

T
631.8
A89

NO SALE A
DOMICILIO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA
PERUANA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

“NIVELES DE CONCENTRACIONES DE
FITOREGULADORES BAP Y AIB
Y SU EFECTO EN LA MULTIPLICACIÓN IN VITRO DE
SEGMENTOS NODALES EN *Myrciaria dubia* (H.B.K.)
Mc VAUGH, CAMU CAMU”

TESIS
PRESENTADO POR



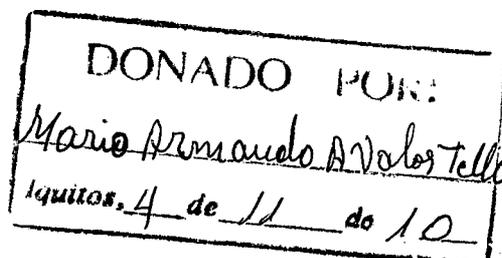
MARIO ARMANDO AVALOS TELLO

BACHILLER EN CIENCIAS AGRONÓMICAS
PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL DE

INGENIERO AGRÓNOMO

IQUITOS – PERÚ

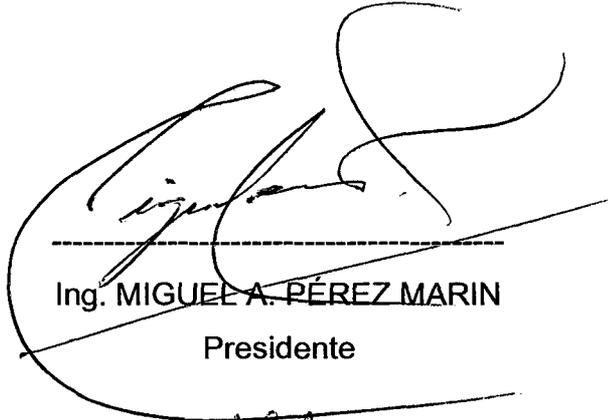
2010.



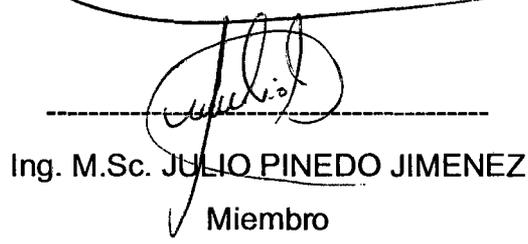
Tesis aprobada en sustentación pública el día 26 DE JUNIO DEL 2010,
por el jurado nombrado por la Facultad de Agronomía, para optar el Título
de:

INGENIERO AGRÓNOMO

JURADOS:



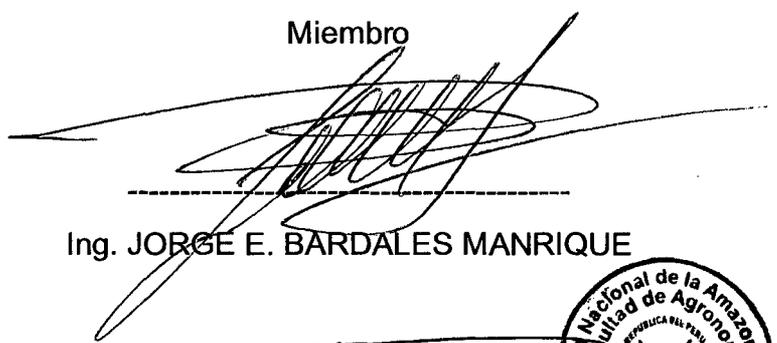
Ing. MIGUEL A. PÉREZ MARIN
Presidente



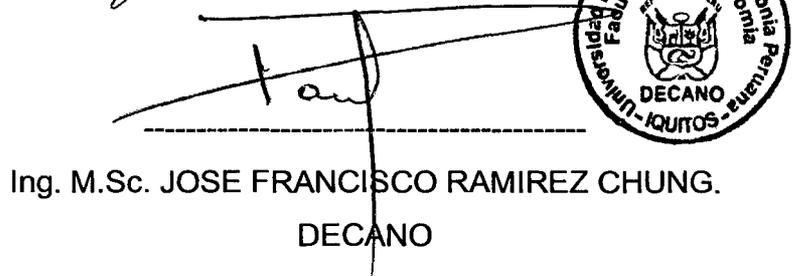
Ing. M.Sc. JULIO PINEDO JIMENEZ
Miembro



Blga. M.Sc. FELICIA DIAZ JARAMA
Miembro



Ing. JORGE E. BARDALES MANRIQUE



Ing. M.Sc. JOSE FRANCISCO RAMIREZ CHUNG.
DECANO



AGRADECIMIENTO

- Al Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), por el apoyo logístico y profesional brindados.
- Al Ing. M.Sc. Mario Pinedo Panduro, por su asesoramiento, amistad y su desprendimiento lleno de valores que a influenciado positivamente en mi formación profesional y personal.
- Al Ing. Jorge Bardales Manrique, por su asesoramiento y la corrección del presente trabajo.
- Al Ing. Sergio Pinedo Freyre por su entrañable labor en el coasesoramiento de esta tesis.
- Al Instituto Nacional de Innovación Agraria por brindarme las facilidades y habilitación de sus instalaciones.
- A la Téc. Eloisa Celis Morey por el apoyo en el mejorar diario de la tesis.

DEDICATORIA

A mi DIOS por la vida y por el amor inmenso que diariamente me da. A mi querida madre la Sra. Teresa María Tello García, por su comprensión, paciencia, confianza y apoyo constante durante mi formación profesional, con mucho amor y gratitud por el sacrificio realizado.

A mi padre el Sr. Armando Avalos Panduro, por su apoyo moral y amistad.

A mis queridos hermanos, Karen, Adonis, Alex, Martín, Roy y Héctor, por el cariño y el vínculo que nos unirá por siempre.

INDICE

PAGINA

CARATULA	1
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTO	4
INDICE DE CONTENIDOS	5
INDICE DE CUADROS	7
INDICE DE GRAFICOS	7
INDICE DE ANEXOS	8
INDICE DE FOTOS	8
INTRODUCCION	9
CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
1.1. PROBLEMAS, HIPOTESIS Y VARIABLES	11
1.2. OBJETIVO DE LA INVESTIGACION	14
1.3. FINALIDAD E IMPORTANCIA	14
CAPITULO II: REVISION LITERARIA	15
2.1. MARCO TEORICO	15
A. GENERALIDADES DEL CULTIVO	15
B. APLICACIÓN DE CULTIVO DE TEJIDOS	20
C. ETAPAS DE LA PROPAGACION	22
D. PROPAGACION CONVENCIONAL	24
2.2. MARCO CONCEPTUAL	25
CAPITULO III: METODOLOGIA	29
3.1. MATERIALES	29
a) MATERIALES DE CAMPO	29
b) MATERIALES DE LABORATORIO	29
3.2. METODOS	31
a) COLECCIÓN E INSTALACION DE ESTACAS	31
b) PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO	32
c) PREPARACION DEL MATERIAL VEGETAL	32

d) METODO DE DESINFECCION	33
e) SIEMBRA IN VITRO DE SEGMENTOS NODALES	33
3.3. FACTORES ESTUDIADOS	34
3.4. CARACTERISTICAS DEL CAMPO EXPERIMENTAL	35
3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL	35
3.6. EVALUACIONES	35
CAPITULO IV. PRESENTACION Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	36
4.1. CONTAMINACION	36
4.2. OXIDACION	37
4.3. N° BROTES/EXPLANTE	40
4.4. N° HOJAS/EXPLANTE	44
4.5. DISCUSION	46
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
5.1. CONCLUSIONES	50
5.2. RECOMENDACIONES	51
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	52
ANEXOS	56

INDICE DE CUADROS

	PAGINA
CUADRO N° 01. Tratamientos que se aplicaron para los segmentos nodales de camu camu.	34
CUADRO N° 02. Análisis de Varianza de los niveles de oxidación (%).	38
CUADRO N° 03. Prueba de Duncan del (%) de oxidación.	38
CUADRO N° 04. Prueba de Duncan del % de oxidación Factor (A) concentraciones de BAP.	39
CUADRO N° 05. Prueba de Duncan del % de oxidación Factor (B) concentraciones de AIB.	39
CUADRO N° 06. Análisis de varianza n° brotes / cm.	41
CUADRO N° 07. Prueba de Duncan n° brotes / cm.	41
CUADRO N° 08. Prueba de Duncan n° brotes / cm. Factor (A) concentraciones de BAP.	42
CUADRO N° 09. Prueba de Duncan n° brotes / cm. Factor (B) concentraciones de AIB	42
CUADRO N° 10. Análisis de Varianza n° hojas / cm.	44
CUADRO N° 11. Prueba de Duncan n° hojas / cm.	44
CUADRO N° 12. Prueba de Duncan n° hojas / cm. Factor (A) concentraciones de BAP.	45
CUADRO N° 13. Prueba de Duncan n° hojas / cm. Factor (B) concentraciones de AIB.	45
CUADRO N° 14. Datos originales de los Niveles de oxidación.	57
CUADRO N° 15. Datos tranformados al Arcsen $\sqrt{x\%}$ de los niveles de oxidación.	57
CUADRO N° 16. Datos originales del n° brotes/explante	58
CUADRO N° 17. Datos transformados a la \sqrt{x} del n° brotes/explante	58
CUADRO N° 18. Datos originales del n° hojas/explante	59
CUADRO N° 19. Datos transformados a la $\sqrt{x+1}$ del n° hojas/explante	59

INDICE DE GRAFICOS

GRAFICO N° 01. Porcentaje de oxidación de segmentos nodales de <i>Myrciaria dubia</i> (H.B.K.) McVaugh a la 8ª evaluación.	36
GRAFICO N° 02. Promedio del n° de brotes por explante a la 8ª semana de evaluación.	37
GRAFICO N° 03. Promedio de n° de hojas por explante a la 8ª semana de evaluación.	40
GRAFICO N° 04. Promedio de n° de hojas por explante a la 6ª semana de evaluación.	43

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 01. Datos originales y transformados de los resultados	57
ANEXO N° 02. Composición de las Soluciones Stock (mg/l)	60
ANEXO N° 03. Flujo de resumen de las actividades	61
ANEXO N° 04. Formato de Evaluación	62

INDICE DE FOTOS

FOTO N° 01. Tamaño de los brotes	61
FOTO N° 02. Corte de los brotes	61
FOTO N° 03. Medio de transporte de los brotes	61
FOTO N° 04. Disección de los brotes	61
FOTO N° 05. Segmentos nodales para siembra	61
FOTO N° 06. Siembra in vitro	61
FOTO N° 07. Segmentos nodales cultivados in vitro	61
FOTO N° 08. Presencia de brotes y hojas definidas	61
FOTO N° 09. Tamaño de brotes y hojas	61

INTRODUCCIÓN

El Camu- camu es un arbusto silvestre representativo de la región y es importante por los niveles excepcionalmente altos de vitamina C que contiene en la pulpa de los frutos, encontrándose un amplio rango de 877 a 3133 mg/100 g de pulpa. **PINEDO, 2002**. Los campos de aplicación de esta vitamina se han ampliado con la investigación médica, cubriendo temas no solo preventivos de la salud, sino también relacionados con el tratamiento de ciertas enfermedades y en la industria de cosméticos.

En vista de su gran importancia alimenticia y económica, este frutal es constantemente extraído, comercializado e inclusive exportado hacia otros países, especialmente al Japón. Pero la producción natural no satisface la demanda del mercado nacional e internacional; siendo necesaria su domesticación, conservación de germoplasma, mejoramiento genético y multiplicación de nuevas áreas de producción de camu camu con plantas selectas resistentes a los diferentes factores externos e internos que limitan su potencial desarrollo.

En la actualidad se están desarrollando nuevas técnicas que permitan solucionar problemas básicos aplicados a la biología de las plantas. Una de ellas es la técnica de cultivo in vitro de tejidos vegetales, parte de la biotecnología que tiene mayor aplicación práctica en la agricultura y se define como un método que consiste en aislar cualquier parte de la planta sea esta una célula, un tejido o un órgano para cultivarlo en un medio nutritivo, artificial y aséptico (**ROCA, 1993**).

