

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**

**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**

**RENOVABLES**

**Escuela Académica de Conservación de Suelos y Agua**



**“PROPAGACIÓN IN VITRO DEL SAUCE (*Salix alba*), PARA  
USO EN DEFENSA RIBEREÑA”**

**TESIS**

**Para optar el título de:**

**INGENIERO EN CONSERVACIÓN DE SUELOS Y AGUA**

**NEYRA VELASCO, IRIS MAGALY**

**Tingo María- Perú**

**2015**

## DEDICATORIA

A Dios, porque siempre está conmigo, en momentos felices y de dificultades, nunca me desamparo en todos mis años de estudio.

A mis queridos padres Antonio NEYRA ALVARDO e Irene VELASCO UBILLUS, por toda la confianza y el apoyo que me brindaron en las diferentes etapas de mi formación profesional.

A mis hermanos y demás familiares que me incentivaron a seguir adelante y a tener presente que podemos lograr todos nuestros objetivos poniendo nuestro esfuerzo y sacrificio y a mi abuela Iris Ubillus Roque, que me acompaña espiritualmente.

## AGRADECIMIENTO

- A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, en especial a la Facultad de Recursos Naturales – Carrera Profesional Ingeniería en Conservación de Suelos y Agua que contribuyeron con mi formación profesional.
- Al Blgo. M. Sc. Julio Alfonso Chía Wong y Ing. M. Sc. Levano Crisóstomo José, por su valiosa orientación, colaboración y supervisión de la tesis.
- A los miembros del Jurado de Tesis, Dr. López López Cesar, Ing. M.Sc. Ruiz Castre Sandro y el Ing. M.Sc. Aguirre Escalante Casiano por su colaboración en el presente trabajo.
- A C. M. S por estar siempre conmigo y haberme apoyado en la realización del presente trabajo.
- A todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi agradecimiento.

## RESUMEN

El trabajo de investigación se llevó a cabo entre Enero y Julio del 2015, en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, ubicado en el campus de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, con la finalidad de determinar un medio de cultivo y concentración de hormonas de AIB y KIN más apropiado para la propagación de yemas axilares de *Salix alba*, Sauce común provenientes de plántulas in vitro.

En el experimento de propagación las yemas axilares del sauce, fueron desinfectadas por inmersión en etanol 70° (1 minuto), seguidas de una solución de NaOCl al 1% más el agregado de dos gotas de Tween, durante 5 minutos y en agitación; finalmente se enjuagó tres veces con agua destilada estéril, en la cámara de flujo laminar, previa escarificación, y luego sembradas en los tratamientos que contenían los medios (agar + agua + azúcar), MS y WPM con combinaciones de 0, 1, 5 y 10 mg/l de ácido indolburico y citoquinina, para la micropropagación de yemas axilares.

Finalmente se determinó una mejor relación de ácido indolbutirico (AIB) y citoquinina (KIN) en la en la propagación de yemas axilares de sauce que fueron las concentraciones del T<sub>2</sub> con concentraciones de 1.0 AIB y 1.0 KIN mg/L en el medio Murashige Skoog (1962).

## I. INTRODUCCIÓN

El sauce (*Salix alba*) es una de las especies que tiene una gran capacidad de adaptabilidad en zonas húmedas y se caracteriza por tener raíces profundas las cuales son fundamentales para el funcionamiento en defensas ribereñas, canales de riego (CASTIGLIONI *et al.*, 1960).

Desafortunadamente en condiciones naturales la pérdida de viabilidad de la semilla es rápida (solo viven un par de días fuera del árbol), por lo que la mayor parte de la germinación se produce en el primer año desde su caída, y está muy correlacionada con el diámetro del embrión y en menor medida con su longitud, además, la necesidad de la preparación del terreno con el objetivo de: poner en contacto la semilla con el suelo mineral y eliminar la competencia de herbáceas y matorrales. La probabilidad de que se encuentren formas adecuadas para la regeneración natural, es muy baja y está supeditada al azar; pudiendo pasar mucho tiempo sin que esto ocurra (ROJO *et al.*, 1996).

Conociendo estos problemas los nuevos enfoques de la investigación se orientan al encontrar otras alternativas de propagación de esta especie, empleando técnicas de cultivo *in vitro*, con la finalidad de estandarizar la metodología de micropropagación de plantones de sauce (*Salix Alba*).

Las técnicas de cultivo de tejidos contribuyen a mejorar el sistema de multiplicación de la especie, ya que es capaz de mantener la uniformidad genética de genotipos deseables. La embriogénesis somática es un sistema que permite obtener clones con una arquitectura dimórfica normal y un sistema radical de gran anclaje, además de los otros potenciales que esta técnica presenta para el mejoramiento genético, intercambio y conservación de material (PIERIK, 1990).

Teniendo como hipótesis que las fitohormonas (auxinas y citoquininas) permitirán, que el proceso de regeneración se pueda dar en menor tiempo de lo que normalmente necesita la planta, esto debido a que las fitohormonas agregadas a los medios de cultivos (Murashige y Skoog 1962 y Woody Plant Medium) y el tipo de concentración que cuenta cada tratamiento, influirán acelerando la propagación de las yemas axilares del *Salix alba*. Para cumplir con esta investigación se tuvo como objetivos:

### **Objetivo general**

- Determinar un medio de cultivo y concentraciones de fitohormonas óptimos que permitan propagación de *Salix alba*, en biomasa suficiente para ser utilizado en defensa ribereña.

**Objetivo específicos**

- Determinar el mejor tratamiento que produzca mayor enraizamiento y propagación de yemas axilares.
- Determinar el grado de contaminación en la propagación de yemas axilares.
- Evaluar los parámetros de propagación en los dos medios de cultivo.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Aspectos generales del sauce (*Salix alba*)

El sauce es una especie cuya altura está entre los 15 - 21 metros en promedio. El diámetro a la altura del pecho alcanza medidas entre los 40 y 80 cm de diámetro, que se ramifica hasta un 30% de su altura, copa cónica o estrechamente triangular, follaje claro y caído, base cónica o alargada, fuste recto con ramas péndulas. La corteza es grisácea pardusca o gris oscura, áspera, desprendiéndose en piezas gruesas e irregulares. El grosor total de la corteza varía de 5 a 15 mm (NIEMBRO, 1983).

Las hojas son simples, alternas, dispuestas en espiral, de 6 a 15 cm de largo y de 0.6 a 0.8 cm de ancho, lanceoladas, pubescentes; ápice largamente atenuado, base aguda, margen entero, peciolo de 0.5 a 1 cm de largo, haz y envés verde amarillentos, ambos glabros. Los frutos son cápsulas ovoideas, dehiscentes por dos valvas, pardas verdosas con muchas semillas rodeadas por abundantes pelos blancos y algodonosos. Las semillas tienen forma comosa, ligeramente aplanadas, de 0.5 a 1.0 mm de largo, rodeadas por un mechón de pelos, se considera el número de semillas puras por kilogramos es de 600000 a 1000000 (NIEMBRO, 1983).

Esto varía de acuerdo a las diferentes zonas donde se ubique la plantación. Su fructificación va a depender de las condiciones climáticas de la zona de plantación (NIEMBRO, 1983).

Se distribuye naturalmente desde los 23° N en MEXICO, atreves de América Central hasta los 45° S en Argentina. Su distribución altitudinal varía de 10 a 1500 msnm y hasta 3300 msnm en Bolivia y Perú, con precipitaciones de 800 a 3300 mm anuales y una estación seca de 1 a 2 meses. Con temperaturas promedio anuales entre 16 y 28 °C. Es una especie pionera típica de bosques secundarios y en ciertos lugares forma rodales puros. Es común en valles y llanuras aluviales de tierras bajas, a lo largo de ríos, esteros y lagos. Se encuentra aislado o en pequeños grupos asociados al matorral típico ribereño. Prefiere suelos húmedos, de textura arenosa y tolera inundaciones periódicas (NIEMBRO, 1983).

### **2.1.1. Taxonomía del sauce**

Según el sistema de clasificación de descrita por Carlos Linneo y publicado en "*Species Plantarum*", la *Salix alba* es:

REYNO : *Plantae*

DIVISION : *Magnoliophyta*

CLASE : *Magnoliopsida*

ORDEN : *Malpighiales*

FAMILIA : *Salicaceae*

GENERO : *Salix*

ESPECIE : *Salix alba*

NOMBRES COMUNES: Sauce Común, sauce Blanco.

(CASTIGLIONI, 1960).

## **2.2. Situación actual del sauce en el Perú**

El sauce es un árbol de tronco grueso y frondoso, distribuido en costa, sierra y selva hasta los 4,000 msnm. La madera de esta planta, fue utilizada por los antiguos peruanos para la confección de cestos. El sauce posee propiedades medicinales, tiene un alto contenido de salicina, sustancia que baja y controla la fiebre... además es antidiarreico, antirreumático, antipalúdico... es un “botiquín” de la medicina natural. Nombres comunes: Sauce, huayaco; wayaw en lengua quechua (ROMERO, 1983).

En 1535, el cronista español Gonzalo F. De Oviedo, menciona al sauce como una planta cultivada en la costa desde épocas muy antiguas. En la cultura Paracas, al interior de los fardos funerarios, se han encontrado cestos pequeños, depositarios de alimentos, hechos con tallos de sauce de 2 a 3 cm. de grosor, intercalados con tallos de totora. La madera del sauce es empleada para la fabricación de muebles. En agroforestería sirve para proteger de la erosión las orillas de los ríos y canales de riego. La fibra de este árbol es utilizada para la cestería. En medicina tradicional tiene múltiples usos es antidiarreico, antirreumático, antifebril y cura el paludismo (ROMERO, 1983).

### **2.3. Semilla del sauce**

En condiciones naturales la pérdida de viabilidad de la semilla es rápida, por lo que la mayor parte de la germinación se produce en el primer año desde su caída, y está muy correlacionada con el diámetro del embrión y en menor medida con su longitud y la del endospermo gran número de autores resaltan, además, la necesidad de la preparación del terreno con el objetivo de: poner en contacto la semilla con el suelo mineral y eliminar la competencia de herbáceas y matorrales. En esta primera etapa, las herbáceas actúan como barrera física impidiendo el contacto de la semilla con el suelo (ROJO *et al.*, 1996).

### **2.4. Importancia del sauce en un sistema agroforestal**

Alrededor de 70 países cultivan sauces en combinación con otras especies forestales naturales, en plantaciones y como árboles separados en el paisaje (incluidos sistemas agroforestales). Los informes de los países a la Comisión Internacional del Álamo y Sauce (CIAS) en 2004 indicaron que cubren una superficie de más de 80 millones de hectáreas en todo el mundo. La Federación de Rusia, Canadá y los Estados Unidos de América son los países con más extensas superficies de bosques naturales de álamos y sauces, mientras que China, India y Pakistán cuentan con las más extensas plantaciones (ROMERO, 1983).

