

T
631.535
C77



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Escuelas de Formación Profesional

de Biología

**INDUCCIÓN DE CALLOS *in vitro* EN EXPLANTES DE
Myrciaria dubia (Kunth) Mc. Vaugh "camu camu"**

TESIS

Requisito para optar el título profesional de

BIÓLOGO

AUTOR (A):

Ana María Córdova López

DONADO POR:
ANA MARIA CORDOVA LOPEZ
Iquitos, 14 de ENERO de 2013



374

IQUITOS - PERÚ

2012



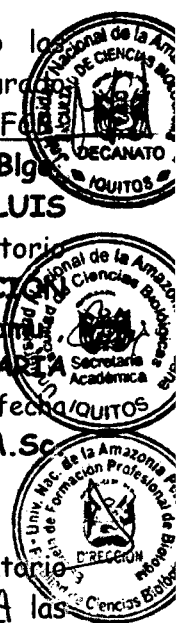
UNAP

Dirección de Escuela Profesional de Biología - FCB

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Iquitos, 20 de julio de 2012

En la ciudad de Iquitos, a los veinte días del mes de julio del 2012 y siendo las 14:00 horas; se reunieron en el auditorio de la Facultad de Ciencias Forestales, el Jurado Calificador y Dictaminador de Tesis que suscribe, designado con R.D. N° 096-2011-DEFP-B-FCB UNAP, presidido e integrado por: **Blga. FELICIA DÍAZ JARAMA, M.Sc.**, Presidente; **Blgo. RICHARD JAVIER HUARANCA ACOSTUPA, M.Sc.**, Miembro; **Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr.**, Miembro. El mencionado Jurado se constituyó en el auditorio para escuchar, examinar y calificar la sustentación y defensa de la tesis titulada: "**INDUCCIÓN DE CALLOS *in vitro* EN EXPLANTES DE *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc.Vaugh "Camu-Camu**" presentado por la bachiller de la Facultad de Ciencias Biológicas - Escuela de Biología **ANA MARÍA CÓRDOVA LÓPEZ** de la Promoción II-2010, graduada de Bachiller con R.R. N° 0510-2012-UNAP de fecha 02 de marzo del 2012; figurando como asesores: **Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, M.Sc.** y **Blga. MARIANELA COBOS RUÍZ, M.Sc.**



Luego de realizada la sustentación de la Tesis, la bachiller fue sometida a un interrogatorio sobre el tema en cuestión, habiendo absuelto de manera SATISFACTORIA las observaciones y objeciones que fueron formuladas por los integrantes del Jurado Calificador y Dictaminador.

Después de la deliberación y votación del caso, el Jurado Calificador y Dictaminador dio como veredicto APROBAR la Tesis por UNANIMIDAD, quedando la candidata apta para ejercer la profesión de Biólogo, previo otorgamiento del Título Profesional por la autoridad Universitaria competente, y su correspondiente inscripción en el Colegio de Biólogos del Perú.

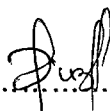
Finalizado el acto, el Presidente del Jurado Calificador y Dictaminador levantó la sesión siendo las 15:50 horas y en fe de lo cual, todos los integrantes suscriben la presente Acta de Sustentación.


Felicia Díaz Jarama
PRESIDENTE


Richard Javier Huaranca Acostupa
MIEMBRO


Jorge Luis Marepara del Aguila
MIEMBRO

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



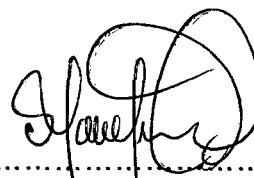
.....
Blga. Felicia Díaz Jarama M.Sc

Presidente



.....
Blgo. Jorge Luis Marapara del Aguila Dr.

Miembro



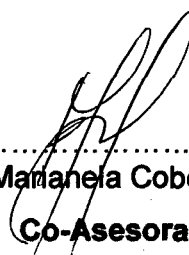
.....
Blgo. Richard Javier Huaranca Acostupa M.Sc

Miembro



.....
Blgo. Juan Carlos Castro Gómez, Dr.

Asesor



.....
Blga. Mamanela Cobos Ruiz M. Sc.

Co-Asesora

DEDICATORIA

A mi familia, en especial a mi madre Socorro López; a mi tíos Pedro López, Nora López ; a mi hermano Luis Córdova. por el constante apoyo que me dieron, cuando lo necesite.

A todo el equipo de Biotecnología-CIRNA que me ayudaron siempre

A mi hija Annie Nicole, A mi Pareja incondicional Edilberto Cienfuegos que son el motivo de mis alegrías, que me impulsa a seguir adelante el día a día.