Mediante este método es posible cultivar camu camu en un medio de cultivo artificial a condiciones controladas, con la finalidad de preservar el germoplasma, obtener mayor cantidad de plántulas en un tiempo mas corto y realizar una rápida multiplicación vegetativa a nivel in vitro.

Hoy en día se conoce un amplio conjunto de sustancias producidas naturalmente por las plantas y que por sus características son definidas como hormonas vegetales; pero de estas sustancias existen varias análogas sintéticas o de origen no vegetal que tienen efectos similares a estas que inhiben o estimulan ciertos procesos ligados al crecimiento y desarrollo de las plantas y que los denominamos fitoreguladores o reguladores de crecimiento. **(DELGADO, G.; ROJAS C. 2001).**

Por otro lado el efecto de la aplicación exógena de los fitoreguladores sobre el crecimiento y desarrollo de células, tejidos y órganos en cultivo, está fuertemente influenciado por otros factores como las condiciones ambientales del cultivo, el tipo de explante y el genotipo. Con frecuencia la combinación de dos o más fitoreguladores de diferente clase resulta necesaria ya sea de manera simultánea o secuencialmente.

Entre estos fitoreguladores tenemos a las Auxinas que tienen como funciones principales de estimular el alargamiento celular y el crecimiento del tallo; las Citocininas que promueven la formación de ápices, anula la dominancia apical y estimula el brotamiento de yemas laterales; en combinación éstas estimulan la división celular y diversos procesos morfogénicos como el aumento en la síntesis proteica necesaria para la mitosis, la diferenciación del xilema y el floema, así como la diferenciación de raíces, etc. Por lo tanto la interacción auxina – citocinina es indispensable en la regulación del crecimiento y organización del desarrollo de las plantas en cultivo de tejidos. **(DELGADO, G.; ROJAS C. 2001).**

Por esto, se plantea el siguiente trabajo con el fin de utilizar dos tipos de fitoreguladores como son el AIB (Auxinas) y BAP (Citocinina) a diferentes concentraciones y determinar sus efectos en la multiplicación in vitro de segmentos nodales de camu camu.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

1.1 Problema, hipótesis y variables

a. El problema

En la Amazonía peruana específicamente en la selva baja, en ciertos caseríos y comunidades los agricultores propagan el camu camu en forma tradicional, es decir por propagación sexual (semilla), sin ningún grado de conocimiento en su selección, lo cual genera una problemática, ya que se genera una gran variabilidad genética, así como también una desuniforme producción y productividad del cultivo que involucra una baja rentabilidad, además que existen pocos trabajos dedicados a su mejoramiento genético. Estas deficiencias se presentan muy notorias en la especie del Camu camu, tanto en las plantaciones de productores como en las colecciones de germoplasma evaluadas en los Centros Experimentales.

La mayor parte de las plantas utilizadas, presentan bajos niveles de productividad que no justifica una inversión de una plantación comercial perenne. Por lo tanto, la disponibilidad de semillas mejoradas para impulsar el agronegocio del Camu-camu *Myrciaria dubia* Mc Vaugh H.B.K., se ha convertido en el principal problema para los fines promocionales de las entidades públicas o para los inversionistas del sector privado en el País.

En nuestra región no existen estudios sobre multiplicación in vitro de segmentos nodales de camu camu utilizando medios de cultivo nutritivos con concentraciones diversas de componentes minerales, vitamínicos, hormonales, etc. Pero dentro de los trabajos realizados en cultivo in vitro en especies leñosas manifiestan que son las que mayores dificultades presentan en su establecimiento y multiplicación.

Parte de estas dificultades que tenemos en camu camu son la contaminación y la elevada oxidación de los explantes, que no permiten lograr objetivos in vitro, ya que estos microorganismos contaminantes (bacterias, virus, hongos, etc.) y compuestos tóxicos (fenoles) ocasionan muerte del tejido, modifican el medio de cultivo, lo agotan y liberan productos de su metabolismo, etc.

Para ello, se pondrá en estudio la utilización de dos fitoreguladores importantes como son el AIB y BAP (Auxinas y Citocininas) que nos permitirán medir el efecto que producen en la multiplicación in vitro de segmentos nodales de camu camu, a fin de obtener una alta tasa productiva, para aumentar en un corto tiempo el número de individuos o plantas definidas para ser introducidas a campo definitivo, y así conservar la uniformidad en función a las características deseables para esta especie de gran importancia.

Por lo tanto, despierta un interés y motivación sobre la realización del presente trabajo de tesis, el cual está orientado a contribuir con el mejoramiento genético del Camu camu *Myrciaria dubia* McVaugh H.B.K., a diferencia de los métodos tradicionales de propagación existentes.

b. Hipótesis

❖ General.

La utilización de un nivel de concentración adecuada de fitoreguladores mejorará el comportamiento de explante para la multiplicación in vitro de segmentos nodales de camu camu.

❖ Específica.

Que al menos un nivel de concentración de fitoreguladores permita la multiplicación in vitro de segmentos nodales de camu camu.

c. Identificación de las variables.

Variables Independientes (X):

X₁: Niveles de concentración de (AIB) – Auxina

X₂: Niveles de concentración de (BAP) – Citocinina

Variables Dependientes (Y):

Y₁: multiplicación in vitro de segmentos nodales.

d. Operacionalización de las variables.

Variables Independientes (X):

X₁: Niveles de concentración de (AIB) – Auxina

Indicadores:	X₁₁	:	0 mg/l
	X₁₂	:	0.1 mg/l
	X₁₃	:	0.3 mg/l

X₂: Niveles de concentración de (BAP) – Citocinina

Indicadores:	X₂₁	:	0 mg/l
	X₂₂	:	1.5 mg/l
	X₂₃	:	2.5 mg/l

Variables Dependientes (Y):

Y₁: Multiplicación in vitro de segmentos nodales.

Indicadores:	Y₁₁	:	Medio de cultivo
	Y₁₂	:	Segmentos nodales

1.2 Objetivos de la Investigación

a. Objetivo General.

Determinar el efecto de dos tipos y concentraciones de fitoreguladores en la multiplicación in vitro de segmentos nodales de camu camu.

b. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de diferentes concentraciones del fitoregulador BAP (0.1 mg/l, 0.3 mg/l) en la multiplicación in vitro de segmentos nodales de camu camu.
- Determinar el efecto de diferentes concentraciones del fitoregulador AIB (1.5 mg/l, 2.5 mg/l) en la multiplicación in vitro de segmentos nodales de camu camu.
- Medir el efecto de interacción de ambos factores.

1.3 Finalidad e importancia.

Finalidad.

La investigación planteada determinara la concentración de fitoreguladores adecuada para definir protocolo de multiplicación in vitro de segmentos nodales, que atienda la necesidad de multiplicación masiva de plantas selectas en el contexto del Plan de Mejoramiento Genético del Camu-camu, puesto en marcha desde el año 2005 en el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP).

CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. MARCO TEÓRICO

A) GENERALIDADES DEL CULTIVO

- **Descripción botánica.**

El Camu-camu *Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh, especie perteneciente a la familia de las mirtáceas, es un arbusto entre 3 y 8 metros. Posee hojas simples, opuestas, elípticas o largamente ovales, con 6 a 10 cm. de longitud y 1,5 a 3,0 de ancho, base oculta o arredondeada o el largo rondo-acuminada. Las flores del Camu-camu son hermafroditas de color blanco con 4 pétalos y 4 sépalos (**ALVES et al., 2000**).

El fruto es una baya globular de 2 a 3 cm de diámetro, de cascara negra violácea, pulpa globosa, color blanquecino o teñido de rosa con suaves fibrillas. Alcanza un peso de 2 a 20 g convirtiéndose en frutos globosos de 10 a 32 mm de diámetro que contiene de 1 a 4 semillas reniformes aplanadas y cubiertas con láminas de fibrillas blancas. La raíz es profunda y con muchos pelos absorbentes, formada por un eje principal que alcanza hasta 50 cm de longitud y raíces secundarias que asimilan los nutrientes del suelo para favorecer el crecimiento y desarrollo de la planta (**CALZADA, 1980**).

VILLACHICA, L. 1996. El camu camu es un arbusto que alcanza hasta 4 metros de altura, se ramifica desde la base formando varios tallos secundarios que a su vez ramifican en forma de vaso abierto.

El tallo y las ramas son glabros, cilíndricos, lisos, de color marrón o rojizo y con corteza que se desprende de forma natural.

PETERS, CH.; VÁSQUEZ, A.; (1986/1987). La floración de un individuo ocurre en forma continua. Las yemas florales emergen desde las ramas superiores hacia las ramas inferiores. Por lo tanto, un individuo puede presentar yemas florales, flores y frutos en varios estados de desarrollo al mismo tiempo.

- **Distribución geográfica.**

PINEDO et al (2001). Menciona que el camu- camu (*Myrciaria dubia*) en estado natural se localiza en fajas de ribera que pueden ser muy estrechas, como en el río Nanay (5 m), hasta muy amplias (unos 100 m) en el río Putumayo. Existen poblaciones naturales en Perú, Brasil y Venezuela. En el Perú, se encuentra en gran número de cuerpos de aguas negras. Su origen es amazónico, se encuentra en afluentes de los ríos Nanay, Napo, Ucayali, Marañón, Tigre, Tapiche, Yarapa, Tahuayo, Pintuyacu, Itaya, Ampiyacu, Apayacu, Manítí, Oroza, Putumayo, Yavari y Curaray. En Brasil, se encuentra en los ríos Tocantins y Trombetas (Estado de Pará); Yavari, Madeira, Negro y Xingú (Estado de Amazonas); Macangana y Urupé (Estado de Rondonia).

- **Clasificación Taxonómica.**

IMAN, C. SIXTO. 2000. Nos proporciona las características Taxonómicas del Camu- camu, según los estudios realizados por Humbolt, Bonpland y Kunt:

División	: Fanerógamas.
Subdivisión	: Angiosperma.
Clase	: Dicotiledóneas.
Orden	: Myrtales.
Familia	: Myrtaceae.
Género	: Myrciaria.
Especie	: dubia (H.B.K), Mc Vaugh.

a) Fenología.

La época de floración del Camu-camu silvestre depende del ciclo hidrológico. A medida que las aguas descienden, aparecen las primeras yemas foliares, y después el término de la fructificación (época de la nueva creciente de los ríos), las plantas pueden sumergirse dependiendo de la creciente, perdiendo completamente las hojas en las grandes inundaciones.

En tierra firme el cambio foliar ocurre durante todo el año; la mayor senescencia de hojas es al final de la fructificación y acentuándose el apareamiento de hojas nuevas en el inicio de la floración. En tierra firme ocurre durante casi el año entero, con picos durante la estación seca e inicio de la estación lluviosa. Observaron grandes desigualdades en la floración y fructificación en plantaciones en tierra firme, con variación en árboles que no florecen ni fructifican durante los primeros años, tanto en plantas abonadas como en las no abonadas, demostrando así que existe segregación genética en cuanto a la precocidad, adaptación a las condiciones de tierra firme y otras características **(FALCÃO, et. al., 1993)**.

En regiones alagadas, las plantas comienzan a florecer cuando el diámetro basal alcanza 2 cm. La floración sigue de esta manera desde los ramos superiores hasta los inferiores. Así la planta puede presentar al mismo tiempo, yemas florales, flores y frutos en varios estadios de maduración. Durante la antesis, el estigma es primero, y después los estambres. Este mecanismo es muy efectivo para evitar al autogamia. Polen de otra flor de la misma planta pueden efectuar polinización (91%), concluyendo de esta manera, que el Camu-camu presenta alogamia facultativa, mas no obligatoria, y no posee mecanismos de incompatibilidad genética. En términos generales, el Camu-camu, en el hábitat natural, presenta 46% de polinización, de estos el 15% de los frutos inmaduros abortan antes de la maduración **(PETERS & VASQUEZ 1986/1987)**.

En tierra firme obtuvieron un porcentaje de promedio de polinización de 32% y 29% en plantas de abonadas y no abonadas, respectivamente, siendo que en uno de los años de estiaje menos acentuado, las medias fueron de 38% en las no abonadas y 36% en las abonadas.