Originarios de zonas templadas y subtropicales, los árboles y arbustos de Salicaceae que incluyen álamos (*Populus* spp.) y sauces (*Salix* spp.) son de crecimiento rápido y de fácil propagación vegetativa. Muchas de las especies se

adaptan a muy diversas condiciones de clima y suelo, desde el calor del desierto chino hasta el frío y el viento de los Andes sudamericanos. Son fáciles de cultivar y constituyen un componente importante de los sistemas agroforestales, a menudo para pequeños agricultores (ROMERO, 1983).

Suministran una amplia gama de productos madereros (madera en rollo industrial, postes y estacas, pasta y papel, tableros reconstituidos, contrachapados, chapas, madera aserrada, jaulas de embalaje, palés y muebles), productos no madereros (forraje, leña) y servicios (abrigo, sombra y protección del suelo, del agua, de los cultivos, del ganado y de las viviendas). Álamos y sauces desempeñan un papel importante en la fitorremediación (retirada de metales pesados para purificar suelos contaminados) de tierras degradadas, la rehabilitación de ecosistemas frágiles (en especial lucha contra la desertificación) y la restauración del paisaje forestal. A menudo se integran con la agricultura, la horticultura, la viticultura y la apicultura. Por su crecimiento rápido son eficaces para la retención del carbono. Ofrecen oportunidades de empleo, impulsan las exportaciones y contribuyen al desarrollo socioeconómico y a la sostenibilidad de los medios de vida en zonas rurales (ROMERO, 1983).

## **2.5. Servicios ambientales del sauce en el bosque**

Control de la erosión de suelos; los árboles, mediante sus ramas y hojas, interceptan la lluvia y mediante sus raíces dan estabilidad al suelo en las laderas de montaña; controlando de esta manera la pérdida de suelos por erosión,

principal problema de los Andes. Mejora de los suelos; los árboles aportan materia orgánica al suelo mediante la caída y descomposición de ramas y hojas. Regulación hídrica; los bosques regulan los flujos de agua al aumentar la capacidad de infiltración de los suelos. Esto se refleja una distribución más equitativa a lo largo del año. (COFOM, 2003).

Incremento de la calidad del agua; los bosques en riberas a cursos de agua evitan que estos se ensucien con lodos durante época de lluvias, por lo que se tiene un abastecimiento de agua más limpia (Mejora del clima; el bosque actúa como regulador de la temperatura y de la velocidad de los vientos, generando un ambiente propicio para el desarrollo de las actividades agrícolas y ganaderas. Refugio de especies, los bosques constituyen el hábitat de fauna silvestre local y migratoria, además de ser reserva genética de especies de flora silvestre, muchas de ellas con potencial de uso que aún no ha sido estudiado (COFOM, 2003).

## **2.6. Ecología del sauce**

### **2.6.1. clima**

Se encuentra en precipitaciones de 800 a 3300 mm anuales y una estación seca de 1 a 2 meses. Con temperaturas promedio anuales entre 16 y 28 °C. Es una especie pionera típica de bosques secundarios y en ciertos lugares forma rodales puros. Es común en valles y llanuras aluviales de tierras bajas, a lo largo de ríos, esteros y lagos. Se encuentra aislado o en pequeños grupos asociados al

matorral típico ribereño. Prefiere suelos húmedos, de textura arenosa y tolera inundaciones periódicas (NIEMBRO, 1983).

### **2.6.2. Fauna y flora**

En las orillas del río, encontramos los sotos, enmarañados bosques donde el clima es más benigno y el cierzo tan típicamente aragonés se ve reducido por la espesa vegetación. Los árboles de estos fantásticos bosques están representados por el álamo blanco (*Populus alba*), el álamo negro (*Populus nigra*), el fresno (*Fraxinus angustifolia*), los sauces siendo el más común el sauce blanco (*Salix alba*) y el olmo (*Ulmus minor*), que hunden sus raíces en el nivel freático del río y que son capaces de resistir las grandes crecidas del río que sumergen en el agua parte del tronco de estas especies. Como especies típicas del sotobosque de los sotos hallamos la zarza (*Rubus caesius*), el rosal silvestre (*Rosa canina*) o el espino albar (*Crataegus monogyna*), todos ellos arbustos cuyos sabrosos frutos son el alimento de aves y mamíferos de los sotos. La fauna asociada es abundante y diversa, entre las aves destacan la oropéndola (*Oriolus oriolus*), el curioso pájaro moscón (*Remiz pendulinus*) que construye un elaborado nido colgante, el pito real (*Picus viridis*), el torcecuello (*Jynx torquilla*), el cuco (*Cuculus canorus*) que llega en primavera con su conocido canto, las currucas, pequeñísimas aves pero con un potente canto, o el ruiseñor común (*Luscinia megarhynchos*) al que será difícil ver pero que seguro nos acompaña su canto, también por la noche (CHUMAKOV, 1991).

En los taludes del cauce cría el avión zapador (*Riparia riparia*), ave de la familia de las golondrinas que para hacer sus nidos excavan pequeños agujeros en las blandas paredes. Mención aparte merecen las colonias de ardeidas y otras aves acuáticas que habitan en los galachos, importantes humedales rodeados de anchas bandas de carrizo que son el hábitat de entre otras, garza real, garza imperial, martinete, focha común, garceta común o garcilla cangrejera. Entre los mamíferos, destacaremos la presencia del tejón, la comadreja, la gineta, el jabalí, el zorro o el erizo. Los anfibios y reptiles están representados por la rana común, la ranita de San Antonio, el sapo común, el lagarto ocelado, la culebra de agua o el galápago europeo (CHUMAKOV, 1991).

### **2.6.3. Importancia del sauce en el servicio a la biosfera**

- La acumulación y reservorio de nitrógeno y de dióxido de carbono.
- La amortiguación de las variaciones climáticas por la humedad ambiental contenida en el bosque.
- La conservación del suelo por el control de la erosión eólica e hídrica.
- La recarga de los mantos freáticos.
- La producción de una serie de compuestos y principios activos de importante aplicación en las industrias química y farmacéutica.
- La protección de los predios por defensas ribereñas naturales (VENTURA, 1994).

## **2.7. Regeneración natural del sauce**

La de regeneración natural se origina en aperturas en el dosel del bosque que llamamos claros, se identifica con tres fases del proceso: la fase de construcción o de regeneración que sigue a la fase de claro y la fase madura que presenta el fin del proceso. La fase de claro puede durar unos meses condiciones ambientales. Así mismo la fase madura puede ser bastante duración y poca actividad mientras los arboles pasan la madurez (MUONAO, 1988).

La regeneración del Sauce está basada exclusivamente en la reproducción sexual. Se han dedicado grandes esfuerzos a la propagación vegetativa de la especie, habiéndose obtenido hasta la fecha escasos éxitos y, en general, partiendo de material juvenil, lo que no permite obtener clones de árboles selectos adultos. Su interés se reduce a la multiplicación de semillas obtenidas de masas selectas y huertos semilleros (en su mayor uso en países extranjeros). Actualmente la línea de investigación más prometedora se basa en la embriogénesis somática a partir de embriones inmaduros, más relacionada con aplicaciones biotecnológicas que con métodos clásicos de mejora forestal (MUONAO, 1988).

La regeneración natural conlleva una serie de etapas sucesivas en la dinámica forestal que abarca desde la iniciación de los primordios florales hasta el establecimiento y desarrollo de las plántulas (MUONAO, 1988).

La existencia de poliembrionia como adaptación a la autopolinización. La mayor parte de los embriones autopolinizados (70-94 %) abortan debido a homocigosis letales (KOSKI, 1991).

### **2.7.1. Factores que intervienen en el establecimiento de la regeneración natural**

La regeneración de los bosques es la condición indispensable para asegurar una producción persistente. De la eficiencia de la regeneración dependerá la renovación y mejoramiento de los bosques aprovechados. Para que la regeneración se produzca en condiciones adecuadas se deben producir algunas situaciones favorables como (KOSKI, 1991).

- Disponibilidad suficiente de semillas.
- Condiciones favorables del suelo para facilitar la germinación y el posterior establecimiento de las plantas.
- Ausencia de maleza.
- Exclusión del ganado de cualquier tipo de la superficie de regeneración, para evitar pisoteo y ramoneo.

## **2.8. Cultivo in vitro**

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

Para crecer las células requieren una variedad de nutrientes orgánicos e inorgánicos, estos requerimientos se demuestran fácilmente en órganos y tejidos

extirpados de la planta superiores e inferiores, los nutrientes orgánicos, al igual que los inorgánicos, se requieren en dos niveles: uno macro y otro micro. Generalmente las células en crecimiento pueden fabricar sus proteínas a partir de fuentes adecuados de nitrógeno y carbohidratos suministrados por el medio de cultivo (ROCA y MROGINSKY, 1991).

Además de una cantidad de sustancias orgánicas adicionales que se requieren en cantidades mínimas y que son muy activas en el crecimiento (ROCA y MROGINSKY, 1991).

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

En términos generales la mayor parte de los tejidos se pueden cultivar exitosamente en un medio que contenga cualquiera de varias mezclas de sales minerales diseñadas para mantener el crecimiento de tejidos y órganos. A menudo se utiliza la sacarosa como una fuente de energía. Algunos tejidos se pueden cultivar exitosamente en un medio completamente definido, mientras otros no presentan crecimiento en soluciones salinas relativamente simples, a menos que se completen con ciertos microelementos, vitaminas y otras sustancias promotoras del

crecimiento de naturaleza completamente definida, tales como el agua de coco (AC), la caseína hidrolizada (CH), los extractos de levadura y de malta, u otros semejantes (ROCA y MROGINSKY, 1991).

El éxito del cultivo de tejidos vegetales depende sustancialmente del medio de cultivo empleado. Para establecer un sistema de cultivo de tejidos se elabora primero un medio de cultivo óptimo que se ajuste a los principales requerimientos nutricionales de la especie vegetal, al tipo de explante, y al sistema de cultivo, la efectividad de un cultivo depende tanto de los ingredientes básicos, nutrientes, azúcar y hormonas, como del agente gelificador (LORZ *et al.*, 1983).

### **2.8.2. Utilización de la propagación In- vitro.**

Según ROCA y MROGINSKY (1991), la utilización del cultivo in vitro de tejidos vegetales son numerosos y diferentes. Los cuales se pueden resumir así:

- Estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines
- Bioconversión y producción de compuestos útiles
- Incremento de la variabilidad genética
- Obtención de plantas libres de patógenos.
- Propagación de plantas.
- Conservación e intercambio de germoplasma.

### **2.8.3. Incubación del cultivo in vitro**

Concluida la siembra in vitro de meristemas los tubos de ensayo son usualmente trasladados y colocadas en su ambiente con temperatura y fotoperiodo controlados. Las condiciones bajo las cuales se mantienen los explantes in vitro son: temperatura promedio 22°C, Intensidad lumínica 2000 – 4000 luz y fotoperiodo 16 hora/día. La iluminación es emitida por tubos fluorescentes (luz/día); sin embargo es posible obtener plántulas in vitro más vigorosas bajo una mezcla de luces emitidas por lámparas ricas en luz roja y luz-día en una proporción 2:1. Es conveniente, que la humedad relativa en el ambiente de incubación se mantenga un rango alto o moderado a fin de evitar la evaporación del agua del medio de cultivo y la deshidratación o muerte del meristema (ESCALANTE, 2002).

