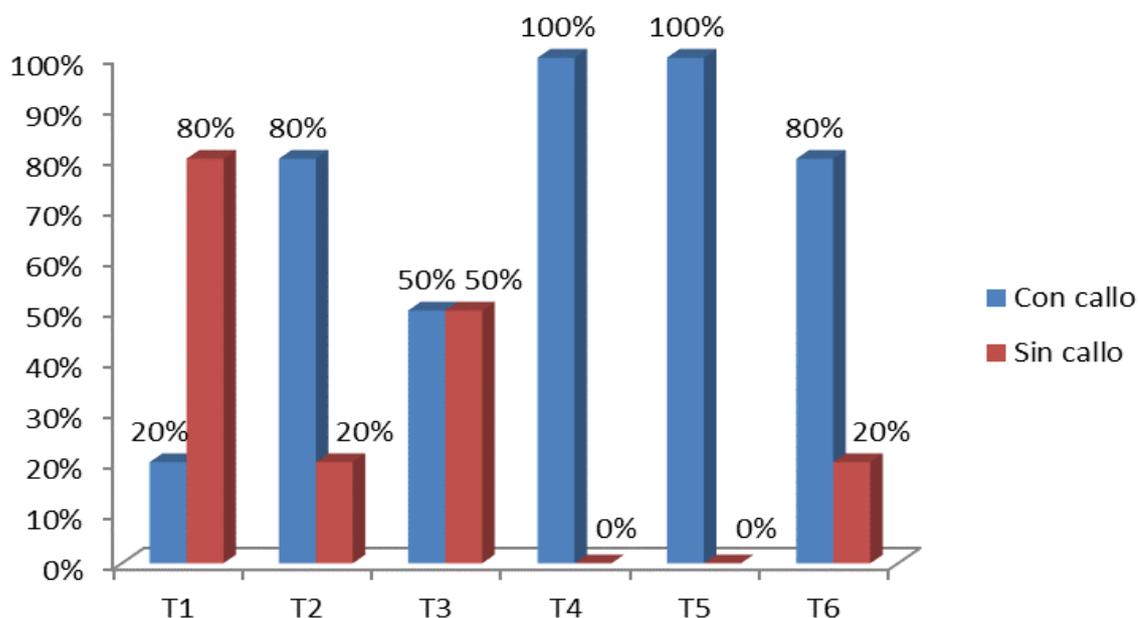


Figura 27. Porcentaje de aparición de callos por efectos de los tratamientos.

Existen 3 grupos estadísticamente diferentes. Por otro lado, analizando las Figuras 25, 26 y 27, se puede afirmar que los mejores tratamientos son T₄ y T₅, (Cuadro 23) los cuales pertenecen a: “Medio MS con fungicida + balance de 1.05 mg/L de 2,4D con 0.1 mg/L de Kinetina”, y “Medio MS con fungicida + balance 2.45 mg/L de 2,4D con 1.05 mg/L de Kinetina respectivamente con 10 callos cada uno, que son el 100% del total por tratamiento, simbolizando los mayores porcentajes de callosidad.

4.5. Ensayo 5. Callogénesis de yemas con medio basal con Fungicida

El presente ensayo se basó en la inducción al proceso de callogénesis in vitro a partir de yemas de tornillo mediante un balance de hormonas y un medio de cultivo (MS) con fungicida sistémico (Benomil), los resultados obtenidos, aparte de sólo tener un 1.6% de contaminación por hongos, fueron los siguientes:

4.5.1. Presencia de callos

Para determinar la diferencia estadística entre los tratamientos en estudio con respecto al número de callos presentes al término de la evaluación (4 semanas) se realizó el análisis de varianza utilizando datos transformados $\sqrt{(x + 1)}$ para determinar la ausencia y presencia (Cuadro 24).

Cuadro 24. Análisis de varianza para presencia de callos con datos transformados $\sqrt{(x + 1)}$.

Fuente de variación	GL	SC	CM	
Tratamiento	5	1.157	0.231	S
Error	54	1.025	0.019	
Total	59	2.048		
CV% = 15.02				

S: Significación estadística al 5% de probabilidad

NS: No existe significación estadística

Como puede observarse, el modelo propuesto resulta significativo, indicando rechazo de la hipótesis nula, los tratamientos son estadísticamente diferentes (Cuadro 24). Cabe así mismo indicar que el modelo presenta 15.02% de coeficiente de variabilidad (CV%), indicando una homogeneidad media de los resultados experimentales. Se realizó la prueba de comparación de medias a través de la prueba Tukey (Cuadro 25).

Cuadro 25. Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para la presencia de callos por los efectos de los tratamientos.

Tratamientos		Presencia de callos	
T ₁	Yema en medio de cultivo con balance de 0 mg/L de 2,4D y 0 mg/L de Kinetina	1.000 (0)	a
T ₂	Yema en medio de cultivo con balance de 0.7 mg/L de Kinetina y 0.18 mg/L de ANA	1.246 (6)	b
T ₄	Yema en medio de cultivo con balance de 1.05 mg/L de Kinetina y 1.05 mg/L de ANA	1.287 (7)	b c
T ₆	Yema en medio de cultivo con balance de 2.45 mg/L de Kinetina y 1.75 mg/L de ANA	1.328 (8)	b c
T ₃	Yema en medio de cultivo con balance de 1.05 mg/L de Kinetina y 0.35 mg/L de ANA	1.410 (10)	c
T ₅	Yema en medio de cultivo con balance de 2.45 mg/L de Kinetina y 1.05 mg/L de ANA	1.410 (10)	c

Las columnas agrupadas por la misma letra agrupan tratamientos que no presentan diferencia estadística

Existen 3 grupos estadísticamente diferentes (Cuadro 25). Por otro lado, se puede afirmar que los mejores tratamientos son T₃ y T₅, los cuales pertenecen a: “Medio MS con fungicida + balance de 1.05 mg/L de Kinetina con 0.35 mg/L de ANA”, y “Medio MS con fungicida + balance 2.45 mg/L de Kinetina con 1.05 mg/L de ANA respectivamente con 10 callos cada uno, que son el 100% del total por tratamiento, simbolizando los mayores porcentajes de callosidad (Figuras 28, 29 y 30).