A mi casa de estudios UNAP por haberme dado la posibilidad de formarme profesionalmente.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo es muy importante para mí formación profesional y se llevo a cabo gracias a la colaboración de las siguientes personas e instituciones:

Al Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA) de la UNAP, Laboratorio de Biotecnología por brindarme sus instalaciones para la ejecución de la investigación.

Al Proyecto Aplicación de herramientas biotecnológicas para la clonación y obtención de líneas celulares de alto rendimiento de vitamina C de *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh "camu camu" por el financiamiento prestado para la realización de esta investigación.

Al Dr. Juan Carlos Castro Gómez, Investigador y Docente de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNAP, por su apoyo y asesoramiento constante e incondicional y a la vez por contribuir con mi formación profesional.

A la Blga. Marianela Cobos Ruiz MSc., Investigadora de La unidad especializada de Biotecnología del CIRNA, por su constante apoyó y asesoramiento en la ejecución de este trabajo

Al Blgo. Richard Huaranca Acostupa MSc. Docente de la UNAP, por sembrar las bases de mis conocimientos en el Area de Biotecnología abocada al cultivo *in vitro*.

A la Blga. Felicia Díaz Jarama M.Sc., Blgo. Jorge Luis Marapara Del Águila, Dr., Docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNAP, por contar con sus orientaciones y apoyo para la realización de la presente tesis.

A todo el equipo de practicantes, internos y tesis del Area especializada del Laboratorio de Biotecnología, en especial a: Blgo. Roberson Ramírez, Mery Siguas, Alina Reátegui, Julián Torres, Angel Araujo.

ÍNDICE

PORTADA	i
PAGINA DE FIRMAS	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE ANEXOS	x
RESUMEN	xi
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 ORIGEN Y DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE <i>M. dubia</i>	3
2.2. CONTENIDO DE VITAMINA C	4
2.3. CALLOGÉNESIS EN OTRAS ESPECIES DE PLANTAS	5
2.4 ESTUDIOS IN VITRO EN <i>M. dubia</i>	8
III. MATERIALES Y METODOS	11
3.1 ÁREA DE ESTUDIO	11
A) ÁREA DE MUESTREO	11
B) ÁREA EXPERIMENTAL	11
3.2 MATERIAL VEGETAL.....	11
A) CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	11
B) DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE	12
3.3 METODOLOGÍA.....	13
3.3.1 COLECTA Y TRANSPORTE DEL MATERIAL VEGETAL	13
A) VARAS YEMERAS	13
B) FRUTOS	13
3.3.2 INSTALACIÓN DE LAS VARAS Y OBTENCIÓN DE BROTES EN EL LABORATORIO	13
3.3.3 PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO Y FITOHORMONAS	14
A) MEDIO DE CULTIVO	14

B) FITOHORMONAS	14
3.3.4 DESINFECCIÓN DE LAS MUESTRAS Y OBTENCIÓN DE EXPLANTES.....	15
A) BROTES	15
B) FRUTOS.....	16
3.3.5 SIEMBRA DE EXPLANTES Y EVALUACIÓN DEL DESARROLLO	16
A) HOJAS	16
B) NUDOS	16
C) FRUTOS.....	16
3.3.6 EVALUACIONES	17
3.3.7 DISEÑO EXPERIMENTAL	18
A) EXPERIMENTO 01	18
B) EXPERIMENTO 02.....	18
3.3.8 ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS	19
IV. RESULTADOS	20
4.1. CONTAMINACIÓN DE LOS EXPLANTES.....	20
4.2. OXIDACIÓN DE LOS EXPLANTES.....	22
4.3. INDUCCIÓN DE LA CALLOGÉNESIS	27
V. DISCUSION.....	36
5.1. CONTAMINACIÓN DE LOS EXPLANTES.....	36
5.2. OXIDACIÓN DE LOS EXPLANTES.....	37
5.3. INDUCCIÓN DE LA CALLOGÉNESIS	38
VI. CONCLUSIONES.....	42
VII. RECOMENDACIONES.....	43
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	44
IX. ANEXOS	51