## **2.9. Estimulantes de crecimiento**

### **2.9.1. Giberelinas**

Las giberelinas son fitohormonas aisladas de un hongo, *Gibberella fujikuroi*, que produce una enfermedad llamada, el “bakanae” provocando gran longitud y necrosis en diversos tejidos y termina por matar a la planta (PIERIK, 1990). La giberelina es un compuesto que tiene un esqueleto de gibane y estimula la división o la elongación celular a ambas cosas (VENTURA, 1994).

### **2.9.2. Auxinas**

En algunos tejidos las auxinas controlan la división celular, como sucede en el cambium. Si a tallos decapitados de *Coleus* se les aplica ácido indol

acético (AIA), el número de elementos de xilema que se forman es proporcional a la cantidad de ácido indol acético (AIA) aplicado (BIOFOREST, 2008).

El desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos fue posible gracias a la acción de las auxinas sobre la división celular. Así, un trozo de zanahoria colocado en un medio de cultivo sin auxinas sufre unas cuantas divisiones y se muere, pero si se añade ácido indol acético (AIA), a una concentración de  $10^{-6}$  M se dividen las células de forma rápida y puede durar muchos años. En otros casos, es necesaria la presencia de otras hormonas para garantizar una división celular continua. Sin embargo, conviene llamar aquí la atención sobre los cultivos de tejidos adaptados; son aquellos cultivos que, tras varias transferencias en un medio con auxinas, se hacen frágiles y semitransparentes a la vez que son capaces de sintetizar su propia auxina (BIOFOREST, 2008).

El proceso de rizogénesis está íntimamente ligado con la división celular, siendo práctica normal en horticultura y, sobre todo, en los viveros, aplicar auxinas a los esquejes para favorecer el enraizamiento.

Hay otros muchos procesos de correlación, como la dominancia apical e inhibición del crecimiento de yemas laterales; inducen el desarrollo del sistema radicular y aéreo; inducen el crecimiento de los frutos (biosíntesis de etileno, cuaje y maduración); estimulan la formación de flores, frutos (parte nocárpicas en ocasiones), raíces y semillas; fototropismo o procesos de abscisión o caída de los frutos en que también las auxinas juegan un papel importante (BIOFOREST, 2008).

### 2.9.3. Citoquininas

La dormancia de semillas está relacionada con los niveles endógenos de CTS, estableciéndose que aumentan su contenido al final del proceso y que estimulan la germinación. En general, estas hormonas influyen en el proceso cuando hormonas como el Ácido Giberélico son utilizados junto o previamente (ROJAS, 1993).

La actividad de las plantas se refleja en la continuidad de crecimiento de los brotes y sus hojas, lo cual repercute en mayor área foliar para maximizar la eficiencia fotosintética de los cultivos. Las CTS son partícipes de este proceso en cuanto a que los tejidos activos producen esa hormona para estimular la división celular y con ello establecer una “base” o estructura sobre la cual continúe el crecimiento (ROJAS, 1993).

Con la aplicación de citocininas no se obtiene una respuesta rápida de crecimiento como la que se obtiene con aplicación de ácido giberélico, ni se induce una clorosis de las hojas; La respuesta es lenta pero vigorosa, preparando la planta para la producción de flores y frutos. En casos en que el crecimiento vegetativo haya estado bajo condiciones de estrés (exceso de agua, sequía, no fertilización (desbalance nutrimental), salinidad, calor extremo, frío intenso, carga excesiva, enfermedades, etc.), la respuesta a la aplicación de citocininas es más efectiva especialmente cuando se hace inmediatamente después de que el cultivo ha salido de esa condición de estrés (ROJAS, 1993).

## **2.10. Contaminación del explante**

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo in vitro, a través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. El explante más usado para los procesos de propagación in vitro son las yemas vegetativas de las plantas. Los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23°C, además de controlar la cantidad de horas de luz. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar. La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación (ESCALANTE, 2002).

Con finalidad puramente descriptiva se puede clasificar los principales factores no biológicos que afectaran al desarrollo (contaminación) del cultivo in vitro, incluyendo:

- Ambiente químico
- Composición del medio de cultivo
- pH
- Ambiente físico
- Temperatura

- Luz y fotoperíodo
- Humedad

Dentro del proceso de micropropagación diferenciamos varias fases o etapas:

- 0: Selección y Preparación de la planta madre
- 1: Desinfección de las yemas de la planta y/o desinfección de semillas
- 2: introducción del material seleccionado in vitro
- 3: Multiplicación de brotes
- 4: Enraizamiento
- 5: Aclimatación

Esta secuencia de etapas abarca el ciclo completo de la multiplicación de plantas in vitro; puede ser aplicada a diferentes especies vegetales, en cada caso se podrán incluir simplificaciones o cambios de acuerdo a las características de las plantas, pero en términos generales son comunes al proceso de propagación in vitro (ESCALANTE, 2002).

#### **2.10.1. Fase 0: Preparación de la planta madre**

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control

de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (CASTILLO, 2004).

### **2.10.2. Fase 1: Desinfección del material vegetal**

Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Los explantes pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. Antes de extraer los explantes se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminarlos contaminantes externos. Los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia (CASTILLO, 2004).

A efectos de obtener las condiciones de asepsia, se trabajará en cabinas de flujo laminar para extraer los explantes a partir del material vegetal. Estos explantes se introducirán en un tubo de cultivo conteniendo medio de iniciación para poder controlar la sanidad y la viabilidad, luego de realizar la desinfección del material con hipoclorito de sodio (agua clorada comercial), pura o diluída durante un período de 5 a 15 minutos, seguido por 3 a 4 enjuagues en agua esterilizada (CASTILLO, 2004).

### **2.10.3. Fase 2: Introducción del material in vitro**

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o

regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo in vitro (CASTILLO, 2004).

#### **2.10.4. Fase 3: Multiplicación de los brotes**

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron la FASE 1 y 2 originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas (CASTILLO, 2004).

El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados (CASTILLO, 2004).

#### **2.10.5. Fase 4: Elección de un medio de enraizamiento de los explantes**

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente plantines individuales de un tamaño aproximado de 2 centímetros. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de

crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea (CASTILLO, 2004).

#### **2.10.6. Fase 5: Aclimatación de los explantes enraizados**

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrirán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales. En el momento en que se extraen los explantes o plantines enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernáculo, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta (CASTILLO, 2004).

La siguiente lista presenta una comparación de las características de una planta en condiciones de laboratorio (in vitro) respecto a una planta en condiciones naturales (in vivo):

**In vitro**

- No realiza fotosíntesis
- Crecimiento en condiciones controladas
- Crecimiento en condiciones de asepsia
- Alta humedad relativa
- Estomas no funcionales
- Ausencia de pelos radiculares
- Ausencia de cera en la cutícula

**In vivo**

- Realiza fotosíntesis
- Crecimiento en condiciones no controladas
- Exposición a los patógenos y gérmenes del ambiente
- Humedad relativa variable
- Estomas funcionales
- Presencia de pelos radiculares
- Presencia de cera en la cutícula

Los plantones enraizados, deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e

incrementando progresivamente la intensidad de luz. Estos plántones se plantarán en contenedores (almacigueros) cubiertos por un plástico, para mantener la humedad relativa elevada (CASTILLO, 2004).

La elección de un sustrato con buenas características físicas, es clave para el éxito de esta etapa. Para el trasplante, elegimos un sustrato suelto, poroso, con mezcla de arena turba, cáscara de arroz quemado, para permitir un desarrollo y crecimiento de raíces muy rápido. Las mezclas son diferentes y muy variadas de acuerdo a la especie con la que estamos trabajando (CASTILLO, 2004).

### **2.11. Oscurecimiento de los explantes**

Después de aislados y sembrados los tejidos, generalmente muchos de ellos se tornan negros o marrones (a veces pardos), inhibiéndose el crecimiento (muerte). Este fenómeno es muy frecuente en especies que contienen altos niveles de taninos u otros hidroxifenoles; siendo los tejidos jóvenes menos afectados que los viejos; pero a la vez los más sensibles a la presencia de auxinas en el medio (ESCALANTE, 2002).

El oscurecimiento de los tejidos, es una consecuencia de la acción de enzimas como las polifenol oxidasas y tirosinasas, las cuales están presentes y son liberados o sistematizadas en los tejidos heridos (cortados) y oxidan a diferentes sustratos, según sea el tejido, siendo comúnmente la tirosina o los hidroxifenoles como el ácido clorogénico (ESCALANTE, 2002).

Las enzimas y sustratos, son normalmente retenidos en los compartimentos celulares. Los fenoles tienen importancia funcional natural en la regulación del proceso oxidativo del ácido indol acético (AIA), y solamente son tóxicos cuando su concentración se incrementa (ESCALANTE, 2002).

Una irreparable inhibición del crecimiento ocurre cuando los fenoles son oxidados a compuestos de quinona altamente activos, los cuales entonces polimerizan y/o oxidan proteínas, incrementándose así la concentración de compuestos metálicos que inhiben el crecimiento y dan un color oscuro al tejido (ESCALANTE, 2002).

Son muchas las técnicas que se utilizan para prevenir la oxidación de estas sustancias, una de ellas es la incorporación al medio 3 g/l de carbón activado el que además de absorber o captar los compuestos segregados por el tejido o que están presentes en el agar y que puede inhibir el crecimiento. Cumple las siguientes funciones.

- Previene el innecesario crecimiento de los callos.
- Promueve la morfogénesis y particularmente la embriogénesis
- Induce una rápida formación de un adecuado sistema radical posiblemente este efecto se debe a la oscuridad que genera en el medio de cultivo.
- Absorbe reguladores del crecimiento, particularmente auxinas, razón por la cual el nivel de auxina en el medio deberá incrementarse hasta diez veces su concentración normal (ESCALANTE, 2002).

## 2.12. Antecedentes

En la tesis realizada por el Br. Forestal Orlando Olivas Ortega, “Desinfección de yemas axilares para su establecimiento in vitro de la capirona”. Determino que para los niveles óptimos para evitar la contaminación de las yemas axilares de la capirona (*Calycophyllum sprucenum* Benth) el mejor tratamiento fue el T10 (Hipoclorito de calcio 2.5% + 10´), y para niveles óptimos de fenolización le corresponde al tratamiento T11 (Hipoclorito de calcio 2.5% + 15´) (OLIVAS, 2009).

También determino que para aumentar la capacidad de enrizamiento (formación de callos, diámetro de callos y número de brotes) de la capirona (*Calycophyllum sprucenum* Benth) le corresponde al tratamiento T16 (Bencilaminopurina 2.0 mg/L + Ácido naftalenacético 1.5 mg/L).