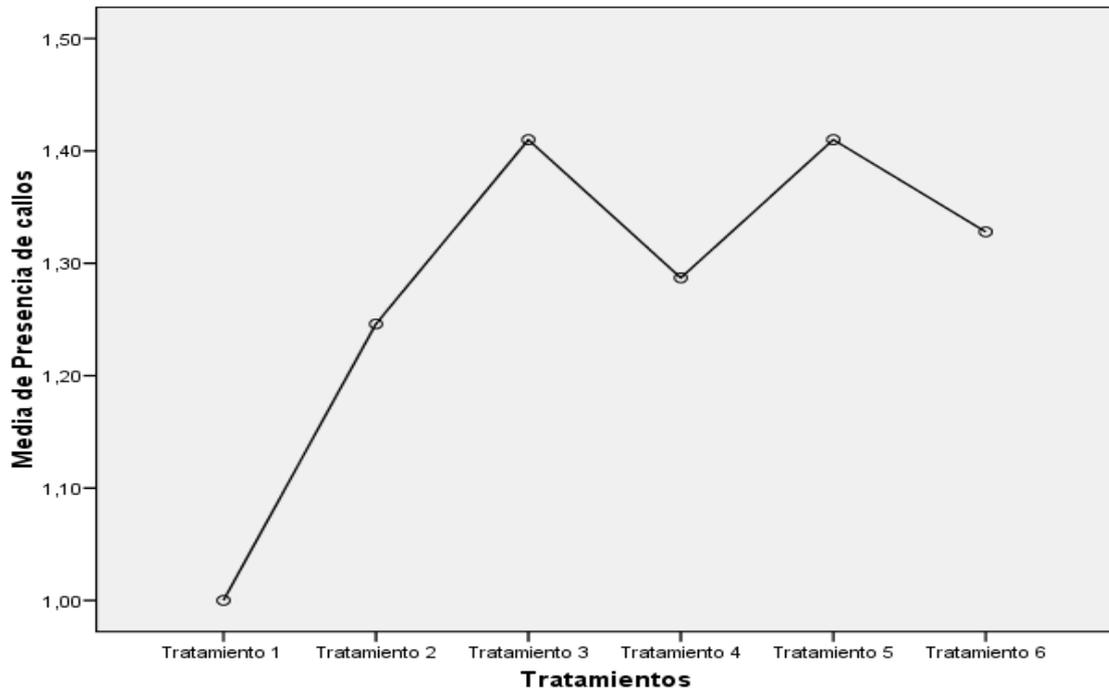


Figura 28. Comparación de medias para la presencia de callos por los efectos de los tratamientos.

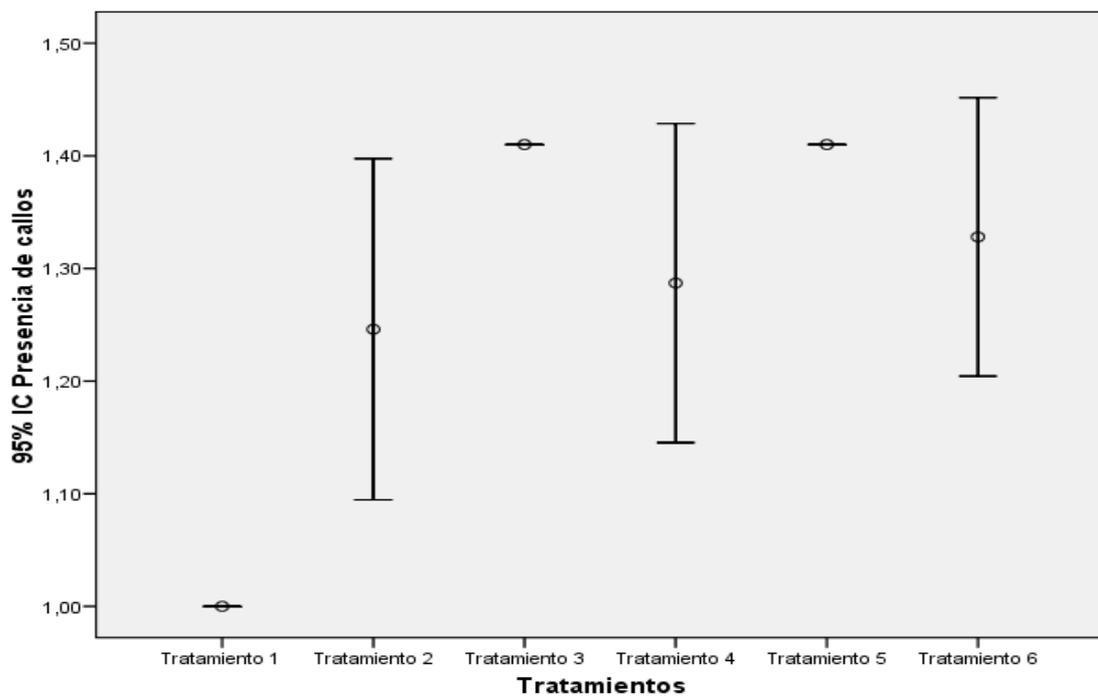


Figura 29. Gráfico de barras de error de medias para la presencia de callos por los efectos de los tratamientos.

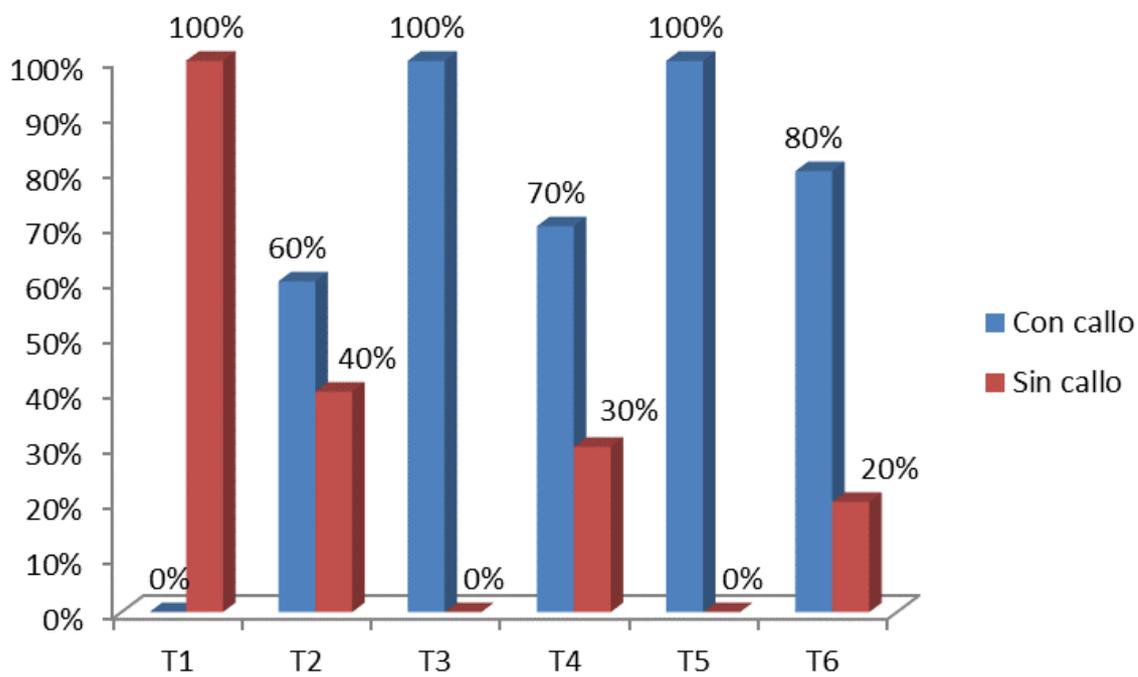


Figura 30. Porcentaje de aparición de callos por efectos de los tratamientos.

