

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA FORESTAL**



**“EFECTO DE DOS MEDIOS DE CULTIVOS Y DOS FITOHORMONAS  
EN LA MICROPROPAGACIÓN DE *Cedrela odorata* L. “CEDRO  
COLORADO”**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE**

**INGENIERO FORESTAL**

**PRESENTADO POR:**

**ROSA MARLENY SANTA CRUZ CARRASCO**

**2022**



## **ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 022-2022-FRNR-UNAS**

Los que suscriben, miembros del Jurado de Tesis, reunidos con fecha 28 de junio del 2022 a horas 4:00 p. m. a través de la Sala Virtual de Conferencias Microsoft Teams de la Escuela Profesional de Ingeniería Forestal de la Facultad de Recursos Naturales Renovables para calificar la Tesis titulada:

### **“EFECTO DE DOS MEDIOS DE CULTIVOS Y DOS FITOHORMONAS EN LA MICROPROPAGACIÓN DE *Cedrela odorata* L.” CEDRO COLORADO”**

Presentado por el Bachiller: **SANTA CRUZ CARRASCO, Rosa Marleny**, después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las interrogantes formuladas por el Jurado, se declara **APROBADO** con el calificativo de **“EXCELENTE”**

En consecuencia, el sustentante queda apto para optar el Título Profesional de **INGENIERO FORESTAL**, que será aprobado por el Consejo de Facultad, tramitándolo al Consejo Universitario para el otorgamiento del Título correspondiente.

Tingo María, 15 de Julio de 2022

Dra. **TANIA ELIZABETH GUERRERO VEJARANO**  
PRESIDENTE

Dr. **CÉSAR SAMUEL LÓPEZ LÓPEZ**  
MIEMBRO

Ing. Mg. **ROBERT GILBERT PECHO DE LA CRUZ**  
MIEMBRO



Blgo. M. Sc. **JULIO ALFONSO CHÍA WONG**  
ASESOR

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA FORESTAL**



**“EFECTO DE DOS MEDIOS DE CULTIVOS Y DOS FITOHORMONAS  
EN LA MICROPROPAGACIÓN DE *Cedrela odorata* L. “CEDRO  
COLORADO”**

**Autor** : SANTA CRUZ CARRASCO, Rosa Marleny

**Asesores** : Blgo. M. Sc. CHIA WONG, Julio  
Ing. M. Sc. ODICIO GUEVARA, Joel E.

**Programa** : Ciencias Básicas Forestales

**Línea de Investigación** : Biotecnología forestal

**Eje temático** : Mejoramiento genético forestal

**Lugar de ejecución** : Laboratorio de Biotecnología y Diversidad Molecular de la  
Facultad de Agronomía

**Duración del trabajo** : Fecha de inicio : junio del 2019  
Término : noviembre del 2019

**Financiamiento** : Propio : S/ 5 000.00 soles

## DEDICATORIA

A Dios, por el obsequio de la vida, Él siempre estuvo en todo momento cuidándome y guiándome con sabiduría para no dejarme vencer por los nuevos retos y adversidades de la vida.

A mi madre Marleny Carrasco Mena, quien estuvo incondicionalmente en cada momento de mi vida, apoyándome y brindándome todo lo posible, incluso algunas veces hasta lo imposible. Estaré eternamente agradecida y espero algún día recompensarlo.

A mi hermano, Martin Santa Cruz Carrasco, por acompañarme en esta y cada etapa de mi vida. A mis tías porque siempre permanecieron cerca brindándome su apoyo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por la vida y brindarme salud durante toda mi etapa de formación profesional.

A mi familia, por estar presente siempre, confiando en mí y alentándome en todo momento en cada nueva experiencia.

A la Universidad Nacional Agraria de la Selva y docentes de la Facultad de Recursos Naturales Renovables, por todas sus sapiencias que transmitidas en cada uno de sus estudiantes.

A mis asesores, Joel Odicio Guevara y Julio Chía Wong, por sus sabias contribuciones para este trabajo de investigación.

Al Ing. Joel Porfirio Sullón Vargas por toda su confianza, apoyo en el desarrollo y a la vez al Laboratorio de Biotecnología y Diversidad Molecular de la Facultad de Agronomía por darme la facilidad de ejecución de tesis en sus instalaciones.

A mis jurados de tesis, por todas las indicaciones para mejorar mi trabajo de investigación.

A mis amigos, por su compañía en toda esta etapa universitaria.

## ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1. Marco teórico .....	3
2.1.1. <i>Cedrela odorata</i> L.....	3
2.1.2. Propagación in vitro.....	5
2.1.3. Medio de cultivo.....	10
2.1.4. Reguladores de crecimiento.....	11
2.1.5. Necrosis y clorosis .....	12
2.2. Estado del arte .....	13
III. MATERIALES Y METODOS .....	21
3.1. Lugar de ejecución.....	21
3.2. Materiales .....	21
3.2.1. Material vegetal.....	21
3.2.2. Materiales y equipos .....	21
3.2.3. Reactivos .....	21
3.3. Metodología.....	22
3.3.1. Fase 1: Para la dosis óptima de desinfección para la propagación de <i>Cedrela odorata</i> L. “cedro colorado” .....	22
3.3.2. Fase 2: Para efecto medios de cultivos (MS Y WPM) y fitohormonas (Kinetina y ANA) en el crecimiento de brotes y raíces en explantes de <i>Cedrela odorata</i> L. “cedro colorado” .....	24
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31

4.1.	Dosis óptima en la desinfección de segmentos de tallo de <i>C. odorata</i> “cedro colorado” .....	31
4.1.1.	Contaminación de explantes .....	31
4.2.	Efecto del medio de cultivo y fitohormonas en la longitud y respuesta vegetativa en segmentos de <i>Cedrela odorata</i> L. “cedro colorado” .....	32
4.2.1.	Número y longitud de brotes .....	32
4.2.2.	Número y longitud de raíces .....	39
V.	CONCLUSIONES.....	45
VI.	PROPUESTAS A FUTURO.....	46
VII.	REFERENCIAS.....	47
	ANEXOS .....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

Tablas	Página
1. Descripción de los factores en estudio. ....	25
2. Componentes para el medio de cultivo MS y WPM .....	28
3. Concentraciones de los stocks para el medio de cultivo. ....	29
4. Porcentaje de mortalidad de explantes de <i>C. odorata</i> propagados <i>in vitro</i> a causa de la contaminación .....	31
5. Estadístico prueba U Mann Whitney para número de brotes influenciados por los medios de cultivo .....	33
6. Comparación de medias del número de brotes en los medios de cultivo. ....	33
7. Estadístico prueba de Kruskal Wallis para el número de brotes influenciados por los niveles hormonales .....	34
8. Comparación de medias de los números de brotes en niveles hormonales .....	34
9. Estadístico prueba U Mann Whitney para la longitud de brotes influenciados por los medios de cultivo .....	36
10. Comparación de medias de la longitud de brotes en los medios de cultivo. ....	36
11. Estadístico prueba de Kruskal Wallis para la longitud brotes influenciados por los niveles hormonales .....	37
12. Comparación de medias de la longitud de brotes en niveles hormonales. ....	37
13. Estadístico prueba U Mann Whitney para el número de raíces influenciados por los medios de cultivo.....	39
14. Comparación de medias del número de raíces en los medios de cultivo. ....	39
15. Estadístico prueba de Kruskal Wallis para el número de raíces influenciados por los niveles hormonales .....	40
16. Comparación de medias del número de raíces en niveles hormonales.....	40



17. Estadístico prueba U Mann Whitney para la longitud de raíces influenciados por los medios de cultivo.....	42
18. Comparación de medias de la longitud de raíces en los medios de cultivo.....	42
19. Estadístico prueba de Kruskal Wallis para la longitud de raíces influenciados por los niveles hormonales. ....	43
20. Comparación de medias del número de raíces en niveles hormonales.....	43
21. Datos de contaminación de la dosis optima de desinfección.....	55
22. Datos de la longitud de brotes (cm) de la propagación <i>in vitro</i> de segmentos de tallos de <i>C. odorata</i> .....	56
23. Datos de la longitud de raíces (cm) de la propagación <i>in vitro</i> de segmentos de tallos de <i>C. odorata</i> . ....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Porcentaje de mortalidad de explantes de <i>C. odorata</i> a causa de contaminación <i>in vitro</i> ....	32
2. Número de brotes del explante de <i>C. odorata</i> de acuerdo a los medios de cultivo.....	33
3. Números de brotes del explante de <i>C. odorata</i> de acuerdo a las hormonas.....	35
4. Longitud de brotes del explante de <i>C. odorata</i> de acuerdo al medio de cultivo. ....	36
5. Longitud de brotes del explante de <i>C. odorata</i> de acuerdo a las hormonas.....	38
6. Número de raíces del explante de <i>C. odorata</i> de acuerdo a los medios de cultivo. ....	39
7. Número de raíces del explante de <i>C. odorata</i> de acuerdo a las hormonas. ....	41
8. Longitud de raíces del explante de <i>C. odorata</i> de acuerdo al medio de cultivo.....	42
9. Longitud de raíces del explante de <i>C. odorata</i> de acuerdo a las hormonas. ....	44
10. Construcción del mini-invernadero para el aislamiento de los plantones de <i>C. odorata</i> ...	58
11. Esterilización de materiales de vidrio y metal en la autoclave.....	58
12. Verificación del Stock y preparación de dosis de hormonas como tratamiento de propagación <i>in vitro</i> .....	59
13. Preparación de medio de cultivo adicionando el tratamiento con dosis hormonal correspondiente .....	59
14. Pre-desinfección de las plantas de <i>C. odorata</i> antes de pasar a la desinfección .....	60
15. Desinfección, enjuague y siembra de las plantas de <i>C. odorata</i> . ....	60
16. Siembra de segmentos de tallo de <i>C. odorata</i> en cámara de flujo laminar .....	61
17. Evaluación de contaminación del explante de <i>C. odorata</i> en la primera semana .....	61

18. Evaluación de yemas, hojas y raíces de segmentos de tallo de <i>C. odorata</i> .....	62
19. Segmentos de tallo de <i>C. odorata</i> evaluados a los 30 días después de la siembra.....	62
20. Segmentos de tallo de <i>C. odorata</i> en la evaluación a los 55 días.....	63

## RESUMEN

El estudio tuvo como finalidad estudiar el efecto de diferentes medios de cultivos y fitohormonas en la propagación *in vitro* de segmentos de tallo de *C. odorata*, basado en un ensayo de desinfección, con 3 diferentes dosis de hipoclorito de sodio, en el que se buscó la dosis óptima para el experimento, posterior a esta fase se trabajó con dos tipos de medio de cultivo MS y WPM adicionado con niveles hormonales de ANA y Kinetina para generar el desarrollo y crecimiento de brotes y raíces. Los resultados fueron los siguientes: El mejor tratamiento de desinfección fue el alcohol al 70% + hipoclorito de sodio 1% por 15 min, lo cual generó un menor porcentaje de contaminación con 40%; para la fase de morfogénesis todas las variables evaluadas, excepto longitud de brotes en el factor hormonal, mostraron numérica y estadísticamente que los niveles hormonales mayores a 0.35 mg/L de kinetina y mayores de 0 mg/L de ANA usados en esta tesis, influenciaron negativamente en el número de brotes, y número de raíces, respuesta posiblemente atribuida al contenido endógeno hormonal de los segmentos nodales provenientes de plántones de *Cedrela odorata* de 2 -3 meses de edad aproximadamente.

**Palabras clave:** *Cedrela odorata*, medio de cultivo, propagación in vitro, fitohormona.

## ABSTRACT

### **EFFECT OF TWO CULTIVATION MEDIA AND TWO PHYTOHORMONES ON THE MICROPROPAGATION OF *Cedrela odorata* L. “CEDRO COLORADO”**

The purpose of the study was to study the effect of different culture media and phytohormones on the in vitro propagation of *C. odorata* stem segments, based on an elimination test, with 3 different doses of sodium hypochlorite, in which it was sought the optimal dose for the experiment, later working with different types of culture medium Murashige & Skoog (MS) and Woody Plant Medium (WPM) and hormonal levels of Naftalen Acetic Acid (ANA) and Kinetin. Where the results were: where the best treatment was sodium hypochlorite 1% for 15 min, which generates a lower percentage of contamination with 20%; for the morphogenesis phase, all the variables evaluated, except the length of the shoots in the hormonal factor, numerically and statistically showed that hormonal levels greater than 0.35 mg/L of kinetin and greater than 0 mg/L of ANA used in this thesis, influenced negatively in the number of shoots, and number of roots. Response possibly attributed to the endogenous hormonal content of the nodal segments from *Cedrela odorata* seedlings approximately 2-3 months old.

Keywords: *Cedrela odorata* L. “cedro colorado”, Culture medium, in vitro propagation, hormone, segment, bud, root, callus, leaf.

## I. INTRODUCCIÓN

*Cedrela odorata* L. “cedro colorado” es una especie de gran importancia económica después de la *Swietenia macrophylla* King. “caoba”, tanto por su anatomía; por su uso en carpintería, enchapados y ebanistería fina, y por su efecto restaurador de microclimas. Sin embargo, no tiene una buena regeneración natural (dependencia de semillas) y sumada a su tala excesiva, se diezman y fragmentan las poblaciones en su área de distribución, colocando esta especie en peligro. Actualmente, la sobreexplotación de dicha especie, pone en peligro su población y distribución del bosque natural, el aprovechamiento forestal selectivo de especies con características superiores a las demás merma la población, por lo que la propagación vegetativa ha tomado un significativo papel en la multiplicación de árboles “élite”. La biotecnología en este contexto, es una alternativa significativa para especies forestales en el proceso de regenerar y multiplicar, que de otro modo sería difícil o lenta regeneración, sumándole la tala excesiva que puede llevar a esta especie a la extinción.

Debido a ello, con el objetivo de propagar constantemente la especie, impedir su desaparición y evitar la dependencia de sus semillas, conlleva a la realización de pruebas experimentales (investigación, tesis, etc.) con tecnología *in vitro* adecuada para futuras plantaciones.

Una de las ventajas que ofrece la propagación *in vitro* es que evita la dependencia de semillas botánicas, periodos fenológicos y que se puede extraer material genético de una parte de la planta sin importar su edad, además ayudar a la propagación de plantas con características deseadas o proporcionar el germoplasma para realizar mejoramiento genético. En tal sentido considerando lo significativo de la especie y el hecho que aún no existen resultados concretos de esta tecnología para la zona en estudio, se formula la siguiente interrogante: ¿Cuál será el efecto de diferentes medios de cultivos y fitohormonas en la propagación *in vitro* de segmentos de tallo de *Cedrela odorata* L. “cedro colorado”?, y de acuerdo a los antecedentes se plantea la siguiente hipótesis: El efecto de los medios de cultivo y fitohormonas en la propagación *in vitro* será significativo en función a la aparición y crecimiento de brotes y raíces.

**Objetivo general:**

- Evaluar el efecto de dos medios de cultivo y dos fitohormonas en la micropropagación de *Cedrela odorata* L. “cedro colorado”.

**Objetivos específicos:**

- Determinar la dosis óptima de hipoclorito de sodio en la desinfección para la micropropagación de *C. odorata* L. “cedro colorado”
- Evaluar el efecto del medio de cultivo (MS y WPM) y fitohormonas (ANA y kinetina) en el crecimiento de brotes y raíces en explantes de *C. odorata* L. “cedro colorado”

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Marco teórico

#### 2.1.1. *Cedrela odorata* L.

##### 2.1.1.1. Clasificación botánica

La clasificación taxonómica para esta especie es básicamente propuesta por Cronquist (1981) es:

REINO	: PLANTAE
SUB REINO	: TRACHEOBIONTA
SUPER DIVISIÓN	: SPERMATOPHYTA
DIVISIÓN	: MAGNOLIOPHYTA
CLASE	: MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	: ROSIDAE
ORDEN	: SAPINDALE
FAMILIA	: MELIACEAE
GÉNERO	: <i>Cedrela</i>
ESPECIE	: <i>Cedrela odorata</i> L.