También en la tesis realizada por el Br. Agrónomo Díaz Chirinos Renato, “Germinación de semilla y obtención de la relación ANA/BAP para la organogénesis de la caoba (*Swietenia macrophylla* c. king) en cultivo in vitro”. Determino que para la mejor relación de ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP) en la organogénesis de caoba, fue el tratamiento T9 (2.5 ANA + 1.5 BAP) mg/L usando el medio Murashige y Skoog (CHIRINOS, 2013).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de ejecución**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Micropropagación in vitro de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en el km 1.5 carretera Tingo María – Huánuco, del Distrito de Rupa - Rupa, Provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, cuyas coordenadas son:

Longitud : 72° 57' 00''  
Latitud Sur : 09°09'08''  
Altitud : 670 m.s.n.m.

#### **3.2. Ensayos de propagación in vitro**

Se realizó un ensayo de propagación con el objetivo de probar la propagación in vitro y la forma indicada de cultivo en las yemas axilares de sauce (*Salix Alva*).

### **3.2.1. Materiales de Laboratorio**

#### **3.2.1.1 Equipos**

- Autoclave
- Cabina de flujo laminar
- Refrigerador
- Horno Microondas

#### **3.2.1.2 Materiales de Laboratorios**

- Tubos de ensayo (20 x 150 mm)
- Vaso precipitados (100 ml, 500 ml)
- Probeta ( 50 ml y 100 ml)
- Agitadores
- Placas Petri.
- Pinzas
- Mechero
- Papel aluminio
- Tijera podadora
- Bandejas
- Pipetas

### 3.2.1.3 Reactivos de Laboratorios y Otros

- Medio Murashige Skoog (1962)
- Medio Woody Plant Medium
- AIB
- KIN
- Agua destilada
- Agua destilada esterilizada
- Lejía comercial
- Alcohol 70°
- Tween 20

### 3.2.2. Material vegetal

Se utilizó yemas axilares provenientes del árboles de sauce (*Salix alba*), de la defensa ribereña del margen izquierda del rio Huallaga puente Calicanto – Huánuco; las cuales se recolectaron en el mes de febrero del 2015.

### **3.2.3. Preparación del medio de cultivo**

Se preparó el medio utilizando la formulación estándar designada en el laboratorio y se llevó a un volumen menor que la del volumen final de medio de cultivo para poder elaborar los tratamientos. Los medios de cultivo que se prepararon fueron el Medio Murashige y Skoog MS (1962) y el Medio WPM (Cuadro 13), se llevó cada medio de cultivo al microondas para diluir el agar agar y así no halla presencia de grumos; luego se agregó los reguladores de crecimiento; es decir fitohormonas con su concentración por cada tratamiento (Cuadro 1.) excepto los tratamiento T1 y T9. Los tubos de ensayo tuvieron 6 cm de cada medio por tratamiento, luego fueron tapados con papel aluminio para su disposición final en la autoclave durante 20 minutos para ser esterilizados.

### **3.2.4. Esterilización de materiales**

Una característica del medio de cultivo, es la conservación del material y que sea libre de contaminantes, principalmente de microorganismos.

Para la esterilización de los materiales de vidrio (placas petri y frascos de vidrio) y material de disección se envolvieron en papel A4 y papel de aluminio, y se sometieron a una temperatura de 121°C durante 20 minutos en autoclave.

Frascos con agua destilada se cubrieron con papel aluminio para ser esterilizado en autoclave a 121°C por 15 a 20 minutos.

### 3.2.5. Preparación y siembra de las yemas

Las yemas de sauce (*Salix alba*), fueron desinfectadas por inmersión en alcohol 70° y en una solución de NaOCl (hipoclorito de sodio) al 1.0 % más el agregado de dos gotas de Tween 20 - C<sub>58</sub>H<sub>114</sub>O<sub>26</sub> (el polisorbato o Tween 20, es un tensoactivo tipo polisorbato cuya estabilidad y relativa ausencia de toxicidad permiten que sea usado como detergente y emulsionante en numerosas aplicaciones domésticas, científicas, alimentarias industriales y farmacológicas.), durante 5 minutos en agitación; y luego se enjuago tres veces con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar esperando 3 minutos en cada enjuagada.

Inmediatamente luego de desinfectada la yema se procedió a realizar la siembra de la forma siguiente: con pinzas estériles se tomó las yemas axilares previamente cortadas en la forma adecuada para la siembra, depositándolo en los tubos de ensayo, la posición de la yema axilar fue forma vertical para facilitar las salida de las raíces y las hojas, sucesivamente se procedió al sellado con un película de parafilm los bordes del tubo de ensayo previamente colocado el papel de aluminio, sucesivamente se flameó para evitar la contaminación del contacto del medio ambiente.

### 3.2.6. Tratamiento en estudios

Para determinar la mejor condición de propagación in vitro de las yemas axilares del sauce (*Salix Alba*) se utilizaron los medios de cultivo MS y WPM más agua, a estos medios se les añadió diferentes concentraciones de hormonas (AIB y KIN), realizando diferentes concentraciones por separado, de estas se eligió la mejor condición de crecimiento, en el Cuadro 01, Se presenta los diferentes tratamientos que se estudió para las pruebas de regeneración.

Cuadro 1. Interacción de medios de cultivo y combinación de hormonas (Ácido indolbutirico y cinetina al 0, 1, 5, 10 mg/l de concentración)

Concentración de AIB (mg/l)	Concentración de KIN (mg/l)	Medios de cultivo	
		Medio MS*	Medio WPM*
0	0	T <sub>1</sub>	T <sub>9</sub>
1	1	T <sub>2</sub>	T <sub>10</sub>
5	5	T <sub>3</sub>	T <sub>11</sub>
1	5	T <sub>4</sub>	T <sub>12</sub>
5	1	T <sub>5</sub>	T <sub>13</sub>
10	10	T <sub>6</sub>	T <sub>14</sub>
1	10	T <sub>7</sub>	T <sub>15</sub>
10	1	T <sub>8</sub>	T <sub>16</sub>

Los \* indica que la composición de los medios de cultivo se pueden ver en anexos en el cuadro N° 05

### 3.2.7. Diseño estadístico

Para el presente trabajo se aplicó el Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial, con 10 repeticiones, con la evaluación de una yema axilar por repetición.

- **Modelo aditivo lineal**

$$Y_{ijk} = u + a_i + e_{ijk}$$

Dónde:

$Y_{ijk}$ : Es la respuesta que se obtuvo en la k-ésima repetición a la cual se le asignó el i-ésimo medio de cultivo a la j-ésima combinación de hormonas.

$u$  : Efecto de la media general.

$a_i$ : Efecto del i-ésima concentración de medio cultivo.

$b_j$ : Efecto del j-ésimo combinación de hormonas.

$e_{ijk}$ : Efecto aleatorio del error experimental asociado a dicha observación.

Para:

$i = 2$  respecto a los medios de cultivo

$j = 8$  respecto a las combinaciones de hormonas

$k = 10$  repeticiones.

### 3.2.8. Parámetros a evaluar

- **Tiempo de la regeneración:** Se evaluó el tiempo que demora la aparición de nuevas estructuras en cada tratamiento, se vio necesario realizar la evaluación diaria en la primera semana después de la siembra, luego se evaluó cada 2 días. Lo que se evaluó fue la presencia de callos en las yemas o el brote de alguna yema.
- **Porcentaje de regeneración de yemas:** Se evaluó el porcentaje de crecimiento y desarrollo de las yemas en cada tratamiento. En este parámetro se evaluó el número de yemas que existía en cada tubo de ensayo/tratamiento.
- **Porcentaje de contaminación:** se evaluó el porcentaje de contaminación en cada tratamiento. Este parámetro se evaluó mediante la observación de algún agente contaminante ajeno al medio y/o yemas axilares.
- **Altura de plántulas:** se evaluó el crecimiento progresivo de las plántulas en centímetros, con una wincha de 1 metro. Este parámetro se evaluó en 90 días aproximados después de la siembra.
- **Número de hojas por plántula:** Se evaluó el número de hojas regeneradas en el transcurso de la incubación de las plántulas. Este parámetro se evaluó, contando el número de hojas por tratamientos en los dos medios de cultivos.

- **Longitud de raíces.** Se evaluó la longitud de raíces en cm, con una wincha de 1 metro. Este parámetro se evaluó en 90 días aproximados después de la siembra, donde se consideró solo la longitud de la raíz principal.

## **IV. RESULTADOS**

### **4.1. Propagación de yemas axilares**

Las pruebas de propagación in vitro de sauce (*Salix alba*), se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología de la facultad de Agronomía, con el fin de encontrar la concentración óptima de las hormonas (0, 1, 5 y 10 mg/l de ácido indolbutírico y cinetina) combinadas con los medios de cultivo Murashige Skoog y WPM formulados 1962 y 1980, respectivamente, dieron respuestas de altura, longitud de raíz y otros parámetros.

#### **4.1.1 Tiempo de regeneración**

Los resultados del tiempo de regeneración de las yemas axilares y hojas, muestran los días en el cual las hormonas tuvieron reacción en los diversos tratamientos debido de las diferentes concentraciones de hormonas en los medios de cultivo MS y WPM.

### - **Tiempo de regeneración de las yemas**

En la evaluación del tiempo de regeneración de las yemas, se obtuvo un mejor resultado en el medio MS, donde se observa un promedio de regeneración de 4 días, en comparación del medio WPM que cuenta con un promedio de regeneración de 6 días, los cálculos de promedios fueron mediante la suma del total de los días de evaluación entre el número de los tratamientos de cada medio. También se realizó un estudio estadístico de PRUEBA T de Student, que compara las medias de los dos medios. Esta prueba sirve para comparar variables numéricas de distribución normal.

El T1 (MS), ha tenido una mejor reacción en los 2 primeros días de evaluación y teniendo como un máximo de días de regeneración al T5 (MS) que demora 8 días en regenerarse (Figura 1). En el medio WPM el tratamiento T1, tuvo una respuesta a la regeneración en los 3 primeros días de evaluación y un máximo de tiempo de regeneración de 9 días en el T5 Y T7.

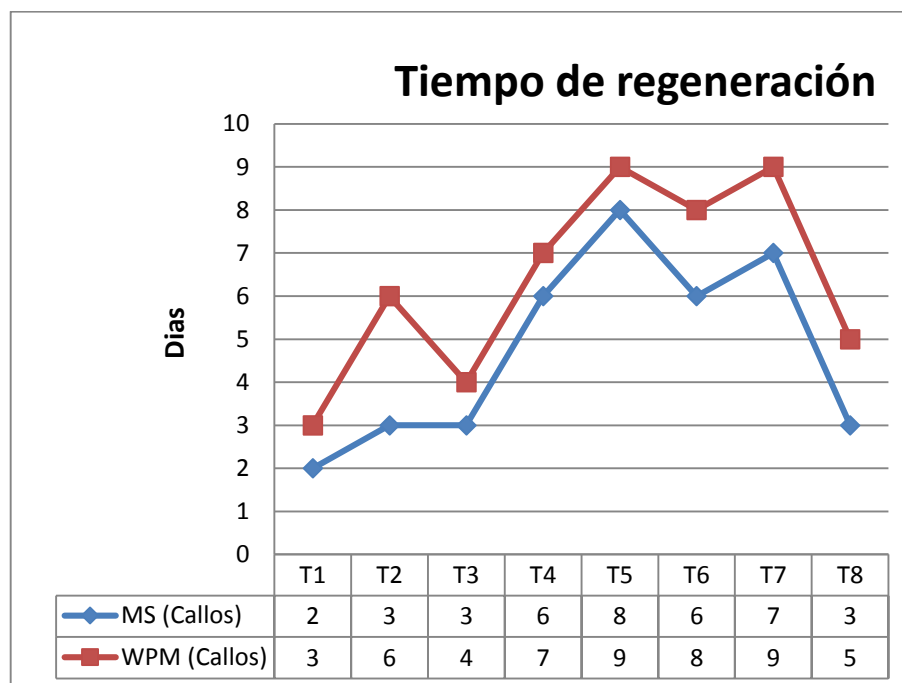


Figura 1. Comparación en crecimiento de yemas en los dos medios.