V. DISCUSIÓN

5.1. Medio de cultivo y balance hormonal para yemas de tornillo (*C. cateniformis* Ducke (Ducke))

Una planta o una fase del desarrollo de ésta puede ser calificada como recalcitrante al cultivo de tejidos, cuando a pesar de manipular las condiciones del cultivo (Concentración de sales, nitrógeno, reguladores de crecimiento, entre otros) no produce la respuesta deseada (BONGA y KLIMASZWEWSKA, 2010; BENSON, 2000). Debido a que los ensayos realizados en este trabajo variaron en cuanto al tipo, concentración y combinaciones de reguladores de crecimiento empleadas, se asume que la recalcitrancia, puede ser la explicación más viable para los resultados obtenidos. Este fenómeno pudo verse favorecido por el estrés al que los explantes se vieron sometidos al ser sembrados in vitro; como lo planteó BENSON (2000), la introducción de plantas en el cultivo de tejidos induce cambios en su metabolismo, fisiología y desarrollo, generando la aparición de disturbios metabólicos que conducen eventualmente a la pérdida de totipotencialidad celular y ausencia de respuesta; y en algunos casos a un elevado nivel de necrosis y finalmente a la muerte.

Los resultados obtenidos no coinciden con lo que mencionan ALMEIDA *et al* (2009), que un genotipo recalcitrante no resiste a condiciones in

vitro y por lo tanto tiene una pobre producción de callos; en este estudio se ha logrado índices mayores al 80% de callosidad tanto para yemas y hojas de tornillo (recalcitrante) con sus respectivas concentraciones de hormonas.

DELGADO (2013) afirma que, empleando brotes apicales y segmentos nodales de plantas jóvenes germinadas en vivero de *Aniba rosaeodora* (Pau-rosa), estimularon la formación callos con el medio de cultivo más efectivo MS₁ y los reguladores 4,0 mg/L de BAP + 6,0 mg/L de 2,4-D el cual permitió la formación de 1,67 callos por explante; asimismo en esta investigación el mejor medio de cultivo para explantes de tornillo (Hoja y yema) es el de murashige & skoog (MS) con un 86% de permanencia y callos viables pero en gran diferencia en el balance hormonal que fue 1.4 mg/L de Kinetina con 1.05 mg/L de ANA, y 1.75 mg/L de Kinetina con 1.75 mg/L de ANA.

5.2. Medio de cultivo y balance hormonal para hojas de tornillo (*C. cateniformis* Ducke (Ducke))

Un factor determinante para la formación de callo *in vitro*, a partir de explante de hoja, es el tamaño del explante (PIERIK, 1990). En general, cuanto más grande sea el explante mayores serán las posibilidades de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos. Sin embargo, a mayor tamaño del explante también son mayores las probabilidades de que los cultivos se contaminen con microorganismos. También es necesario tomar en cuenta que existe un tamaño mínimo de explante, que depende de la especie y del material vegetal (SEVILLA, 2004). El tamaño del explante va a determinar si

se da o no la formación del callo (PIERIK, 1990). En la investigación realizada el tamaño de los explantes fueron en hojas: 1 cm² y en yemas 2 cm.

Otro factor, que determina la formación de callo, es la posición del explante en el medio de cultivo. Si el explante de hoja se la coloca con el haz hacia arriba y el envés hacia abajo, se estimula la formación de callo. En la presente investigación, hubo reducidas ocasiones que se cultivó el explante con el envés hacia arriba, lo que ocasionó limitada formación de callo, el cual murió al poco tiempo de formado, sin que se pueda atribuir este comportamiento a razones específicas. Para cualquier tipo de cultivo *in vitro*, hay que ubicar el haz de la hoja hacia arriba, directo a la fuente de luz y el envés debe estar en contacto con el medio de cultivo (PIERIK, 1990). La mejor respuesta en callogénesis se puede atribuir a que la nervadura central que tienen, cambia cuando está en contacto con el medio de cultivo y por lo tanto reacciona mejor a los cambios hormonales.

5.3. Protocolo de desinfección

En el cultivo *in vitro* de plantas, uno de los principales problemas es la enorme dificultad para establecer los explantes en condiciones asépticas y lograr brotación, debido a la alta incidencia de contaminación fúngica y bacteriana (LEIFERT *et al.*, 1999; LEIFERT y CASELLS, 2001). Éstos contaminantes pueden ser introducidos con el explante, durante manipulación en el laboratorio o a través de algunos vectores. MARTINEZ *et al* (2005) mencionan que para la obtención de cultivo aséptico en la propagación de

eucaliptos (*Eucalyptus urophylla* clon-141 y *E. grandis* clon-246), los mejores tratamientos de desinfección son las combinaciones de los factores que llevan fungicida sistémico (Cuprimicin 150 mg/100 ml) y antibiótico (Terramicina 40 mg/100 ml), en el cual se deben exponer a los explantes de eucalipto durante 10 y 30 minutos, donde se obtuvo más del 80% de desinfección del total de explantes sembrados; que contrasta con esta investigación en incluir fungicidas al medio, en éste caso para el tornillo se determinó que 2 g/L en medio de cultivo MS es la mejor concentración, porque brindó una contaminación del 0% en explantes de hojas y yemas de tornillo.

La desinfección es uno de los pasos más críticos en el establecimiento de un cultivo *in vitro* por lo que uno de los principales problemas es la contaminación de los explantes con diversos tipos de microorganismos (Hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus) y por otro lado la necrosis de los cultivos (MROGINSKI *et al.*, 2010), por lo que para esta investigación se trató de reducir lo más posible el nivel de contaminación, ya sea con nuevos protocolos o con concentraciones de fungicidas en el medio de cultivo, dando buenos resultados.

VI. CONCLUSIONES

1. El mejor medio de cultivo para explantes de tornillo (Hoja y yema) es el de Murashige & Skoog (MS) con un 86% de permanencia y callos viables.
2. Las mejores combinaciones de hormonas para la producción de callos en yemas fueron b_4 y b_5 que simbolizan el 80%, 90% y 90% del total; Asimismo las mejores combinaciones de hormonas con interacción del medio de cultivo con fungicida Benomil fueron T_3 y T_5 que son el 100% del total por tratamiento.
3. Las mejores combinaciones de hormonas para la producción de callos en hojas fueron T_3 , T_4 y T_5 que simbolizan el 90%, 90% y 100% del total. Asimismo, las mejores combinaciones de hormonas con interacción del medio de cultivo con fungicida Benomil fueron T_4 y T_5 , los cuales son el 100% del total por tratamiento.
4. El mejor protocolo de desinfección de hojas y yemas como explantes de tornillo (*Cedrelinga cateniformis* Ducke (Ducke)) fue el Protocolo 2, además la mejor concentración de fungicida en el medio de cultivo fue de 2 g/L porque permitió el 0% de contaminación por hongos sin efectos adversos.