Después la floración en las plantas silvestres, la maduración del fruto generalmente ocurre en los meses de Enero a Abril (110 días), variando con la vaciante de los ríos. Para aumentar el periodo de oferta anual de frutos de Camu-camu, su cultivo en tierra firme sería una alternativa, pues la floración ocurre casi todo el año y La fructificación en periodos más pronunciados, coincidiendo con el fin de la estación seca y el inicio de la lluviosa. Así mismo, en los años con poco periodo de inundación normalmente se encuentran flores, frutos pequeños, y frutos maduros en la misma planta, durante el año entero. Esa fase (floración) no está sincronizada en cada planta, ocurriendo varios ciclos durante el año
FALCÃO et al. (1993)

b) Hábitat.

En hábitat silvestre, la especie se desenvuelve en sustratos aluviales, de textura limosa, arcillosa, limo- arcillosa, limo- arenosa, y en suelos pocos drenados **(CALZADA B. 1980)**.

El suelo es extremadamente ácido en rodales naturales, habiéndose encontrado valores de pH que varían de 3,25 a 4,66. En los orillares de aguas blancas, con plantaciones de camu- camu en buen estado, se encontraron valores de pH de 5,77 a 6.83, clasificados como ligeramente ácidos. Se infiere que el camu- camu desarrolla, adecuadamente, en suelos variados en pH, desde muy ácidos a ligeramente ácidos y hasta de reacción neutra **(PINEDO et al. 2001)**.

En cuanto al contenido de materia orgánica, valores medios entre 2% y 4% son considerados adecuados. Contenidos cercanos a 2% pueden encontrarse; frecuentemente, en los orillares de ríos de aguas blancas como el Napo y el Amazonas. En los rodales naturales, los valores de materia orgánica son mayores (rango de 3,8 a 12%) **(PINEDO *et al.* 2001).**

La planta esta adaptada a suelos con inundación temporal o con mal drenaje, mas no en áreas pantanosas. Adaptada a suelos ácidos de baja fertilidad, mas crece mejor en suelos húmedos con textura media pesada, pH mayor que 5.0 e buen nivel de fertilidad. Cuanto mayor la fertilidad del suelo, mayor la producción y la precocidad de la planta en iniciar la producción. Algunas veces, en un año atípico con rápida subida de agua, las plantas pueden quedar totalmente sumergidas durante 3 a 4 meses. Suponiéndose que la fisiología de la planta se altere como si estuviese invernando, coincidiendo con la época de maduración del fruto; por eso, la dispersión natural de la especie ocurre normalmente.

El clima en las zonas donde crece de manera natural, cuenta con temperatura media anual de 25°C. Con precipitaciones pluviales de 2000 a 3000 mm. /año en las zonas donde es silvestre. También se cultiva en zonas con 1700 a 3000 mm. /año. Con menos de 2500 mm. de precipitación anual, se debe plantar en suelos con drenaje deficiente, que permite un almacenamiento de agua durante la época seca **(VILLACHICA L. 1996).**

c) Importancia ecológica-económica

Los frutos constituyen una importante fuente de vitaminas y sales minerales para la ictiofauna distribuidos en los ríos y afluentes, responsable de la dispersión de las semillas a grandes distancias, colonizando áreas diferentes para luego germinar, se establecen y forman comunidades poblacionales, cuando las condiciones son favorables. Las especies de la ictiofauna que son las responsables en mayor grado de importancia son (*colossoma macropomum*), (*Mylesinus schomburgki*), (*Brycom brevicauda*) y (*Prochilodus nigricans*). (OLIVA, C.C. 2002).

El alto nivel de ácido ascórbico hace del camu- camu una fruta muy atractiva para el mercado extranjero. La fruta con mayor nivel de ácido ascórbico actualmente cultivada es la acerola, que posee cerca de 46.8% del ácido ascórbico encontrado en el camu- camu (VILLACHICA L. 1996).

B) CULTIVO IN VITRO

Dentro de los estudios realizados en cultivo in vitro de especies leñosas, se pueden mencionar a JORDAN et al., 1985. Quienes expresan que las especies forestales y leñosas en general son las que mayores dificultades presentan en el establecimiento y desarrollo in vitro.

ARIAS, 1995. Trabajó con nogal (*Junglas neotropica Diels*) a partir de embriones, yemas y nudos; logrando obtener plantas completas. Señala que los mejores tratamientos en la fase preliminar, fueron aquellos en que se utilizó hipoclorito de sodio (lejía) y alcohol, ya que no tuvieron efectos negativos sobre la germinación in vitro.

SALINAS, 1995. Trabajó en micropropagación in vitro de tornillo (*Cedrelinga cateniformis*), donde reporta que los diferentes tratamientos de desinfección tuvieron efectos sobre la contaminación y sobrevivencia de los explantes y el mejor tratamiento de desinfección fue con Hipoclorito de sodio (lejía) al 2%, Benlate al 2% por 5 minutos y Alcohol al 96% por un minuto.

BADILLA et al., 1992. Utilizó ápices y microestacas de jaul (*Alnus acuminata*) para establecerlas in vitro y al realizar los cortes al material, éste se torno de color café a pocos minutos debido a la oxidación de fenoles que se convierten en quinonas, las cuales son tóxicas y dañan las células del material.

REY et al., 1991. Señala que los segmentos nodales y los explantes foliares de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) tienen un comportamiento in vitro similar al mostrado por la mayoría de especies leñosas, pues la implantación de los cultivos puede verse dificultada por la contaminación por hongos y bacterias. El ennegrecimiento (oxidación) de los explantes esta estrechamente relacionado con la utilización de las concentraciones mas altas del medio básico que evidentemente resultan toxicas.

PARRA et al., 1991. Utilizaron Hipoclorito de sodio durante 5 minutos, y se presentó 55% de contaminación por hongos y bacterias; mientras que durante 10 minutos presento 30%. También señalan que la aplicación de PVP, previo a la desinfección y en el medio el porcentaje de oxidación fue progresivo y elevado, encontrándose a los 21 días después de la siembra, 75% de ennegrecimiento. El % de sobrevivencia fue del 4.17%.

GUEVARA et al., 1992. Trabajaron con cedro dulce (*Cedrela tonduzii*) donde indican que los hongos fueron el principal agente causante de contaminación. Las estacas fueron el tipo de explante que presentó mayores problemas de contaminación tanto por bacterias como por hongos.



: 923

C) ETAPAS DE LA PROPAGACION IN VITRO

Según **Olmos et al. (2002)**, la regeneración de plantas in vitro presentan cuatro etapas principales:

ETAPA 0: Preparación del material vegetal.

El empleo de explantes que se encuentran a bajos niveles de patógenos puede resolver el problema de contaminación por hongos y bacterias durante el establecimiento del cultivo in vitro. Los factores que influyen sobre la calidad del explante son:

- El tipo de órgano que sirve como explante.
- La edad ontogénica y fisiológica del tipo de órgano.
- La estación en la cual se colecta el material vegetal.
- El tamaño y el estado sanitario general de la planta donante.

La planta donante debe elegirse sobre la base de una selección masal positiva para las características agronómicas deseables. En general, el material joven utilizado es el que tiene mejor respuesta en el establecimiento que los obtenidos a partir de material adulto.

ETAPA 1: Establecimiento del cultivo.

El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y axénicos. El éxito está determinado por la edad de la planta donante, la edad fisiológica, el estado de desarrollo y el tamaño del explante. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes. La obtención de cultivos axénicos puede lograrse trabajando tanto sobre aspectos preventivos como curativos.

Por otro lado las plantas enfermas pueden tratarse con técnicas adecuadas para la eliminación de patógenos como la termoterapia, la quimioterapia a través de la aplicación de antibióticos, desinfectantes, antivirales y el cultivo de meristemas. Esta fase se completa cuando un número adecuado de explantes sobrevivieron sin contaminarse e iniciaron su proceso de crecimiento.

ETAPA 2: Multiplicación.

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento, bulbificación, etc.). Es importante señalar que en esta etapa cualquiera que sea la vía de regeneración empleada, es conveniente evitar la formación de callo para disminuir el riesgo de variación somaclonal.

En esta etapa los medios de cultivo, fitoreguladores y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantes. Las condiciones culturales en las cuales crece el explante son el resultado de la interacción de tres factores: El estado del explante, el medio de cultivo y el ambiente externo. La capacidad de respuesta de los explantes a un mismo medio de cultivo cambia con el número de subcultivos, el tipo subcultivado de explantes y el método de repique. Por esto mismo el medio de cultivo debe optimizarse a fin de lograr la mayor tasa de multiplicación vegetativa. Los tipos de fitoreguladores, sus combinaciones y rangos de concentraciones deben ser optimizados para cada especie, genotipo y etapa de multiplicación determinada.

ETAPA 3: Enraizamiento.

En esta etapa se produce la formación de raíces adventicias .En las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en las especies leñosas es complicado por su limitada capacidad rizogénica.

ETAPA 4: Aclimatación.

El enraizamiento ex vitro permite que el enraizamiento y aclimatación se logren simultáneamente y que raramente se forme callo en la base de las estacas, asegurando así una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz; sin embargo el estrés asociado a la evapotranspiración acelerada de las plantas durante las etapas iniciales del trasplante puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia. Por ello es conveniente contar con instalaciones de invernadero, para brindar temperatura y humedad relativa moderadas, que permitan lograr la rusticación de las plantas en forma progresiva. Bajo condiciones ex vitro se utilizan diferentes sustratos, mezclas de tierra y arena, los cuales conviene que estén debidamente esterilizados.

D) PROPAGACION CONVENCIONAL

Hudson y Dale (1978). La propagación de plantas por estacas, permite obtener en corto tiempo plantas de mayor producción y con características de la planta madre; también se acorta el periodo de fructificación. Además manifiestan que una estaca es una parte del tallo, que colocada bajo condiciones favorables, nos permite obtener una planta idéntica a su progenitora.

AREVALO, G. (1996). Menciona que se practicaron ensayos de diferentes tipos de estacas: estaca apical, estaca media y estaca basal con un testigo de semilla botánica. La estaca basal, resulto ser el mejor material de propagación, pues tuvo un mejor prendimiento, aunque no se llevo a realizar el trasplante.

MANCO, E. (2005). Recomienda que el método de propagación mas efectiva es la sexual puede sembrarse directamente en el campo o vivero; y se ha conseguido acelerar la germinación de 8 a 10 días haciendo un raspado a las semillas.

2.2. MARCO CONCEPTUAL

- **Adventicio.** Referido a órganos vegetales (raíces, tallos, etc.) que aparecen a partir de estructuras no preformadas. (**Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación**).
- **Análisis de Varianza.** Técnica descubierta por Fisher, es un proceso aritmético para descomponer una suma de cuadrados total y demás componentes asociados con reconocidas fuentes de variación. (**Hurtado 1987**).
- **Asepsia.** Conjunto de procedimientos científicos destinados a eliminar gérmenes infecciosos o patógenos de un organismo u objeto. (**Pinedo 2001**).
- **Auxinas.** Grupo de reguladores del desarrollo vegetal relacionado con la elongación celular, dominancia apical, iniciación de raíces, etc. Algunas de las auxinas usadas frecuentemente en cultivos in vitro son: Ácido Indolacético (AIA), Ácido Naftaleneacético (ANA), Ácido Indolbutírico (AIB) y Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). (**Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación**).
- **Axénicos.** Referido a la característica fitosanitaria de los explantes, es decir libre de impurezas (desinfectadas). (**Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación**).
- **Biotecnología.** Toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos en usos específicos. (**Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación**).
- **Citoquininas.** Grupo de reguladores del desarrollo vegetal que causan división celular, diferenciación celular, diferenciación de tallo, rotura de la dominancia apical, etc.