Para calcular la PRUEBA T de Student se ingresó los datos al programa SPSS Statistics 21, donde se logró obtener que la media entre el medio MS y WPM, no exista una diferencia significativa, debido a la corta diferencia de días de regeneración.

Cuadro 2. Datos estadísticos de grupo de la evaluación de los medios

Tabla estadística de grupo de las evaluación de los Medios					
	IEDIOS	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Regeneración	MS	8	4,7500	2,25198	0,79620
	WPM	8	3,3750	2,26385	0,80039

En el cuadro 2 de las pruebas de muestra independientes se determinó que la significancia en la prueba de T es de 0.796 es mayor que el alfa 0.05 (intervalo de confianza), entonces se acepta la hipótesis  $H_0$  y se concluye que no existe diferencia significativa entre los tratamientos. Y en prueba de Levene para las igualdades de medias se confirmó lo resultado por la prueba T, donde resulto una significancia de 0.172 siendo mayor que el intervalo de confianza (0.05), entonces se determina que no existe diferencia de las medias en la significación estadística y se acepta la hipótesis nula (no existe diferencia entre los tratamientos).

Cuadro 3. Datos de la prueba de muestras independientes.

Prueba de muestras independientes									
	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. De la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
Regeneración	0,078	0,784	-1,439	14	0,172	-1,625	1,1289	-4,046	0,796
			-1,439	14,000	0,172	-1,625	1,1289	-4,046	0,796

Los resultados para el tiempo de regeneración presentados en cuadro 03, señalan que no existe significación estadística para la fuente de variación de los

tratamientos, indica que el efecto de la condición de regeneración de los tratamientos no es diferente. Y se determina que no existe significación estadística.

#### - Tiempo de aparición de hojas

En la evaluación del tiempo de aparición de hojas, se obtuvo un mejor resultado en el medio MS, donde se observa que el Medio MS obtuvo resultados en todos los tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 y T8) y el Medio WPM obtuvo resultados a la interacción de las concentraciones de hormonas en los tratamientos (T1, T2 y T3). No se realizó la prueba F (ANVA) por falta de datos para realizar dicha comparación.

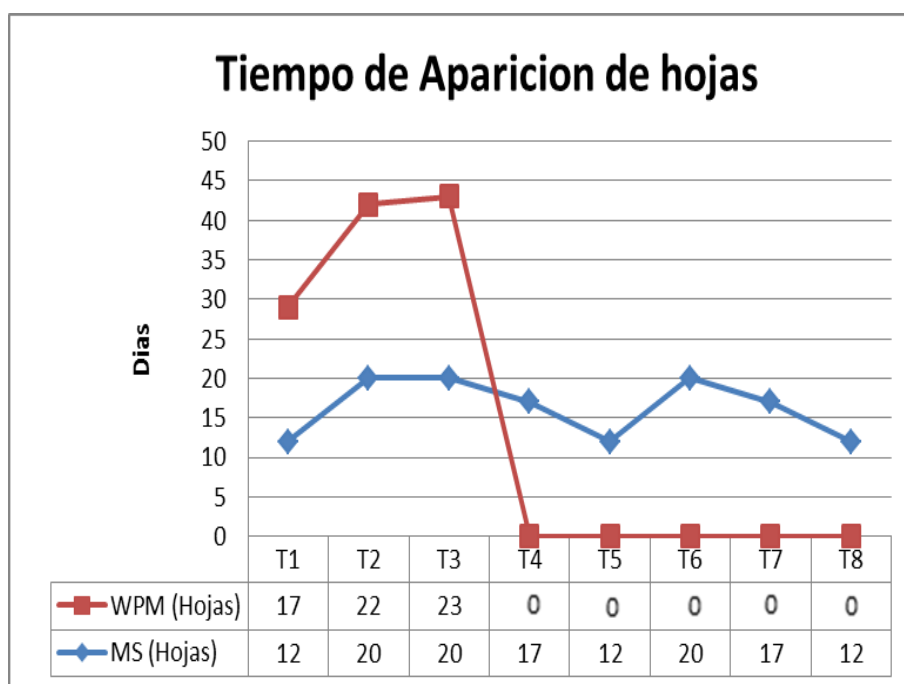


Figura 2. Comparación en crecimiento de hojas en los Medios MS y WPM, donde se observa una gran diferencia en los resultados.

Se mostró que en los posteriores días de evaluación el medio WPM no cuenta con datos en raíz, tallo, hoja, mientras que el MEDIO MS cuenta con una mayor cantidad de datos obtenidos, por lo cual se determinó que el Medio MS es el más óptimo para la realización de la regeneración del *Salix alba* In Vitro.

#### 4.1.2 Porcentaje de regeneración de yemas

El porcentaje de regeneración fue del 69% bajo una temperatura entre 28 – 30 °C y a plena luz (luz artificial). Esto también depende mucho de la adaptabilidad de las yemas axilares, donde el pre tratamiento antes de la siembra In Vitro, es importante para obtener una mínima contaminación y muerte de yemas.

Cuadro 4. Evaluación de regeneración de las yemas axilares del *Salix alba*.

MEDIO	TRATAMIENTOS	REPETICIONES	Nº de Regeneración
<b>MS</b>	T1	10	9
	T2	10	7
	T3	10	6
	T4	10	8
	T5	10	9
	T6	10	7
	T7	10	8
	T8	10	7
<b>WPM</b>	T9	10	8
	T10	10	7
	T11	10	7
	T12	10	9
	T13	10	4
	T14	10	5
	T15	10	6
	T16	10	3
	<b>TOTAL</b>	<b>160</b>	<b>110</b>

El Nº de regeneración de las yemas axilares presentadas en el cuadro muestra la respuesta a las concentraciones de hormonas.

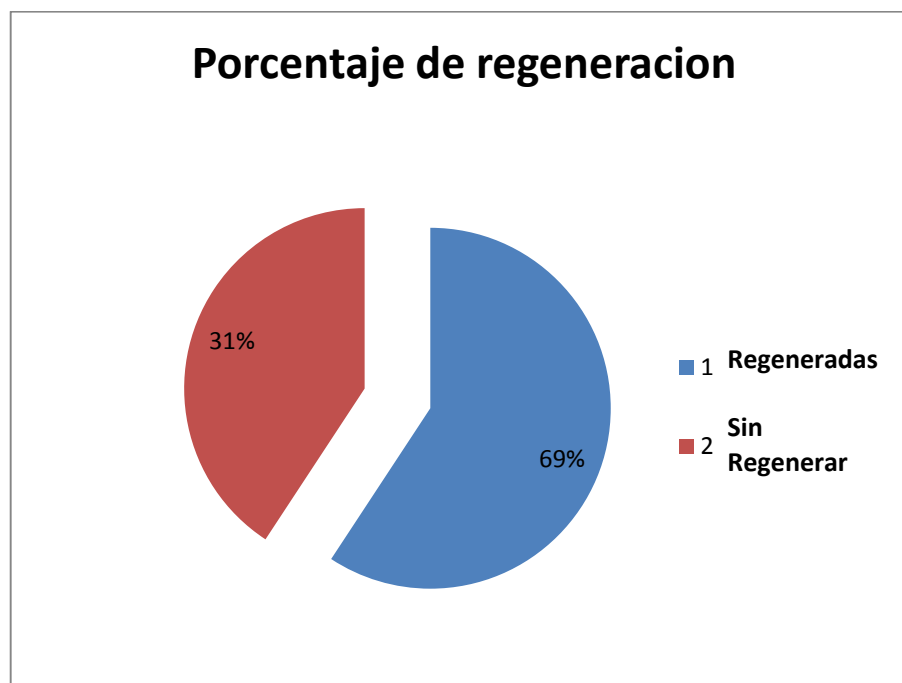


Figura 3. Porcentaje de regeneración de las yemas axilares en los diferentes medios con diversas concentraciones.

La respuesta de las yemas axilares a las diversas concentraciones de hormonas (auxina y citoquinina) en los dos medios de cultivos (MS y WPM), dieron una mejor respuesta en el Medio MS, donde se obtuvo 61 yemas axilares con regeneración de las 80 yemas axilares que estuvieron en tratamiento. En comparación al Medio WPM, que se obtuvo 49 yemas axilares con regeneración de las 80 yemas axilares.

## 4.2. Grado de contaminación en la propagación de yemas axilares

### 4.2.1. Porcentaje de contaminación

La contaminación se manifiesta en todo trabajo in vitro, en este trabajo hubo una contaminación de 56 % en los 30 primeros días después de la siembra, en los dos medios (MS y WPM) con presencia de hongos endófitos, la contaminación se debe a factores de desinfección que se realiza antes de siembra In Vitro, luego con hipoclorito de sodio 1 % más dos gotas de Tween por 5 minutos en agitación y finalmente tres enjuagues con agua destilada estéril. Este procedimiento es fundamental para lograr resultados óptimos.

Cuadro 5. Evaluación de contaminación de las yemas axilares del *Salix alba* en cada medio/tratamiento.

Medio	Tratamientos	Nº de yemas axilares Regeneradas/Tratamientos	TOTAL	Nº de yemas axilares Contaminados/Tratamientos	TOTAL
MS	T1	9	61	4	20
	T2	7		2	
	T3	6		1	
	T4	8		2	
	T5	9		2	
	T6	7		3	
	T7	8		4	
	T8	7		2	
WPM	T9	8	49	6	42
	T10	7		5	
	T11	7		4	
	T12	9		9	
	T13	4		4	
	T14	5		5	
	T15	6		6	
	T16	3		3	
	TOTAL	110		62	

Se observa en el cuadro que el medio Ms tiene un % menor de contaminación que la del medio WPM, el resultado obtenido se debe a diversos factores en el procedimiento de la siembra In Vitro.