*C. odorata*, conocida de acuerdo al lugar con los nombres de cedro colorado, cedro rojo, cedro amargo, entre otros.



### 2.1.1.2. Distribución y hábitat

*C. odorata* es procedente del trópico americano, desarrollándose hasta los 1,700 msnm. La distribución abarca desde México (Latitud 26° N) hasta el Norte de Argentina (Latitud 28° S). Prospera en territorios de origen volcánico o calizo, con drenaje bueno y permeable en su profunda extensión. Prefiere climas húmedos y con precipitación en 3,000 mm anuales aproximadamente. Las temperaturas óptimas el crecimiento son entre 25 °C y 35°C (CONAFOR, 2007).

### 2.1.1.3. Descripción botánica

Pertenece a la familia Meliaceae, sumamente débil a la *Hypsipyla grandella* Zeller el barrenador, quien afecta principalmente la yema y causa una deformación de los fustes. Cuenta con un fuste recto que llega a medir los 40 m de altura total, le nacen sus brotes en la parte superior del medio de su altura y el diámetro en árboles maduros de 1 a 2 m, presenta aletones pequeños sobre la base que facilita reforzar el árbol, debido a su sistema radical superficial.

La corteza, llega a medir un grosor de 2 cm, en colores gris-claro y limitadamente dividido en planchas con ligeras hendiduras en un árbol joven, por otro lado, los árboles adultos poseen corteza fisurada y profunda, la corteza es de coloración rosa en la parte interna, fibrosa con sabor desagradable, con un profundo y fuerte aroma característico de la especie.

La copa presenta follaje denso con formas abultadas o redondas, con un color verde-claro, las hojas son compuestas paripinnadas e impar-pinnadas, alternas, con un largo de 30 a 70 cm, con folíolos en pares de 5 a 11 (mayormente de 6-7 pares). Generalmente folíolos puntiagudos, con una longitud de 8 a 17 cm por un ancho de 2.6 a 5.4 cm, acuminados, con un ángulo mayor a 90° y a veces mucronados en el ápice, muy delgados a redondos y desiguales en la base, con márgenes completos.

Las flores se agrupan en inflorescencias con panículas de tamaño variable, generalmente son glabras. Las flores con un largo de 6 a 9 mm, perfumadas delicadamente, con un color crema un toque verdoso. Un cáliz verdoso, con forma de embudo o copa, con un largo de 2 a 3 cm, 5 lóbulos dentados. Una corola con forma tubular; con 5 pétalos que se abren, con un largo de 7 a 8 mm. Presenta 5 estambres libres con tamaño más

pequeños que los pétalos. Tiene un pistilo que sobrepasa los estambres en longitud y un estigma ensanchado.

Sus frutos son cápsulas leñosas dehiscentes, un poco elíptico y oblongos, con un largo de 2.5 a 5 cm, se presentan en grupos que cuelgan en los extremos de las ramas. Tiene aspectos un poco leñosos en la etapa de la madurez, con un color marrón chocolate, con un número abundantes de lenticelas de color amarillentas. Se encuentra durante mayor tiempo arriba del árbol. Produce frutos en años alternados.

Con una madera de fuerte olor, con gran parte de la madera liviana, peso específico que varía en 0.42 a 0.63, mayormente flácida o mediamente sólida. La coloración que tiene la albura es blanquiñoso-amarillo o grisáceo que diferencia el duramen, a partir de un color rojizo hasta un color pardo claro. Esta estructura es inicialmente fina a áspera (Hoyos, 1985).

#### **2.1.1.4. Fenología**

Es un árbol caducifolio, las hojas caen en el momento que los frutos del periodo anterior han madurado completamente, precedente a la floración. Florece de abril a agosto a veces hasta octubre, con frutos que maduran de 6-9 meses, sin embargo, no todos los años fructifica siendo un factor que dificulta la obtención de semillas. Las hojas caen en junio y los nuevos brotes de hojas salen en enero y abril. La madurez reproductiva es obtenida a los 15 años de edad y posterior tiene una fructificación abundantemente en cada año (Herrera y Lanuza, 1996).

Los resultados para *Cedrela odorata* y *C. fissilis* indican que existen problemas de regeneración y esto se concentra en una producción irregular o deficiente de semillas, la falta de claros grandes con alta disponibilidad lumínica y debido a la sobreexplotación tiene como consecuencia la falta de árboles semilleros (Mostacedo y Fredericksen, 2000).

#### **2.1.2. Propagación in vitro**

##### **2.1.2.1. Cultivo *in vitro* de especies leñosas**

Se define como diversas metodologías donde un explante de tejido vegetal, es decir, porciones del material vegetativo protoplastos, células, tejidos u órganos, en

condiciones de gran asepsia y en un medio de cultivo artificial con una estructura química determinada, controlando las situaciones climáticas, como resultado de este proceso se genera una nueva planta de una o muchas plantas clones a partir de una fracción de material vegetal (Mronginski *et al.*, 2010).

Estas técnicas de producción modernas tienen sus ventajas al lado de las convencionales, ya que permite producir un material de alta calidad genética. (Gonzales *et al.*, 1998).

Especies arbóreas (recalcitrantes) por la condición de estructura han generado mayor dificultad además los métodos morfológicos, funcionales y biológicos no tienen un número considerable de estudios (Perea, 1990).

Se encuentra una mayor desigualdad en plantas herbáceas y leñosas, esto se debe a que las últimas tienen más dificultad al clonar ya que tiene la facultad regenerativa limitadamente lenta (Pierik, 1990).

Dentro del cultivo *in vitro* de algunos especímenes forestales esta encuentra la regeneración de plantas, requiere la búsqueda de metodologías difíciles (Perugorría, 2005). Las siguientes metodologías deben permitir que estas plantas cumplan el rol de sobrevivir a problemas y dificultades de oxidación, heterogeneidad de argumento y por ende a lograr un ambiente adecuado para el proceso de trasplante a un sustrato natural y condiciones climáticas. Este material vegetativo puede dar dos respuestas: una de diferenciación a nivel celular que conduce al desarrollo tumoral, como consecuencia se obtiene una turba de células llamada callo o una respuesta morfogénica, formándose organogénesis o embriogénesis somática (López, 1996).

El multiplicar especies agrícolas y forestales *in vitro* puede darse en caminos diversos: 1) de crecimiento de brotes ya existentes, 2) de producción de la parte adventicia de los meristemos, y, 3) de diferenciación de embriones somáticos (Aguilar *et al.*, 2010).

Generalmente es utilizado los cultivos de yemas y de meristemos en diversas plantas, con el fin de lograr, reservar y propagar la materia genéticos, en algún caso, se restablece la planta y en otras se incita a la generación de múltiples yemas, en casos como este se espera conseguir la generación de ramas axilares que lleguen a distanciarse y enraizar; en teoría las yemas axilares o laterales logran generar ramas axilares adicionales a perennidad,

a disposición se realiza un sub cultivo de cada yema al principio de la formación o cada explante de nudo. En consiguiente, la técnica es buena para lograr una rápida y efectiva propagación clonal, y se aplican en mayor diversidad de especies vegetales, herbáceas y leñosas (Styer *et al.*, 1983).

Con relación de producción y multiplicación de brotes adventicios, la etapa implica una incitación de tejido meristemático ubicado con reguladores de crecimiento, estableciéndose la diferenciación del primordio y el avance de las yemas. Habitualmente se implica el desarrollo de un callo, como respuesta a las consecuencias de las citoquininas en tejido meristemático tal como el cambium y otros de importancia fisiológica como el apical (Thorpe, 1991).

Se posibilita la producción de nuevos brotes adventicios en la mayoría de los individuos del reino vegetal desde callos, no obstante, es considerablemente dificultoso en las especies coníferas. El trayecto generalmente utilizado en la generación de tejido *in vitro* de especímenes leñosos, una etapa en la que radica el establecer un cultivo, desarrollarlo, multiplicarlo y enraizarlo en yemas (Thorpe, 1991).

Existen explantes jóvenes como también los embriones cigóticos, cotiledones, hipocótilos o brotes de plantas y hojas jóvenes generan mayor respuesta en el cultivo *in vitro* que distintos tejidos de los árboles de edad adulta, existiendo con mayores resultados para la clonación forestal (Thorpe, 1991).

#### **2.1.2.2. Fases de la propagación *in vitro***

##### **- Fase 1. Desinfección de los explantes**

Para la obtención de los explantes se recomienda conservar la futura planta madre, es decir la planta que servirá de donante, esta se debe mantener por una etapa de semanas hasta meses en invernadero con situaciones de clima controladas (Ortiz *et al.*, 1998). El proceso de cultivar la planta en condiciones de asepsia y mantener controlada la nutrición y un adecuado riego para un desarrollo sano y con vigor. (Pierik, 1990).

Se extraen fracciones a partir de los que se obtuvo el explante. Dentro de los explantes se puede tomar brotes, fragmentos de hojas, fracciones de raíz o semillas.

Previamente de la extracción el explante se hace una desinfección de las fracciones de la planta donadora para eliminar la contaminación.

Generalmente la contaminación muy frecuente son los hongos y los microbios que residen de manera nativa dentro del entorno. Para desinfectar se usa hipoclorito de sodio, agua clorada comercial, peróxido de hidrogeno, nitrato de plata alcohol, pura o diluida por un periodo de 5 a 15 minutos, seguidamente con 3 a 4 enjuagues en agua esterilizada (Murashige, 1974).

- **Fase 2. Introducción de material seleccionado in vitro (siembra)**

Existe un problema muy trascendental en esta etapa del cultivo in vitro y es el riesgo de contaminación. Por consiguiente, de la esterilización exterior de explantes y en la cámara se elimina toda presencia de material con contaminación y los explantes se siembran en el medio nutritivo estéril.

- **Fase 3. Propagación y crecimiento de brotes**

En el transcurso de 7 días a 14 días, empieza la etapa de reproducción de tejidos vegetales nuevos, emprendiendo el desarrollo de propagar. Dentro la fase se tiene como expectativa que los explantes que subsistieron la etapa 2 dé como resultado de yemas de origen axilar o adventicia con diversos entrenudos. Cada cierto tiempo estas nuevas yemas necesitan ser sub cultivados dentro de la cámara de flujo con diferente medio de cultivo por medio de segmentaciones y multiplicación en tubos de ensayo u otros depósitos convenientes (Pierik, 1990).

Los tubos se trasladan al cuarto donde se procede a la incubación en situaciones ambientales controladas, donde el explante crece y se desarrolla obteniendo una planta completa genéticamente idéntica a la madre (Gonzales *et al.*, 1998).

### **2.1.2.3. Condiciones del cultivo *in vitro***

Además de las condiciones externas que se van a detallar a continuación, varios factores intervienen en este cultivo, en gran parte estas características con dicha planta, por ejemplo, el tipo, su genética, variedad de explante, fracción más joven o madura (Morales, 2002).

## - **Temperatura**

La temperatura en la cual se expone el explantes en cultivo in vitro influencia gran parte a fases fisiológicas y por consiguiente es un elemento primordial de control, por repetición de especie se cuenta con un intervalo de temperaturas en el que se origina un desarrollo absoluto. Dicho intervalo puede ser diverso en función de genotipo, del órgano que dio producto del explante, de la estación, de los años del material vegetal donado, de las horas de luz y oscuridad, etc. Una  $T^{\circ}$  puede oscilar entre los  $\pm 20$  y  $28^{\circ}$  C (Marín *et al.*, 1997).

## - **Luz**

Estas cámaras de cultivo deben iluminar todo el exterior útil de dicha cámara, por este motivo se sitúa un grupo de unidades creadoras de luz. Dichas unidades que producen luces fluorescentes y suelen estar ubicadas de diversas formas:

**Horizontales:** En parte superior del área de cultivo se ubican las baterías de los fluorescentes. Dicho método cuenta con la superioridad de que logra la distribución más semejante de la iluminación en el cultivo, por otro lado existe un problema, y que esto ocasiona un calentamiento en techo y esto ocasiona un incremento de temperatura en el siguiente nivel, de este modo ocasiona una distribución imparcial de temperatura.

**Verticales:** Esta distribución de la iluminación en el cultivo in vitro es irregular, de esta manera las baterías de los fluorescentes se ubican en la parte lateral de la cámara de cultivo, esto produce un nivel imperceptible de distribución de calor (Marín *et al.*, 1997).

## - **La contaminación**

Mroginski *et al.* (2010), señala que la esterilización es una fase muy crítica en la multiplicación de un cultivo in vitro dado el principal inconveniente es el contagio en explantes. La contaminación es definida como un inicio ocasional de microbios, hongos o bacterias, vectores y fuentes patogénicas que no son deseadas, en el cual se incluye los patógenos que contaminan y no contaminan (Kubota *et al.*, 1999). No obstante, estas

plantas de cultivo son consideradas como cultivos desinfectados dada la manifestación de dichos microbios ha llevado a los expertos de la ciencia a deliberar la idea y precisar como cultivos asépticos (Hernan, 1990).

En algunos casos se da la contaminación propia del explante, esto sucede cuando se obtiene la contaminación en las diversas fases como por ejemplo en el preámbulo del material donador. De la misma forma se da accidentalmente la contaminación en el desarrollo del medio, o en el subcultivo, el cual es una fase en el que se abre los recipientes y estos tienen una exposición al ambiente externo, por otro lado, también a causa de la ineficiencia de técnica estéril por el operador. La frecuente contaminación es causada por microorganismo se dan en cultivos con mayor edad que se encuentran en el área de incubación.

En la biotecnología, la contaminación pertenece a los principales problemas dificultan enormemente el desarrollo de los explantes en circunstancias estériles y generar brotación, por otro lado la mayor ocurrencia de contagio fúngico y bacteriano; cualquier pequeño cambio en las condiciones del ambiente *in vitro* (Temperatura, pH, composición del medio de cultivo, humedad, etc.) puede crear que los contaminantes latentes proliferen velozmente (Leifert *et al.*, 2001).

Marulanda *et al.* (2010), menciona que la labor primordial de asepsia en explantes se encuentra condicionada en una desinfección exterior de los propios. Del mismo modo, Olmos *et al.* (2010), indica en diversos procesos que se desarrolla el contagio posterior del proceso de la esterilización a causa de la presencia de individuos nocivos, sin embargo, estos logran ser dominados con la colocación de bacteriostáticos o antibióticos en el caldo nutritivo o medio nutritivo.

### **2.1.3. Medio de cultivo**

Se le llama a la mezcla sólida o líquida de alimentos para la planta. Frecuentemente se añaden sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. Habitualmente lo definen como medio basal y además se logra reforzar con alguna fitohormona de crecimiento o otros componentes.

Las sustancias nutritivas son primordiales para el desarrollo del explante, sin agua y un alimento mineral la planta no puede sobrevivir en ninguna tecnología. Además, se

añade azúcar en el medio, debido a que el explante no es totalmente autotrófico en dicho estado (Suárez, 2003).

Son WPM (Woody Plant Medium) (Lloyd y McCown, 1981) y MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionalmente con BAP (bencilamino purina) los medios que usualmente y generalmente son empleados para el desarrollo de brotes en angiospermas (Thorpe, 1991).

Alternando el alimento del medio de cultivo se llega a incrementar el % de explantes que generen yemas adventicias y/o la cantidad de yemas adventicias o vástagos. Medios con un bajo nivel de sales como el WP Woody Plant, 1970 y GD Gresshoff & Doy, 1972 aumentan muchas ocasiones el proceso de enraizamiento (Thorpe, 1991).