Algunas citoquininas usadas en el cultivo de tejidos son: la quinetina, Benzilaminopurina (BAP), 2-isopenteniladenina (2-ip) y zeatina. **(Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación).**

- **Coefficiente de Variación.** Es una medida de variabilidad relativa, que indica el porcentaje de la media correspondiente a la variabilidad de los datos. **(Hurtado 1987).**
- **Cultivo de tejidos.** Cultivo in vitro de células, tejidos u órganos en un medio con sustancias nutritivas bajo condiciones estériles. **(Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación).**
- **Diferenciación.** Desarrollo en el explante de nuevas características morfológicas o fisiológicas. **(Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación).**
- **Explante.** Es el fragmento o tejido escisado del material parental para iniciar un cultivo in vitro; también se le denomina propágalo. **(Franquesa y Molins 1997).**
- **Fenotipo.** Conjunto de todas los caracteres aparentes expresados por un organismo, sean o no hereditarias. **(Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación).**
- **Fotoperíodo.** Alternancia de horas de luz y de oscuridad en un día. **(Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación).**
- **Genotipo.** Constitución genética, de uno o más genes, de un organismo en relación a un rasgo hereditario específico o a un conjunto de ellos. **(Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación).**
- **Germoplasma.** La variabilidad genética total, representada por células germinales, disponibles para una población particular de organismos. **(Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación).**

- **Hormonas.** Sustancia orgánica de origen natural de las plantas y que en bajas concentraciones influyen en los procesos fisiológicos; principalmente en los procesos de crecimiento, diferenciación y desarrollo de la planta. **(Ancelucii 1987).**
- **In vitro.** Literalmente "en vidrio", se aplica a los cultivos (o procesos) que se desarrollan en recipientes estériles. **(Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación).**
- **Inducir.** Causar la iniciación de un proceso o estructura. **(Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación).**
- **Material genético.** todo material de origen vegetal, animal, microbiano o de otro tipo que contenga unidades funcionales de la herencia. **(Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación).**
- **Meristemo.** Grupo localizado de células en continua división, a partir de las cuales se forman nuevos tejidos y órganos (raíces, tallos, etc.) **(Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación).**
- **Meristemático.** Que tiene las características del meristemo. **(Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación).**
- **Micropropagación.** Propagación asexual (vegetativa) *in vitro* de plantas. **(Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación).**
- **Morfogénesis.** Desarrollo de algún carácter morfológico o estructura del organismo. **(Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación).**
- **Oxidación.** Aspecto común que presentan los tejidos vegetales como resultado de una herida; esta suele manifestarse por un oscurecimiento del tejido y generalmente precede a la inhibición del crecimiento y en los casos graves a la necrosis y muerte del tejido. **(Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación).**

- **Protocolo.** Documento de normalización que establece su justificación, los objetivos, el diseño, la metodología y el análisis previsto de los resultados así como las condiciones bajo las que se realizará y desarrollará. (**Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación**).
- **Prueba de Duncan.** Prueba de significancia estadística utilizada para realizar comparaciones precisas, se aun cuando la prueba de Fisher en el análisis de varianza no es significativa. (**Hurtado 1987**).
- **Totipotente.** Capacidad que tienen las células de regenerarse. Se aplica a las células que pueden dar origen a células de todos los órdenes. (**Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación**).
- **Yema.** Tejido meristemático cubierto por escamas protectoras, que son hojas rudimentarias o en formación, se localiza en el ápice de una rama o en las axilas de las hojas. (**Font 1993**).

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. Materiales.

a. Materiales de campo:

- Material vegetal.
- Tijeras podadoras de mano.
- Vernier o Pie de Rey.
- Marcador indeleble.
- Cámara Digital.
- Libreta de campo.
- Machete.

b. Materiales de Laboratorio:

❖ Equipos:

- Horno.
- Autoclave.
- Refrigeradora.
- pH metro.
- Agitadores Magnéticos.
- Balanza Analítica.
- Destilador para Agua.
- Cámara de Flujo laminar

❖ Material de Vidrio:

- Pipetas.
- Matraces Erlenmeyers.
- Frascos estériles.
- Probeta graduada.
- Vasos de precipitado.
- Mecheros de alcohol.
- Tubos de ensayo.
- Fiolas.

❖ Medios de Cultivo:

- Murashige & Skoog (1962) M&S COMPLETO

❖ Componentes del medio:

- Nutrientes mayores y menores
- Gelificantes

❖ Fitoreguladores:

- Bencilaminopurina (BAP)
- Acido Indolbutírico (AIB)

❖ Desinfectantes y Aditivos:

- Hipoclorito de Sodio NaOCl (Lejía).
- Alcohol de 70° y 96°
- Carbón activado
- Phytigel

❖ Otros materiales:

- Algodón.
- Gradillas.
- Escobillas.
- Detergentes.
- Papel aluminio.
- Papel secante.

❖ Material de Gabinete:

- Útiles de Oficina.
- Literatura.
- Computadora.
- Papelería en general.

3.2. Métodos

a. Colección e instalación de las estacas.

✓ Trabajo en Campo. Selección, colecta y transporte de las estacas.

El material vegetal utilizado, consta de ramas o varas tomadas de la parte apical de plantas adultas, las cuales fueron seleccionadas según genotipo en estudio; tratando de que las ramas a colectar sean lo más óptimo (Edad, tamaño y estado fenológico de la planta).

Las ramas o varas seleccionadas fueron cortadas a una longitud de 40 cm. y diámetros entre 0.8 a 1.2 cm. respectivamente, con la ayuda de un vernier para tomar los datos biométricos; posteriormente se eliminaron en su totalidad la masa foliar con la ayuda de una tijera de corte podadora. Estas estacas o ramas fueron envueltas en papel periódico o secante humedecidos con agua y colocadas en un termo de tecnopor para su transporte al laboratorio.

✓ Trabajo en Laboratorio. Lavado, desinfección e instalación de estacas.

Para el lavado de las muestras colectadas, se utilizó agua tratada en un volumen de dos litros agregando 10 ml. de Hipoclorito de Sodio NaOCl (lejía), a una concentración de 5,25 % depositados en una bandeja de plástico para dejarlas en reposo por espacio de 10 minutos antes de realizar el proceso de lavado.

Una vez terminado el tiempo de desinfección superficial de las ramas se procedió a lavar cada rama con ayuda de un cepillo tratando de no dañar las futuras yemas. Una vez lavado el material vegetal se procedió a cortarlas 5 cm. por cada lado; se tomó muy en cuenta la polaridad de cada estaca con tamaño final de 30 cm. para su instalación en tubos de ensayo de 25 x 150 mm. conteniendo agua tratada o clorada en un volumen de 50 ml. por cada tubo.

b. Preparación del Medio de cultivo.

Para la preparación del medio de cultivo, se procedió a llenar aproximadamente 500 ml. de agua destilada en un matraz, colocándolo sobre un agitador magnético a agitación constante, donde utilizando pipetas de diferentes capacidades, se agregaron las cantidades de soluciones STOCK (A, B, C, D y E), previamente preparadas; se adicionó sacarosa y una vez bien disuelta se enrazó la solución a un litro, donde se incluyó un agente gelificante, carbón activado como antioxidante y se distribuyeron las concentraciones de fitoreguladores para cada tratamiento.

Luego se midió y ajustó el pH dentro de un rango de 5.7 – 5.8, después se procedió a hervir la solución y dispensando a un volumen de 6 ml en cada tubo de ensayo los cuales fueron asegurados con tapas de plástico de distintos colores para cada tratamiento; así mismo se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos. Finalmente los medios de cultivo fueron dejados a enfriar para ser guardadas en refrigeración para su uso inmediato.

c. Preparación del material vegetal.**Obtención de los segmentos nodales.**

Los segmentos nodales (2 yemas) utilizados para la siembra en el medio de cultivo se obtuvieron a partir de los 30 días después de su instalación y se realizó el corte de estos brotes en su estado de hoja abierta; estos segmentos se empiezan a formar a partir de los 10 - 15 días después de su instalación en los tubos de ensayo.

Los cortes de los segmentos nodales fueron de 5 a 7 cm. de longitud, conservando de 2 a 3 yemas por corte, para de esta manera tener la posibilidad de obtener un mayor número de brotes.

Una vez cortados los segmentos fueron depositados en un envase de plástico conteniendo agua destilada como medio de transporte inmediato para no permitir la deshidratación de las muestras.

d. Método de desinfección

Los segmentos nodales fueron llevados a la cámara de flujo laminar donde la desinfección es como sigue: La primera desinfección superficial es con alcohol al 70° por espacio de 30 segundos. La segunda desinfección de profundidad con Hipoclorito de sodio NaOCl (lejía) por espacio de 10 minutos, posteriormente se realizaron tres lavados con agua destilada estéril por 15, 10 y 5 minutos respectivamente.

e. Siembra in vitro de los segmentos nodales

Dentro de la cámara de flujo laminar, sobre papel estéril haciendo uso del material de disección previamente esterilizados, los segmentos nodales fueron cortados y despojados de sus hojas; de esa manera se obtuvo un explante final de dos yemas para la siembra in vitro, donde utilizando pinzas se procedió a colocarlos suavemente sobre los tubos de ensayo conteniendo el medio de cultivo, tomando en cuenta la polaridad de desarrollo de estos segmentos.

Por ultimo los tubos fueron tapados con plástico (Cling Wrap) y trasladados a la cámara de crecimiento acondicionada con temperatura promedio de 22°C, una humedad relativa de 70%, fotoperiodo de 16 horas.

3.3. FACTORES ESTUDIADOS

FACTOR A: Concentraciones de BAP

A1	:	0 mg/l.
A2	:	0.1 mg/l.
A3	:	0.3 mg/l.

FACTOR B: Concentraciones de AIB

B1	:	0 mg/l.
B2	:	1.5 mg/l.
B3	:	2.5 mg/l.

Factores constantes: Medio de cultivo al 100% (M&S 1962), Hipoclorito de sodio al 0.05% por un tiempo de 15 minutos, segmentos nodales.

Unidad Experimental: 01 tubo

Repeticiones: 6 repeticiones por tratamiento

CUADRO N° 01. Tratamientos que se aplicaron

Tttos.	COMBINACION	CONCENTRACIONES
T1	A1B1	0 mg/l BAP + 0 mg/l AIB
T2	A1B2	0 mg/l BAP + 1.5 mg/l AIB
T3	A1B3	0 mg/l BAP + 2.5 mg/l AIB
T4	A2B1	0.1 mg/l BAP + 0 mg/l AIB
T5	A2B2	0.1 mg/l BAP + 1.5 mg/l AIB
T6	A2B3	0.1 mg/l BAP + 2.5 mg/l AIB
T7	A3B1	0.3 mg/l BAP + 0 mg/l AIB
T8	A3B2	0.3 mg/l BAP + 1.5 mg/l AIB
T9	A3B3	0.3 mg/l BAP + 2.5 mg/l AIB

3.4. Características del campo experimental.

El trabajo de investigación se desarrollo en los ambientes de la Subdirección de Recursos Genéticos y Biotecnología (SUDIRGEB), Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto Nacional de Innovación Agraria - San Roque – INIA, ubicado en el AA. HH. “San Roque” - Distrito de San Juan Bautista.

3.5. Diseño Experimental.

Según la naturaleza del estudio se opto por utilizar el Diseño Completamente al Azar (DCA), en la cual contamos de un número determinado de tratamientos y cuyo modelo aditivo lineal es el siguiente:

$$Y_{ij} = u + t_i + E_{ij}$$

Y_{ij} = Variable respuesta correspondiente al i-esimo tratamiento y a la j-esima repetición.

u = Media general (efecto general).

t_i = Efecto del i-esimo tratamiento.

E_{ij} = Error aleatorio, error experimental, variación debida al azar o variación de muestreo.