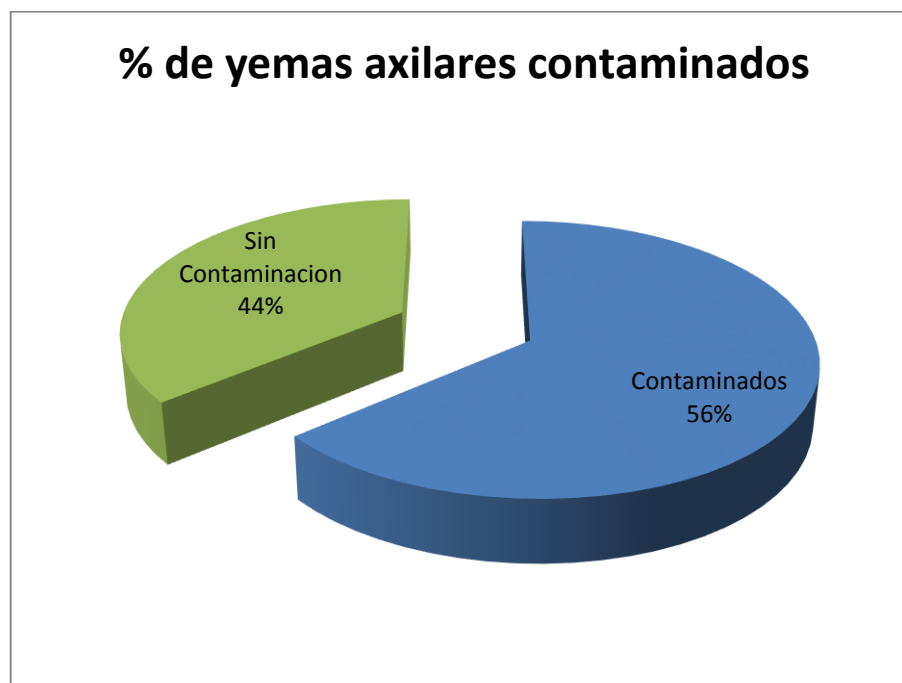


Figura 4. Porcentaje de contaminación de las yemas axilares en los diferentes medios (MS y WPM).

Para determinar a los contaminantes en los tratamientos/ repeticiones, se solicitó la ayuda del técnico del laboratorio de micología de agronomía, el Tec. Michael, donde se observó en su laboratorio los diferentes tubos de ensayos con presencia de contaminantes más resaltantes. En los diferentes tratamientos se observó las siguientes características de los contaminantes:

- Los tubos con presencia de una coloración blanca.- Es la presencia de contaminantes que se encuentran en el ambiente del laboratorio, las cuales son Micelios (saprofitos). La identificación exacta de este contaminante no

se pudo determinar por qué en su estructura no cuenta con Conidias (sin estructuras completas). (Figura 17)

- Los tubos con presencia de coloración verdosa.- Es la presencia de *Aspergillus* que también son contaminantes que se encuentran en el ambiente del laboratorio, la característica de este contaminante es que no mato a la yema axilar en todo sus crecimiento. (Figura 13 y 17)
- Los tubos con presencia de Coloración negra.- no se pudo determinar esta coloración del contaminante x falta de equipos, ya que en el tiempo de estudio ya los contaminantes estaban en completo desarrollo, lo cual dificulta su determinación en los microscopios. (Figura 17)

### 4.3. Parámetros de propagación en los medios de cultivo

#### 4.3.1. Altura de plántula

El análisis de varianza para la altura de plántula presentados en el Cuadro 06, señalan que no hay significación estadística en los tratamientos, el análisis presentado son los resultados de los datos obtenidos del Medio MS, en todos los meses de estudio.

Cuadro 6. Análisis de Variancia de la Altura de las yemas axilares del *Salix alba* en cada medio/tratamiento.

Pruebas de los efectos inter-sujetos							
Variable dependiente: ALTURA							
Fuente de Variacion	Grados de Libertad (GL)	Suma de Cuadrados(SC)	Cuadros Medios (CM)	Fc	Ft	P	Sig
Tratamiento	7	4,42	0,63	0,87	2,14	0,534	NS
Error	72	52,27	0,73				
Total	79	56,695					

AS: Si existe significación estadística a un nivel de  $P < 0.05$ .

NS: No existe significación estadística a un nivel de  $P > 0.05$ .

Del Cuadro 6, se deduce lo siguiente:

- No existe significancia para la fuente de variación de los medios de cultivo, se interpreta como que las concentraciones de AIB + KIN no obtuvieron una significación estadística alta.
- Como el P valor es de 0.534 es mayor que el alfa 0.05 (intervalo de confianza), entonces se acepta la hipótesis nula y se concluye que no existen diferencias significativas entre los tratamientos. Se confirma este resultado cuando se observa el  $F_c$  es menor que el  $F_t$ , la cual indica que no hay significancia estadística.

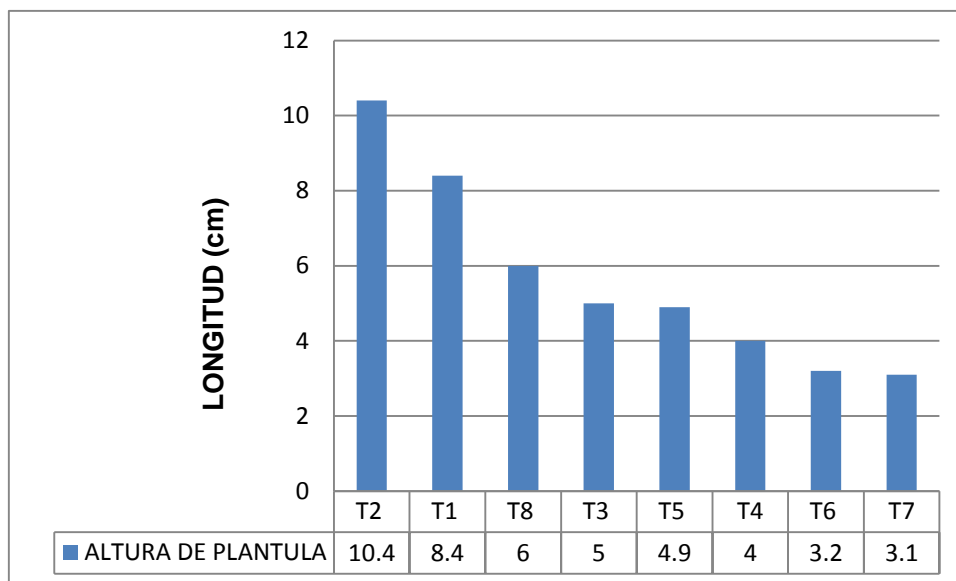


Figura 5. Longitud de plántula alcanzada en los distintos tratamientos.

Se observa, los resultados de la altura de plántula (Figura 5), siendo el T<sub>2</sub> (Medio MS con concentraciones de 1.0 AIB y 1.0 KIN mg/L) con una altura de 10.40 cm, superior a todos los tratamientos y siendo óptimo para su propagación.

### 4.3.2. Numero de hojas

La formación de hojas comenzó a las 3 semanas después del Cultivo In Vitro, donde se manifestaron una gran respuesta en el Medio MS, en los tratamientos correspondientes se encontraron plántulas con más de 10 hojas (Ver Figura 13) que dieron una gran respuesta a los tratamientos.

Se observa el cuadro de análisis de variancia (Cuadro 7), realizado a los datos obtenidos de números de hojas, en el programa SPSS Statistic 21, donde se calculó el análisis de variancia y la prueba de Tukey.

Cuadro 7. Análisis de Variancia del número de hojas obtenidos de las yemas axilares del *Salix alba* en cada medio (MS)/tratamiento.

Fuente de Variacion	Grados de Libertad (GL)	Suma de Cuadrados(SC)	Cuadros Medios (CM)	Fc	Ft	P	Sig
Tratamiento	7	171.350	24.479	0.651	2,14	0.712	NS
Error	72	2706.20	37.586				
Total	79						

AS: Si existe significación estadística a un nivel de  $P < 0.05$ .

NS: No existe significación estadística a un nivel de  $P > 0.05$ .

Como el P valor es de 0.712 es mayor que el alfa 0.05 (Intervalo de confianza), entonces se acepta la hipótesis nula y se concluye que no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

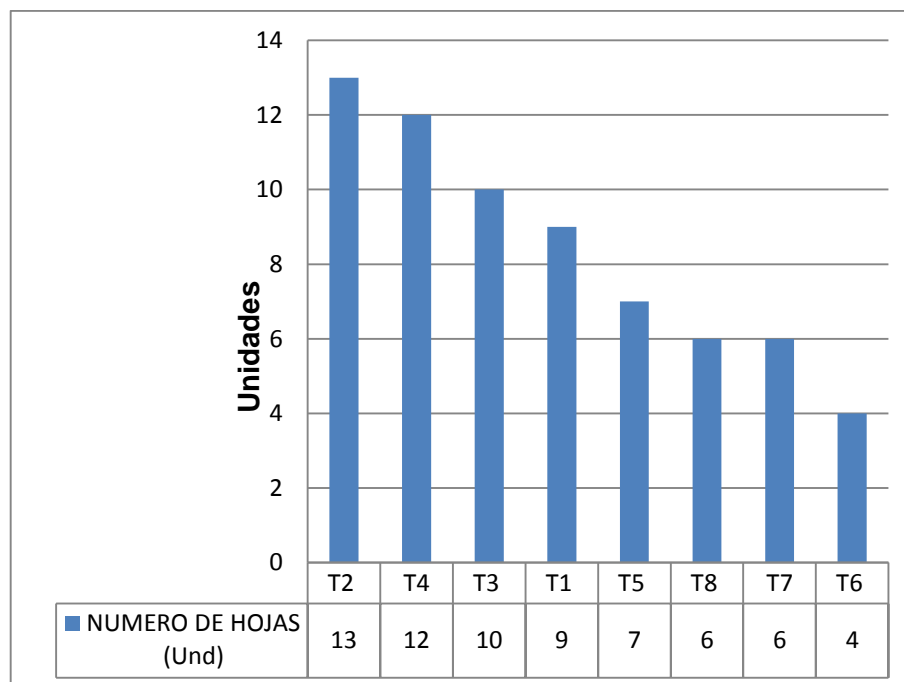


Figura 6. Número de hojas alcanzado en los distintos tratamientos.

El mejor resultado para una mejor propagación de hojas (Figura 6) fue el T<sub>2</sub> (Medio MS con concentraciones de 1.0 AIB y 1.0 KIN mg/L) con un número de hoja de 13 (12.6), siendo superior a todo los tratamientos.

### 4.3.3. Longitud de raíz

Observando, los resultados del análisis de varianza para la longitud de raíz presentada en el cuadro 10, se encontró que no existe una significancia estadística para las fuentes de variación de los tratamientos.

Al no encontrar significación estadística en los tratamientos para la fuente de variación, indica que no existen diferencias estadísticas en cuanto a longitud de raíz.

Cuadro 8. Datos del análisis de variancia para longitud de raíz.

Fuente de Variación	Grados de Libertad (GL)	Suma de Cuadrados(SC)	Cuadros Medios (CM)	Fc	Ft	P	Sig
Tratamiento	7	34.614	4.945	1.463	2,14	0.194	NS
Error	72	243.435	3.381				
Total	79	278.049					

AS: Si existe significación estadística a un nivel de  $P < 0.05$ .

NS: No existe significación estadística a un nivel de  $P > 0.05$ .