VII. RECOMENDACIONES

1. Hay que tener mucho cuidado de la posición en la que se cultive el explante, debido que si se coloca el explante con el envés hacia arriba se formará callo pero no regenerará retoños.
2. Con base en los resultados obtenidos, se podría probar nuevas combinaciones y concentraciones adicionales de auxinas y citoquininas para la obtención de callos embriogénicos, organogénesis, etc.
3. Es importante realizar más estudios histológicos sobre esta especie, porque debemos de estar orgullosos de tenerlo a nuestro alcance en el Bosque Reservado de la UNAS, debido que se está agotando y perdiendo cada día a causa de la minería, agricultura migratoria y deforestación, es importante con esta tecnología hacer miradas hacia un buen futuro sostenible.

**DETERMINATION OF A PROTOCOL FOR THE REGENERATION IN VITRO
OF YOLKS And SHEETS OF TORNILLO (*Cedrelinga cateniformis* Ducke
(Ducke))**

ABSTRACT

The present study seeks to determine the best conditions for the regeneration in vitro of the tornillo (*Cedrelinga cateniformis* Ducke (Ducke)), which is why they came into question like objectives, determining the midway of cultivation and the best hormonal balance that enable a better vegetative answer, as well as determining a protocol of disinfection for the explants of sheets and yolks of tornillo. Constituted for 5 essays: multiplication of yolks, callogénesis in sheets, protocol of combined disinfection, callogénesis in sheets with half a fungicide and callogénesis in yolks with half a fungicide. They developed him in 4 phases each: theoretical phase, phase of isolation, phase of laboratory and the phase of evaluation. The obtained results indicate that: 1) The Best culture medium for explants is the Murashige and Skoog (MS) with 86% of permanence and viable corns. 2) The Best hormone combinations for the production of corns in yolks were b₄ and b₅ that the 80% and 90% of the total symbolize. In like manner, the best hormone combinations with interaction of the midway of cultivation with fungicide Benomil were T₃ and T₅ that are 100% of the total for treatment. 3) The Best hormone combinations for the production of corns in sheets were T₃, T₄ and T₅ that symbolize the 90, 90 and 100 % of the total and, the best hormone combinations with interaction of the midway of cultivation with fungicide Benomil were T₄ and T₅, which are 100% of

the total for treatment. 4) The Best protocol of disinfection of sheets and yolks was Protocol 2, besides the best concentration of fungicide in the middle of cultivation the L was 2 g because it enabled 0% of contamination for mushrooms.

Keywords: *Cedrelinga cateniformis*, in vitro, hormone, callus, buds, leaves.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, M., VILLALOBOS, V., SALGADO, R. 2010. Cultivo *in vitro* de *Paulownia tomentosa*. Instituto Nacional de Investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias. Campo experimental Uruapan, México. [En línea]: Agroforestal (<http://agroforestal.com.mx/content/cultivo-vitro-de-paulonia>, documentos, 22 Nov. 2015).
- ALMEIDA, A.V.H. 2009. Determinación de las condiciones adecuadas de pretratamiento frío y dosis óptima de radiación gamma Co^{60} , para realizar cultivo *in vitro* de micróscoras aisladas de maíz de las variedades INIAP-101 e INIAP-601. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador. p. 12-17.
- BENSON, E. 2000. Special symposium: *in vitro* plant recalcitrance: an introduction. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 36:141-148.
- BONGA, J.M., KLIMASZEWSKA, K.K., ADERKAS, P. 2010. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 100:241-254.
- CELESTINO, C., HERNÁNDEZ, I., CARNEROS, E., LÓPEZ-VELA, D., MARTINEZ, T. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. [En línea]: Inia, (<http://www.inia.es/>

[gcontrec/pub/CELESTINO-HERNANDEZ-CARNEROS.pdf](#), documentos 18 Nov. 2015).

DE LA FE, C.F., ORTIZ, R., JIMÉNEZ, M. 1998. Aportes a la tecnología de micropropagación de la caña de azúcar aplicada en Cuba. II. Efecto de análogos de brasinoesteroides en la multiplicación, el enraizamiento y la adaptación de las vitroplantas. *Cultivos Tropicales*. 19(3):45-48.

DELGADO, L. 2013. Multiplicación clonal in vitro e in vivo de la especie forestal nativa *Aniba perutilis Hemsley*. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 71 p.

DESPOMMIER, D. 2009. A Farm on Every Flor. *The New York Times*. [En línea]: *Nytimes*, (<http://www.nytimes.com/2009/08/24/opinion/24Despommier.html>], documentos 18 Nov. 2015).

FAO. 2004. Biotechnology in forestry, including: Forest Genetic Resources Working Paper FGR/59E. Roma. [En línea]: *Fao*, (www.fao.org/docrep/008/ae574e/ae574e00.htm), documentos 18 Nov. 2015).

GAMBORG, O., PHILLIPS, G. 1995. *Plant cell, Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods*. Lab manual. Las Cruces. 315 p.

GONZALES, C., VILCA, J. 1998. Micropropagación Vegetativa In Vitro De Aliso (*Alnus acuminata*). Edición Graficas de ADEFOR. Cajamarca, Perú. p. 6-13.

GUTIÉRREZ, C., OLIVA, M. 2003. Curso, principios y prácticas en el cultivo de tejidos vegetales, Teoría. San José, Costa Rica. p. 4-40.

- HERMAN, E.B. 1990. Bacterial Contamination in micropropagation. *Agricell Reporter*. 14:41-43.
- HORPE, F. 1991. Introducción al cultivo de tejidos y biotecnología vegetal. Resumen del Curso. Técnicas y Aplicación de Biotecnología en Especies Forestales. Corporación Andina de Fomento. Caracas, Venezuela. p. 91-107.
- ICRAF. 2006. Plantemos madera- Manual sobre el establecimiento, manejo y aprovechamiento de plantaciones maderables para productores de la Amazonía peruana. World Agroforestry Centre. Lima, Perú. 138 p.
- INIA – OIMT. 1996. Manual de Identificación de Especies Forestales de la sub región Andina. INIA - OIMT. PD 150/91. Lima, Perú. 489 p.
- INRENA-OIMT. 1995. El mercado de madera de Pucallpa en setiembre de 1995. Boletín informativo N° 5. Pucallpa, Perú. 22 p.
- IZQUIERDO, M. 1999. Ingeniería genética y transferencia génica. Pirámide, Madrid, España.
- KUBOTA, C., TADOKORO, N. 1999. Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. *In vitro Cell and Developmental Biol. Plant*. 35(4):296-298.
- LABARTA, R., WEBER, J. 1998. Valorización económica de bienes de cinco especies arbóreas agroforestales de la Cuenca Amazónica Peruana. *Revista Forestal Centroamericana*. 7(23):12-21.