3.6. EVALUACIONES

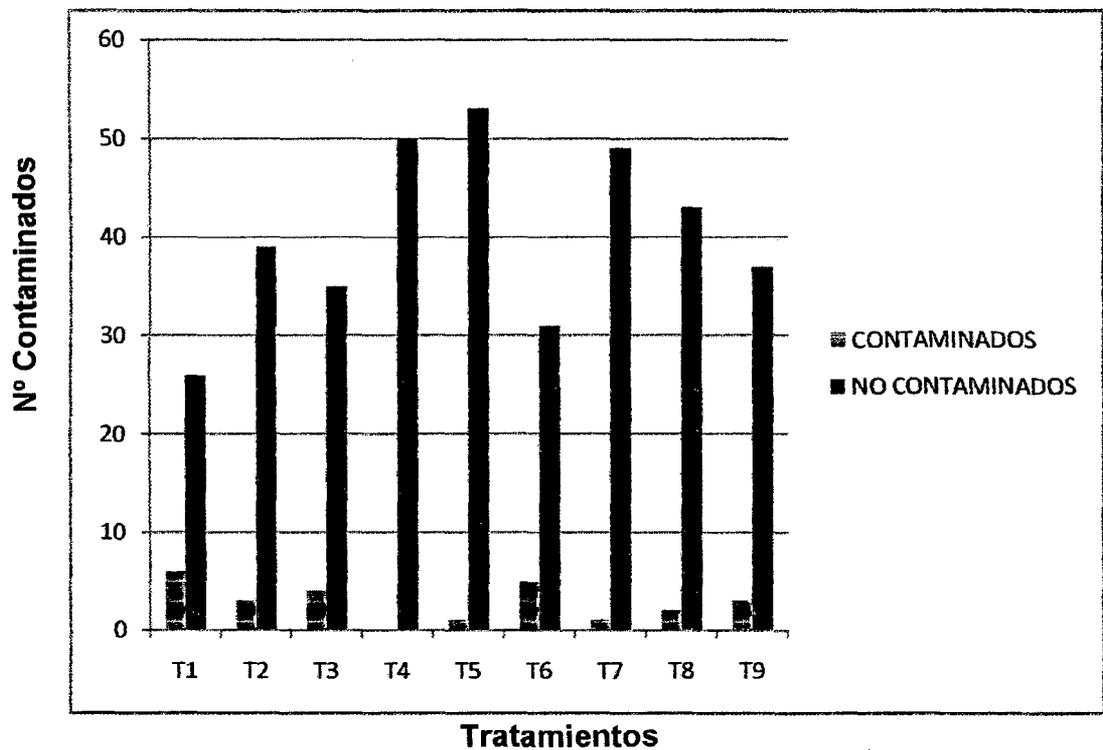
Se realizaron observaciones semanalmente, registrando en una ficha de evaluación (Anexo N° 04) los cambios ocurridos o respuestas de los explantes. Los tubos contaminados fueron desechados y los no contaminados sirvieron para continuar con las evaluaciones.

CAPITULO IV. PRESENTACION Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS.

4.1. CONTAMINACION.

En el Gráfico N° 01 se describe acerca del número de explantes no contaminados lo cual resulta ser mayor, mientras que los explantes contaminados resultan ser un promedio menor, siendo este porcentaje de 96.56 % y 6.44% respectivamente.

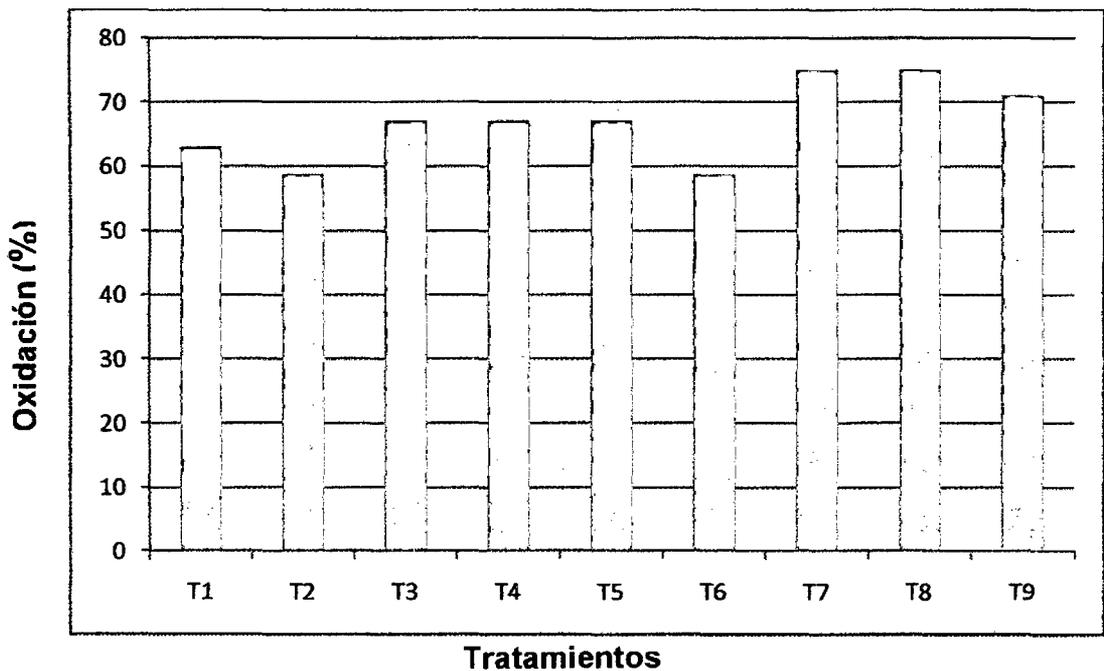
GRAFICO N° 01. N° de explantes contaminados.



4.2. OXIDACIÓN.

Para evaluar la variable oxidación se trabajó con aquellos explantes que no fueron contaminados. El Grafico N° 02 muestra el porcentaje de oxidación de los explantes a la 6^{ta} semana de evaluación donde se observa que los **T7 y T8** presentan un mayor porcentaje de oxidación (**75 %**), mientras que los **T2 y T6** un menor porcentaje de oxidación (**58.68%**).

GRAFICO N° 02. Porcentaje de oxidación de segmentos nodales de *Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh a la 6^{ta} evaluación.



CUADRO N° 02. ANALISIS DE VARIANZA DE OXIDACION (%).

Fy	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					0.05	0.01
Tratam.	8	675	84.38	0.58 NS	2.15	2.93
A	2	475	237.5	1.64 NS	3.21	5.11
B	2	25	12.50	0.08 NS	3.21	5.11
AB	4	175	43.75	0.30 NS	2.58	3.77
ERROR	45	6525	145			
TOTAL	53	7200				

NS: No Significativo

Coefficiente de Variación: 17.96%

Según el Análisis de Varianza en el **Cuadro N° 02** se aprecia que no hay diferencia estadística significativa para las fuentes de variación puestas en evaluación: Los tratamientos del Factor A (Concentraciones de BAP), Factor B (Concentraciones de AIB) y la interacción AB (Concentraciones de BAP Y AIB); el coeficiente de variación de 17.96% indica confianza experimental de los resultados obtenidos.

Para mejor interpretación de los resultados se hizo la prueba de Duncan que se indica en el **Cuadro N° 03**.

CUADRO N° 03. PRUEBA DE DUNCAN DEL % DE OXIDACION.

OM	TRATAMIENTO		PROMEDIOS %	SIGNIFICACION (*)
	Clave	Descriptivo BAP – AIB		
1	T7	0.3 mg/l – 0 mg/l	75.00	a
2	T8	0.3 mg/l – 1.5 mg/l	75.00	a
3	T9	0.3 mg/l – 2.5 mg/l	71.13	a
4	T5	0.1 mg/l – 1.5 mg/l	67.10	a
5	T4	0.1 mg/l – 0 mg/l	67.10	a
6	T3	0 mg/l – 2.5 mg/l	67.10	a
7	T1	0 mg/l – 0 mg/l	62.94	a
8	T2	0 mg/l – 1.5 mg/l	58.68	a
9	T6	0.1 mg/l – 2.5 mg/l	58.68	a

- Promedio con letras iguales no difireren estadísticamente.

Según el **Cuadro N° 03** se observa la presencia de un (01) grupo estadísticamente homogéneo entre sí, siendo **T7 (0.3 mg/l – 0 mg/l)** quien tuvo 75% de oxidación, mientras que **T6 (0.1 mg/l – 2.5 mg/l)** tuvo promedio igual a 58.68%.

CUADRO N° 04. PRUEBA DE DUNCAN DEL % DE OXIDACION FACTOR (A) CONCENTRACIONES DE BAP.

OM	FACTOR (A)		PROMEDIOS %	SIGNIFICACION (*)
	Clave	Descriptivo		
1	A3	0.3 mg/l.	73.73	a
2	A2	0.1 mg/l.	64.34	b
3	A1	0 mg/l.	62.94	b

- Promedio con letras iguales no difieren estadísticamente.

El **Cuadro N° 04** indica % de oxidación Factor A donde **A3 (0.3 ppm)** ocupó el primer lugar del orden de merito con promedio de 73.73% superando a **A2 (0.1 ppm)** y **A1 (0 mg/l)** que conforman el grupo homogéneo y tuvieron promedios igual a 64.64% y 62.94% respectivamente.

CUADRO N° 05. PRUEBA DE DUNCAN DEL % DE OXIDACION FACTOR (B) CONCENTRACIONES DE AIB.

OM	FACTOR (B)		PROMEDIOS %	SIGNIFICACION (*)
	Clave	Descriptivo		
1	B1	0 mg/l	68.46	a
2	B2	1.5 mg/l	67.10	a
3	B3	2.5 mg/l	65.73	a

- Promedio con letras iguales no difieren estadísticamente.

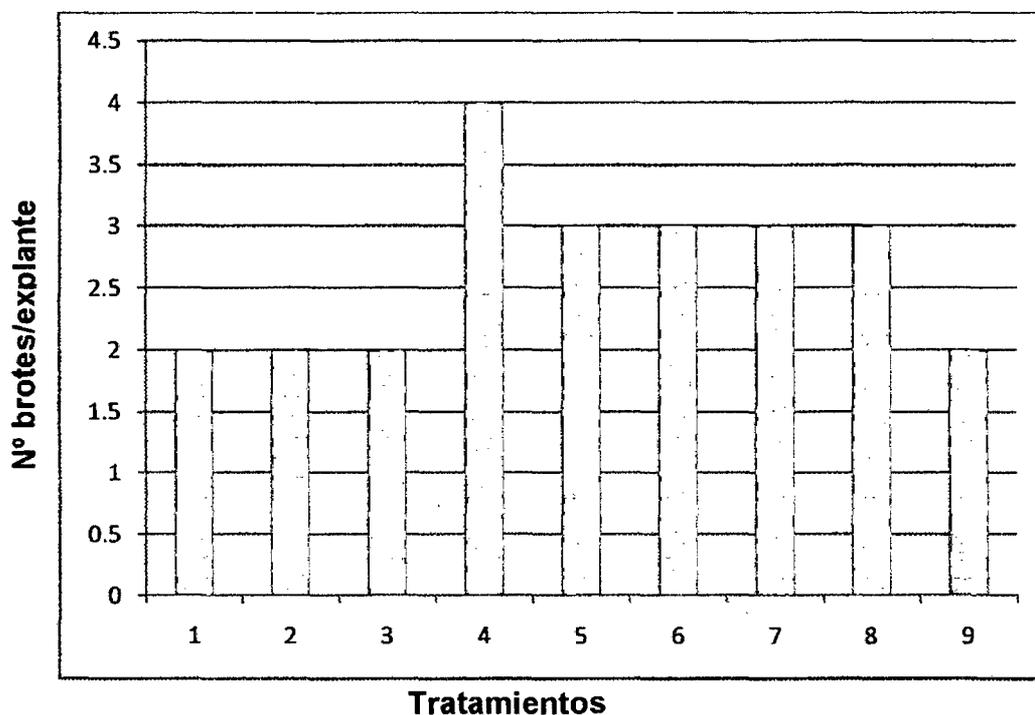
En el **Cuadro N° 05** se indica la prueba de Duncan del % oxidación Factor B, se observa un solo grupo estadísticamente homogéneo entre si, donde **B1 (0 mg/l)** tuvo promedio de 68.46%, mientras que **B3 (2.5 mg/l)** tuvo promedio de 65.73% que ocupó el tercer lugar del orden de merito (OM).

4.3. N° BROTES/EXPLANTE

GRAFICO N° 03. Promedio del N° de brotes por explante a la 6ª semana de evaluación.

Para evaluar esta variable se tomo en cuenta la viabilidad de los explantes en función a la progresiva oxidación existente.

El Grafico N° 03 nos muestra promedio del n° de brotes por explante a la 6ª semana de evaluación, donde se observa que el T4 fue el que tuvo mayor número de brotes por explante (04), comparada con los demás tratamientos T5, T6, T7 y T8 que tuvieron (03) y T1, T2, T3 y T9 con (02) brotes por explante.



CUADRO N° 06. ANALISIS DE VARIANZA N° BROTES/EXPLANTE.