LISTA DE FIGURAS

N°	Título	Pág.
1.	Porcentaje de contaminación por tipo de explantes de <i>M. dubia</i> para la inducción de callos	20
2.	Contaminación en hoja (A), nudo (B) y pulpa (C) de <i>M. dubia</i> durante la inducción de callos.....	20
3.	Oxidación por grados en explantes de hojas y nudos de <i>M. dubia</i> para la inducción de callos.....	22
4.	Oxidación por grados en explantes de pulpa de <i>M. dubia</i> para la inducción de callos.....	25
5.	Áreas de oxidación(indicadas por las flechas) en hoja con un grado de 25 % de oxidación (A), nudos con un grado de 75 % de oxidación (B), pulpa con un grado de 25 % de oxidación (C)en <i>M. dubia</i> empleados para la inducción de callos en cultivos in vitro.	26
6.	Inducción de callogénesis en explantes de hojas y nudos de <i>M. dubia</i> con los tratamientos fitohormonales evaluados.....	27
7.	Inducción de callogénesis en explantes de pulpa verde y pintón en frutos de <i>M. dubia</i> con los tratamientos fitohormonales evaluados	29
8.	Callos obtenidos en explantes de hojas, nudos y pulpa de <i>M. dubia</i> tratados con 2,4-D (2mg/l) y BAP (0,1mg/l), excepto el obtenido a la primera semana en nudos que fue 2,4-D (2mg/l) y BAP (0,1mg/l).....	32
9.	Respuesta de los explantes de hojas de <i>M. dubia</i> por tratamiento fitohormonal en el tiempo.....	33

10.	Respuesta de los explantes de Nudos de <i>M. dubia</i> por tratamiento fitohormonal en el tiempo.....	34
11.	Respuesta de los explantes de Pulpa de <i>M. dubia</i> por tratamiento fitohormonal en el tiempo.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

N°	Título	Pág.
1.	Tratamientos con fitohormonas para la inducción de callos en hojas y nudos de <i>M. dubia</i> "camu camu"	15
2.	Tratamientos con fitohormonas para la inducción de callos en pulpa de frutos verdes y pintones de <i>M. dubia</i> "camu camu".....	15
3.	Tratamientos utilizados para hojas y nudos.....	18
4.	Tratamientos utilizados para pulpa.....	18
5.	Análisis de la varianza con ANOVA en la contaminación en los tres explantes de <i>M. dubia</i>	21
6.	Análisis con la Prueba de Tukey de la contaminación por semanas en los 3 tipos de explante	21
7.	Análisis de la varianza con ANOVA en la oxidación en hojas y nudos.	23
8.	Análisis con la Prueba de Tukey de la oxidación por tratamiento en explante de hojas de <i>M. dubia</i>	23
9.	Análisis con la Prueba de Tukey de la oxidación por tratamiento en explante de nudos de <i>M. dubia</i>	24
10.	Análisis de la varianza con ANOVA en la oxidación en pulpa.....	25

11.	Análisis de la varianza con ANOVA en expresión de callos en hoja y nudos.....	28
12.	Análisis con la prueba Tukey de la expresión en nudos.....	28
13.	Análisis de la varianza con ANOVA en expresión de callos en pulpa.....	29
14.	Análisis con la prueba Tukey de la expresión en pulpa verde y pulpa pintón	30
15.	Análisis de la varianza con ANOVA en expresión de callos en el tiempo de hojas.....	33
16.	Análisis de la varianza con ANOVA en expresión de callos en nudos.....	34
17.	Análisis de la varianza con ANOVA en expresión de callos en pulpa.....	35

ÍNDICE DE ANEXOS

N°	Título	Pág.
1.	Ubicación de la zona de muestreo.....	52
2.	Flujograma de preparación de medio M&S y fitohormonas.....	52
3.	Flujograma para la obtención de callos.....	53
4.	Ficha de evaluación para el registro de inducción de callos in vitro de <i>M. dubia</i> camu camu.....	54
5.	Figuras de la expresión callogénica según tratamiento fitohormonal	55

RESUMEN

Debido a la alta variabilidad en la producción de vitamina C en el camu camu, es necesario establecer procedimientos biotecnológicos para la propagación clonal masiva de las plantas con las mejores cualidades. El objetivo del estudio fue inducir la expresión de callos *in vitro* en explantes de *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh "camu camu". Las muestras botánicas fueron obtenidas de la colección de germoplasma del INIA. Los explantes (hojas, nudos y pulpa de frutos) fueron desinfectados y sembrados en medio M&S suplementado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), bencilaminopurina (BAP) y kinetina (K). El cultivo se realizó a 25 ± 2 °C, en oscuridad por 15 días y luego con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. En la primera semana de cultivo se registró hasta 75 % de oxidación de los explantes. Asimismo, la contaminación (por hongos y bacterias) afectó al 31 % de las muestras sembradas. Se logró inducir callogénesis en los tres tipos de explantes con la combinación de auxina/citoquinina, particularmente combinando 2 mg/l de 2,4-D y 0.1 mg/l de BAP. Los callos se evidenciaron a partir de la primera semana (nudos) y después de la cuarta semana (hojas y pulpa). En conclusión, la mayoría de los tratamientos fitohormonales indujeron respuesta callogénica en las hojas (4^{ta} semana), nudos (1^{ra} a 5^{ta} semana) y pulpa (6^{ta} semana). El tratamiento con 2 mg/l de 2,4-D y 0,1 mg/l de BAP propició mayor callogénesis en los tres tipos de explantes. Los callos obtenidos fueron friables (hojas y nudos) y no friables (pulpa).