Existen algunas sustancias que no se permiten introducir en la autoclave como vitaminas, antibióticos, ácido giberélico, sacarosa, encimas, extractos vegetales, etc., ya que son sustancias no aptas para altas temperaturas. Los antibióticos pueden ser usados particularmente con el fin de disminuir algún patógeno mediante una filtración directa (Morales, 2002).

#### **2.1.4. Reguladores de crecimiento**

Para un inicio de raíz secundaria se implican diversos reguladores de crecimiento como las auxinas, citoquininas y giberelinas. Las auxinas generan un significativo resultado en el desarrollo de raíces en segmentos de tallo vegetales. Asimismo, de controlar su desarrollo.

El empleo de auxinas enraizantes es la metodología eficaz en la multiplicación vegetal. La tarea de una auxina es la inducción del proceso de enraizar, está conectada con su trabajo de diferenciación y el desarrollo celular y en la síntesis de la pared celular (Weaver, 1976).

Las auxinas mayormente empleadas para generar el desarrollo de raíz son los ácidos indol-3- acético (AIA), naftalenacético (ANA) e indol-3- butírico (AIB). El AIB es más usado, en mayor concentración en gran número de especies, ya que el nivel de toxicidad es mínimo y químicamente es mayormente constante que el AIA, quiere decir que al conectar



con el sustrato de propagación el AIB es un producto químico constante el cual se reserva aledaño al lugar de la utilización (Hartmann *et al.*, 2002).

Las exigencias de dichas sustancias se transforman ampliamente con las tipologías de tejidos y los niveles endógenos de estos reguladores, un propósito del cultivo *in vitro* (Pierik, 1990).

(Pierik, 1990) mencionan sobre las citoquininas impulsan la división de las células y estimula brotes adventicios en callogénesis y organogénesis. Utilizan agregados para la difusión de tallos axilares por el rompimiento de la dominancia apical. Las citoquininas utilizadas son: BAP (bencilamino purina), kinetina y 2-ip (isopentenil-adenina). Habitualmente son disueltas con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio (Pierik, 1990).

#### **2.1.5. Necrosis y clorosis**

Para comprender el significado de necrosis se debe saber el origen dicha palabra. Necrosis llega de ‘Nekrós’, vocablo oriundo de Grecia con significado de cadáver y ‘-osis’, una terminación que define declinación y deterioro del organismo, dicho caso, artrosis con un significado de pérdida de articulación. En la muerte de los tejidos es declive de tejido puede pasar por dos razones: un trauma (lesión directa) o por inhabilidad de ajuste del mismo tejido (suele darse por exigir en mayor intensidad al tejido o de otro modo exigir al tejido en pésima condición y este desierta de cumplir su función). Un tejido extinto se declina, se vuelve absorber y es reemplazado por diferente tejido, un tejido que es fibroso, menor nivel definido y no funcional (o sea, cumple distinta función) (Junquera, 2018).

Así mismo, Agrios (2004) menciona que la necrosis, es la muerte total de los tejidos ocasionado por el ataque de factores bióticos o abióticos. De igual manera RAE (2019) menciona que la degradación del tejido por la destrucción de las células es la necrosis.

La clorosis es el amarillamiento de las partes verdes de una planta a causa de la falta de trabajo de sus cloroplastos (RAE, 2019). La clorosis de las plantas es una dificultad que condiciona el crecimiento de los cultivos en suelos de pH superior o calcáreos. La sintomatología característica es una clorosis internerval que daña más a las hojas jóvenes que a las maduras. Habitualmente se sostiene que la carencia se produce por una disminución de

hierro (Fe) en estos suelos, asociado con una disminución en la absorción y translocación dentro de la planta. Por otro lado, la dificultad de la clorosis en las plantas que crecen en suelos calcáreos no es completamente entendido aún (Mengel, 1995).

La insuficiencia de hierro es alta, cuando se torna un color amarillo de las hojas, signo que se reconoce como clorosis férrica. No obstante, los suelos, mayormente, contienen mayor proporción de hierro total, este elemento no se halla en forma utilizable para las plantas, ya que forma óxidos e hidróxidos férricos de muy baja solubilidad (Loeppert, 1988).

Los medios comprometen ser ajustadas para el tipo de especie, acatando el nivel de lignificación de la estaca y la permanencia de la inmersión no puede ser extensa para advertir la intoxicación y posterior fase de necrosis. En el empleo de reguladores de crecimiento para un desarrollo de raíz se torna cuando existe un equilibrio en las citoquininas/auxinas en nivel alto. Consiguientemente, es inevitable que exista un equilibrio entre auxinas, giberelinas y citoquininas, es decir, un balance de generadores e inhibidores de la fase de preparación radicular (Blazich 1988).

## 2.2. Estado del arte

Aponte (2008) desarrolló un protocolo en desinfección de *G. crinita* y *C. odorata*, buscando germinarla *In vitro*, experimentó desiguales duraciones en la inmersión de hipoclorito de sodio al 2%, en 10, 30 y 40 min. Estos resultaron, para obtener 0% de desinfección en el cedro, trabajó con 40 min de exposición al desinfectante; por otro lado, la bolaina blanca necesitó unos 30 min, con similares resultados. Finalmente, el porcentaje de germinación se logró un 26,66% y 28% para el cedro y bolaina respectivamente.

Huamán *et al.* (2012) determinaron un protocolo para multiplicar plantas de cedro a desde segmentos. El explante fue cultivado en medio MS (1962) 1/2 adicionado con carbón activado + agar y diferentes dosis de fitohormonas: i) Tres concentraciones de BAP y dos concentraciones de ANA, en el que las variables evaluadas fueron altura de plantas, número de nudos, porcentaje de enraizamiento, longitud de raíces. Los resultados mostraron que en diferentes concentraciones las fitohormonas repercutieron equitativamente en el desarrollo *in vitro* del cedro, lográndose plantas con buen crecimiento de raíces. Por consiguiente, el T<sub>2</sub>

(0,5 mgL<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mg. L<sup>-1</sup> de ANA) indujo al desarrollo de plantas con altura de 4,82 cm, con 2,87 de nudos y 100% de desarrollo de raíces, con diferencias significativas al resto de tratamientos. Igualmente, todas las concentraciones de BAP obtuvieron resultados eficaces para la brotación de segmentos nodales, el T<sub>4</sub> (1 mg. L<sup>-1</sup> de BAP) dio como resultado mayor número de nudos, pero con altura inferior en comparación con los demás tratamientos, estas diferencias no fueron significativas.

Pérez *et al.* (2002) realizaron la micropropagación del Cedro. En esta investigación se trabajó con plántulas de un mes con medio de cultivo MS (1962) adicionando BAP, kinetina y 2-iP (2,2, 6,5, 13,3, 20 µM). La conducta de dichos explantes en contacto con citoquininas nos dieron como resultado: los tratamientos con 6,5 µM de BAP obtuvo un porcentaje de brotación de 60,8% con una altura de 1cm aproximadamente, con favorable resultado; por otro lado, los siguientes tratamientos no mostraron diferencias significativas 2,2 µM de BAP y 2,2 µM de kinetina con 33% y 33,2% respectivamente, con una altura de 0,16 cm aproximadamente. Por otro lado, los tratamientos con 20 µM de BAP, 6,5 µM de kinetina y 13,3 o 20 µM de 2-iP dieron un resultado bajo en desarrollo de brotes, pero con un desarrollo de callos en los explantes. En conclusión, (BAP) a un nivel de 2,2 y 6,5 µM resultaron favorecedores al desarrollo de brotes en explantes, a pesar de ello la longitud de los brotes no da garantía de un éxito posterior.

Huamán (2014) realizó una investigación en la micropropagación de cedro, con diversas dosis de reguladores de crecimiento en explantes nodales para el desarrollo de raíz y brotes. Se trabajó con plantas de un mes de edad, con el medio de cultivo MS (1962) a esto se le adiciono 6-bencilaminopurina (0,5, 1,00, 2,00 mg. L<sup>-1</sup>) y ácido 1-naftalenacetico (0,00, 0,1, 0,25 mg. L<sup>-1</sup>). Como resultado en la variable altura se tiene como mejor tratamiento BAP (0,5mg. L<sup>-1</sup>) con 4,34 cm y a los tratamientos ANA (0,00 mg. L<sup>-1</sup>) con 4,13 cm, (0,1 mg. L<sup>-1</sup>) con 4,16 cm, (0,25 mg. L<sup>-1</sup>) con 4,01 cm. En la variable número de hojas el mejor tratamiento fue BAP (1,00 mg. L<sup>-1</sup>) con un promedio de 3,46 hojas; para la variable número de raíces se obtuvo con el tratamiento BAP (1,00 mg. L<sup>-1</sup>) un promedio 5,72 raíces; para la variable longitud de raíz con el tratamiento BAP (0,05 mg. L<sup>-1</sup>) con promedios de 9,79 cm. En conclusión, concentración de BAP (0,05 mg. L<sup>-1</sup>) incrementa el desarrollo de brotes laterales, formación y desarrollo de raíz a comparación de concentraciones BAP (1,00 mg. L<sup>-1</sup>) estimula el desarrollo de hojas por explante.

Remache (2011) en su investigación para micropropagar in vitro *Cedrela montana*. Se usaron plantas de tres meses de edad y con cuatro tratamientos i) WPM + ANA (0,5 ppm) + BAP (0,2 ppm), ii) MS + kinetina (4 ppm), iii) MS ½ + BAP (0,0065 ppm) + kinetina (0,246 ppm), iv) MS ½ + ANA (0,5 ppm) + BAP (0,2 ppm). Para los resultados se presentó el medio más eficiente para multiplicar ápices fue el MS+ kinetina (4 ppm) dicho medio permitió el desarrollo de nuevos brotes a los 15 días con un promedio de 4,9 mm, a los 90 días un promedio de 5,8 mm. En este trabajo se presentaron diferencias significativas entre el cultivo de ápices y de entrenudos.

García *et al.* (2011) realizó la propagación in vitro de cedro desde brotes vegetativos jóvenes usando esquejes de brotes jóvenes de plantas adultas con 5 cm de longitud y medio de cultivo MS (1962). Para la fase de desinfección se trabajaron con dos tratamientos: i) Hipoclorito de sodio al 1% y 5% por 10, 20 y 30 min y ii) Propiconazol CE 25 ((2 RS, 4RS, 2 RS, 4 SR)-1-[2-(2,4-diclorofenil)-4-propil-1,3-dioxolan-2-ilmetil] por 1 hora. Este último permitió un alto porcentaje de desinfección de explantes, por ende, la respuesta morfológica fue eficiente en brotes. Para la fase de multiplicación se usaron los seis tratamientos: i) AIA 1,0 mg. L<sup>-1</sup>, ii) AIA 2,0 mg. L<sup>-1</sup>, iii) AIA 3,0 mg. L<sup>-1</sup>, iv) ANA 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, v) ANA 2,0 mg.L<sup>-1</sup>, vi) ANA 3,0 mg.L<sup>-1</sup>. El mayor desarrollo de hojas y tallos se obtuvo con los tratamientos con AIA 3,0 mg. L<sup>-1</sup>, ANA 2,0 mg. L<sup>-1</sup> y ANA 3,0 mg. L<sup>-1</sup>; para el incremento de longitud de estos explantes el mejor tratamiento fue ANA 0.3 mg. L<sup>-1</sup> que generó una altura media de 3,93 cm a esto la adición de concentraciones de ANA mejoró la altura de los brotes del explante. Para la formación de raíces a mayor dosis de AIA Y ANA (3,0 mg. L<sup>-1</sup>) generaron eficientemente el desarrollo de raíces, sin embargo, mostraron oxidación parcial; en comparación con el tratamiento ANA 0,2 mg. L<sup>-1</sup> que mostró raíces más vigorosas y pigmentadas, con buena formación de raíces cortas secundarias.

Arteaga *et al.* (2020) en su investigación de la esterilización de fragmentos de nudo en dosis de 3% para Ca (ClO)<sub>2</sub> y NaOCl por 10, 15 y 20 minutos en cada experimento. Dichas muestras que sobrevivieron se trasladaron a los medios de cultivo como MS, WPM e hidropónico LM para su desarrollo. Por consiguiente, se colocaron en niveles de BAP (0,1, 0,5 y 1 mg/l) y ANA (0,1 y 0,5 mg/l) en el proceso de propagar. Los brotes más sobresalientes se colocaron en WPM a diversas concentraciones de BAP (0,5 y 1 mg/l) y ANA (1 y 2 mg/l) para el desarrollo de raíz. El tratamiento con NaClO al 3% por 15 minutos tuvo un alto % de sobrevivencia de los segmentos nodales (87%). La fase de desarrollo en el cultivo más eficiente fue el WPM que produjo brotes de aproximadamente 7,20 mm. En la fase de

propagación la concentración de 1 mg/l de BAP promovió brotes de aproximadamente 8 mm y en la etapa del desarrollo de raíz, fue el experimento que comprendía 1 mg/l de ANA en el que se logró la alta cantidad de raíz en un periodo de 50 días.

Acanda *et al.* (2008) determinaron una técnica de multiplicación para el Cedro a partir de explantes nodales, se trabajó con explantes jóvenes en medio de cultivo MS (1962). Para la iniciación de brotes axilares se usó BAP (0, 0,25, 0,5, 1 y 2 mg. L<sup>-1</sup>) y para la fase de elongación de los brotes axilares ANA (0, 0,25, 0,5 o 1 g/l). El tratamiento de BAP con 0,25 mg. L<sup>-1</sup> mostró la mejor respuesta en generación de brotes, en cambio, altas concentraciones de BAP favorecieron la formación de callos en la base del explante; por otro lado, en la elongación de brotes el 86,3% de brotes axilares no alcanzaron 1 cm de longitud, mientras que un ensayo posterior con medio de cultivo sin adición de auxinas tuvo un resultado de 2cm de longitud en brotes.

Sampayo *et al.* (2016), realizaron un procedimiento para propagar *in vitro* de *C. odorata*. Al medio MS se le adiciona antioxidantes, antiséptico y auxinas se logró un 55% de establecimiento, por otro lado, la etapa de propagación el medio MS adicionándole una concentración alta de auxinas benefició la emisión de brotes (95%) y gran parte de los medios beneficiaron el alargamiento de los mismos. *C. odorata* presentó buen nivel de desarrollo de raíz todavía sin auxinas, pero el medio MS adicionándole con 0.1 ml L<sup>-1</sup> de AIB y 0.1 ml L<sup>-1</sup> de ANA fue mayor en el enraizamiento (12%), en conclusión como consecuencia del medio de cultivo es concluyente para establecer, multiplicar y enraizar *in vitro* de *C. odorata*. Al igual que el genotipo ya establecido muestra un resultado de sobrevivencia y respuesta de raíz.

Jiménez *et al.* (2007) lograron reducir el nivel de contagio microbiano y aumentaron la resistencia *in vitro* de *C. odorata*. En las plantas donadoras se realizó el incremento de vigor. Se realizó la colección en diversas etapas de periodos estaquillas de 1-2 cm de diámetro y 25 cm de longitud estas fueron plantadas en una cámara para cultivo. Se aplicó una solución con fitohormonas para valorar su resultado sobre el proceso de brote, y desarrollaron brotes y raíces. Se usaron brotes juveniles expuestos por las estacas que tomaron el tratamiento con fungicidas para reducir el contagio *in vitro* y se equipararon con los ápices y fragmentos nodales obtenidos directamente de las plantas en campo y de la cámara para cultivo, que no tuvo contacto con fungicidas. Se efectuó la etapa de esterilización de los explantes con

hipoclorito de sodio (NaClO) y resultaron ubicados en un caldo nutritivo con 6-BAP 0,25 mg. L<sup>-1</sup> y AIA 0,125 mg. L<sup>-1</sup>. Se aplicaron contenidos que estimularon los brotes y desarrollo de las yemas axilares y la manifestación de raíz en estacas. Resultó un 84% de sobrevivencia y 10% de contagio de explantes con la esterilización por 10 minutos por introducción en NaClO al 1,5%. Mostró lo indispensable que es ejecutar la revitalización del donador para establecer el cultivo *in vitro* de fracción nodal de cedro.