- LEIFERT, C., CASSELLS, C. 2001. Microbial Hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 37:137-138.
- LEIFERT, C., RITCHIE, J.Y., WAITES, W.M. 1991. Contaminants of plant tissue and cell cultures. Review. *World journal of Microbiology and Biotechnology.* 7:452-469.
- LÓPEZ, M. 1996. Estudio de la expresión genética durante la embriogénesis somática en *Saccharum officinarum* y su relación con el ácido abscísico y la sequía. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Genética. España.
- MALLEUX, J. 1975. Mapa forestal del Perú. Memoria explicativa. Universidad Nacional Agraria. Lima, Perú. 161 p.
- MARÍN, I., PAZ, F., CHÁVEZ, J., CASIANO, M., SOLORIO, N. s.d. Modelación de la función de distribución bidireccional de la temperatura radiactiva en cultivos agrícolas. *Chapingo, México.* 31(4):259-274.
- MEJÍA, R. 1994. Agrobiotecnología fundamentos y aplicaciones, propagación comercial 312 especies de plantas por cultivo in vitro. La Molina, Perú.
- MINAM. 2012. Mapa de deforestación de la amazonía peruana-2012. Memoria descriptiva. Editor Q & P impresores. Lima, Perú. 103 p.
- MORALES, J. 2002. Cultivo in vitro de árboles frutales. Multiplicación o reproducción de frutal invitro. [En línea]: Infojardín, (<http://articulos.infojardin.com/Frutales/cultivo-in-vitro-reproduccion.htm>., documentos 18 Nov. 2015).

- MOSTACERO, J., MEJIA, F. 1993. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. Lima, Perú, Normas Legales S.A.C. 667 p.
- MROGINSKI, L., SANSBERRO, P., FLASCHLAND, E. 2010. Establecimiento de cultivos vegetales. En: Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Argenbio. INTA. p. 70-84.
- MUÑOZ, S. 2003. Embriogénesis somática en cedro (*Cedrela odorata* Linnaeus) A Partir De Cotiledones. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú [En línea]: Lamolina, (<http://www.lamolina.edu.pe/cirgebb/tesis%20total.pdf>, documentos 18 Nov. 2015).
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues culture. *Physiol Plant*. 15:473-497.
- PEREA, D. 1990. Biotecnología agrícola mediante la utilización de los sistemas in vitro. Agricultura de las Américas. Bogotá, Colombia.
- PÉREZ, J. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba, GEO. 391 p.
- PERUGORRÍA, M. 2005. Desarrollo de una técnica para la micropropagación de especies leñosas en biorreactores. Facultad de Ciencias. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Uruguay.
- PIERIK, R. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Trad. Ayerbe, L. 3 ed. Madrid, España Mundi-prensa. [En línea]: Etsea, (<http://www.etsea2.udl.es/invitro/micropro/explant3.gif&imgrefurl=http://w>

www.etsea2.udl.es/invitro/micropro.htm&usgDmicropropagacion%2B%2560%26hl%3Des%26lr%3Dlang_es%26sa%3DX%26um%3D1,

documentos 18 Nov. 2015).

REMACHE, M. 2011. Tesis - Desarrollo de una técnica de micropropagación in vitro de cedro (*Cedrela montana*) a partir de ápices, hojas y entrenudos. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador. 59 p.

REYNEL, C., PENNINGTON, R., FLORES, C. 2003. Árboles útiles de la amazonia peruana y sus usos. Manual con apuntes de identificación, ecología y propagación de las especies. Lima, Perú. 502 p.

ROCA, W.M., MROGINSKI, L.A. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. [En línea]: Micropropagación, (http://www.micropropagacion/in_vitro/pdf, documentos 18 Nov. 2015).

SALAZAR, M. 2008. Cultivo in vitro. [En línea]: Mrsalazar, (www.mrsalazar.blogspot.com, documentos 18 Nov. 2015).

SCHLEIDEN, N., SCHWANN, K. 1938. Los organismos están formados por células. 7 ed. 564 p.

SEVILLA, R., HOLLE, M. 2004. Recursos genéticos Vegetales. Perú.

SPICHIGER, R., MÉROZ, J., LOIZEAU, A., ORTEGA, L. 1990. Los árboles del Arborétum Jenaro Herrera, Contribución a la Amazonía Peruana. Botanique de Genève. Suiza. 355 p.

- STYER, D.J., CHIN, C.K. 1983. Meristem and shoot-tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm preservation. Hort. Rev. 5(5):221-277.
- SUAREZ, S. 2003. Medios de cultivo, Facultad de Biología. Universidad La Habana. Departamento de Biología Vegetal. [En línea]: Tema, ([http://Tema % 205 /medios de cultivo \[1\].doc](http://Tema%205/medios%20de%20cultivo%20[1].doc), documentos 8 Dic. 2015).
- THORPE, A., HARRY, I., KUMAR, P. 1991. Application of micropropagation to forestry. In: P.C. Deberghy, R.H. Zimmerman (eds). Micropropagation. Kluwer Academic. Publishers (Netherlands). p. 31-33.
- TOBAR, C. 2011. Totipotencialidad. [En línea]: Buenastareas, (<http://www.buenastareas.com/ensayos/Totipotencialidad/1499061.html>., documentos 18 Nov. 2015).
- VASIL, I., VASIL, V. 1980. Clonal propagation. In: Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. Int. Rev. Cytol. Supp. 11A. Ed: I. K. Vasil. p. 143-173.
- VIDAURRE, H. 1994. Balance de experiencias silviculturales con *Cedrelinga cateniformis* Ducke (Mimosoideae) en la Región de Pucallpa, Amazonia Peruana. Tesis Mg. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 111 p.

ANEXO

Anexo 1. Datos registrados.

Cuadro 26. Presencia de callos y contaminación para el ensayo 1.