Palabras clave: *Myrciaria dubia*, callogénesis, 2,4-D, BAP, K, propagación *in vitro*.

I. INTRODUCCIÓN

Myrciaria dubia (Kunth) Mc Vaugh "camu camu", es un frutal silvestre de la Amazonía. Crece en las riberas inundables de los ríos y cochas de aguas oscuras y puede permanecer completamente sumergido por cuatro a cinco meses (Peters y Vásquez, 1986). Se caracteriza principalmente por tener frutos con más de 2000 mg de vitamina C por 100g de pulpa (Córdova y colaboradores 2010), y diversas sustancias con potencial uso farmacológico como las antocianinas (0,8 mg/100 g pulpa), las responsables de la pigmentación rojo-purpura en el "camu camu", carotenoides (0,2 mg/100 g pulpa), los que disminuyen con la maduración de la fruta (Andrade 1993), como la luteína que es más abundante en los frutos de "camu camu", seguido del β -caroteno y zeaxantina (Azevedo y Rodríguez, 2004). Por estas cualidades cuenta con buena demanda en mercados locales, nacionales e internacionales como Estados Unidos, Francia, Japón (Silva y colaboradores 1998).

Sin embargo, las plantaciones naturales y parcelas sembradas por los agricultores presentan una amplia variación en el contenido de vitamina C. (Castro y colaboradores 2010) muestran que la colección del germoplasma del Instituto Nacional de Innovación Agraria de "camu camu" hay plantas que difieren en su producción de vitamina C, fluctuando de 650 a 2475 mg /100 g pulpa. Esta variación representa un problema para los agricultores, porque aún no es posible garantizar una producción elevada y uniforme que exigen los mercados para el consumo directo e industrialización.

En ese sentido, es preciso contar con procedimientos de propagación clonal masiva de las plantas con las mejores cualidades mediante la Biotecnología vegetal es posible producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada (Levitus y colaboradores 2010). Con este propósito, se han realizado varios estudios para establecer las condiciones de propagación *in vitro* del "camu camu" pero con resultados limitados (Gómez y Huaranca, 1997; Gutiérrez e Inguil, 2003) porque *M. dubia* es una especie recalcitrante (Rivera 2012), debido a que no se puede mantener o propagar *in vitro* hasta el momento por falta de enraizamiento de las vitroplantas. Una de las alternativas viables para conseguir la propagación *in vitro* del "camu camu" sería la embriogénesis indirecta, mediante la inducción de callos y posterior embriogénesis.

Por tanto, con el fin de contribuir al conocimiento científico que permitirá sentar las bases para la propagación *in vitro* del "camu camu", se propuso como objetivo general "Inducir la expresión de callos *in vitro* en explantes de *M. dubia* (Kunth) Mc Vaugh "camu camu" y como objetivos específicos: "Conocer el porcentaje de oxidación y contaminación producidos durante el proceso de inducción de callos *in vitro* en explantes de *M. dubia* (Kunth) Mc Vaugh "camu camu". "Establecer la concentración óptima de reguladores de crecimiento (2,4 D, BAP y Kinetina) en la inducción de callos *in vitro* de los explantes de *M. dubia* (Kunth) Mc Vaugh "camu camu". "Estandarizar un protocolo de inducción de callos en explantes de *M. dubia* (Kunth) Mc Vaugh "camu camu". "Determinar el explante óptimo para la inducción de callos de *M. dubia* (Kunth) Mc Vaugh "camu camu".

II. ANTECEDENTES

2.1. Origen y distribución geográfica de *Myrciaria dubia*.

Peters y Vásquez (1986), describen que *M. dubia* (Myrtaceae) es un frutal arbustivo silvestre de la Amazonia; crece en las riberas inundables de los ríos, lagos y cochas de aguas oscuras formando poblaciones naturales densas y puede permanecer completamente sumergido en agua durante 4 a 5 meses. Su hábitat principal son las zonas naturales inundables, aunque se da en suelos de altura en forma de sembríos manejados.

Pinedo *et al.*, (2002), mencionan que en el departamento de Loreto, las poblaciones naturales del "camu camu" se encuentran en las cuencas de los ríos Putumayo, Napo, Curaray, Tigre, Marañón, Yavarí, Ucayali, Itaya y Nanay. Asimismo Rodríguez y colaboradores (2001), comentan la existencia de plantaciones del "camu camu" en las cuencas de los ríos Tahuayo, Pintuyacu, Ampiyacu, Apacayu, Manati, Oroza y Curaray.