Como el P valor es de 0.194 es mayor que el alfa 0.05 (Intervalo de confianza), entonces se acepta la hipótesis nula y se concluye que no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

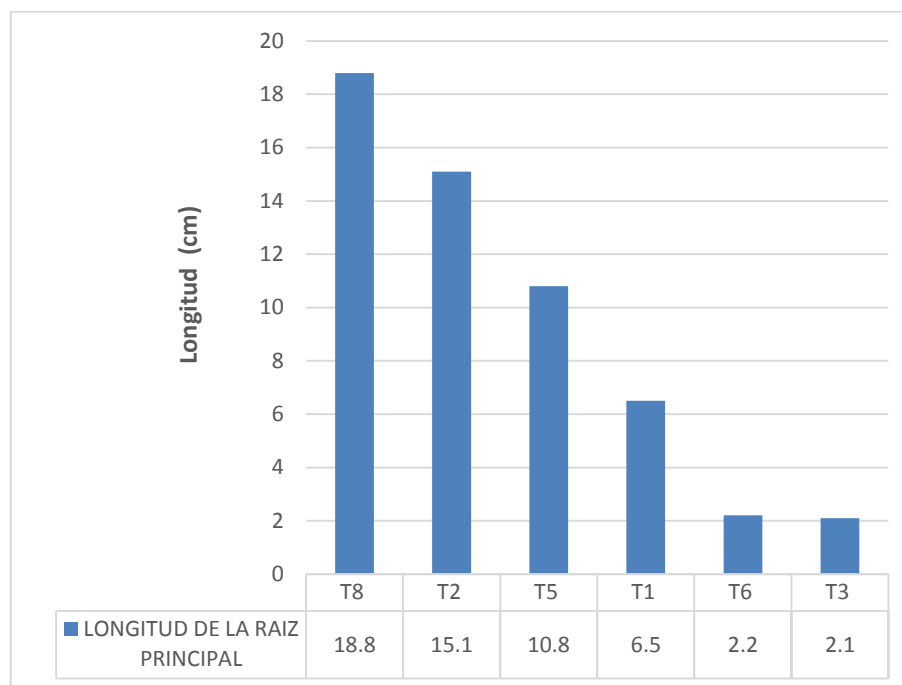


Figura 7. Altura de raíz alcanzada en los distintos tratamientos en los días de evaluación.

Se obtuvo buen enraizamiento el T<sub>8</sub> (Medio MS con concentraciones de 10.0 AIB y 1.0 KIN mg/L) logro una longitud de 18.80 cm (Figura 7), superior a todos los tratamientos y siendo óptimo para la propagación in vitro de las raíces.

#### **4.3.4. Días de formación de raíces**

En los experimentos en estudio la presencia de raíces fue óptima, esta se atribuye a causas hormonales provocadas por las hormonas AIB que son estimuladores de desarrollo radicular (Figuras 14,15 y 16). Los días que se obtuvo presencia de las raíces fueron en los 45 días de la siembra In Vitro.

Se observó que en tratamientos con algunos tubos de ensayos (repeticiones), existía presencia de contaminación, pero esto no inhibía el crecimiento de las raíces y su desarrollo normal. El crecimiento de las raíces fue en un 19% de un total de 80 yemas axilares sembradas.

## V. DISCUSIÓN

### 5.1. Enraizamiento y propagación de yemas axilares

Según LORZ (1983), el éxito del cultivo de tejidos vegetales depende sustancialmente del medio de cultivo empleado. Para establecer un sistema de cultivo de tejidos se elabora primero un medio de cultivo óptimo que se ajuste a los principales requerimientos nutricionales de la especie vegetal, al tipo de explante, y al sistema de cultivo, la efectividad de un cultivo depende tanto de los ingredientes básicos, nutrientes, azúcar y hormonas, como del agente gelificador. En la evaluación de los tratamientos, la especie vegetal obtuvo un mejor resultado en el Medio MS los cuales indica que la especie vegetal encontró las concentraciones óptimas en este medio para su propagación. La propagación de la yemas axilares en el medio MS fue del 69%, y un buen enraizamiento en el tratamiento 8, dando lugar a una altura de 18.8 cm, donde se puede afirmar que la especie vegetal (*Salix alba*) encontró las concentraciones óptimas de hormonas para su propagación y enraizamiento.

### 5.2. Grado de Contaminación en la propagación

Según ESCALANTE (2002), los tejidos (yemas axilares) después de ser aislados y sembrados, generalmente muchos de ellos se tornan negros o

marrones (a veces pardos), inhibiéndose el crecimiento (muerte). Este fenómeno es muy frecuente en especies que contienen altos niveles de taninos u otros hidroxifenoles; siendo los tejidos jóvenes menos afectados que los viejos; pero a la vez los más sensibles a la presencia de auxinas en el medio. Esta información afirma lo observado en los resultados, de la presente investigación que la mayoría de las yemas obtenidas de tejidos viejos no obtuvieron crecimiento y se murieron, por la alta concentración de taninos. Donde se observó un porcentaje de contaminación de 56%, las cuales no afectaron en el desarrollo de la especie vegetal (*Salix alba*).

### **5.3. Parámetros de propagación de los medios de cultivo**

Según Castillo (2004), Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. La cual en ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades. La falta de una especie cercana en la ciudad de Tingo María, fue una dificultad en la realización del estudio. Obtuvimos resultados notorios en los parámetros evaluados, los tratamientos 2 y 8, nos mostraron que existe posibilidad de regeneración sin contar con una especie vegetal en condiciones controladas.

## VI. CONCLUSIONES

1. El mejor medio en comparación a resultados entre en el Medio MS y WPM, fue el Medio MS que obtuvo una mejor propagación In Vitro de las yemas Axilares del *Salix alba*.
2. El mejor tratamiento para un buen enraizamiento fue el tratamiento T<sub>8</sub> (Medio MS con concentraciones de 10.0 AIB y 1.0 KIN mg/L) con un longitud de 18.00 cm.
3. El porcentaje de contaminación en los tratamientos fue de 56% en el primer mes después de la siembra. Se pudo identificar que una mayor cantidad de yemas contaminadas fueron de ramas jóvenes de *Salix alba*.
4. En los parámetros evaluados se encontró lo siguiente:
  - El tiempo de regeneración fue de 4 días (medio MS) y 6 días (medio WPM), obteniendo en ambos un 69 % de regeneración.
  - El porcentaje de regeneración en el medio de cultivo Murashige Scoog 1962 fue de 69%.
  - El mejor tratamiento para una altura de planta y mayor propagación de hojas, es el tratamiento T<sub>2</sub> (Medio MS con concentraciones de 1.0 AIB y 1.0 KIN mg/L), que obtuvo una altura de 10.40 cm y un numero de 13 hojas.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar otros ensayos utilizando diferentes fuentes de explantes de *Salix alba*, con diferentes concentraciones de AIB y KIN en el micro propagación in vitro del Sauce.
2. Continuar con experimentos considerando otras hormonas y niveles (dosis), con el fin de optimizar el crecimiento y elongación de raíces.
3. Se recomienda la obtención de plantones de la especie estudiada. Para que de esta manera sean tratadas (desinfección), y exista una menor contaminación.
4. La mejor desinfección de las yemas axilares con NaOCl (hipoclorito de sodio), es con un concentración 2.5%.
5. Se recomienda la utilización de guantes y mascarilla, para evitar contaminación en los Medios.
6. Se recomienda usar envases con mayor concentración que los tubos de ensayo, para ver el comportamiento de las yemas con las fitohormonas.

## **SPREAD IN VITRO SAUCE (*Salix alba*), FOR USE ON DEFENCE RIBEREÑA**

### **ABSTRACT**

Research was conducted between January and July 2015, at the Laboratory of Biotechnology, Faculty of Agriculture, located on the campus of the Universidad Nacional Agraria de la Selva, in order to determine a culture medium and concentration AIB hormone and more suitable for the propagation of axillary buds of *Salix alba* KIN, common Sauce from seedlings in vitro.

In the propagation experiment willow axillary buds they were disinfested by alcohol immersion 70 (1 minute), followed by a solution of 1% NaOCl plus the addition of two drops of Tween for 5 minutes stirring; finally rinsed three times with sterile distilled water in laminar flow chamber, after scraping, and then planted in the treatments containing media (agar + water + sugar), MS and WPM with combinations of 0, 1, 5 and 10 mg / l cytokinin indolburico and acid, for micropropagation of axillary buds.

Finally a better relationship indolebutyric acid (AIB) and cytokinin (KIN) was determined in the spread of the axillary buds of willow were T2 concentrations with concentrations of 1.0 and 1.0 KIN AIB mg / L in the Murashige Skoog (1962)

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- BIOFOREST S.A 2008. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Laboratorio Cultivo de Tejidos, Centro de Biotecnología, Victoria 631, Concepción, Chile.
- CASTIGLIONI, J. 1960. Características e identificación de las Salicáceas cultivadas en la Argentina. INTA, 80 p.
- CASTILLO A. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas- 16 p.
- COFOM. 2003. Plan de Desarrollo Forestal Sustentable de Michoacán. Bosques y Selvas de Michoacán. Año 1. Vol. 1. Morelia. Michoacán. 11-13 p.
- CHUMAKOV, V.V. 1991. Establecimiento de plantaciones de sauce rico en tanino, Moscú, Federación de Rusia, Instituto de Investigación de los Recursos Forestales de la URSS, Comité Forestal Estatal. (En ruso.) 542 pg.
- DIAZ CHIRINOS, R. 2013. Germinación de semillas y obtención de la relación ANA/BAP para la organogénesis de la caoba (*swietenia macrophylla* C. King) en cultivo in vitro. Tingo Maria – Huanuco (UNAS),

- ESCALANTE B. 2002. Cultivo in vitro de papa principios y metodología, erradicación de patógenos y micropropagación clonal volumen I CONCYTEC Lima-Perú. 106 p.
- KIOSKI V. 1991. Generative reproduction and genetic processes in nature. In: Genetics of Scots pine. Giertych M, ed. Elsevier, Amsterdam. 59-73 p.
- LORZ, H. LARKING, P. y SCOWCROFT, W. 1983. Improved protoplast culture and agarose media. Plant cell tissue culture. Londrez. 217-226 p.
- LLOYD, G. & BRENT, McC. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Proceedings International Plant Propagators' Society 30: 421-427
- MUONAO. , HARJU A., KARKKAINEN K, 1988. Genetic Comparison of Natural and Nursery Grown Seedlings of *Pinus sylvestris* Using Allozymes. Scand J. For. Res., 3, 37-46p.
- MURASHIGE, T. y SKOOG, 1962. A revised medium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol.Plantarum*. 15:473-497.
- NIEMBRO R. A. 1983. Características morfológica y antomica de semillas forestales. Chapingo, Mexico, 2012 p.
- OLIVAS O, Orlando 2009. Desinfeccion de yemas axilares para su establecimiento in vitro de la capirona, Tingo Maria – Huanuco, (UNAS).

- PIERIK, R. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 p.
- ROCA, W. y MROGINSKI, L. 1991. Cultivo de Tejidos del desarrollo de plantas. Editorial LIMUSA, S.A. Mexico. 13 -87 p.
- ROJAS B. 1993. Instituto Nacional de Investigación Agroforestal – estudio de especies regenerativas, Argentina, 185 p.
- ROJO et al 1996. Cultivo y Propagación de plantaciones Forestales en Sudamérica, Argentina, 58p.
- ROMERO, M. 1983. La Reforestación en el Perú y algunos países de América Latina, proyecto PNDU/FAO/PER/81/002/ Lima. Perú. 110 p.
- VENTURA M. 1994. Compendio Forestal de la actividad forestal y fauna 1980-1991. MINAG-INRENA, Lima – Perú. 22 p.