Factor A	Factor B	Tratamiento	Repetición	Callo	Hongo	Bacteria	Necrosamiento
a ₁	b ₁	1	1	1.41	0	0	0
a ₁	b ₁	1	2	1.41	0	0	0
a ₁	b ₁	1	3	1.00	0	0	0
a ₁	b ₁	1	4	1.41	1	1	0
a ₁	b ₁	1	5	1.41	0	0	0
a ₁	b ₁	1	6	1.00	0	0	1
a ₁	b ₁	1	7	1.41	0	0	0
a ₁	b ₁	1	8	1.41	0	0	0
a ₁	b ₁	1	9	1.00	0	0	0
a ₁	b ₁	1	10	1.41	0	0	0
a ₁	b ₂	2	1	1.41	0	0	0
a ₁	b ₂	2	2	1.41	0	0	0
a ₁	b ₂	2	3	1.41	0	0	0
a ₁	b ₂	2	4	1.41	0	0	0
a ₁	b ₂	2	5	1.41	0	0	0
a ₁	b ₂	2	6	1.00	0	0	0
a ₁	b ₂	2	7	1.00	0	0	0
a ₁	b ₂	2	8	1.41	0	0	0
a ₁	b ₂	2	9	1.00	0	0	0
a ₁	b ₂	2	10	1.41	0	0	0
a ₁	b ₃	3	1	1.41	0	0	0
a ₁	b ₃	3	2	1.41	0	0	0
a ₁	b ₃	3	3	1.41	0	0	0
a ₁	b ₃	3	4	1.41	1	0	0
a ₁	b ₃	3	5	1.41	0	0	0
a ₁	b ₃	3	6	1.41	0	0	0
a ₁	b ₃	3	7	1.00	0	0	0
a ₁	b ₃	3	8	1.41	0	0	0
a ₁	b ₃	3	9	1.41	0	0	0
a ₁	b ₃	3	10	1.41	0	0	0
a ₁	b ₄	4	1	1.41	0	0	0
a ₁	b ₄	4	2	1.41	0	0	0
a ₁	b ₄	4	3	1.41	0	0	0
a ₁	b ₄	4	4	1.41	0	0	0
a ₁	b ₄	4	5	1.41	0	0	0
a ₁	b ₄	4	6	1.41	0	0	0
a ₁	b ₄	4	7	1.41	0	0	0
a ₁	b ₄	4	8	1.41	0	0	0

a ₁	b ₄	4	9	1.41	0	0	0
a ₁	b ₄	4	10	1.41	0	0	0
a ₁	b ₅	5	1	1.41	0	0	0
a ₁	b ₅	5	2	1.41	0	0	0
a ₁	b ₅	5	3	1.41	0	0	0
a ₁	b ₅	5	4	1.41	0	0	0
a ₁	b ₅	5	5	1.41	0	0	0
a ₁	b ₅	5	6	1.41	0	0	0
a ₁	b ₅	5	7	1.41	0	0	1
a ₁	b ₅	5	8	1.41	1	0	0
a ₁	b ₅	5	9	1.41	0	0	0
a ₁	b ₅	5	10	1.41	0	0	0
a ₂	b ₁	6	1	1.41	0	0	0
a ₂	b ₁	6	2	1.41	0	0	0
a ₂	b ₁	6	3	1.00	0	0	0
a ₂	b ₁	6	4	1.00	0	0	0
a ₂	b ₁	6	5	1.00	0	0	0
a ₂	b ₁	6	6	1.00	0	0	0
a ₂	b ₁	6	7	1.41	0	0	0
a ₂	b ₁	6	8	1.41	0	0	0
a ₂	b ₁	6	9	1.00	0	0	0
a ₂	b ₁	6	10	1.00	0	0	0
a ₂	b ₂	7	1	1.00	0	0	0
a ₂	b ₂	7	2	1.41	0	0	0
a ₂	b ₂	7	3	1.00	0	0	0
a ₂	b ₂	7	4	1.00	0	0	0
a ₂	b ₂	7	5	1.41	0	0	0
a ₂	b ₂	7	6	1.41	0	0	0
a ₂	b ₂	7	7	1.41	0	0	0
a ₂	b ₂	7	8	1.00	0	0	0
a ₂	b ₂	7	9	1.41	0	0	0
a ₂	b ₂	7	10	1.00	0	0	0
a ₂	b ₃	8	1	1.41	0	0	0
a ₂	b ₃	8	2	1.00	0	0	0
a ₂	b ₃	8	3	1.41	0	0	0
a ₂	b ₃	8	4	1.41	0	0	0
a ₂	b ₃	8	5	1.00	0	0	0
a ₂	b ₃	8	6	1.41	0	0	0
a ₂	b ₃	8	7	1.00	1	1	0
a ₂	b ₃	8	8	1.41	0	0	0
a ₂	b ₃	8	9	1.41	0	0	0
a ₂	b ₃	8	10	1.41	0	0	0
a ₂	b ₄	9	1	1.41	0	0	0
a ₂	b ₄	9	2	1.00	0	0	1

a ₂	b ₄	9	3	1.41	0	0	0
a ₂	b ₄	9	4	1.41	0	0	0
a ₂	b ₄	9	5	1.41	0	0	0
a ₂	b ₄	9	6	1.00	0	0	0
a ₂	b ₄	9	7	1.41	0	0	0
a ₂	b ₄	9	8	1.41	0	0	0
a ₂	b ₄	9	9	1.41	0	0	0
a ₂	b ₄	9	10	1.41	0	0	0
a ₂	b ₅	10	1	1.41	0	0	0
a ₂	b ₅	10	2	1.41	0	0	0
a ₂	b ₅	10	3	1.41	0	0	0
a ₂	b ₅	10	4	1.41	0	0	0
a ₂	b ₅	10	5	1.00	0	0	0
a ₂	b ₅	10	6	1.41	0	0	0
a ₂	b ₅	10	7	1.00	0	0	0
a ₂	b ₅	10	8	1.41	1	1	0
a ₂	b ₅	10	9	1.41	1	0	0
a ₂	b ₅	10	10	1.41	0	0	0

1.00 = sin callo
1.41 = con callo

Cuadro 27. Presencia de callos y contaminación para el ensayo 2.

Tratamiento	Repetición	Callos	Hongos	Bacterias	Necrosamiento
1	1	1.00	0	0	0
1	2	1.41	0	0	0
1	3	1.41	0	0	0
1	4	1.00	1	0	0
1	5	1.41	0	0	0
1	6	1.41	0	0	0
1	7	1.41	0	0	0
1	8	1.41	0	0	0
1	9	1.00	1	0	1
1	10	1.41	0	0	0
2	1	1.00	0	0	0
2	2	1.00	0	0	0
2	3	1.00	0	0	0
2	4	1.41	0	0	0
2	5	1.00	1	1	0
2	6	1.00	1	0	0
2	7	1.41	0	0	0
2	8	1.41	0	0	0
2	9	1.41	0	0	0
2	10	1.41	0	0	0
3	1	1.41	0	0	0

3	2	1.41	0	0	0
3	3	1.41	0	0	0
3	4	1.41	0	0	0
3	5	1.41	0	0	0
3	6	1.00	1	0	1
3	7	1.41	0	0	0
3	8	1.41	0	0	0
3	9	1.41	0	0	0
3	10	1.41	0	0	0
4	1	1.00	1	0	0
4	2	1.41	0	0	0
4	3	1.41	0	0	0
4	4	1.41	0	0	0
4	5	1.41	0	0	0
4	6	1.41	0	0	0
4	7	1.41	0	0	0
4	8	1.41	0	0	0
4	9	1.41	0	0	0
4	10	1.41	0	0	0
5	1	1.41	0	0	0
5	2	1.41	0	0	0
5	3	1.41	0	0	0
5	4	1.41	0	0	0
5	5	1.41	0	0	0
5	6	1.41	0	0	0
5	7	1.41	0	0	0
5	8	1.41	0	0	0
5	9	1.41	0	0	0
5	10	1.41	0	0	0

1.00 = sin callo

1.41 = con callo

Cuadro 28. Presencia de contaminación para el ensayo 3.