Picón y Acosta (2000), comprobaron que existen 1,320 ha de plantaciones del "camu camu" distribuidas en las principales cuencas de los ríos amazónicos; Nanay, Ucayali, Marañón, Napo, Yavarí, Curaray, Tigre, Amazonas y Putumayo.

Pinedo y colaboradores (2004), reportan una notable concentración de la diversidad del "camu camu" en la Amazonia peruana y brasileña. Además, indican que algunos informes revelan la existencia de poblaciones naturales en la Amazonia colombiana (río putumayo e Inírida) y en Venezuela (ríos Orinoco, Caciqueare, Oreda, Pargueni y Caura).

López (2003), afirma que en la quebrada "Iricahua" afluente del río Ucayali, existe el "camu camu" tipo árbol en poblaciones relativamente medianas y cuya época de recolección se efectúa entre los meses de enero y marzo. Cabe indicar que el "camu camu" tipo árbol no se encuentra en poblaciones compactas como el arbustivo, sino en asociación con otras especies

forestales como "capirona", "quinilla", "shimbillo" entre otras, con una densidad de 20 a 50 individuos por ha.

2.2. Contenido de vitamina C

Siguas y colaboradores (2010), evaluaron la concentración de vitamina C en diferentes frutos ("guayaba", "ubos", "carambola", "cocona", "mango", "taperiba" y "tomate") de la Amazonia peruana, utilizando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), obteniendo la más alta concentración de vitamina C en "casho" (191 mg /100g de pulpa), seguido de la "guayaba" (52.6 mg /100g de pulpa). La más baja concentración se reportó en "granadilla" (2.9 mg /100g de pulpa) en comparación al "camu camu" (1227.2 mg /100g de pulpa).

Córdova y colaboradores (2010), determinaron la concentración de vitamina C en cáscara y pulpa en los diferentes estados de maduración de frutos de *M. dubia* utilizando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Mencionan que obtuvieron la más alta concentración de vitamina C en cáscara y pulpa de frutos pintones en comparación con los verdes y maduros con valores promedio de 1987.41 ± 615.10 para cascara y 1616.02 ± 453.95 para pulpa.

Pinedo y colaboradores (2008), evaluaron 160 plantas que presentaron valores entre 1081 mg y 2282 mg con una diferencia altamente significativa entre plantas. Se han seleccionado las plantas que presentaron alto contenido de vitamina C (>2000 mg) y la menor desviación estándar (4 a 12,66).

Imán y Melchor (2007), describen que la pulpa de *M. dubia*, por su elevado contenido de Ácido Ascórbico, se ha constituido como la principal materia prima de la industria alimentaria y farmacéutica. La pulpa es empleada en consumo directo para la preparación de refrescos y cócteles; en la agroindustria se elaboran chupetes, helados, néctares, yogures, mermeladas, caramelos, vinos, vinagres, entre otros, en la industria farmacéutica principalmente se elaboran grageas y cápsulas que se consumen por las bondades de la vitamina C como poderoso antioxidante en general.

2.3 Callogénesis en otras especies de plantas

Levitus y colaboradores (2010), identificaron el ácido indolacético (AIA), que permitió el mantenimiento indefinido *in vitro* de callos en zanahoria y tabaco. Posteriormente descubrieron el efecto de la leche de coco como estimulante de la formación de callos sobre el cultivo de embriones de *Datura stramonium*.

Jiménez y colaboradores (2009), evaluaron el efecto de las fitohormonas Zeatinribósido (ZR), Ácido naftalénacetico (ANA) y Ácido gibérelico (AG₃), utilizadas en combinaciones específicas, sobre la inducción de callo, la regeneración y el número de brotes producidos por explante. La presencia de ANA demostró ser esencial en la respuesta callogénica y regenerativa de los explantes. Encontraron que la adición de 3,0 mg/l de ZR, 0,02 mg/l de ANA y 1,0 mg/l de AG₃ sobre un medio básico Murashige y Skoog (M&S), es una formulación hormonal adecuada para inducir el proceso de organogénesis indirecta sobre la variedad de papa Pastusa Suprema; produce Callogénesis y regeneración en porcentajes superiores al 90%, con un promedio de seis regenerantes por explante.

Pérez y colaboradores (2009), describen las condiciones óptimas para la callogénesis y cocultivo de callos con *Agrobacterium tumefaciens* de la variedad de arroz J-104. Determinaron el efecto de diferentes concentraciones de 2.4-D, agar y de L-prolina y L-glutamina en el medio de cultivo de callos. El uso de 2,5 mg/l de 2.4-D y 0,8% de agar permitió lograr el porcentaje más alto de callos embriogénicos. La formación de callos fue mejorada considerablemente con la adición de 500 mg/l de L-prolina e igual concentración de L-glutamina en el medio de cultivo.