Fy	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					0.05	0.01
Tratam.	8	1.85	0.23	38.33 **	2.15	2.93
A	2	1.39	0.70	** 116.67	3.21	5.11
B	2	0.15	0.08	** 13.33	3.21	5.11
AB	4	0.31	0.08	** 13.33	2.58	3.77
ERROR	45	0.29	0.006			
TOTAL	53	2.14				

**** Alta Diferencia Estadística.**

Coefficiente de variación: 4.75%

En el **Cuadro N° 06** indica el ANVA del N° de brotes/explante, donde se observa alta diferencia estadística para tratamientos del Factor A, B y la interacción AB, el C.V de 4.75% indica confianza experimental de los datos obtenidos. Para mejor interpretación de los resultados se uso la Prueba de Duncan.

CUADRO N° 07. PRUEBA DE DUNCAN N° BROTES/EXPLANTE.

OM	TRATAMIENTO		PROMEDIOS %	SIGNIFICACION (*)
	Clave	Descriptivo BAP – AIB		
1	T4	0.1 mg/l – 0 mg/l	4.0	a
2	T6	0.1 mg/l – 2.5 mg/l	3.0	b
3	T5	0.1 mg/l – 1.5 mg/l	3.0	b
4	T7	0.3 mg/l – 0 mg/l	3.0	b
5	T8	0.3 mg/l – 1.5 mg/l	3.0	b
6	T3	0 mg/l – 2.5 mg/l	2.0	c
7	T9	0.3 mg/l – 2.5 mg/l	2.0	c
8	T1	0 mg/l – 0 mg/l	2.0	c
9	T2	0 mg/l – 1.5 mg/l	2.0	c

El **Cuadro N° 07** muestra que **T4 (0.1 mg/l – 0 mg/l)** ocupó el primer lugar del OM con promedio de brotes/cm igual a 4, superando estadísticamente a los demás tratamientos que constituyen dos grupos homogéneos donde **T2 (0 mg/l – 1.5 mg/l)** ocupó el último lugar con promedio 2 brotes/cm.

**CUADRO N° 08. PRUEBA DE DUNCAN N° BROTES/EXPLANTE.
FACTOR (A) CONCENTRACIONES DE BAP**

OM	FACTOR (A)		PROMEDIOS %	SIGNIFICACION (*)
	Clave	Descriptivo		
1	A2	0.1 mg/l	3	a
2	A3	0.3 mg/l	3	a
3	A1	0 mg/l	2	b

En el **Cuadro N° 08** indica la prueba de Duncan para el n° de brotes que **A2 (0.1 mg/l)** y **A3 (0.3 mg/l)** con promedio de 3 brotes superaron estadísticamente a **A1 (0 mg/l)** que tuvo 2 brotes.

**CUADRO N° 09. PRUEBA DE DUNCAN N° BROTES/EXPLANTE.
FACTOR (B) CONCENTRACIONES DE AIB.**

OM	FACTOR (A)		PROMEDIOS %	SIGNIFICACION (*)
	Clave	Descriptivo		
1	B1	0 mg/l	3	A
2	B2	1.5 mg/l	3	A
3	B3	2.5 mg/l	2	B

- **Promedio con letras iguales no difieren estadísticamente.**

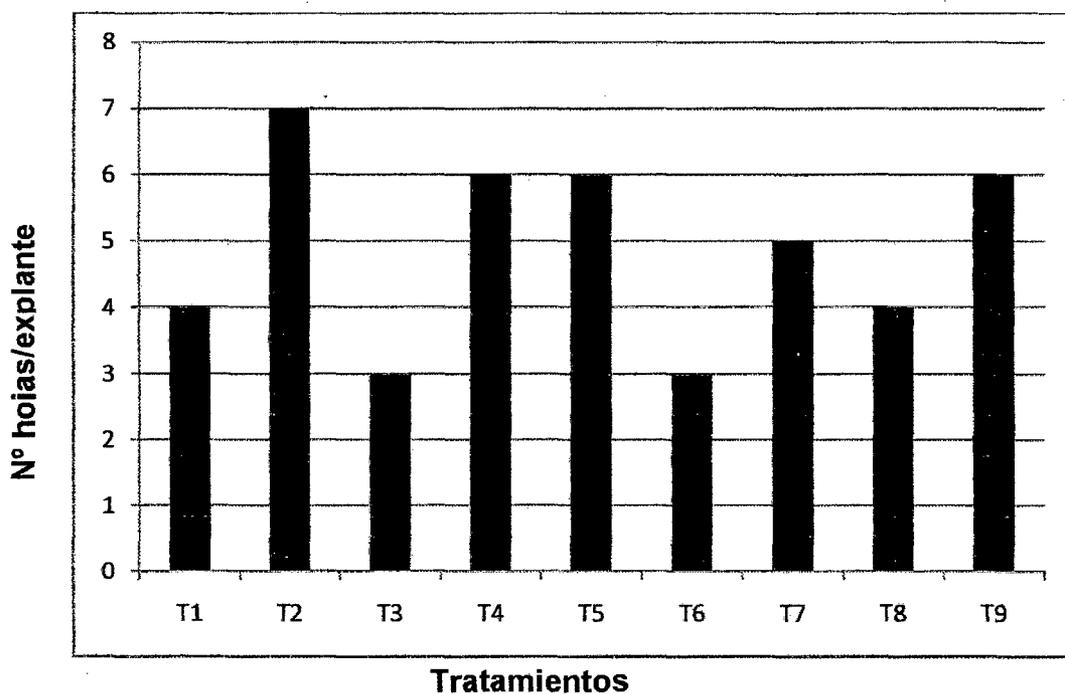
En el **Cuadro N° 09** se aprecia la prueba de Duncan del n° de brotes que **B1 (0 mg/l)** y **B2 (1.5 mg/l)** están con promedio de 3 brotes (grupo homogéneo), superaron estadísticamente a **B3 (2.5 mg/l)** que ocupó el último lugar con promedio de 2 brotes.

4.4. N° HOJAS/EXPLANTE.

GRAFICO N° 04. Promedio de n° de hojas por explante a la 6ª semana de evaluación.

Para evaluar esta variable se tomo en cuenta el crecimiento continuo de los brotes, dando paso a la formación de hojas y también en función a la progresiva oxidación existente.

El Grafico N° 04 nos muestra el promedio del n° de hojas por explante a la 6ª semana de evaluación, donde se observa una variable cantidad en los tratamientos, donde T2 tuvo mayor número de hojas por explante (07), en comparación con los demás tratamientos T4, T5 y T9 con (06); T7 con (5); T1 y T8 con (04); y por último T3 y T6 con (03) hojas por explante.



CUADRO N° 10. ANALISIS DE VARIANZA N° HOJAS/EXPLANTE

Fy	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					0.05	0.01
Tratam.	8	4.84	0.61	0.61	2.15	2.93
A	2	0.86	0.43	0.86	3.21	5.11
B	2	1.53	0.68	1.36	3.21	5.11
AB	4	2.63	0.66	1.32	2.58	3.77
ERROR	45	22.62	0.50			
TOTAL	53	27.46				

- **Coefficiente de variación: 14.14%**

En el **Cuadro N° 10** se indica el análisis de varianza del n° hojas/explante; se observa ausencia de diferencias estadísticas significativas para los tratamientos Factor A, B y la interacción AB, el coeficiente de variación de 14.14% indica confianza experimental de los resultados obtenidos. Para mejor interpretación de los resultados se uso la Prueba de Duncan.

CUADRO N° 11. PRUEBA DE DUNCAN N° HOJAS/EXPLANTE

OM	TRATAMIENTO		PROMEDIOS %	SIGNIFICACION (*)
	Clave	Descriptivo BAP - AIB		
1	T2	0 mg/l – 1.5 mg/l	7	A
2	T4	0.1 mg/l – 0 mg/l	6	B
3	T9	0.3 mg/l – 2.5 mg/l	6	B
4	T5	0.1 mg/l – 1.5 mg/l	6	B
5	T7	0.3 mg/l – 0 mg/l	5	C
6	T8	0.3 mg/l – 1.5 mg/l	4	D
7	T1	0 mg/l – 0 mg/l	4	D
8	T6	0.1 mg/l – 2.5 mg/l	3	E
9	T3	0 mg/l – 2.5 mg/l	3	E

- **Promedio con letras iguales no difieren estadísticamente.**

En el **Cuadro N° 11** se indica la prueba de Duncan que **T2 (0 mg/l – 1.5 mg/l)** con promedio de 7 hojas ocupó el primer lugar de orden de mérito, superando estadísticamente a los demás tratamientos que conforman 3 grupos estadísticamente homogéneos entre sí, donde **T3 (0 mg/l – 2.5 mg/l)** ocupó el último lugar con promedio de 3 hojas respectivamente.

**CUADRO N° 12. PRUEBA DE DUNCAN N° HOJAS/EXPLANTE.
FACTOR (A) CONCENTRACIONES DE BAP**

OM	FACTOR (A)		PROMEDIO %	SIGNIFICACION (*)
	Clave	Descriptivo		
1	A3	0.3 mg/l	5	A
2	A2	0.1 mg/l	5	A
3	A1	0 mg/l	4	B

- Promedio con letras iguales no difieren estadísticamente.

En el **Cuadro N° 12** indica la prueba de Duncan del n° hojas Factor A y se observa que tanto **A3 (0.3 mg/l)** y **A2 (0.1 mg/l)** tienen promedio de hojas igual a 5, superaron estadísticamente a **A1 (0 mg/l)** que tuvo 4 hojas como promedio.

**CUADRO N° 13. PRUEBA DE DUNCAN N° HOJAS/EXPLANTE.
FACTOR (B) CONCENTRACIONES DE AIB.**

OM	FACTOR (A)		PROMEDIOS %	SIGNIFICACION (*)
	Clave	Descriptivo		
1	B2	1.5 mg/l	5	A
2	B1	0 mg/l	5	A
3	B3	2.5 mg/l	4	B

- Promedio con letras iguales no difieren estadísticamente.

En el cuadro N° 13 se indica la prueba de Duncan del n° de hojas/cm del Factor B; se observa que **B2 (1.5 mg/l)** y **B1 (0 mg/l)** con promedio de 5 hojas superaron estadísticamente a **B3 (2.5 mg/l)** que tuvo 4 hojas y ocupó el último lugar del orden de mérito (OM).

4.5. DISCUSION:

CONTAMINACION:

Los análisis realizados en las diferentes fechas de evaluación, muestran que la desinfección usando Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 0.05% obtuvo un bajo porcentaje de contaminación (6.44%) esto puede deberse al tamaño de los explantes, al uso de tapas de plástico, así como también al manejo que se dio a los explantes antes y después de la siembra y a las condiciones estériles que se presentaron en el laboratorio; esto adquiere consistencia cuando **ROCA & MROGINSKI (1993)** afirman que el tamaño del explante cuanto mas grande es, mayores son las posibilidades de contaminación con microorganismos.

Por otra parte se comprende que la planta posea su propia flora microbiana; por eso **PIERIK (1990)** acertadamente señala que la contaminación de origen endógeno, puede constituir un problema importante causado por microorganismos que se encuentran en el interior de la misma planta.

De igual manera **JORDAN et al. (1985)** Citado por **HUARANCA & GOMEZ (1997)**, mencionan que las especies leñosas en general son las que mayor dificultades presentan en el establecimiento in vitro por lo tanto no se podrá realizar las demás fases de multiplicación, enraizamiento y aclimatación.

Podemos definir que el uso de tapas influyó en la mínima contaminación de los explantes; ya que el material sembrado fue cerrado herméticamente con tapas de plástico y sellado con parafilm, concordando con lo manifestado con **PIERIK (1990)**, quien sostiene que los tubos de ensayo deben ser cerrados para impedir la deshidratación e infección del explante, pero por otro lado debe existir intercambio gaseoso con el exterior.

OXIDACION:

Según el gráfico nº 01, vemos que se presentan altos porcentajes de oxidación en los explantes; esto tomando en cuenta que se usó carbón activado 0.25 mg/l como antioxidante en el medio de cultivo; por lo tanto el porcentaje de sobrevivencia fue bajo y podría deberse a la baja concentración del antioxidante, a un posible daño ocasionado al tejido al extraer los segmentos nodales o la variabilidad asociada con el genotipo de la planta; sin embargo no se logró la disminución del problema de oxidación, ya que como señala **ROCA Y MROGINSKI (1993)**, que es muy frecuente que en idénticas condiciones de medio y ambiente, las respuestas de un determinado explante de una misma especie difieren entre sí, ya que la escisión del tejido provoca un estado de tensión que altera su metabolismo celular, pudiéndose notar a veces una coloración oscura en el fragmento del tejido vegetal y en el medio de cultivo, por eso se considera que los explantes sean colocados en una solución antioxidante estéril durante los cortes.