Factor A	Factor B	Tratamiento	Repetición	Hongos	Bacterias	Necrosamiento
a ₁	b ₁	1	1	1.00	1.41	1.41
a ₁	b ₁	1	2	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₁	1	3	1.00	1.41	1.41
a ₁	b ₁	1	4	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₁	1	5	1.41	1.00	1.41
a ₁	b ₁	1	6	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₁	1	7	1.00	1.41	1.41
a ₁	b ₁	1	8	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₁	1	9	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₁	1	10	1.41	1.41	1.41

a ₁	b ₂	2	1	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₂	2	2	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₂	2	3	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₂	2	4	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₂	2	5	1.41	1.00	1.41
a ₁	b ₂	2	6	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₂	2	7	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₂	2	8	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₂	2	9	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₂	3	10	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₃	3	1	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₃	3	2	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₃	3	3	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₃	3	4	1.41	1.41	1.00
a ₁	b ₃	3	5	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₃	3	6	1.41	1.41	1.00
a ₁	b ₃	3	7	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₃	3	8	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₃	3	9	1.41	1.41	1.41
a ₁	b ₃	3	10	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₁	4	1	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₁	4	2	1.00	1.41	1.41
a ₂	b ₁	4	3	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₁	4	4	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₁	4	5	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₁	4	6	1.00	1.41	1.41
a ₂	b ₁	4	7	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₁	4	8	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₁	4	9	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₁	4	10	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₂	5	1	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₂	5	2	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₂	5	3	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₂	5	4	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₂	5	5	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₂	5	6	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₂	5	7	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₂	5	8	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₂	5	9	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₂	5	10	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₃	6	1	1.41	1.41	1.00
a ₂	b ₃	6	2	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₃	6	3	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₃	6	4	1.41	1.41	1.00

a ₂	b ₃	6	5	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₃	6	6	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₃	6	7	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₃	6	8	1.41	1.00	1.00
a ₂	b ₃	6	9	1.41	1.41	1.41
a ₂	b ₃	6	10	1.41	1.41	1.41

1.00 = sin hongo

1.41 = con hongo

Cuadro 29. Presencia de callo para los ensayos 4 y 5.

Tratamiento	Repetición	Callo E1	Callo E2
1	1	1.00	1.00
1	2	1.00	1.00
1	3	1.00	1.00
1	4	1.00	1.00
1	5	1.41	1.00
1	6	1.00	1.00
1	7	1.41	1.00
1	8	1.00	1.00
1	9	1.00	1.00
1	10	1.00	1.00
2	1	1.41	1.41
2	2	1.41	1.41
2	3	1.41	1.00
2	4	1.00	1.41
2	5	1.41	1.00
2	6	1.41	1.41
2	7	1.41	1.41
2	8	1.00	1.00
2	9	1.41	1.41
2	10	1.41	1.00
3	1	1.00	1.41
3	2	1.41	1.41
3	3	1.41	1.41
3	4	1.00	1.41
3	5	1.41	1.41
3	6	1.00	1.41
3	7	1.41	1.41
3	8	1.41	1.41
3	9	1.00	1.41
3	10	1.00	1.41
4	1	1.41	1.41
4	2	1.41	1.41
4	3	1.41	1.41

4	4	1.41	1.41
4	5	1.41	1.00
4	6	1.41	1.00
4	7	1.41	1.41
4	8	1.41	1.41
4	9	1.41	1.00
4	10	1.41	1.41
5	1	1.41	1.41
5	2	1.41	1.41
5	3	1.41	1.41
5	4	1.41	1.41
5	5	1.41	1.41
5	6	1.41	1.41
5	7	1.41	1.41
5	8	1.41	1.41
5	9	1.41	1.41
5	10	1.41	1.41
6	1	1.00	1.41
6	2	1.41	1.41
6	3	1.41	1.41
6	4	1.41	1.41
6	5	1.41	1.41
6	6	1.41	1.00
6	7	1.00	1.41
6	8	1.41	1.00
6	9	1.41	1.41
6	10	1.41	1.41

1.00 = sin callo

1.41 = con callo

Anexo 2. Panel fotográfico



Figura 31. Fase de aislamiento (fumigación a los plántones de tornillo).

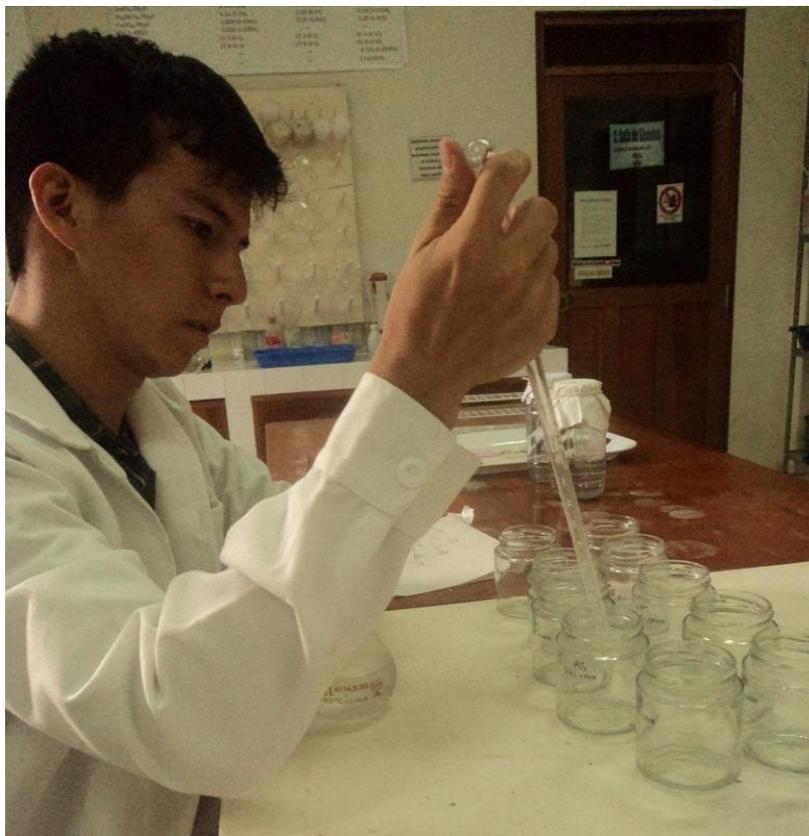


Figura 32. Fase de laboratorio (balance de hormonas por tratamientos).