Morales (2008), realizó ensayos experimentales de inducción de callos a partir de nudos de *Jacaratia mexicana* de 1 cm de longitud. Obteniendo callos friables cultivando en medio de cultivo MS completo con sales con 2-4 D (2.26uM), BAP (2.19uM), 2% de sacarosa y 0.6% de agar y mantenidos en fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad a 27°C.

Muhammad y colaboradores (2007), lograron inducir callos a partir de hojas de *Artemisia absinthium* L. utilizando diversas concentraciones de auxina y

citocinina. Las concentraciones moderadas de los reguladores de crecimiento en combinación o sólo en el medio M y S produjeron callo friable verde. Estas células totipotentes dieron lugar al aumento de callos al ser transferidos a un segundo sub-cultivo. El cultivo óptimo de callos fue el que presentó medio de cultivo M&S a la mitad complementado con diversas concentraciones de auxinas. Concluyendo que el efecto sinérgico del regulador del crecimiento vegetal desempeña un papel importante en la inducción del callo y la diferenciación de la célula.

Martínez y colaboradores (2007), utilizaron como explantes hojas jóvenes de *Borojoa patinoi* obtenidas *in vitro* a partir de semillas, las cuales se cultivaron en medio M&S suplementado con 2,4-D en combinación con el BAP y TDZ sin obtener respuesta favorable para los callos friables entre el día 15 y 45 después de iniciado el cultivo. Sin embargo, realizaron otro ensayo con el mismo explante en medio de cultivo M y S con la adición de 1mg/l de 2,4-D como medio para la iniciación de de embriogénesis observándose a los 45 días la formación de callos friables de color amarillo verde.

Posso y colaboradores (2007), evaluaron los efectos de dos concentraciones de 2,4-D sobre la calogénesis de explantes de un clon de *Solanum tuberosum* y uno de *Pomoea batata* medidas en términos de cantidad de materia seca. En el caso de papa, obtuvieron mejor respuesta de calogénesis en la concentración de 5 mg/l de 2,4-D que en la concentración de 10 mg/l. En el caso de camote, sin embargo no se observó diferencias debidas a los tratamientos fitohormonales. En las concentraciones de 5 y 10 mg/l de 2,4-D, con 30 g/L de sacarosa, se dió rizogénesis indirecta en un período de 20 días. Siendo el cultivo de papa fuertemente inducido por los tratamientos fitohormonales.

Paz y colaboradores (2006), afirman que un cociente alto de auxinas en relación con la concentración de citocininas favoreció la formación de callos en *Galipea longiflora*. Los tejidos expuestos a la combinación con 5 mg/l de 2,4-D y 0.1 mg/l de cinetina, dieron lugar a la formación de callos friables a los 20 días de iniciado su cultivo.

Ruiz y colaboradores (2006), investigaron la influencia de los reguladores de crecimiento para la obtención de callos friables en caucho (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) Sin llegar a obtener regeneración de plántulas. Para los diferentes tratamientos se utilizaron como explantes hojas jóvenes e integumento de semillas de ocho a diez semanas de edad. Se cultivaron en medio M&S modificado con la adición de 0.67 mg/l de BAP y 0.66 mg/l de 2,4-D, como medio de iniciación de de embriogénesis, observándose a los 25 días la formación de callos friables y de color blanco. Éstos fueron subcultivados en medio M&S suplementado con 0.35 mg/l de BAP Y 0.2 Mg/l de 2,4-D como de expresión de callogénesis observándose a los 50 días expresión embriogénica. Para las hojas jóvenes se cultivaron en medio M&S suplementado con 0.5 mg/l BAP y 0.5 mg/l de ANA, presentaron una mejor consistencia de callo friable después de 50 días de cultivo.

Gonzales (2003), cultivó *in vitro* explantes foliares de ramas ortotrópicas de *Coffea canephora* P. establecidas en el campo. Los medios de cultivo contenían las sales minerales recomendadas por Murashige y Skoog (1962) y como reguladores de crecimiento se estudiaron el 2,4-D (0.5 mg/l) y la Kinetina (2.0 mg/l), así como el RIZOBAC (0.4 -1.8 mg/l) para la inducción de callo embriogénico. Se observó que la dosis de 0.9 mg/l de RIZOBAC y 2.0 mg/l de Kinetina favorecieron notablemente la formación de callos embriogénicos, Estos a su vez fueron cultivados en un medio suplementado con ANA (0.1 mg/l) Y Kinetina (0.5 mg/l) originaron embriones somáticos en diferentes estadios de desarrollo.