Carranza *et al.* (2013) trabajaron en la propagación clonal de caoba para establecer una técnica que facilite la multiplicación de sus explantes vía organogénesis. En esta investigación se utilizaron plantas de seis meses de edad, con explantes de 1,5 y 2 cm de longitud. Para la fase de multiplicación, con medio de cultivo MS con BAP (1,2 y 3 mg. L<sup>-1</sup>) y AIB (0,5 y 1 mg. L<sup>-1</sup>), como resultado se obtuvo como mejor tratamiento MS adicionado 2 mg. L<sup>-1</sup> de BAP y 1 mg. L<sup>-1</sup> de AIB que generó un 70% de brotación sana. Para la etapa de multiplicar se trabajó con medio MS con AIB en concentraciones de 1, 1,5, 2 y 2,5 mg. L<sup>-1</sup>, como resultado se tuvo que con el tratamiento MS suplementado con BAP 2 mg. L<sup>-1</sup> + ANA 1 mg. L<sup>-1</sup> se lograron un 65% de explantes vivos de lo contrario no se obtuvo un resultado positivo, esto puede ser influenciado por el corto tiempo de evaluación o las bajas concentraciones de las fitohormonas, recomendaron trabajar con dosis altas a 2mg.L<sup>-1</sup> de BAP, ANA y AIA.

Collado *et al.* (2004) trabajaron en un estudio sobre el establecimiento *in vitro* para la propagación de caoba con el fin de propagar árboles élite, desde brotes jóvenes. Para la fase de desinfección de explantes se usaron dos concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl: 2,0% y 3,0%) en combinación de tres tiempos de exposición (10, 20 y 30 min). El mejor tratamiento fue la combinación de NaClO al 2,0% con un tiempo de exposición de 20 min. Para la fase de multiplicación se trabajó con el medio de cultivo MS (1962) ½ adicionado con (6-BAP) (0,1, 0,2, 0,3, 0,5 y 1,0 mg. L<sup>-1</sup>), al finalizar se tuvo como resultado favorable al tratamiento MS suplementado con 0,2 mg. L<sup>-1</sup> + (BAP) que obtuvo resultados significativamente superiores a las demás concentraciones.

Rojas y Hine (2019) desarrollaron un protocolo para establecer *in vitro* 2 clones (33 y 80) para mejoramiento genético forestal de caoba, en condiciones de invernadero. Para la fase de desinfección se colectaron los segmentos en una solución de 0,5 g/l de cisteína y posteriormente en 3 tratamientos: i) Hipoclorito de calcio 15% Ca(ClO)<sub>2</sub> + 0,1% de tween 80 por 20 min, ii) Hipoclorito de sodio 3,0% (NaClO) + 0,1% de tween 80 por 5 min, iii) Hipoclorito de sodio 3,0% (NaClO) + 0,1% de tween 80 por 5 min en bomba al vacío;

como resultado favorable de esta fase se obtuvo el tratamiento Hipoclorito de sodio 15%  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  + 0,1% de tween 80 por 20 min el cual dio un 55% de explantes libres de contaminación. Para la fase de multiplicación se cultivó en un medio MS (1962) adicionado con diferentes dosis de 6-BAP (0, 0,88, 1,33, 1,77 y 2,21  $\mu\text{M L}^{-1}$ , para el clon 80 el mejor resultado fue el tratamiento con 6-BAP (0,88  $\mu\text{M L}^{-1}$ ) donde se presentó favorable de brotes y hojas; para el clon 33 se tuvo como mejor resultado al tratamiento BAP (0,44  $\mu\text{M L}^{-1}$ ) donde dio un desarrollo de brote favorable.

Campos *et al.* (2020) desarrollaron un estudio en la micropropagación in vitro de caoba; donde utilizaron plantas de dos meses en un medio de cultivo MS (1962). Para la fase de desinfección se usaron hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) e hipoclorito de calcio ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ), ambos al 3% adicionando tres gotas de tween 80 durante periodos de 10, 15 y 20 min, como resultado se demostró que el hipoclorito de sodio al 2% durante 15 minutos generó un 87% de explantes sanos libres de contaminación, en comparación con las concentraciones alta y tiempo de exposición alto que los explantes se oxiden. En la etapa para multiplicar de las yemas axilares se trabajó con un medio de cultivo WPM adicionado con BAP (0, 0,1, 0,5, 1,0) y ANA (0, 0,1, 0,5). Como resultado el tratamiento WPM adicionado con diferentes dosis de BAP 1,0  $\text{mg. L}^{-1}$  desarrolló longitudes de brotes que alcanzaron un promedio de 8mm; por otra parte, el explante desarrolló el crecimiento de hojas. En la etapa de enraizar se usó el medio de cultivo WPM adicionado con BAP (0, 0,5, 1,0) y ANA (1,0, 2,0). Como resultado, el WPM adicionado de ANA 1,0  $\text{mg. L}^{-1}$  demostró ser el único tratamiento que estimulo el desarrollo y crecimiento de raíces en los explantes, generando un promedio de 9 mm con un porcentaje de 30%.

Rivero (2016) determinó un método para la regeneración in vitro del tornillo (*Cedrelinga cateniformis* Ducke (Ducke)), como un mejor medio de cultivo y dosis de hormonas y un procedimiento de esterilización para los explantes de hojas y yemas de tornillo. Conformado por 5 ensayos: multiplicar las yemas, callogénesis en las hojas, un procedimiento para esterilización combinada, callogénesis en las hojas y yemas en medio fungicida. Los logros obtenidos muestran: 1) Para el medio de cultivo más sobresaliente fue el MS con un 86% de estabilidad y callos viables. 2) Para las hormonas más sobresalientes en el desarrollo de callos en yemas fueron b4 y b5 que presentan el 80% y 90% del total. Del

mismo modo, las combinaciones más sobresalientes de hormonas con interacción del medio de cultivo con fungicida Benomil fueron T3 y T5 con 100% cada uno. 3) Para la combinación más sobresaliente para producir callos en hojas fueron T3, T4 y T5 con el 90, 90 y 100% del total y 4) En el protocolo óptimo para desinfectar hojas y yemas fue el Protocolo 2, asimismo la concentración más eficaz de fungicida dentro del medio de cultivo fue 2 g/L ya que facilitó el 0% de contaminación.

Navarro (2001) realizó la micropropagación a partir de yemas de la especie “tornillo” *Cedrelinga cateniformis* (Ducke) Ducke provenientes de plantas de 7-9 años de edad del Bosque Reservado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (BRUNAS). Para la instalación del ensayo se desinfectaron los explantes con detergente y lejía 2,5% + benlate al 2% por 5 minutos + alcohol 96% por 1 minuto. Para el desarrollo de brotes se colocaron los explantes en medio de cultivo MS (1962) con los siguientes tratamientos: T1: ANA (0,05g) +BAP (0,05g), T2: ANA (0,1g) + Inositol (0,05g), T3: ANA (0,5g) + Inositol (0,05g) donde los resultados señalan al T1 como el tratamiento que generó proliferación de masa celular; por otro lado, los T2 y T3 tuvieron una producción inferior de desarrollo debido al componente Inositol. Para la fase inducción de raíz se colocaron los explantes en medio de cultivo MS ½ (1962) adicionado con las siguientes dosis: i) AIA (0,04g) + cinetina, ii) Inositol (0,1g) + AIB (0,003g), iii) BAP (0,001g) donde se mostraron resultados negativos, es decir, no se observaron desarrollo de raíces al utilizar los tratamientos, esto debido a que las concentraciones y combinaciones de los reguladores de crecimientos no fueron adecuadas.

Castro *et al.* (2002) realizaron la propagación clonal in vitro de árboles plus de Teca (*Tectona grandis* L.) a partir de brotes epicórmicos de árboles de 18 de edad. La desinfección de esto explantes se realizaron con etanol (50%) por un minuto y nitrato de plata (0,5%) por cinco minutos. Se evaluaron dos medios de cultivos: MS (1962) y WPM adicionado con concentraciones de AIB (0, 0,1, 0,5, 1,0 y 2,0 mg/L). Como resultado se obtuvo que AIB entre 0,5 y 1,0 mg/L presentaron un porcentaje superior en el proceso del desarrollo de la raíz con un número de raíces promedio de 4 cm y una longitud de 1,6 cm, de lo contrario al ser la dosis más alta en desarrollo disminuye además de presenta callos en la base del explante. Por otro lado, en el desarrollo del número de hojas se tiene la dosis de AIB (0 mg/L) con un promedio de número de hojas de 4, esto significa que a dosis bajas el desarrollo es superior.



Rojas y Abdelnour (2012) comentaron en su investigación de la especie teca (*Tectona grandis* L. f.) donde experimentaron en el desarrollo de brotes in vitro de yemas de la especie, para la instalación del ensayo se trabajó con plántulas propagadas por semillas mediante cultivo in vitro, con un medio de cultivo MS (1962) adicionado con (BA) (0, 0,5, 1,0 y 2,0 mg/L<sup>-1</sup>) y (AIA) (0, 0,005, 0,01, 0,02). Para el resultado se observó que el 24% de yemas brotó sin necesidad de la adición de fitohormonas, estos brotes en ausencia de callo; el mejor resultado fue la dosis (0,005 mg/l) AIA que mostraron un 56% de inducción en brotación de yemas y 0% en desarrollo de callos, se puede concluir que a menor dosis de BA la inducción del callo es nula lo que es muy beneficioso cuando se requiere generar la planta sin dicho proceso.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Lugar de ejecución

La ejecución de la investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y Diversidad Molecular de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), ubicado en el Km 1,21 carretera Tingo María-Huánuco, distrito Rupa Ropa, provincia Leoncio Prado, región 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

Se utilizaron porciones de tallos con presencia de yemas axilares de *C. odorata* de plántulas de 2 a 3 meses de edad aproximadamente.

##### 3.2.2. Materiales y equipos

Autoclave, ambiente de incubación en temperatura de  $21 \pm 2$  °C, humedad 70 - 80% y fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, balanza analítica, refrigerador, microondas, destilador de agua.

##### 3.2.3. Reactivos

Medio basal Murashige & Skoog (MS 1962), medio Basal de Woody Plant Media (WPM) marca Sigma., reguladores de crecimiento: ácido naftalenacético (ANA) marca Sigma, Kinetina marca Sigma, alcohol medicinal 70% y 96%, hipoclorito de sodio al colocar las 3 dosis (0.5%, 1%, 1.5%), Mancozeb, Benomil y Ceftriaxona.

### **3.3. Metodología**

Se utilizó la metodología utilizada por Rivero (2016) modificada a su conveniencia para el diseño de los tratamientos con medio de cultivo y hormonas. La investigación se realizó en dos fases:

#### **3.3.1. Fase 1: Para la dosis óptima de desinfección para la propagación de *Cedrela odorata* L. “cedro colorado”**

En esta fase, la dosis óptima para la desinfección fue determinada mediante el siguiente procedimiento.

##### **3.3.2.1. Aislamiento del material vegetal**

Se germinaron las semillas de *C. odorata* en condiciones del Vivero Forestal de la Facultad de Recursos Naturales Renovables en sustrato de germinación compuesta de aserrín descompuesto. Luego se repicaron a las 4 semanas en sustrato (tierra negra, arena y aserrín en proporción 3:2:1 respectivamente).

Finalmente, se aislaron los plántones de *C. odorata* en un invernadero simple con plástico translúcido de 1 m x 1 m x 1.30 m, además de suministrarle una dosis de 5 mg/L de fungicida Mancozeb (de contacto) y Benomil (sistémico) dos veces por semana por un mes, antes de ingresar al laboratorio.

##### **3.3.2.2. Tratamientos de desinfección**

Se trasladaron las porciones de segmento con presencia de yemas axilares de *C. odorata* al Laboratorio de Biotecnología y Diversidad Molecular.

En el área de preparación de sustancias, se sumergió en agua con detergente al 2% por 10 min frotando las partes externas del material vegetal para después enjuagar, luego se sumergió en solución de 2 litros de agua con fungicida Mancozeb, Benomil y un bactericida Ceftriaxona (2 g/L, 2 g/L y 0,5 g/L respectivamente) por 1 hora.

En el área de siembra, se procedió a desinfectar los explantes con etanol al 70% por 2 min, siguiendo con hipoclorito de sodio (lejía) disuelto en tres dosis de 0,5%, 1%, y 1,5% por 15 min, teniendo como tratamientos:

$T_1 = \text{Alcohol 70\% por 2 min} + \text{hipoclorito de sodio 0,5\% por 15 min}$

$T_2 = \text{Alcohol 70\% por 2 min} + \text{hipoclorito de sodio 1\% por 15 min}$

$T_3 = \text{Alcohol 70\% por 2 min} + \text{hipoclorito de sodio 1,5\% por 15 min}$

Posteriormente se realizó el enjuague de los explantes con agua esterilizada 3 veces por 5 min.

### **3.3.2.3. Siembra de explantes**

Con la ayuda de una pinza y bisturí estériles se eliminó de 1 a 2mm de los extremos de los segmentos nodales antes de la siembra, esto debido a la acción de la desinfección con hipoclorito de sodio.

Las longitudes de los explantes fueron aproximadamente de 20 mm; se sembraron en cada tubo con el respectivo tratamiento, se sellaron con el papel aluminio y se reforzó con una tira de Parafilm.

Finalmente, los tubos se trasladaron a la cámara de cultivo bajo condiciones controladas de temperatura  $21 \pm 28$  °C, humedad 70 - 80% y fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

### **3.3.2.4. Evaluación de la contaminación de explantes**

La contaminación de los explantes por tratamiento se determinó contabilizando el número de explantes contaminados por tratamiento.

$$C\% = \frac{\# \text{ explantes contaminados} \times 100}{\text{total de explantes}}$$

Con los resultados de la dosis óptima de esta fase, se realizó la siguiente fase de organogénesis para los medios y niveles hormonales.

### **3.3.2. Fase 2: Para efecto medios de cultivos (MS Y WPM) y fitohormonas (Kinetina y ANA) en el crecimiento de brotes y raíces en explantes de *Cedrela odorata* L. “cedro colorado”**

Se realizó una esterilización de los materiales de vidrio (tubos, varillas, matraz, vaso de precipitado entre otros) y metal (gradillas, pinzas, bisturí), además, también se desinfectó la cámara de flujo laminar con alcohol 70% e hipoclorito de sodio al 4%. Esta fase estuvo compuesta por los siguientes factores y tratamientos:

#### **3.3.2.1. Identificación de los factores**

La identificación de los factores se realizó de acuerdo a la cantidad de variables independientes (medio de cultivo y dosis hormonal) debido que influenciaron en la variable dependiente:

#### **Factor A. Medio de cultivo basal**

a<sub>1</sub>: MS

a<sub>2</sub>: WPM

#### **Factor B. Dosis de reguladores de crecimiento**

b<sub>1</sub>: sin dosis de reguladores de crecimiento

b<sub>2</sub>: dosis: 0,35 mg/L de Kinetina y 0 mg/L de ANA

b<sub>3</sub>: dosis: 0,7 mg/L de Kinetina y 0,35 mg/L de ANA

b<sub>4</sub>: dosis: 1,05 mg/L de Kinetina y 0,7 mg/L de ANA

b<sub>5</sub>: dosis: 1,4 mg/L de Kinetina y 1,05 mg/L de ANA

b<sub>6</sub>: dosis: 1,75 mg/L de Kinetina y 1,75 mg/L de ANA

### 3.3.2.2. Disposición de los factores de estudio

Los tratamientos que se observan en la siguiente tabla resultaron de la combinación de los niveles de los factores considerados para el presente estudio, siendo 2 niveles del factor A y 6 niveles del factor B haciendo un total de 12 tratamientos aplicados al explante de *C. odorata* (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Descripción de los factores en estudio.