OLMOS et al. (2002), sostiene que la presencia de compuestos fenólicos oxidados se encuentra asociada con tejidos vegetales sometidos a situaciones de estrés, tales como aquel provocado por el daño mecánico producido durante el aislamiento del explante de la planta madre. Estos compuestos se encuentran por lo general en las plantas en estado reducido y el ataque de patógenos produciría su oxidación y liberación.

Existe la posibilidad que la oxidación observada en los explantes haya inhibido la formación de brotes; esto coincide con **BADILLA et al. (1992)**, citado por **HUARANCA Y GOMEZ (1997)**, al hacer los cortes se tornaron de color café a pocos minutos, debido a la oxidación de fenoles que se convierten en quinonas, los cuales son tóxicas y dañan las células del material.

La oxidación de los explantes fue rápida, coincidiendo con **PARRA et al, (1991)**, quien trabajo con ápices y nudos de *Psidium guajaba* donde el porcentaje de ennegrecimiento fue progresivo y elevado, encontrándose a los 21 días después de la siembra 75% de oxidación.

Nº BROTES/EXPLANTE

En el Grafico Nº 03 se observa que a la 6ª semana de evaluación el **T4 (0.1 mg/l BAP – 0 mg/l AIB)** fue el que tuvo mayor número de brotes por explante (04), comparada con los demás tratamientos T5, T6, T7 y T8 que tuvieron (03) y T1, T2, T3 y T9 con (02) brotes por explante, lo cual nos indica que el fitoregulador utilizado (BAP - Citocinina) independientemente estimula el desarrollo y formación de brotes, lo cual en concordancia con **DELGADO Y ROJAS (2001)** afirman que las citocininas además de inducir la división celular en presencia de auxinas, también promueven el proceso morfogénico de formación de ápices, anula la dominancia apical y estimula el brotamiento de yemas laterales de manera independiente.

PIERIK (1990), indica que las sales del medio básico (M&S) y las concentraciones de fitoreguladores también juegan un papel muy importante en la formación y desarrollo del explante; es decir los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta; sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir in vitro o in vivo.

DELGADO Y ROJAS (2001). Indica que la respuesta de los explantes esta en relación con el estado de desarrollo y edad de la planta madre; por lo tanto el éxito del cultivo de tejidos en particular de las fases propias a esta actividad es la totipotencia morfológica y química que ostente cada célula en cultivo, es decir la capacidad de inducir la regeneración normal de una planta.

Nº HOJAS/EXPLANTE

El Grafico Nº 04 nos muestra a la 6ª semana de evaluación, donde el nº de hojas del T2 (0 mg/l BAP – 1.5 mg/l AIB) fue mayor con (07), mientras que en los otros tratamientos fue menor como T4, T5 y T9 con (06); T7 con (5); T1 y T8 con (04); y por último T3 y T6 con (03) hojas por explante, lo cual nos indica que el fitoregulador AIB – Auxina actúa tanto de manera independiente, como en interacción con el fitoregulador BAP – Citocinina en la formación y desarrollo de hojas en los explantes, lo cual tiene concordancia con lo indicado por **DELGADO Y ROJAS (2001)** quienes sostienen que las auxinas estimulan el alargamiento celular y el crecimiento del tallo; en combinación con las citocininas estimulan la división celular y diversos procesos morfogénicos.

SALINAS, A. (1995). En tanto afirma que la concentración de fitoreguladores no es determinante para inducir una respuesta fisiológica en la planta, debido a que ello depende del estado de “**Sensibilidad**” del tejido al compuesto. Así mismo en relación al ciclo de acción, la actividad de ciertos genes, probablemente estimulados o inhibidos directa o indirectamente por la acción del fitoregulador, determina que diversos procesos parciales conlleven a la ocurrencia de un determinado efecto fisiológico

En términos generales podemos decir que con respecto a los tratamientos con fitoreguladores aplicados al medio de cultivo, vemos que se dio un porcentaje positivo de número de brotes y hojas en los tratamientos, pudiéndose solo evaluar hasta la 6ª semana; esto debido a la influencia de la oxidación en los explantes, ya que ocasionaron una deficiencia y limitación en un mayor desarrollo vegetativo, causando pérdida en su potencial regenerativo.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES:

- La desinfección con Hipoclorito de Sodio al 0.05%, resulto muy eficiente para la desinfección de los explantes, ya que permitió obtener menor porcentaje contaminación.
- El tratamiento óptimo en la formación de brotes fue el **T4 (0.1 mg/IBAP – 0 mg/l AIB)** que presento promedio de 4 brotes por explante (viables) y en la formación de hojas fue **T2 (0 mg/IBAP – 1.5 mg/lAIB)** que presentaron promedio de 07 hojas por explante.
- Se observó que a la 2^{da} semana de evaluación se dio la formación de brotes definidos, posteriormente a la 3^{ra} semana se indujo a la formación de hojas.
- La interacción de los factores (concentraciones de auxinas y Citoquininas) favorecieron a la formación de brotes y hojas.
- Las variables contaminación y oxidación juegan un papel muy importante en la sobrevivencia y crecimiento de los explantes.
- No se pudo efectuar la fase de multiplicación de los explantes debido a que estas no cumplieron con las características óptimas requeridas para tal fin (viables y axénicos).

Bibliografía Consultada.

- **ANCELUCII, E. 1987.** Análisis químico de alimentos. Campinas. Brasil. Pag. 3 – 48, 78.
- **ALVES, R. E; BORGES, M. F.; MOURA, C.F.H. 2000.** Camu camu. *In:* Caracterização de frutas da América Latina. Jaboticabal. Sao Paulo. Pág. 23-26.
- **AREVALO, G.1996.** El Cultivo de Sacha Inchiem la Amazonía. Instituto Nacional de Investigación Agraria – INIA – Tarapoto. 68 pp.
- **ARIAS, E. 1995.** Cultivo in vitro de nogal (*Junglas neotropicaDiels*). Tesis Ingeniero Forestal. UNALM. Lima – Perú.
- **BADILLA M. V.; HIDALGO, N.; MURILLO, O., 1992.** Cultivo in vitro de plántulas de jaul (*Alnusacuminata*). Tecnología en Marcha. Vol 11. Costa Rica. pp. 3 – 9.
- **CALZADA BENZA. 1980.** Investigación básica para la factibilidad del camu- camu como fuente de Vitamina C para la industria. Universidad Agraria La Molina, 9 pág. (mimeografiado).
- **DELGADO, GUILLERMO E.; ROJAS CONSUELO I. 2001.** Cultivos de Tejidos Vegetales I. Fundamentos y Aplicaciones. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque.
- **FALCÃO, M. A.; FERREIRA, S.A.N.; CHAVEZ-FLORES, W. B. CLEMENT, C.R. 1993.** Aspectos fenológicos e ecológicos do camu-camu(*Myrciariadubia*. H. B. K. Mc Vaugh) na terra firme da Amazônia Central. *In:* Falcão, M. A. Aspectos fenológicos, ecológicos e de produtividade de algumas fruteiras cultivadas na Amazônia. Manaus Ufam. Pág. 57-65.

Bibliografía Consultada.

- **ANCELUCII, E. 1987.** Análisis químico de alimentos. Campinas. Brasil. Pag. 3 – 48, 78.
- **ALVES, R. E; BORGES, M. F.; MOURA, C.F.H. 2000.** camu-camu. *In:* Caracterização de frutas da América Latina. Jaboticabal. Sao Paulo. Pág. 23-26.
- **AREVALO, G. 1996.** El Cultivo de Sacha Inchi em la Amazonía. Instituto Nacional de Investigación Agraria – INIA – Tarapoto. 68 pp.
- **ARIAS, E. 1995.** Cultivo in vitro de nogal (*Junglas neotropica Diels*). Tesis Ingeniero Forestal. UNALM. Lima – Perú.
- **BADILLA M. V.; HIDALGO, N.; MURILLO, O., 1992.** Cultivo in vitro de plantulas de jaul (*Alnus acuminata*). Tecnologia en Marcha. Vol 11. Costa Rica. pp. 3 – 9.
- **CALZADA BENZA. 1980.** Investigación básica para la factibilidad del camu- camu como fuente de Vitamina C para la industria. Universidad Agraria La Molina, 9 pág. (mimeografiado).
- **DELGADO, GUILLERMO E.; ROJAS CONSUELO I. 2001.** Cultivos de Tejidos Vegetales I. Fundamentos y Aplicaciones. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque.
- **FALCÃO, M. A.; FERREIRA, S.A.N.; CHAVEZ-FLORES, W. B. CLEMENT, C.R. 1993.** Aspectos fenológicos e ecológicos do camu-camu (*Myrciaria dubia*. H. B. K. Mc Vaugh) na terra firme da Amazônia Central. *In:* Falcão, M. A. Aspectos fenológicos, ecológicos e de produtividade de algumas fruteiras cultivadas na Amazônia. Manaus Ufam. Pág. 57-65.

- **FONT, P. 1993.** Diccionario de botânica. 1 Edición. Editorial Labor S.A. 1244 pp.
- **FRANQUESA T.; MOLINS M. 1997.** Botânica general Edición 1. Editorial FAPA S.L. España 110 pp.
- **Glosario de Biotecnología para La Agricultura y la Alimentacion.** Estúdio FAO Investigacion y Tecnologia. Roma 2004. 5, 28, 106 pp.
- **GUEVARA, E.; HIDALGO, N.; MURILLO, O., 1992.** Cultivo in vitro de cedro dulce (*Cedrela tonduzii*). Tecnología en marcha. Vol. 11 N° 03. Costa Rica 10 – 16 pp.
- **HUARANCA, R. Y GOMEZ, M. 1997.** Establecimiento in Vitro de Propagulos de camu camu (*Myrciaria dubia*. H. B. K. Mc Vaugh). Tesis. Biología. UNAP. Perú. 47 pp.
- **HURTADO D. 1987.** Cultivo de Tejidos Vegetales. Edic. 1. Editorial trillas S.A. MEXICO pp 48 - 53.
- **HUDSON, T.H. Y DALE, E. K. 1978.** Propagación de plantas. Editorial - continental. México. 733 p.
- **IMAN, C. SIXTO. 2000.** Cultivo de Camu camu *Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh en la Región Loreto. Instituto Nacional de Investigación Agraria. Manual N° 01. Iquitos, Perú.
- **JORDAN, M.; PEDRAZA, J. Y GOREAUX, A., 1985.** In vitro Propagation studies of tree Prosopies especies. Through Shoot Tip Cultures. 265 – 267 p.
- **MANCO, E. 2005.** EL Cultivo de Sacha Inchi. Instituto Nacional de Investigación de Extensión Agraria – Dirección General de Investigación Agraria. San Martin – Perú. 13 pp

- **OLIVA, C.C. 2002.** "Evaluación de la productividad del Camu camu. *Myrciaria Dubia* (H.B.K). Mc Vauh en Loreto". Tesis para optar el título de Ing. Agrónomo. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.
- **OLMOS S.; LUCIANI G.; GALDEANO E. 2002.** Biotecnología y mejoramiento vegetal. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Edic. Mundi Prensa. España. 161 p.
- **PARRA, G.; PEREZ, J. Y VILORIA, Z., 1991.** Una Metodología para el control de contaminantes y ennegrecimiento en diferentes tipos de explantes de *Psidium guajava* L. Revista de la Facultad de Agronomía. Vol 8. N° 04. Universidad de Zulia. Maracaibo – Venezuela. 238 p.
- **PETERS, C.M.; VASQUEZ, M. A. 1986 /1987.** Estudios ecológicos de camu camu (*Myrciaria dubia*). I. Producción de frutos en poblaciones Naturales. Acta Amazónica 16/17:161-173.
- **PIERIK R. L. 1990.** Cultivo in vitro de plantas superiores. Edic. Mundi Prensa. España. 326 pp.
- **PINEDO, P. M.; 2002.** Evaluación de Vitamina "C" del camu camu en cinco (5) cuencas de Loreto – Perú. Artículo Científico.
- **PINEDO, P.M.; LINARES, C.; MENDOZA H.; ANGUIZ R. 2001** Plan de mejoramiento genético de Camu camu. Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana (IIAP). Primera edición. 2004. 52 pp.
- **REY, H. Y.; BURTNICK, O. J.; SANSBERRO, P. A.; MROGINSKI, L. A., 1991.** Medios de Cultivo para el Establecimiento in vitro de explantes de yerba mate (*Ilex paraguariensis*). Turrialba. Rev. Interamericana de Ciencias Agrícolas. Vol. 41 N° 03. Julio – Setiembre. 306 – 310 pp.