## **IX. ANEXO**



Figura 8. Seleccionando estacas con yemas del sauce (Ciudad de Huánuco).



Figura 9. Estacas seleccionadas de sauce (*Salix alba*), para el cultivo In Vitro (Ciudad de Huánuco).



Figura 10. Podado de las estacas de *Salix alba* en el laboratorio.



Figura 11. Yemas axilares seleccionadas para ser realizadas el cultivo In Vitro.



Figura 12. Cultivo In Vitro de las yemas axilares en los medios correspondientes.



Figura 13. Evaluación de la reacción obtenida en la primera semana de siembra.



Figura 14. Evaluación de las yemas axilares en los dos medios (MS y WPM) en la segunda semana.

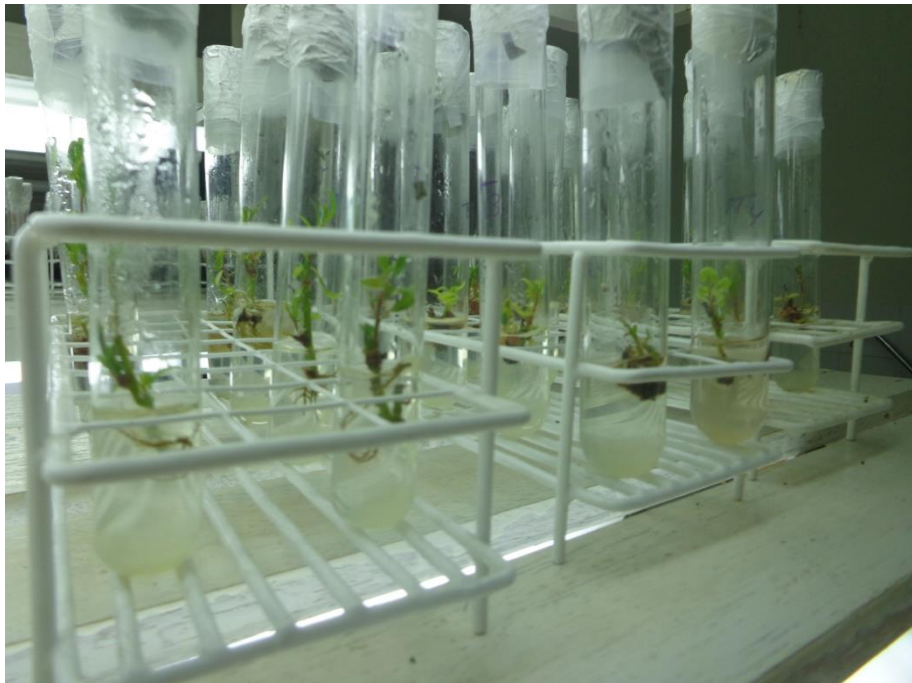


Figura 15. Regeneración de las yemas en el medio MS.



Figura 16. Distintos resultados obtenidos (Raíz, Contaminación, Hojas y Callos).

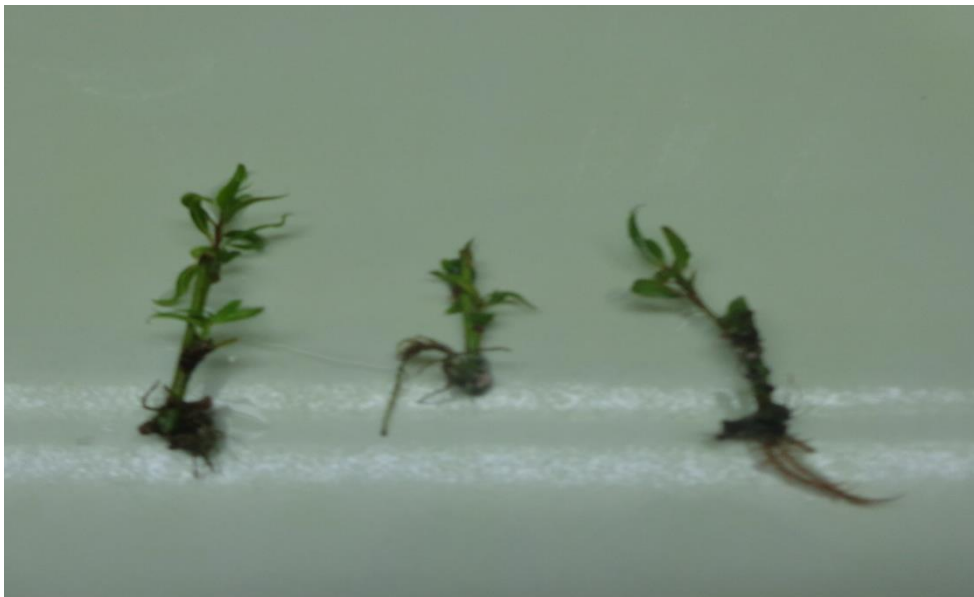


Figura 17. Evaluación de los resultados obtenidos (raíz y hojas).



Figura 18. Medición de las Raíces de las yemas de *Salix alba*.



Figura 19. Medición de raíz del mejor resultado en el Medio MS.



Figura 20. Tubos de ensayos con presencia de contaminantes, elegidos para ser identificados.



Figura 21. Ayuda del técnico Michael en la identificación de los contaminantes.

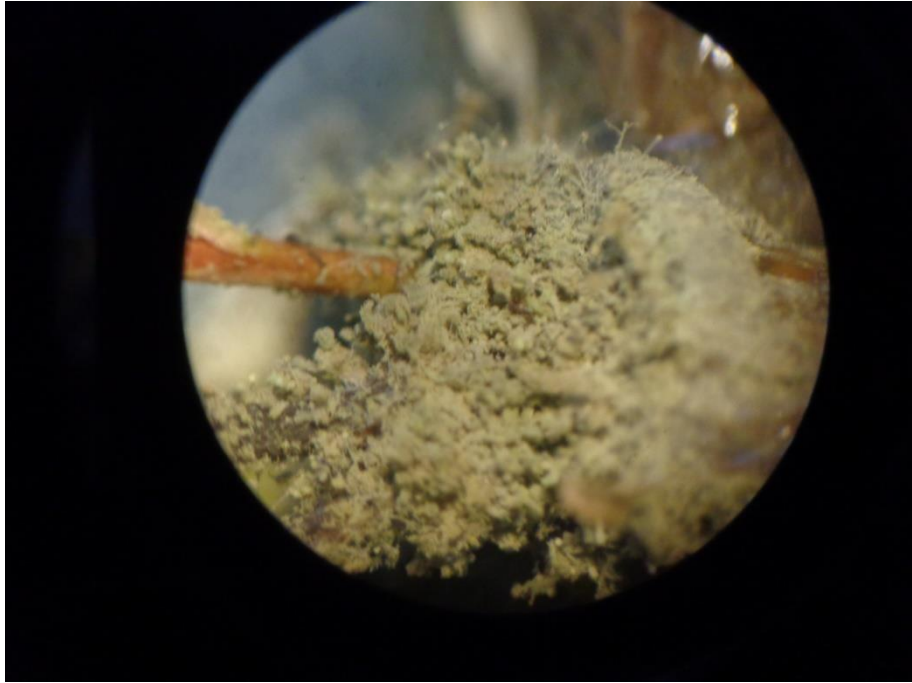


Figura 22. Contaminante sin estructura, se denomina un contaminante de laboratorio.



Figura 23. Prueba de desinfección de yemas axilares con diferentes concentraciones de NaOCl (hipoclorito de sodio).

Cuadro 9. Composición de los medios de cultivo Murashige Skoog MS (1962) y Lloyd Mc Cown WPM (1980) a usar en la tesis.

<b>Componentes</b>	<b>MS<sup>1</sup> mg/l</b>	<b>WPM<sup>2</sup> mg/l</b>
<b>Macronutrientes</b>		
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1900	---
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	1650	400
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	440	96
<b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	---	556
<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	---	990
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	370	370
<b>NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	---	---
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	170	170
<b>Micronutrientes</b>		
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	6.2	6.2
<b>MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	22.3	29.4
<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	8.6	8.6
<b>KI</b>	0.83	---
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0.25	0.25
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	0.025	0.25
<b>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	0.025	---
<b>Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	27.8	27.8
<b>Na<sub>2</sub>-EDTA</b>	37.3	37.3
<b>Vitaminas</b>		
<b>Tiamina-HCl</b>	0.1	1.6
<b>Ácido Nicotínico</b>	0.5	0.5
<b>Piridoxina HCl</b>	0.5	---
<b>Glicina</b>	2.0	---
<b>Myo inositol</b>	100	100
<b>Sucrosa</b>	30000	30000

Cuadro 10. Volúmenes utilizados de los medios de cultivo Murashige Skoog MS (1962) y Lloyd Mc Cown WPM (1980) a usar en la tesis.

Componentes	Medio MS		Medio WPM	
	1000 ml	480 ml	1000 ml	480 ml
<b>Macro elementos</b>	50	24	50	24
<b>Micro elementos</b>	5	2.4	5	2.4
<b>Fe EDTA</b>	1	0.48	10	4.8
<b>Myo inositol</b>	5	2.4	5	2.4
<b>Glicerina</b>	-	-	4	1.92
<b>Tiamina</b>	0.2	0.096	0.2	0.096
<b>Pirodoxiria</b>	-	-	0.1	0.048
<b>Aci. Nicotínico</b>	1	0.48	0.1	0.048
<b>Glicina</b>	4	1.92	-	-
<b>Azúcar (sacarosa)</b>	30	14.4	20 gr	9.6
<b>Agar</b>	4	1.92	4 gr	1.92

Cuadro 11. Respuestas de las relaciones de AIB/KIN en la micropropagación de yemas axilares en el medio MS.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>Regeneración (días)</b>	<b>Formación de brotes (días)</b>	<b>Altura (cm)</b>	<b>Número de hojas (Und)</b>	<b>Longitud de raíz</b>
<b>T1 - (0.0 AIB + 0.0 KIN)</b>	12	2	8.400	9.400	6.500
<b>T2 - (1.0 AIB + 1.0 KIN)</b>	20	3	10.40	12.600	15.10
<b>T3 - (5.0 AIB + 5.0 KIN)</b>	20	3	5.000	10.00	2.100
<b>T4 - (1.0 AIB + 5.0 KIN)</b>	17	6	4.900	11.800	0.000
<b>T5 - (5.0 AIB + 1.0 KIN)</b>	12	8	4.900	7.000	10.80
<b>T6 - (10.0 AIB + 10.0 KIN)</b>	20	6	3.200	4.400	2.200
<b>T7 - (1.0 AIB + 10.0 KIN)</b>	17	7	3.200	6.000	0.000
<b>T8 - (10.0 AIB + 1.0 KIN)</b>	12	3	6.000	6.200	18.00