Medio	Hormona	Tratamientos	Descripción
MS (a <sub>1</sub> )	H <sub>1</sub> (b <sub>1</sub> )	T <sub>1</sub> (a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> )	Medio de cultivo MS sin balance hormonal
	H <sub>2</sub> (b <sub>2</sub> )	T <sub>2</sub> (a <sub>1</sub> b <sub>2</sub> )	Medio de cultivo MS y con balance de 0,35 mg/L de Kinetina y 0 mg/L de ANA
	H <sub>3</sub> (b <sub>3</sub> )	T <sub>3</sub> (a <sub>1</sub> b <sub>3</sub> )	Medio de cultivo MS y con balance de 0,7 mg/L de Kinetina y 0,35 mg/L de ANA
	H <sub>4</sub> (b <sub>4</sub> )	T <sub>4</sub> (a <sub>1</sub> b <sub>4</sub> )	Medio de cultivo MS y con balance de 1,05 mg/L de Kinetina y 0,7 mg/L de ANA
	H <sub>5</sub> (b <sub>5</sub> )	T <sub>5</sub> (a <sub>1</sub> b <sub>5</sub> )	Medio de cultivo MS y con balance de 1,4 mg/L de Kinetina y 1,05 mg/L de ANA
	H <sub>6</sub> (b <sub>6</sub> )	T <sub>6</sub> (a <sub>1</sub> b <sub>6</sub> )	Medio de cultivo MS y con balance de 1,75 mg/L de Kinetina y 1,75 mg/L de ANA
WPM(b <sub>1</sub> )	H <sub>1</sub> (b <sub>1</sub> )	T <sub>7</sub> (a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> )	Medio de cultivo WPM sin balance hormonal
	H <sub>2</sub> (b <sub>2</sub> )	T <sub>8</sub> (a <sub>2</sub> b <sub>2</sub> )	Medio WPM y con balance de 0,35 mg/L de Kinetina y 0 mg/L de ANA
	H <sub>3</sub> (b <sub>3</sub> )	T <sub>9</sub> (a <sub>2</sub> b <sub>3</sub> )	Medio WPM y con balance de 0,7 mg/L de Kinetina y 0,35 mg/L de ANA
	H <sub>4</sub> (b <sub>4</sub> )	T <sub>10</sub> (a <sub>2</sub> b <sub>4</sub> )	Medio WPM y con balance de 1,05 mg/L de Kinetina y 0,7 mg/L de ANA
	H <sub>5</sub> (b <sub>5</sub> )	T <sub>11</sub> (a <sub>2</sub> b <sub>5</sub> )	Medio WPM y con balance de 1,4 mg/L de Kinetina y 1,05 mg/L de ANA
	H <sub>6</sub> (b <sub>6</sub> )	T <sub>12</sub> (a <sub>2</sub> b <sub>6</sub> )	Medio WPM y con balance de 1,75 mg/L de Kinetina y 1,75 mg/L de ANA

### 3.3.2.3. Análisis estadístico

#### 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 conteniendo el explante.

#### Diseño del experimento

Para la esta investigación experimental se usó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo combinatorio bifactorial 2A (Medios de cultivo) x 6B (Niveles hormonales) para el cual se trabajó con 10 repeticiones.

El modelo aditivo lineal de la presente investigación es:

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

Dónde:

$Y_{ijk}$  = 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.

$\mu$  = Es el efecto de la media general.

$\alpha_i$  = Es el efecto del i-ésimo medio de cultivo (MS, WPM).

$\beta_j$  = Es el efecto de la j-ésima combinación de hormonas (dosis de Kinetina con dosis de ANA)

$(\alpha\beta)_{ij}$  = 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

Se realizó un análisis de normalidad (Kolmogorov - smirnov) a un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ , posterior a este se realizaron las pruebas no paramétricas.

#### - Prueba de U de Mann-Whitney

Para comparar dos muestras independientes (medios), esta prueba se utilizó para aquellas variables que no cumplieron con el supuesto de normalidad (Kolmogorvo-smirnov)

#### - Prueba de Kruskal-Wallis

Esta prueba no paramétrica fueron para las variables que no cumplieron con el supuesto de normalidad, y a la vez para comparar los niveles hormonales.

#### 3.3.2.4. Variables independientes y dependientes

- Variables independientes. - medio de cultivo (MS y WPM) y hormonas (Kinetina y ANA)
- Variables dependientes. - número y longitud.

La fase de organogénesis consistió en la ejecución del siguiente procedimiento:



### 3.3.2.5. Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo se consideró todos los nutrientes, minerales y adicionales propios del MS y WPM tales como macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y orgánicos (**Tabla 3**).

**Tabla 2.** Componentes para el medio de cultivo MS y WPM

Componentes /MS		Componentes/WPM	
Macronutrientes	mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	Macronutrientes	mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400
KNO <sub>2</sub>	1900	Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	556
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	KH <sub>2</sub> PO <sub>2</sub>	170
-	-	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	96
Micronutrientes	mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>	Micronutrientes	mg <sup>l</sup> <sup>-1</sup>
KI	0,83	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	-
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8
Na <sub>2</sub> -EDTA	37,3	Na <sub>2</sub> -EDTA	37,3
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	-	-
Vitaminas y orgánicos		Vitaminas y orgánicos	
Myo-Inositol	100	Thiamine HCl	1,6
Acido nicotínico	0,5	Pyridoxina HCl	-

Pyridoxina HCl	0,5	Acido nicotínico	0,5
Thiamine HCl	0,1	Myo-Inositol	100
Glycina	2,0	Glycina	-

Fuente: GAMBORG y PHILLIPS (1995).

Se prepararon 840 ml de medio de cultivo (MS y WPM) en proporciones iguales, que se determinó de la multiplicación de sus tratamientos, repeticiones y contenido del tubo de ensayo (T x R x 7 ml) y de acuerdo al stock de las concentraciones se pudo sacar las cantidades adecuadas de cada componente (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Concentraciones de los stocks para el medio de cultivo.

Descripción	Stock	1000 ml	840 ml
Macronutrientes	10x	100	84
Micronutrientes	100x	10	8,4
FeEDTA	100x	10	8,4
Mioinositol	100x	10	8,4
Ac. Nicotínico	100x	10	8,4
Piridoxina	100x	10	8,4
Tiamina	100x	10	8,4
Glicina	100x	10	8,4
Sacarosa		30 g/L	
Agar		4 g/L	

\* Para los medios MS y WPM.

Posteriormente fue adecuado el balance hormonal de la citoquinina (kinetina) y auxina (ácido 1-naftalenacético) con sus respectivas dosis para poder determinar la dosis adecuada en su medio de cultivo adecuado para cada tratamiento de la investigación.

Se mezclaron todos los componentes líquidos, se procedió a combinar el medio con las hormonas, conteniendo el respectivo tratamiento.

Posteriormente se agregó las cantidades de agar y la sacarosa, se mezclaron uniformemente y después fue llevado al horno microondas con el propósito de activar el agar. Después de ello, se repartió en cada tubo 7 ml de medio, siendo 10 tubos considerados como un tratamiento (10 repeticiones).

Luego fueron tapados con papel aluminio y administrados en el Autoclave para esterilizarlos a aproximadamente 15 Psi por 15 min, finalmente después de enfriarse se colocó a refrigerarse para comenzar a gelificar y conservar el medio hasta la siembra.

#### **3.3.2.6. Desinfección de explantes**

Con los resultados de la fase 1 de la dosis óptima se procedió a desinfectar los explantes con etanol al 70% por 2min, siguiendo con Hipoclorito de sodio (lejía) al 1% por 15 min para finalmente enjuagar en agua esterilizada 3 veces por 5 min.

#### **3.3.2.7. Siembra de explantes**

Con la ayuda de una pinza y bisturí estéril se eliminó de 1 a 2 mm de los extremos de los explantes antes de la siembra, esto debido a la acción de corrosión del hipoclorito de sodio. Se introdujeron los explantes en cada tubo con el respectivo tratamiento para luego sellarlo con papel aluminio y una tira de Parafilm para evitar el ingreso de agentes extraños. Finalmente, los tubos se trasladaron a la cámara de cultivo bajo condiciones controladas de temperatura  $21 \pm 28$  C., humedad 70 - 80% y fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

#### **3.3.2.8. Evaluación respuesta vegetativa (brotes y raíces)**

- **Brotes:** Se realizó el conteo de aparición de brotes y se estimó la longitud de estas con una regla milimetrada.

- **Raíz:** Se realizó el conteo de aparición de raíces y se estimó la longitud de éstas con una regla milimetrada.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Dosis óptima en la desinfección de segmentos de tallo de *C. odorata* “cedro colorado”

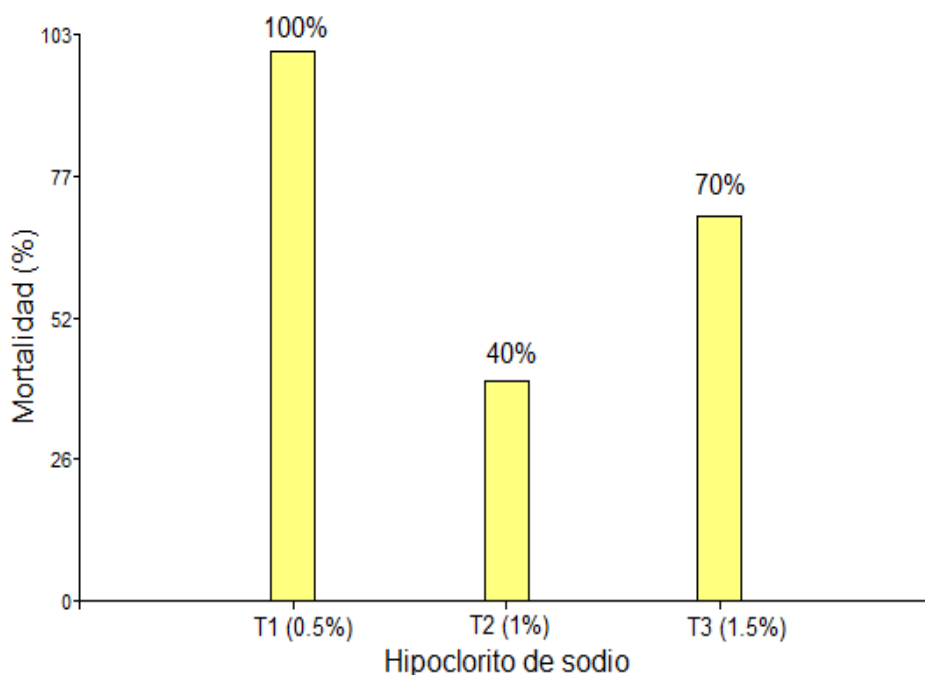
#### 4.1.1. Contaminación de explantes

En la investigación se demostró que el T<sub>2</sub> (Explante de *C. odorata* sometido a alcohol 70% por 2 min + hipoclorito de sodio 1% por 15 min) mostró sólo un 40% contaminación/mortalidad, seguido del T<sub>3</sub> (Explante de *C. odorata* sometido a alcohol 70% por 2 min + hipoclorito de sodio 1,5% por 15 min) que obtuvo una contaminación/mortalidad del 70% y en último lugar se encontró a T<sub>1</sub> (Explante de *C. odorata* sometido a alcohol 70% por 2 min + hipoclorito de sodio 0,5% por 15 min) que no alcanzó el nivel de desinfección esperado con un 100% de contaminación/mortalidad, siendo la dosis de 1% de hipoclorito de sodio la dosis adecuada (**Tabla 4 y Figura 1**). El tratamiento T<sub>2</sub> obtenido en este trabajo coincidió con Aponte (2008), sin embargo, este autor realizó la esterilización de semillas con hipoclorito de sodio al 2% por 40 min; la diferencia del tiempo de exposición puede influenciar en el tipo de explante ya que las semillas necesitan un mayor tiempo de contacto con la solución para desinfectar. Por otro lado, Campos *et al.* (2020) desarrollaron un protocolo de desinfección y micropropagación *in vitro*; donde utilizaron plantas de tres meses en un medio de cultivo MS (1962). Para la fase de desinfección se usaron hipoclorito de sodio al 2% durante 15 minutos generó un 87% de explantes sanos libres de contaminación, en comparación con las concentraciones alta y tiempo de exposición alto que los explantes que origina una oxidación.

**Tabla 4.** Porcentaje de mortalidad de explantes de *C. odorata* propagados *in vitro* a causa de la contaminación

Tratamientos	N° explantes instalados	N° explantes contaminados	Mortalidad (%)
T <sub>1</sub> (0.5%)	10	10	100
T <sub>2</sub> (1%)	10	4	40
T <sub>3</sub> (1.5%)	10	7	70

Ti: iésimo tratamiento de desinfección con hipoclorito de sodio.



**Figura 1.** Porcentaje de mortalidad de explantes de *C. odorata* a causa de contaminación *in vitro*

Por otro lado, coincidimos con Leifert *et al.* (2001), en la técnica del cultivo *in vitro* el principal problema es la contaminación que impide poder instalar los explantes en condiciones aptas, esto debido a que el porcentaje de contaminación que puede ocurrir es muy frecuente en el cultivo *in vitro* debido a múltiples factores que se desarrollan en el proceso de instalación. Similarmente a este trabajo, Pasqual y Ferreira (2007), usaron fungicidas de gran espectro antes al cultivo *in vitro*, dando resultados satisfactorios, más que todo en explantes de meristemas, para el dominio de gran escala de microorganismos, no generaron consecuencias de daño en el material vegetal; sin embargo, aunque no con la misma parte vegetal como explante se obtuvieron resultados efectivos.

#### **4.2. Efecto del medio de cultivo y fitohormonas en la longitud y respuesta vegetativa en segmentos de *Cedrela odorata* L. “cedro colorado”**

##### **4.2.1. Número y longitud de brotes**

###### **4.2.2.1. Número de brotes**

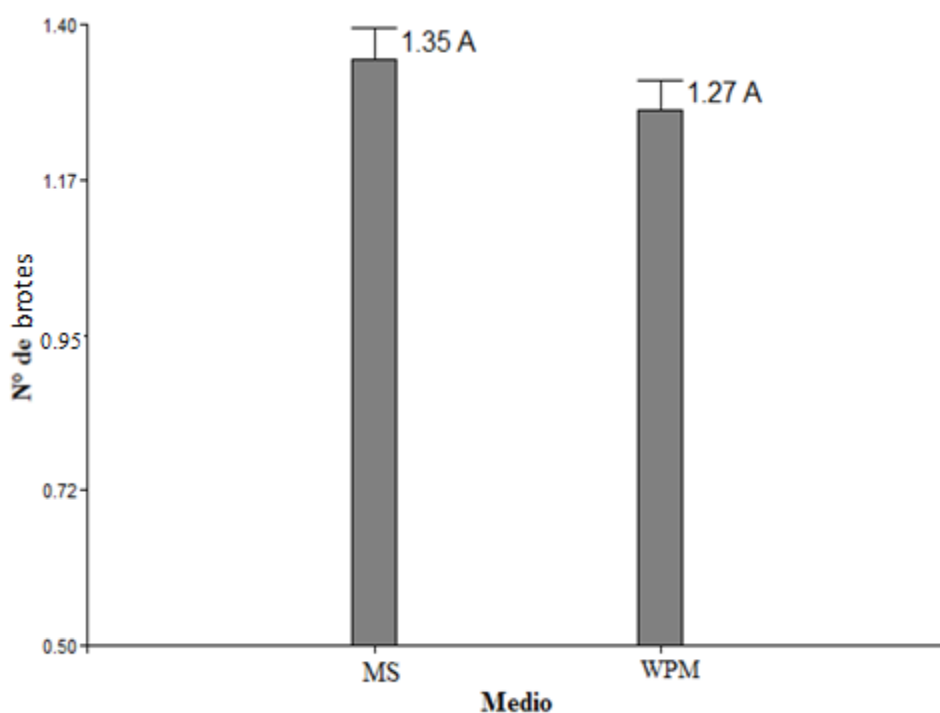
Para los medios de cultivo, ya que no cumplieron con el supuesto normalidad, en la **Tabla 5** se muestra el estadístico de U Mann Whitney de libre distribución, donde no se registró diferencias estadísticas significativas (p valor =0,4943).