Daquinta y colaboradores (2002), utilizaron como explantes ápices y botones florales de árboles adultos y cotiledones de semillas de *Tectona grandis*. Las semillas se desinfectaron con HgCl₂ al 0.2% durante 10 minutos. Para el establecimiento *in vitro* de los cotiledones. Se evaluaron diferentes concentraciones de Thidiazuron en los explantes antes señalados, con el objetivo de lograr la formación de callos y diferentes niveles de Bencilaminopurina y Kinetina para la emisión de brotes. Se logró la formación de callos en todos los explantes empleados. Se formaron callos nodulares a partir de los segmentos de ápices, cotiledones y botones florales y se regeneraron brotes en los callos provenientes de ápices.

Dodds (1987), define el callo como una masa amorfa de células de las paredes delgadas del parénquima derivados de la proliferación de las células del tejido de la planta madre. Con frecuencia, se produce como un resultado de las heridas, un callo se forma en el extremo cortado de un tallo o raíz. La formación de callo se ha observado con mayor énfasis en los tejidos de las gimnospermas, helechos, musgos y hepáticas. El callo no tiene un patrón predecible de la organización, aunque los centros localizados de la actividad meristemática están presentes, y con frecuencia una región cambial rudimentaria aparece con zonas de diferenciación vascular. Los estímulos implicados en la iniciación del callo son la auxina y citoquinina. Además de los daños mecánicos, el callo se puede producir en los tejidos de la planta después de una invasión por parte de ciertos microorganismos o por la alimentación de los insectos. Utilizando técnicas de cultivo de tejidos formación de callos pueden ser inducidos en numerosos tejidos vegetales y órganos que usualmente no se desarrollan callos en respuesta a una lesión.

2.6. Estudios *in vitro* en *M. dubia*

Rivera (2012), utilizó como explantes microestacas de "camu camu" a partir de varas yemas establecidas en laboratorio, utilizo para la desinfección de estos NaCl al 0.05%, para el control de la oxidación utilizo 0.5 g/l de carbón activado y trabajo con el medio de cultivo M y S complementado con fitohormonas (AIA 0.25 mg/l y AG3 1.5 mg/l) en el cual obtuvo un 75% de sobrevivencia.

Gutiérrez e Inguil (2003), hicieron germinar en condiciones *in vitro* semillas de "camu camu" y a partir de nudos y ápices de las plántulas intentaron la propagación clonal en medio M y S suplementado con reguladores de crecimiento (ácido giberélico-3 1.5 mg/l y ácido naftaleno acético 5 mg/l, carbón activado 3g/l y ácido ascórbico 50 mg/l, a pH 5.6). Pero no pudieron obtener plántulas completas a partir de los explantes evaluados.

Pinedo y colaboradores (2008),lograron el establecimiento de segmentos nodales de 2-3 nudos bajo condiciones asépticas tanto con estacas traídas del campo y puestas a brotar dentro del laboratorio, como en semillas

germinadas de *M. dubia* en el laboratorio con 69.2% de sobrevivencia a los 30 días de cultivo. Los segmentos nodales procedentes de semillas germinadas en arena estéril resultaron los más adecuados para inducir brotes y enraizamiento *in vitro*. Fueron obtenidas raíces bien definidas a partir de los 40 días después de la siembra en el medio de cultivo Murashige y Skoog, suplementado con carbón activado y los fitoreguladores ácido indolacético, ácido gibérelico, ácido indolbutírico y bencilaminopurina. Obtuvieron un 7 % de enraizamiento en segmentos nodales. También indican, que lograron la inducción de callos en segmentos nodales y hojas cultivadas en medio basal Murashige y Skoog suplementado con 8 a 10 mg/l de 2,4-D. Pero sus resultados muestran aparentemente callos no friables, necrosados y oxidados.

González (2002), determinó el tipo de patrón adecuado en *M. dubia* (cotiledón o sin cotiledón) para el prendimiento, crecimiento y desarrollo de microinjertos de "camu camu" asimismo estandarizó el medio óptimo donde la preparación de estos microinjertos presento un alto porcentaje de contaminación y oxidación, a pesar de ello se obtuvo resultados positivos con prendimiento promedio de 15% entre todos los tratamientos, alcanzando un máximo de 6 cm de crecimiento en longitud, 12 nudos y 18 hojas aproximadamente a la 9^{na} y última evaluación, además el MS ¼ de concentración son los más ideales para el crecimiento y desarrollo de microinjertos.