Figura 33. Fase de laboratorio (medio de cultivo).



Figura 34. Fase de laboratorio (desinfección de hojas).



Figura 35. Fase de laboratorio (Desinfección de yemas).



Figura 36. Fase de laboratorio (siembra).



Figura 37. Ensayo 1 instalado.

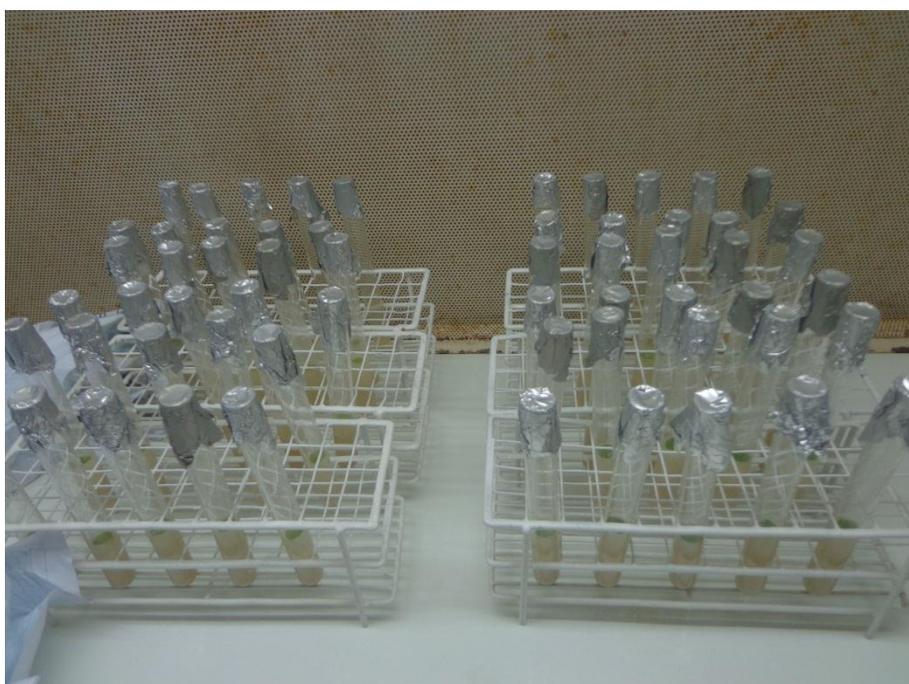


Figura 38. Ensayo 2 instalado.



Figura 39. Ensayo 3 instalado.

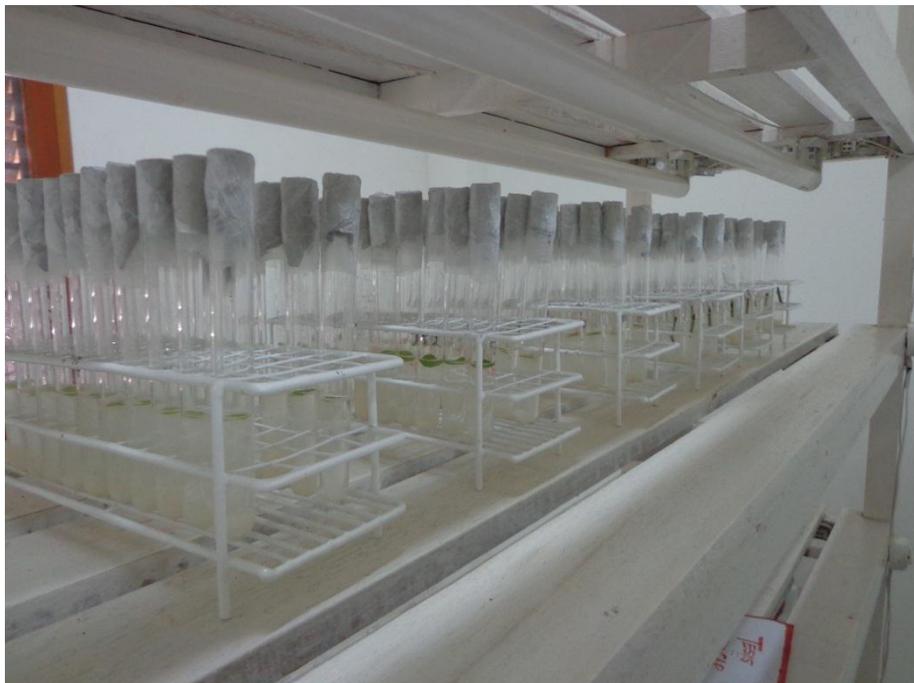


Figura 40. Ensayo 4 instalado.



Figura 41. Ensayo 5 instalado.



Figura 42. Fase de evaluación (formación de callo en yemas).

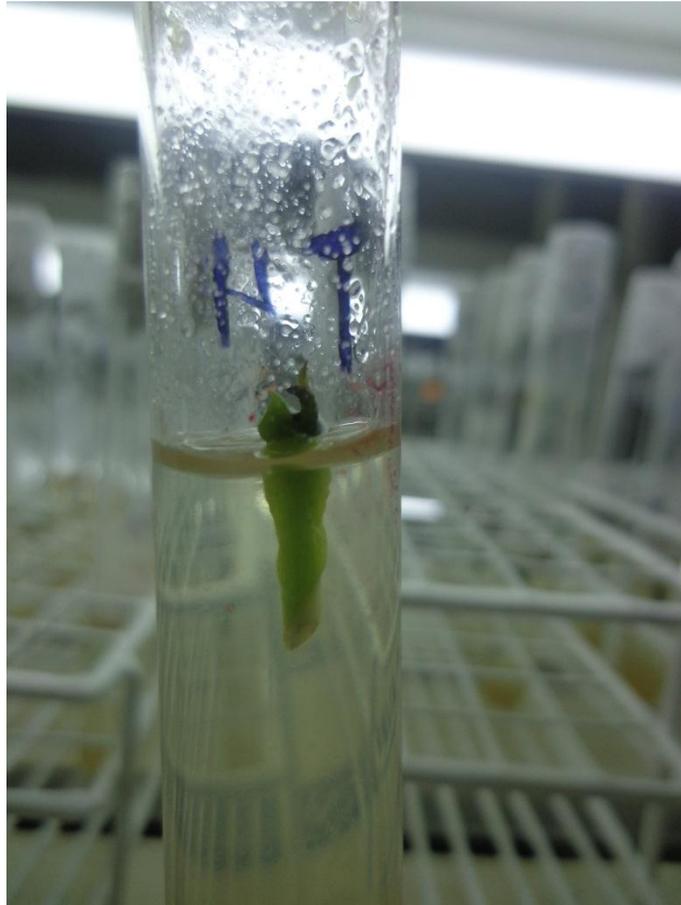


Figura 43. Fase de evaluación (formación de brotes en yemas).