**Tabla 5.** Estadístico prueba U Mann Whitney para número de brotes influenciados por los medios de cultivo

Medio	N	Media	U Mann Whitney	P-valor
MS	60	1,35	3748,5	0,4943
WPM	60	1,27		

**Tabla 6.** Comparación de medias del número de brotes en los medios de cultivo.

Medio	N	Media	Sig.
MS	60	1.35	A
WPM	60	1.27	A



**Figura 2.** Número de brotes del explante de *C. odorata* de acuerdo a los medios de cultivo.

Por otro lado, para los niveles hormonales, la prueba de Kruskal Wallis para la variable número de brotes del segmento de tallo de *C. odorata* mostró que existen diferencias altamente significativas ( $p$ -valor= 0,0001) entre los tratamientos, lo que significa que los niveles hormonales son diferentes entre sí (**Tabla 11**).

**Tabla 7.** Estadístico prueba de Kruskal Wallis para el número de brotes influenciados por los niveles hormonales

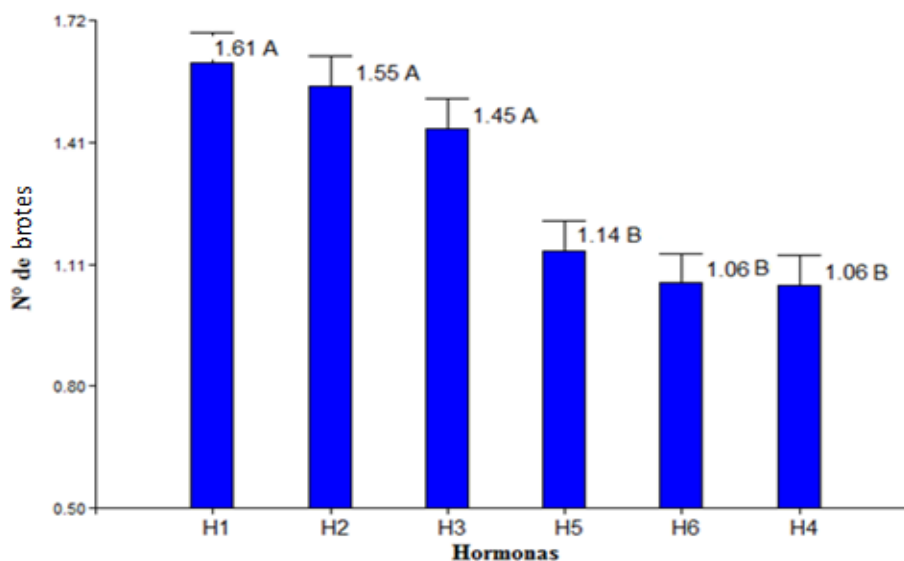
Hormonas	N	Medias	D.E	Mediana	gl	H	p - valor
H <sub>1</sub>	20	1,61	0,51	1,73	5	33,31	0,0001
H <sub>2</sub>	20	1,55	0,44	1,57			
H <sub>3</sub>	20	1,45	0,32	1,41			
H <sub>4</sub>	20	1,06	0,18	1,00			
H <sub>5</sub>	20	1,14	0,20	1,00			
H <sub>6</sub>	20	1,06	0,15	1,00			

En la (**Tabla 8**) para el número de brotes del explantes influenciado por niveles hormonales, donde demostró que los efectos son diferentes al dividirlos en dos grupos, del cual podemos mencionar que de acuerdo con la media de la longitud total el balance H<sub>1</sub> (sin balance hormonal) con un valor de 1,61 cm demostró mayores resultados con respecto a los balances H<sub>4</sub> (Balance: 1,05 mg/L de Kinetina y 0,7 mg/L de ANA) con un valor de 1,06 cm.

**Tabla 8.** Comparación de medias de los números de brotes en niveles hormonales

Hormonas	Descripción	Medias	Rangos	Sig
H <sub>1</sub>	Sin balance hormonal	1,61	80,23	A
H <sub>2</sub>	Balance: 0,35 mg/L de Kinetina y 0 mg/L de ANA	1,55	79,13	A
H <sub>3</sub>	Balance: 0,7 mg/L de Kinetina y 0,35 mg/L de ANA	1,45	76,10	A
H <sub>5</sub>	Balance: 1,4 mg/L de Kinetina y 1,05 mg/L de ANA	1,14	49,10	B
H <sub>6</sub>	Balance: 1,75 mg/L de Kinetina y 1,75 mg/L de ANA	1,06	39,90	B
H <sub>4</sub>	Balance: 1,05 mg/L de Kinetina y 0,7 mg/L de ANA	1,06	38,55	B

Las letras agrupadas en columnas de la misma letra simbolizan que no presentan diferencia significativa



**Figura 3.** Números de brotes del explante de *C. odorata* de acuerdo a las hormonas.

En tal sentido, los efectos de las variables fueron altamente significativos para los niveles hormonales, es decir que generan diferentes efectos en el número de brotes del explante de *C. odorata*, el H<sub>1</sub> (Explante sembrado en medio MS sin balance hormonal) y el H<sub>2</sub> (Explante sembrado en medio MS con 0,35 mg/L de Kinetina y 0 mg/L de ANA) presentan valores superiores con una media de 1,61 y 1,55 cm respectivamente. (**Tabla 8 y Figura 3**), de modo similar Huamán (2014) realizó una investigación en la propagación in vitro con el medio de cultivo MS (1962) adicionado con BAP (0,05 mg.L<sup>-1</sup>) incrementa el desarrollo de brotes laterales, a diferencia de nuestros resultados este componente actúa solo y al ser una citoquinina origina el desarrollo de la ramificación lateral influenciando en el desarrollo de brotes; por otro lado Remache (2011) realizó una investigación in vitro de cedro con los siguientes tratamientos : Medio WPM + ANA (0,5 ppm) + BAO (0,2 ppm) y MS+ kinetina (4 ppm), el mejor tratamiento fue MS+ kinetina (4 ppm) donde desarrollo nuevos brotes a los 15 días con un promedio de 4,9 mm, a los 90 días un promedio de 5,8 mm, coincide con nuestros resultados en factor medio de cultivo , pero no en el factor nivel hormonal, donde la concentración de Kinetina no supero los resultados del autor en el desarrollo y crecimiento de brotes, por otro lado, la dosis hormonal en el medio WPM obtuvo resultados inferiores. De la misma forma, Hine (2019) realizó una investigación con el fin para un mejoramiento genético forestal de caoba, para la fase de multiplicación se cultivó en EL medio MS (1962) adicionado con 6-BAP (0, 0,88, 1,33, 1,77 y 2,21  $\mu\text{M L}^{-1}$ , para el clon 80 el mejor resultado fue el tratamiento con 6-BAP (0,88  $\mu\text{M L}^{-1}$ ) en el que se observó un desarrollo favorable de brotes y hojas; para el clon 33 se tuvo como mejor resultado al tratamiento BAP (0,44  $\mu\text{M L}^{-1}$ ) donde dio un desarrollo de brote favorable, en conclusión el componente BAP desarrolla el



crecimiento de yemas y hojas, dicho elemento trabaja por sí solo y demuestra que actúa de forma positiva, sin embargo, la dosis BAP ( $0,44 \mu\text{M L}^{-1}$ ) también genera buenos resultados.

#### 4.2.2.2. Longitud de brotes

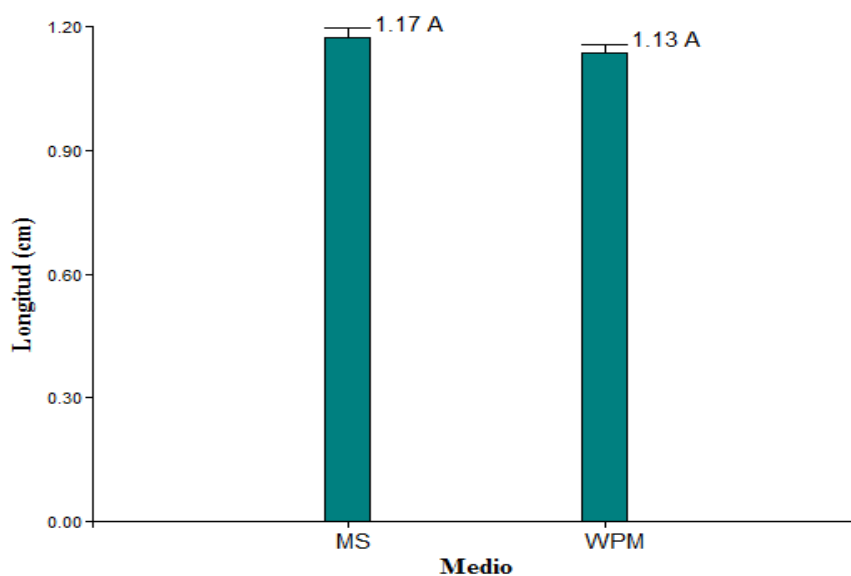
Para los medios de cultivo, ya que no cumplieron con el supuesto normalidad, en la **Tabla 9** se muestra el estadístico de U Mann Whitney de libre distribución, donde no se registró diferencias estadísticas significativas ( $p$  valor =0,4477).

**Tabla 9.** Estadístico prueba U Mann Whitney para la longitud de brotes influenciados por los medios de cultivo

Medio	N	Media	U Mann Whitney	P-valor
MS	60	1,17	3762,00	0,4477
WPM	60	1,13		

**Tabla 10.** Comparación de medias de la longitud de brotes en los medios de cultivo.

Medio	N	Media	Sig.
MS	60	1.17	A
WPM	60	1.13	A



**Figura 4.** Longitud de brotes del explante de *C. odorata* de acuerdo al medio de cultivo.

El análisis estadístico prueba Kruskal Wallis para la variable longitud de brotes del explante de *C. odorata* muestra que, para los niveles hormonales, existen

diferencias altamente significativas ( $p$ -valor= 0,0001) lo que significa que los niveles hormonales son diferentes entre sí (**Tabla 11**).

**Tabla 11. c**

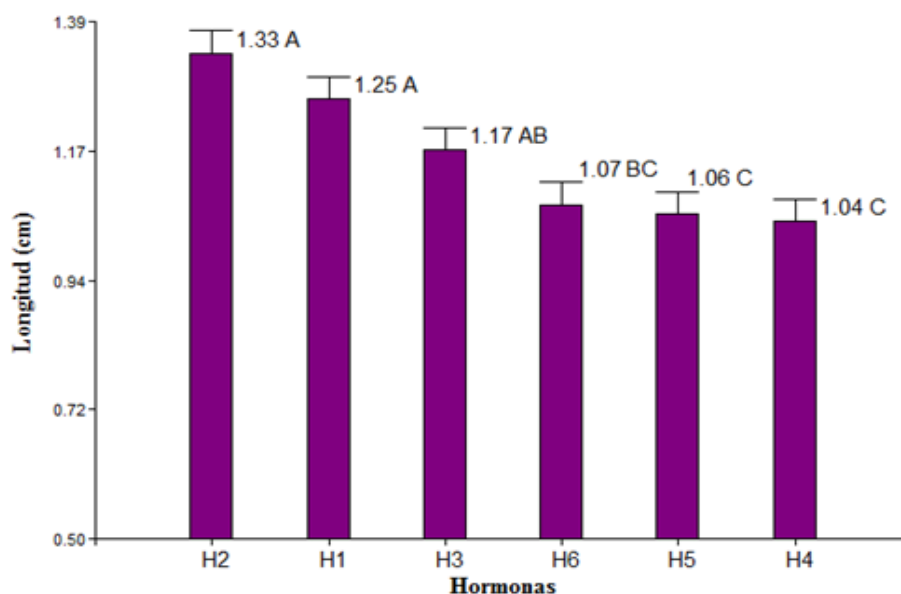
Hormonas	N	Medias	D.E	Mediana	gl	H	p - valor
H <sub>1</sub>	20	1,25	0,22	1,30	5	26,57	0,0001
H <sub>2</sub>	20	1,33	0,25	1,38			
H <sub>3</sub>	20	1,17	0,15	1,18			
H <sub>4</sub>	20	1,04	0,09	1,00			
H <sub>5</sub>	20	1,06	0,11	1,00			
H <sub>6</sub>	20	1,07	0,13	1,00			

En la (**Tabla 12**) para la longitud de brotes del explantes influenciado por niveles hormonales, donde demostró que los efectos son diferentes al dividirlos en tres grupos, del cual podemos mencionar que de acuerdo a la media de la longitud total el balance H<sub>2</sub> (Balance: 0,35 mg/L de Kinetina y 0 mg/L de ANA) con un valor de 1,33 cm demostró mayores resultados con respecto a los balances H<sub>4</sub> (Balance: 1,05 mg/L de Kinetina y 0,7 mg/L de ANA) con un valor de 1,04 cm.

**Tabla 12.** Comparación de medias de la longitud de brotes en niveles hormonales.

Hormonas	Descripción	Medias	Rangos	Sig
H <sub>2</sub>	Balance: 0,35 mg/L de Kinetina y 0 mg/L de ANA	1,33	84,93	A
H <sub>1</sub>	Sin balance hormonal	1,25	76,33	A
H <sub>3</sub>	Balance: 0,7 mg/L de Kinetina y 0,35 mg/L de ANA	1,17	66,48	AB
H <sub>6</sub>	Balance: 1,75 mg/L de Kinetina y 1,75 mg/L de ANA	1,07	47,45	BC
H <sub>5</sub>	Balance: 1,4 mg/L de Kinetina y 1,05 mg/L de ANA	1,06	45,33	C
H <sub>4</sub>	Balance: 1,05 mg/L de Kinetina y 0,7 mg/L de ANA	1,04	42,50	C

Las letras agrupadas en columnas de la misma letra simbolizan que no presentan diferencia significativa



**Figura 5.** Longitud de brotes del explante de *C. odorata* de acuerdo a las hormonas.

En tal sentido, para la variable niveles hormonales se obtuvieron resultados altamente significativos, es decir que los niveles hormonales generan diferentes efectos en la longitud de brotes del explante de *C. odorata*, el H<sub>2</sub> (Explante sembrado en medio MS con 0,35 mg/L de Kinetina y 0 mg/L de ANA) presentan valores superiores con una media de 1,33 cm. (Tabla 14 y Figura 7), Remache (2011) realizo una investigación en el desarrollo de una técnica con medio de cultivo MS + kinetina (4 pp) como resultado de esta investigación se obtuvo que dicho medio desarrollo nuevos brotes a los 15 días con un promedio de 4,9 mm, a los 90 días un promedio de 5,8 mm; por otro lado, Acanda *et al* (2008) determino al Cedro a partir de explantes nodales, en medio de cultivo MS (1962) para el desarrollo de brotes se colocaron los explantes en medio de cultivo MS (1962) donde los resultados i)AIA (0,04g)+ kinetina, ii)Inositol (0,1g) + IBA (0,003g), iii) BAP (0,001g) donde se mostraron resultados nulos, no se observaron desarrollo de raíces al utilizar los tratamientos, esto debido a que las concentraciones y combinaciones de los reguladores de crecimientos no fueron adecuadas, del mismo modo, Sampayo *et al.* (2016), realizaron un procedimiento para propagar in vitro de *C. odorata*, por yemas axilares, con el medio MS se le adiciona antioxidantes, antiséptico y auxinas, se logró adicionándole una concentración alta de auxinas benefició la emisión de brotes (95%), se concluye que medio de cultivo es concluyente para establecer, multiplicar y enraizar in vitro de *C. odorata*, de igual forma el genotipo ya establecido muestra un resultado de sobrevivencia y su respuesta morfológica.