- **ROCA, W. M. & MROGRINSKI, L. A.; 1993.** Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Cali – Colombia. P. 127 – 141.
- **SALINAS, A.; 1995.** Desinfección y Determinación de explantes para la propagación In vitro de *Cedrelinga cateiniformes* (Ducke) Ducke. Tesis Ing. Forestal. UNAS Tingo Maria – Peru. 100 pp.
- **VILLACHICA, L. H.; 1996.** El Cultivo del camu camu (*Myrciaria dubia*) Mc Vaugh en la Amazonia Peruana. TCA – Secretaria Pro Tempore. Lima N° 46 – 95 pp.

ANEXO

CUADRO N° 14**DATOS ORIGINALES DE LOS NIVELES DE OXIDACION.**

Repetición	A1			A2			A3		
	B1	B2	B3	B1	B2	B3	B1	B2	B3
1	50	50	50	50	25	25	25	25	50
2	50	50	50	50	75	50	75	75	75
3	50	50	75	75	75	50	75	75	75
4	75	50	75	75	75	75	75	75	75
5	75	75	75	75	75	75	75	100	75
6	75	75	75	75	75	75	100	75	75

CUADRO N° 15**DATOS TRANSFORMADOS AL ARC SEN $\sqrt{X\%}$ DE LOS NIVELES DE OXIDACIÓN.**

Repetición	A1			A2			A3		
	B1	B2	B3	B1	B2	B3	B1	B2	B3
1	45	45	45	45	30	30	30	30	45
2	45	45	45	45	60	45	60	60	60
3	45	45	60	60	60	45	60	60	60
4	60	45	60	60	60	60	60	60	60
5	60	60	60	60	60	60	60	90	60
6	60	60	60	60	60	60	90	60	60
AB	315	300	330	330	330	300	360	360	345
A	A1 = 945			A2 = 960			A3 = 1065		
B	B1 = 1005			B2 = 990			B3 = 975		

CUADRO N° 16**DATOS ORIGINALES DEL N° BROTES/EXPLANTE.**

Repetición	A1			A2			A3		
	B1	B2	B3	B1	B2	B3	B1	B2	B3
1	2	2	3	4	3	4	3	3	2
2	2	2	2	4	3	3	3	3	3
3	2	2	2	4	3	3	3	3	2
4	2	2	2	4	3	3	3	3	2
5	2	2	2	3	3	3	3	3	2
6	2	2	2	4	3	3	3	3	2

CUADRO N° 17**DATOS TRANSFORMADOS A LA \sqrt{x} DEL N° BROTES/ EXPLANTE.**

Repetición	A1			A2			A3		
	B1	B2	B3	B1	B2	B3	B1	B2	B3
1	1.41	1.41	1.73	2.00	1.73	2.00	1.73	1.73	1.41
2	1.41	1.41	1.41	2.00	1.73	1.73	1.73	1.73	1.73
3	1.41	1.41	1.41	2.00	1.73	1.73	1.73	1.73	1.41
4	1.41	1.41	1.41	2.00	1.73	1.73	1.73	1.73	1.41
5	1.41	1.41	1.41	1.73	1.73	1.73	1.73	1.73	1.41
6	1.41	1.41	1.41	2.00	1.73	1.73	1.73	1.73	1.41
TOTAL	8.46	8.46	8.78	11.73	10.38	10.65	10.38	10.38	8.78
A	A1 = 25.70			A2 = 32.76			A3 = 29.54		
B	B1 = 30.57			B2 = 29.22			B3 = 28.21		

CUADRO N° 18**DATOS ORIGINALES DEL N° HOJAS/ EXPLANTE.**

Repetición	A1			A2			A3		
	B1	B2	B3	B1	B2	B3	B1	B2	B3
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	6	8	3	8	8	4	6	5	8
3	5	9	4	9	7	4	7	6	9
4	5	9	4	9	7	5	7	6	8
5	5	9	4	9	7	4	6	6	9
6	5	9	4	8	7	4	6	5	9

CUADRO N° 19**DATOS TRANSFORMADOS A LA $\sqrt{X+1}$ DEL N° HOJAS/ EXPLANTE.**

Repetición	A1			A2			A3		
	B1	B2	B3	B1	B2	B3	B1	B2	B3
1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2	2.65	3.00	2.0	3.00	3.0	2.24	2.65	2.45	3.0
3	2.45	3.16	2.24	3.16	2.83	2.24	2.83	2.65	3.16
4	2.45	3.16	2.24	3.16	2.83	2.45	2.83	2.65	3.0
5	2.45	3.16	2.24	3.16	2.83	2.24	2.65	2.65	3.16
6	2.45	3.16	2.24	3.00	2.83	2.24	2.65	2.45	3.16
TOTAL	13.45	16.64	11.96	16.48	15.32	12.41	14.61	13.85	16.48
A	A1 = 42.05			A2 = 44.21			A3 = 44.94		
B	B1 = 44.54			B2 = 45.81			B3 = 40.85		

Composición Química del Medio de Cultivo Murashige & Skoog (1962)**Solución A: Macronutrientes, concentración 25 X**

Compuesto Químico	Símbolo Químico	mg./L.	Para preparar solución Stock		
			250 ml.	500 ml.	1000 ml.
Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	1,650	10.31 g.	20.63 g.	41.25 g.
Nitrato de Potasio	KNO ₃	1,900	11.88 g.	23.75 g.	47.50 g.
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	2.31 g.	4.63 g.	9.25 g.
Fosfato Monobásico de Potasio	KH ₂ PO ₄	170	1.06 g.	2.13 g.	4.25 g.
Usar o Tomar:			10 ml./L.	20 ml./L.	40 ml./L.

Solución B: Micronutrientes, concentración 100 X

Compuesto Químico	Símbolo Químico	mg./L.	Para preparar solución Stock		
			250 ml.	500 ml.	1000 ml.
Ioduro de Potasio	KI	0.83	20.75 mg.	41.50 mg.	83 mg.
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	6.20	155.00 mg.	310.00 mg.	620 mg.
Sulfato de Manganeseo	MnSO ₄ . 4H ₂ O	22.30	557.50 mg.	1,115.00 mg.	2,230 mg.
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.60	215.00 mg.	430.00 mg.	860 mg.
Molibdato de Sodio	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.25	6.25 mg.	12.50 mg.	25 mg.
Sulfato de Cobre	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025	0.63 mg.	1.25 mg.	2.5 mg.
Cloruro de Cobalto	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025	0.63 mg.	1.25 mg.	2.5 mg.
Usar o Tomar:			2.5 ml./L.	5 ml./L.	10 ml./L.

Solución C: Macronutrientes, concentración 25 X

Compuesto Químico	Símbolo Químico	mg./L.	Para preparar solución Stock		
			250 ml.	500 ml.	1000 ml.
Cloruro de Calcio	CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	11 g.	22 g.	44 g.
Usar o Tomar:			2.5 ml./L.	5 ml./L.	10 ml./L.

Solución D: EDTA – Hierro, concentración 100 X

Compuesto Químico	Símbolo Químico	mg./L.	Para preparar solución Stock		
			250 ml.	500 ml.	1000 ml.
Sulfato Ferroso	FeSO ₄ . 7H ₂ O	27.80	0.70 g.	1.39 g.	2.78 g.
EDTA	Na ₂ .EDTA. 2H ₂ O	37.30	0.93 g.	1.87 g.	3.73 g.
Usar o Tomar:			2.5 ml./L.	5 ml./L.	10 ml./L.

Solución E: Vitaminas, concentración 100 X

Compuesto Químico	Símbolo Químico	mg./L.	Para preparar solución Stock		
			250 ml.	500 ml.	1000 ml.
Mio – Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100	2,500 mg.	5,000 mg.	10,000 mg.
Tiamina HCl	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS.	0.10	2.5 mg.	5 mg.	10 mg.
Glicina	NH ₂ CH ₂ COOH	2.00	50 mg.	100 mg.	200 mg.
Piridoxina HCl	C ₈ H ₁₁ NO ₃	0.50	12.5 mg.	25 mg.	50 mg.
Ácido Nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0.50	12.5 mg.	25 mg.	50 mg.
Usar o Tomar:			2.5 ml./L.	5 ml./L.	10 ml./L.

FLUJO DE RESUMEN DE LAS ACTIVIDADES

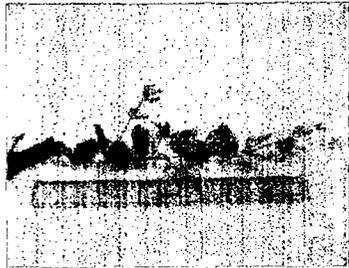


FOTO N° 01. Tamaño de brotes a los 30 días (segmentos nodales)



FOTO N° 02 y 03. Corte y transporte de los brotes en agua destilada

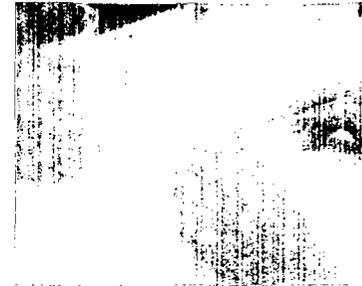


FOTO N° 04. Disección de los brotes

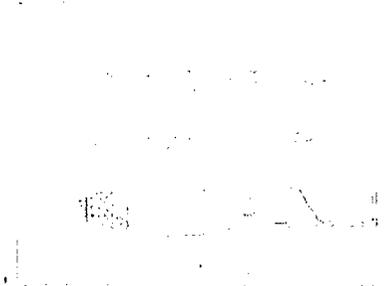


FOTO N° 05. Segmentos nodales para siembra

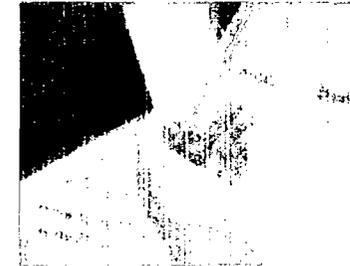


FOTO N° 06. Siembra in vitro



FOTO N° 09. Tamaño de brotes y hojas

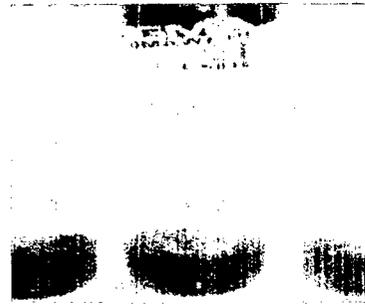


FOTO N° 08. Presencia de brotes v Hojas definidas

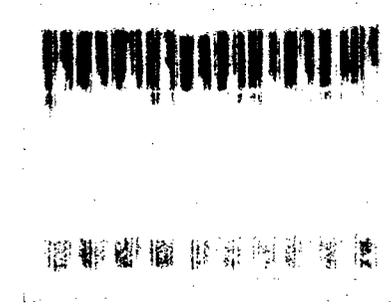


FOTO N° 07. Segmentos nodales sembrados in vitro

Nº EVALUACION: _____

FORMATO DE EVALUACION

- Fase:.....
- Cultivo:.....
- Tipo Explante:.....
- F. Prep. Medio:.....
- F. Siembra:.....
- F. Evaluación:.....

Condiciones del Experimento	
Tratamiento	Medio de cultivo

Nº tubos	Contaminación 0 - 1	Oxidación 0-1-2-3-4	Crecimiento Nº/cm				Observaciones
			Nº Brotes	Long. (cm)	Nº Hojas	Long. (cm)	
TOTAL							

LEYENDA:

CONTAMINACION:

- 0 = Contaminado
- 1 = No Contaminado

OXIDACIÓN:

- 0 = 0%
- 1 = 25%
- 2 = 50%
- 3 = 75%
- 4 = 100%