## 4.2.2. Número y longitud de raíces

### 4.2.3.1. Número de raíces

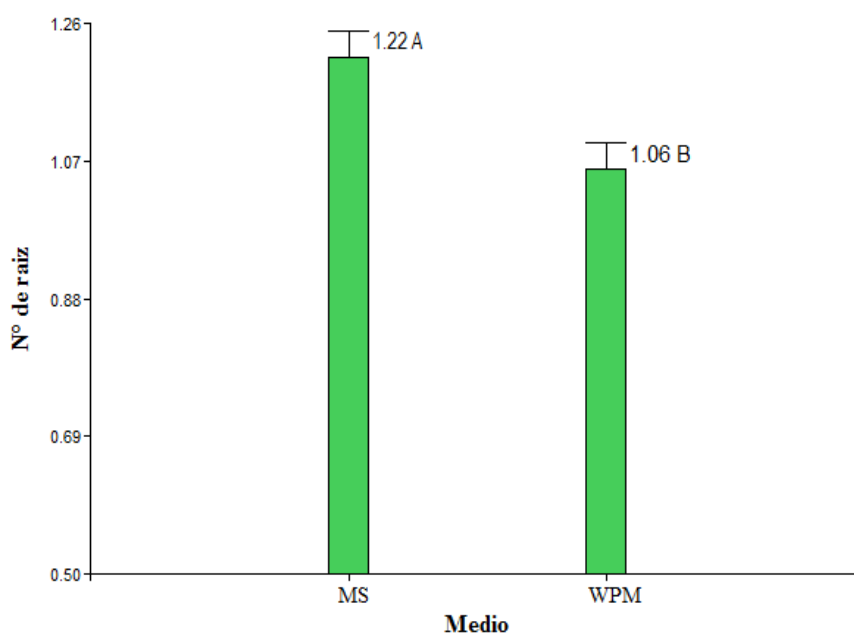
Para los medios de cultivo, ya que no cumplieron con el supuesto normalidad, en la **Tabla 13** se muestra el estadístico de U Mann Whitney de libre distribución, donde se registró diferencias estadísticas significativas (p valor =0,0405), en tal sentido presentan al medio de cultivo MS (1962) con 1,22 cm como el mejor medio para generar un efecto en el número de raíces (**Figura 6**)

**Tabla 13.** Estadístico prueba U Mann Whitney para el número de raíces influenciados por los medios de cultivo.

Medio	N	Media	U Mann Whitney	P-valor
MS	60	1,22	3910,5	0,0405
WPM	60	1,06		

**Tabla 14.** Comparación de medias del número de raíces en los medios de cultivo.

Medio de cultivo	N	Media	Sig.
MS	60	1,22	A
WPM	60	1,06	B



**Figura 6.** Número de raíces del explante de *C. odorata* de acuerdo a los medios de cultivo.

El análisis estadístico prueba Kruskal Wallis para la variable número de raíces del explante de *C. odorata* muestra que, para los niveles hormonales, existen diferencias altamente significativas ( $p$ -valor= 0,0087) lo que significa que los niveles hormonales son diferentes entre sí (**Tabla 15**).

**Tabla 15.** Estadístico prueba de Kruskal Wallis para el número de raíces influenciados por los niveles hormonales

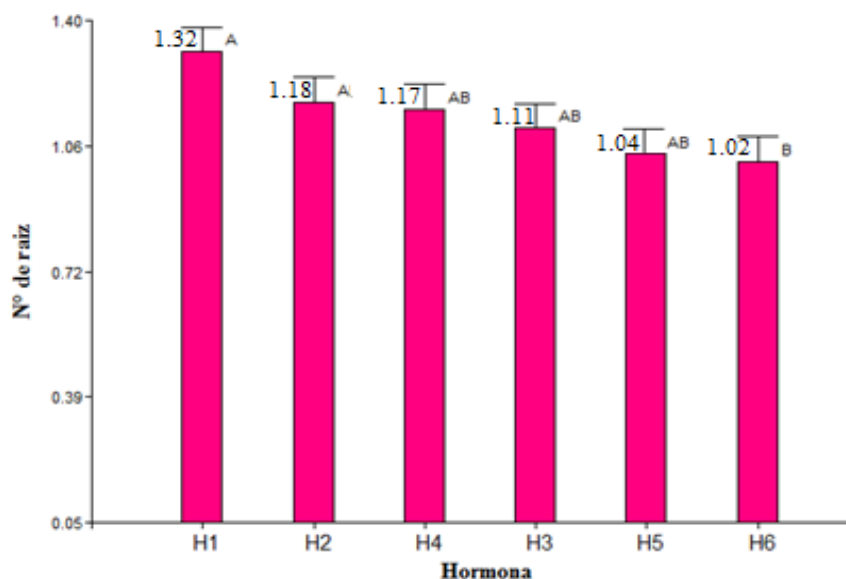
Hormonas	N	Medias	D.E	Mediana	gl	H	p – valor
H <sub>1</sub>	20	1,32	0,45	1,21	5	7,96	0,0087
H <sub>2</sub>	20	1,18	0,32	1,00			
H <sub>3</sub>	20	1,11	0,26	1,00			
H <sub>4</sub>	20	1,17	0,45	1,00			
H <sub>5</sub>	20	1,04	0,13	1,00			
H <sub>6</sub>	20	1,02	0,09	1,00			

En la (**Tabla 16**) para el número de raíces del explantes influenciado por niveles hormonales, donde demostró que los efectos son diferentes al dividirlos en dos grupos, del cual podemos mencionar que de acuerdo a la media de la longitud total el balance H<sub>1</sub> (Sin balance hormonal) con un valor de 1,32 cm demostró mayores resultados con respecto a los balances H<sub>6</sub> (Balance: 1,75 mg/L de Kinetina y 1,75 mg/L de ANA) con un valor de 1,02 cm.

**Tabla 16.** Comparación de medias del número de raíces en niveles hormonales.

Hormonas	Descripción	Medias	Rangos	Sig
H <sub>1</sub>	Sin balance hormonal	1,32	77,30	A
H <sub>2</sub>	Balance: 0,35 mg/L de Kinetina y 0 mg/L de ANA	1,18	65,78	A
H <sub>3</sub>	Balance: 0,7 mg/L de Kinetina y 0,35 mg/L de ANA	1,11	59,23	AB
H <sub>4</sub>	Balance: 1,05 mg/L de Kinetina y 0,7 mg/L de ANA	1,17	57,38	AB
H <sub>5</sub>	Balance: 1,4 mg/L de Kinetina y 1,05 mg/L de ANA	1,04	53,05	AB
H <sub>6</sub>	Balance: 1,75 mg/L de Kinetina y 1,75 mg/L de ANA	1,02	50,28	B

Las letras agrupadas en columnas de la misma letra simbolizan que no presentan diferencia significativa



**Figura 7.** Número de raíces del explante de *C. odorata* de acuerdo a las hormonas.

En tal sentido, la variable medio de cultivo obtuvo diferencias significativas y la variable niveles hormonales obtuvieron resultados altamente significativos, es decir que las variables generan diferentes efectos en el número de raíces del explante de *C. odorata*, el H<sub>1</sub> (Sin balance hormonal) presentan valores superiores con una media de 1,32 cm. (Tabla 16 y Figura 7), del mismo Huamán *et al* (2012) determinaron un medio de cultivo que permita la multiplicación y enraizamiento de plantas de cedro en medio MS (1962) adicionado con (0,5 mgL<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA) indujo al desarrollo de plantas con altura y a un 100% de desarrollo de raíces, con diferencias significativas al resto de tratamientos, al igual que en nuestros resultado el autor obtuvo desarrollo morfológico por lo que se concluye que la auxina ANA influye en el crecimiento de la variable número de raíz y que en combinación con la citoquinina BAP logra desarrollar un 100% de raíz. Por otro lado, Sampayo *et al.* (2016), realizaron un procedimiento para propagar in vitro de *C. odorata*, con medio MS adicionado con 0,1 ml L<sup>-1</sup> de AIB y 0,1 ml L<sup>-1</sup> de ANA fue mayor en el enraizamiento (12%), del mismo que el anterior autor la auxina ANA denota que es una hormona que influye en el crecimiento y desarrollo de la raíz, sin embargo el desarrollo tiene que ver también con el estado del explante y a esto las características genotípicas de la madre; agregando a lo anterior, Huamán (2014) realizó una investigación en la propagación in vitro de Cedro vía organogénesis, con el medio de cultivo MS (1962) adicionado de BAP (1,00 mg.L<sup>-1</sup>) para la variable número de raíces se obtuvo con un promedio 5,72 raíces, a diferencia de nuestros resultados el número de raíces fue superior; por otro lado Campos *et al.* (2020) trabajó en una investigación para el establecimiento in vitro de caoba; con el medio

WPM adicionado de ANA  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  demostró ser el único tratamiento que estimulo el desarrollo y crecimiento de raíces en los explantes, generando un porcentaje de 30%, lo que significa que el tipo de medio variará en relación a la especie y a las necesidades de macro y micronutrientes de estas especies, en este caso la especie Caoba reacciona positivamente con el medio WPM mostrando resultados en el desarrollo morfológico.

#### 4.2.3.2. Longitud de raíces

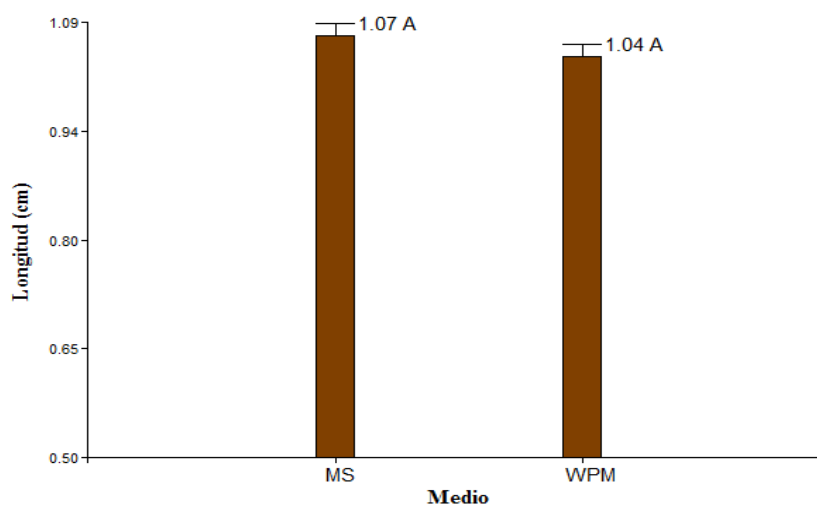
Para los medios de cultivo, ya que no cumplieron con el supuesto normalidad, en la **Tabla 17** se muestra el estadístico de U Mann Whitney de libre distribución, donde no se registró diferencias estadísticas significativas (p valor =0,2164).

**Tabla 17.** Estadístico prueba U Mann Whitney para la longitud de raíces influenciados por los medios de cultivo.

Medio	N	Media	U Mann Whitney	P-valor
MS	60	1,07	3815,00	0,2164
WPM	60	1,04		

**Tabla 18.** Comparación de medias de la longitud de raíces en los medios de cultivo.

Medio	N	Media	Sig.
MS	60	1.07	A
WPM	60	1.04	A



**Figura 8.** Longitud de raíces del explante de *C. odorata* de acuerdo al medio de cultivo

El análisis estadístico prueba Kruskal Wallis para la variable longitud de raíces del explante de *C. odorata* muestra que, para los niveles hormonales no existen diferencias significativas (p-valor= 0,2209) lo que significa que los niveles hormonales son similares entre sí (**Tabla 19**).

**Tabla 19.** Estadístico prueba de Kruskal Wallis para la longitud de raíces influenciados por los niveles hormonales.

Hormonas	N	Medias	D.E	Mediana	gl	H	p - valor
H <sub>1</sub>	20	1,10	0,15	1,05	5	4,32	0,2209
H <sub>2</sub>	20	1,10	0,20	1,00			
H <sub>3</sub>	20	1,03	0,06	1,00			
H <sub>4</sub>	20	1,08	0,17	1,00			
H <sub>5</sub>	20	1,02	0,05	1,00			
H <sub>6</sub>	20	1,02	0,04	1,00			

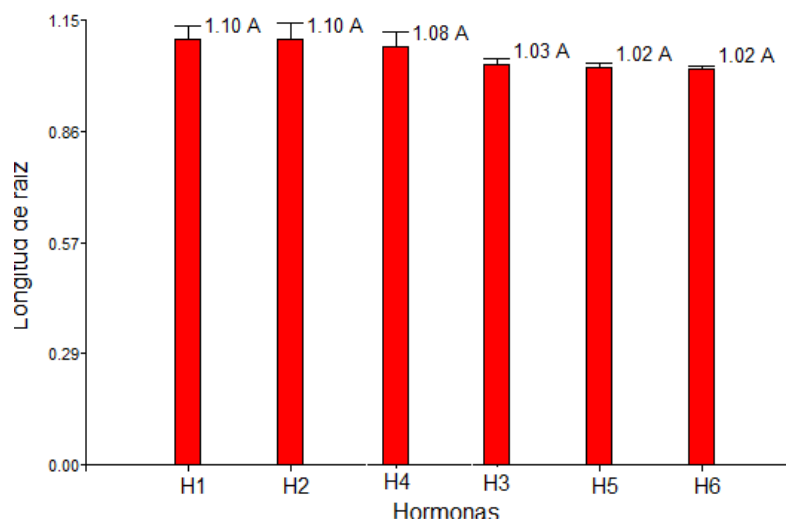
En la (**Tabla 20**) para la variable de longitud de raíces del explantes influenciado por niveles hormonales, donde demostró que los efectos son similares entre sí.

**Tabla 20.** Comparación de medias del número de raíces en niveles hormonales.

Hormonas	Descripción	Medias	Rangos	Sig
H <sub>1</sub>	Sin balance hormonal	1,10	73,65	A
H <sub>2</sub>	Balance: 0,35 mg/L de Kinetina y 0 mg/L de ANA	1,10	63,60	A
H <sub>4</sub>	Balance: 1.05 mg/L de Kinetina y 0,7 mg/L de ANA	1,08	58,30	A
H <sub>3</sub>	Balance: 0.7 mg/L de Kinetina y 0,35 mg/L de ANA	1,03	58,05	A
H <sub>5</sub>	Balance: 1,4 mg/L de Kinetina y 1,05 mg/L de ANA	1,02	55,20	A
H <sub>6</sub>	Balance: 1,75 mg/L de Kinetina y 1,75 mg/L de ANA	1,02	54,20	A

Las letras agrupadas en columnas de la misma letra simbolizan que no presentan diferencia significativa





**Figura 9.** Longitud de raíces del explante de *C. odorata* de acuerdo a las hormonas.

En tal sentido, los efectos de la variable longitud de raíces resultaron no significativos, es decir que los tratamientos generan efectos similares, el H<sub>1</sub> (Sin balance hormonal) presentan una media de 1,10 cm. (**Tabla 20 y Figura 9**), con respecto a nuestro trabajo Huamán (2014) realizó una investigación en la propagación in vitro de Cedro con el medio de cultivo MS (1962) adicionado con BAP (0,05 mg.L<sup>-1</sup>) para la variable longitud de raíz con promedios de 9,79 cm., en comparación con nuestros resultados la hormona BAP por sí sola logra una longitud superior a la hormona ANA en combinación con Kinetina, esto puede ser causa por la combinación y la saturación micro o macronutrientes para la plantas que inhibe su desarrollo. Por otro lado, García *et al* (2011) investigó una técnica de propagación in vitro de Cedro con medio de cultivo MS (1962) adicionado con dosis de AIA y ANA (3,0 mg.L<sup>-1</sup>) para la formación de raíces generan eficientemente el desarrollo de raíces, sin embargo mostraron oxidación parcial; en comparación con el tratamiento ANA 0,2 mg.L<sup>-1</sup> que mostro el resultados de raíces más vigorosas y pigmentadas, con buena formación de raíces cortas secundarias, del mismo muestran en los resultados que al trabajar con solo una hormona se obtiene resultados positivos y un buen desarrollo de raíces en comparación con la combinación de dos auxinas que provocan la oxidación fenólica que inhibe el desarrollo de la planta.

## V. CONCLUSIONES

1. Explante de *C. odorata* sometido a alcohol 70% por 2 min + hipoclorito de sodio 1% por 15 min generó el menor porcentaje de contaminación con 40%.
2. Todas las variables evaluadas, excepto longitud de brotes en el factor hormonal, mostraron numérica y estadísticamente que los niveles hormonales mayores a 0.35 mg/L de kinetina y mayores de 0 mg/L de ANA usados en esta tesis, influenciaron negativamente en el número de brotes, y número de raíces. Respuesta posiblemente atribuida al contenido endógeno hormonal de los segmentos nodales provenientes de plántones de *Cedrela odorata* de 2-3 meses de edad aproximadamente.

## **VI. PROPUESTAS A FUTURO**

1. Efectuar experimentos complementarios en la propagación clonal para evaluar otras dosis y combinaciones de hormonas para aumentar el índice de velocidad de propagación.
2. Continuar este trabajo de investigación en fases posteriores como la multiplicación y aclimatación en invernadero y posteriormente en vivero para evaluar mortalidad y la relación entre el medio de cultivo y las hormonas.
3. Realizar el mismo experimento, pero tomando como muestra vegetal árboles con características ya seleccionadas para incentivar al mejoramiento genético.
4. Desarrollar más combinaciones hormonales, pero ajustando el rango de los mejores tratamientos, con el fin de mejorar la precisión del balance hormonal, de igual manera para los medios de cultivos.

## VII. REFERENCIAS

- Acanda, Y., Rodríguez, R., Días, A. (2008). Multiplicación de *Cedrela odorata* L. a partir de explantes nodales. *Cuba tabaco*, 9(1), 42-47.
- Agrios, G. N. (2004). Fitopatología. México DF. Editorial LIMUSA. S.A.
- 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 jun. 2020).
- Aponte, F. (2008). *Determinación del protocolo de desinfección de semillas de bolaina blanca (Guazuma crinita, Mart.) y cedro (Cedrela odorata, L.) para germinación in vitro*. [Tesis pre grado, Universidad Nacional de Ucayali] Repositorio UNU.  
  
<http://repositorio.unu.edu.pe/handle/UNU/2124>
- Arteaga, M., Campos, L., Campos, S., Chico, J. (2020). Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación *in vitro* de "Caoba" *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). *Revista Arnaldoa*. 27(1)
- Blazich, F. (1988). Chemicals and formulations used to promote adventitious rooting. Dioscorides Press.
- Campos, J., Arteaga, M., Campos, S., Chico, J., Cerna, L. (2020). Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación *in vitro* de "caoba" *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). *Arnaldoa*, 27(1), 141-156.

- Carranza, M., Reyes, H., Mora, W., Cevallos, O., Escobar, A., Cadme, M., Nieto, J., Morante, J. (2013). Propagación clonal in vitro de *Swietenia macrophylla* King (CAOBA). *Ciencia y tecnología*, 6(2), 1-8.
- Castro, D., Díaz, J., Carlos, J. (2002). Propagación clonal in vitro de árboles elite de teca (*Tectona grandis* L.). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 4(1), 49-53.
- Collado, R., Barbon, R., Agramonte, D., Jiménez, F., Pérez, M., Gutiérrez, O., Ramírez, D. (2004). Establecimiento in vitro de ápices y segmento nodales de *Swietenia macrophylla* King. *Biotecnología vegetal*, 4(3), 143-146.
- CONAFOR (2007). Cedro (*Cedrela odorata* L.) Protocolo para su colecta, beneficio y almacenaje.
- Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press.
- García, R., Delgado, M., Gonzales, Y., Gonzales, A., Garriga, M., Galigari, P., Carrasco, B., Quiroz, K. (2011). *in vitro* propagation of cedar (*Cedrela odorata* L.) from juvenile shoots. *Revista Chilena de Investigaciones Agropecuarias*, 71 (3), 376-382.
- Gonzales, C., Vilca, J. (1998). Micropropagación Vegetativa *In vitro* De Aliso (*Alnus acuminata*). Edición Graficas de ADEFOR. Cajamarca, Perú.
- Gutiérrez, C., Oliva, M. (2003). Curso, principios y prácticas en el cultivo de tejidos vegetales, Teoría. San José, Costa Rica.
- Hartmann, H., Kester, J., Davies, F., Geneve, R. (2002). Principios y prácticas de propagación de plantas. Prentice Hall.

- Herrera, L., Lanuza Z. (1996). Especies para reforestación en Nicaragua. Nicaragua, Ministerio del Ambiente y Recursos Naturales (MADERA), Servicio Forestal.
- Herman, E.B. (1990). Bacterial Contamination in micropropagation. *Agricell Reporter*. 14:41-43.
- Hine, A., Rojas, A. (2019). Micropropagación de clones superiores de caoba (*Swietenia macrophylla King*) a partir de segmentos nodales. *Revista de ciencias ambientales*, 53(2), 47-59.
- Hoyos, J. (1985). Flora emblemática de Venezuela. Ernesto Armitano Editor.
- Huaman, X., Ruiz, M., Guerrero, J., Pichis, L., García, L., Solís, R. (2012). Propagación in vitro de segmentos nodales de Cedro (*Cedrela odorata L.*) obtenidos a partir de semillas botánicas. *Folia Amazónica*, 21(2), 109-114.
- Huaman, G. X. (2014). *Propagación in vitro de Cedro (Cedrela odorata L.) vía organogénesis* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de San Martín]. Repositorio Institucional UNSM.  
[https://repositorio.unsm.edu.pe/bitstream/handle/11458/589/TFCA\\_127.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unsm.edu.pe/bitstream/handle/11458/589/TFCA_127.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Jiménez, F., Barbón, R., La O, M., Pérez, M., Collado, R., Acosta, M., Alvarado, Y., Agramonte, D. (2007). Efecto de la revigorización en el establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de *Cedrela odorata L.* *Bioteología Vegetal*. 7(1).
- Junquera, I. (2018). Necrosis de tejidos. [En línea]: (<https://www.fisioterapia-online.com/videos/necrosis-de-tejidos-que-es-como-se-produce-y-cual-es-su-importancia>, revisado 12 ago, 2020).

- 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.
- Leifert, C., Cassells, C. (2001). Microbial Hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 37:137-138.
- Loeppert, R. H. (1988). Chemistry of iron in calcareous systems. pp. 689-714.
- 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.* [Tesis doctoral, Universidad complutense de Madrid]. Repositorio UCM <https://eprints.ucm.es/id/eprint/4275/>
- Lloyd, G., McCown, H. (1981). Woody Plant Medium (WPM) a mineral nutrient formulation for microculture of Woody Plant Species. *HortScience*, 16, 453.
- Marulanda, M., López, A., Uribe, M., Gutiérrez, L. (2010). Biodiversidad y biotecnología de la *Guadua angustifolia Kunth*. Risaralda. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia. 106 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.
- Mengel, K. (1995). Iron availability in plant tissues - iron chlorosis on calcareous soil. *Nutrition in Soils and Plants.* 389-397.

- 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 04 jun. 2020).
- Mostacedo, Bonifacio; Fredericksen, Todd S. (2000). Manual de Métodos Básicos de Muestreo y Análisis en Ecología Vegetal. Santa Cruz, Bolivia.
- Mroginski, L., Sansberro, P., Flaschland, E. (2010). Establecimiento de cultivos vegetales. En: Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Argenbio. INTA.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues culture. *Physiol Plant*. 15:473-497.
- Navarro, G. R. (2001). *Micropropagación de Cedrelinga cateniformis (Ducke) Ducke tornillo a partir de yemas*. [tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria de la Selva]. Repositorio Institucional UNAS.  
<http://repositorio.unas.edu.pe/handle/UNAS/607>.
- Olmos, S., Luciani, G., Galdeano, E. (2010). Micropropagación. En: Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hoop, E.; Mroginski, L. eds. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. p. 352-362.
- Pascual, M., Ferreira, E. (2007). Micropropagation of fig trees (*Ficus carica*). In Protocols for Micropropagation of Wood Trees and Fruit. Jain S.M., Haggman H. eds. Springer. p. 409-416.
- Perea, D. (1990). Biotecnología agrícola mediante la utilización de los sistemas *in vitro*. Agricultura de las Américas. Bogotá, Colombia.



- Pérez, J., Mesén, F., Hilje, L., Aguilar, M. (2012). Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L. Optimización de la fase de multiplicación. *Revista forestal Centroamericana*. 68(1), 67-71.
- 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://www.etsea2.udl.es/invitro/micropro.htm&usqDmicropropagacion%2B%2560%26hl%3Des%26lr%3Dlang\\_es%26sa%3DX%26um%3D1](http://www.etsea2.udl.es/invitro/micropro/explant3.gif&imgrefurl=http://www.etsea2.udl.es/invitro/micropro.htm&usqDmicropropagacion%2B%2560%26hl%3Des%26lr%3Dlang_es%26sa%3DX%26um%3D1), documentos 23 jun. 2020).
- RAE. (2019). Clorosis. Diccionario de la lengua española de la Real Academia Española – Clorosis. [En línea]: (<https://dle.rae.es/clorosis>, Consultado 18 de ago, 2020).
- RAE. (2019). Necrosis. Diccionario de la lengua española de la Real Academia Española – Necrosis. [En línea]: (<https://dle.rae.es/necrosis?m=form>, Consultado 18 de ago, 2020).
- Remache, L. M. (2011). Desarrollo de una técnica de micropropagación in vitro de Cedro (*Cedrela montana*) a partir de ápices, hojas y entrenudos [tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. Repositorio Institucional de ESPOCH. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/1823>.
- Rivero, F. (2016). *Determinación de un protocolo para la regeneración in vitro de yemas y hojas de tornillo (Cedrelinga cateniformes Ducke (Ducke))*. [Tesis pre grado, Universidad Nacional Agraria de la Selva] Repositorio Institucional UNAS. <http://repositorio.unas.edu.pe/handle/UNAS/1125>
- Rojas, F., Abdelnour, A. (2012). Brotación in vitro de yemas de teca *Tectona grandis* L. f. *Tecnología en marcha*. 25 (5), 67-72.

- Rojas, A., Hine, A., (2019). Micropropagación de clones superiores de caoba (*Swietenia macrophylla King*) a partir de segmentos nodales. *Revista de ciencias ambientales*, 53(2), 47-59.
- Sampayo, M., Castillo, C., Jasso, J., Jiménez, M., López, J., Sánchez, V. (2016). Efecto del medio de cultivo en la propagación *in vitro* de genotipos de *Cedrela odorata* L. Posgrado en Ciencias Forestales, Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. México. 8 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 jun. 2020).
- 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.
- Weaver, R. (1976). *Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura*. Editorial Trillas.

## **ANEXOS**

## Anexo 1. Datos de evaluación

**Tabla 21.** Datos de contaminación de la dosis optima de desinfección

Tratamientos		Evaluación final (Explante contaminado)									
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
<b>T<sub>1</sub></b>	Hipoclorito de sodio 0.5% x 15 min	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>T<sub>2</sub></b>	Hipoclorito de sodio 1% x 15 min	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
<b>T<sub>3</sub></b>	Hipoclorito de sodio 1.5% x 15 min	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1





## Anexo 2. Panel fotográfico



**Figura 10.** Construcción del mini-invernadero para el aislamiento de los plantones de *C. odorata*



**Figura 11.** Esterilización de materiales de vidrio y metal en la autoclave.



**Figura 12.** Verificación del Stock y preparación de dosis de hormonas como tratamiento de propagación *in vitro*



**Figura 13.** Preparación de medio de cultivo adicionando el tratamiento con dosis hormonal correspondiente





**Figura 14.** Pre-desinfección de las plantas de *C. odorata* antes de pasar a la desinfección



**Figura 15.** Desinfección, enjuague y siembra de las plantas de *C. odorata*.



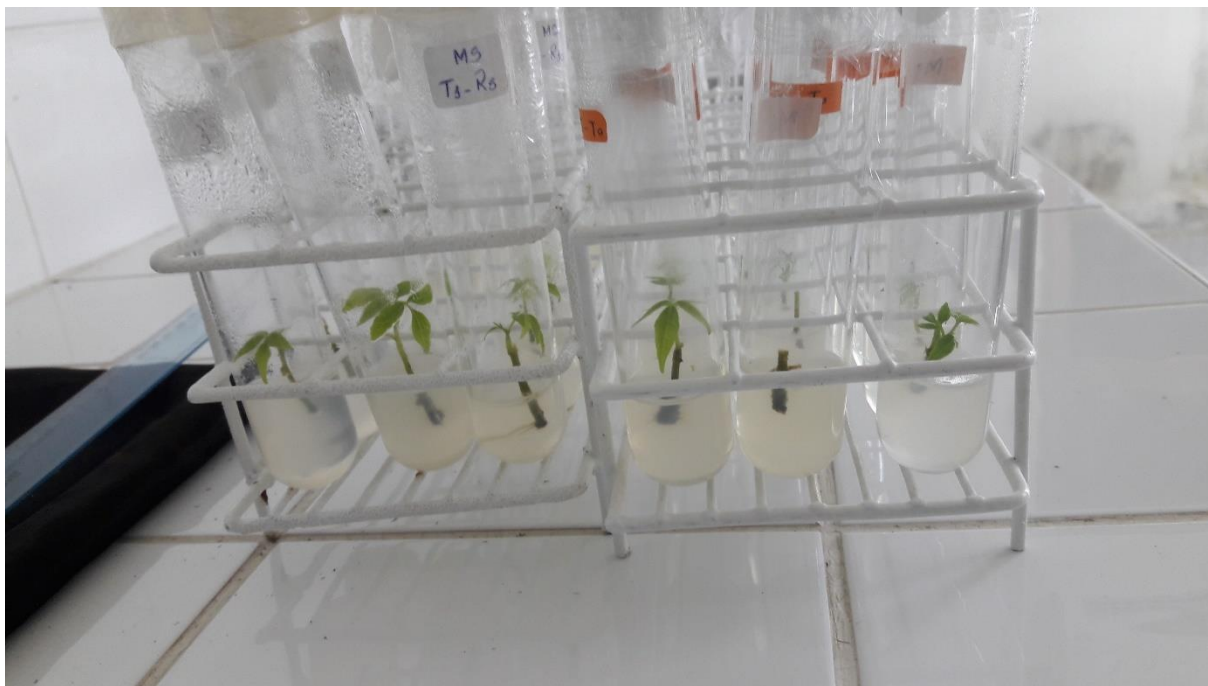
**Figura 16.** Siembra de segmentos de tallo de *C. odorata* en cámara de flujo laminar



**Figura 17.** Evaluación de contaminación de Segmentos de tallo de *C. odorata* en la primera semana



**Figura 18.** Evaluación de yemas, hojas y raíces de segmentos de tallo de *C. odorata*



**Figura 19.** Segmentos de tallo de *C. odorata* evaluados a los 30 días después de la siembra



**Figura 20.** Segmentos de tallo de *C. odorata* en la evaluación a los 55 días.