Huaranca y colaboradores (2000) realizaron micropropagación de *M. dubia*, donde las semillas de "camu camu" crecen favorablemente en el medio M y S ½ sin sacarosa, las cuales son previamente escarificadas y desinfectadas con NaOCl 2 %. La multiplicación por estacas establecidas previamente es nula debido a la elevada oxidación.

Gómez y Huaranca (1997), manifiestan que la oxidación y contaminación afectan el crecimiento de los cotiledones del "camu camu" cortados al 25 %. Asimismo, indican que la oxidación en el establecimiento de semillas sexuales no impidió el crecimiento del tallo. La contaminación y oxidación en el cultivo de estacas fueron un obstáculo para el establecimiento de propágulos. El uso

de hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones no resultó favorable para la desinfección de las estacas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

a). Área de muestreo

Se realizó en el Centro Experimental El Dorado de la Estación Experimental Agraria San Roque - INIA , ubicado en el Km 25 de la carretera Iquitos- Nauta a 03° 57' 17" LS y 73° 24' 55" LW con una altitud de 112 m.s.n.m. donde se encuentra instalada la Colección Nacional de Germoplasma de "camu camu", constituido por 43 muestras representativas de la variabilidad genética de esta especie; pertenecientes a 8 principales cuencas hidrográficas de la Región Loreto: Nanay, Itaya, Napo, Ucayali, Putumayo, Curaray, Tigre y Amazonas (Anexo N°1).

b) Área experimental

La investigación se desarrolló en los años 2011-2012 en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA), ubicado en el departamento de Loreto, ciudad de Iquitos, Distrito de San Juan Bautista, en el pasaje los Paujiles s/n. Nuevo San Lorenzo, Km. 2.0 de la Av. Abelardo Quiñones.

3.2. Material vegetal

a) Clasificación taxonómica Según Angiosperm Phylogeny Group III (2009),

Clase	:	Magnoliopsida
Sub clase	:	Rosidae
Orden	:	Myrtales
Familia	:	Myrtaceae
Sub familia	:	Myrtoideae
Tribu	:	Myrteae
Género	:	Myrciaria
Especie	:	<i>Myrciaria. dubia</i>
Nombre científico	:	<i>Myrciaria. dubia</i> (Kunth) McVaugh
Nombre común	:	"camu camu"

b) Descripción botánica de la especie. Según Rengifo (2009) y Imán (2000)

Arbusto de 3 m, pudiendo alcanzar hasta 8 m de altura, glabro, muy ramificado, con ramas que nacen desde tierra. Tronco delgado es liso, tiene un diámetro de 10 a 15 cm y es muy ramificado, con renuevos basales que se desarrollan profusamente; las ramas son delgadas y levemente péndulas. El tronco forma una corteza color café claro a grisácea, la que regularmente se desprende en capas delgadas, con laminillas que se desprenden fácilmente en la época de estiaje, con las ramas superiores hispíduladas. Hojas opuestas, simples, enteras, sin estípulas y tienen un pecíolo de 1,5 a 3 mm de largo y cerca 1 mm de ancho; las láminas son lanceoladas a elípticas, de 4,5 a 10 cm de largo, 1,5 a 4,5 cm de ancho, con ápice agudo, base redondeada y cubierta de glándulas, con ambas caras glabras. El haz de la hoja es verde oscuro y algo brillante, mientras que el envés es opaco y verde claro. La nervadura se compone de un nervio medio sobresaliente y de hasta 20 pares de nervios secundarios. Los nervios secundarios forman un ángulo de 45° con el nervio principal y se curvan en dirección al ápice de la hoja, ápice acuminado, margen entero y ligeramente ondulado. Las Inflorescencias axilares tienen normalmente cuatro flores hermafroditas en dos pares opuestos en el eje de la inflorescencia, que es de 1 a 1,5 mm de largo. Las brácteas y bractéolas son persistentes. El cáliz, de cerca 2 mm de largo y 2 mm de ancho, se compone de cuatro sépalos, tiene un ápice anchamente redondeado. Los cuatro pétalos son blancos, aovados, 3 a 4 mm de largo, con margen ciliado. Los cerca de 125 estambres por flor son de 7 a 10 mm de largo, con anteras de 0,5 a 0,7 mm de largo; del ovario ínfero se origina un estilo simple de 10 a 11 mm de largo. El fruto comestible, de sabor muy ácido, es una baya esférica con un diámetro de 1 a 3(5) cm. La baya, que tiene en el ápice una cicatriz hipantial redondeada, desarrolla en estado maduro un color café-rojizo a violeta negruzco y una pulpa carnosa suave en la que se encuentran alojadas 2 a 3(4). Semillas reniformes de 8 a 5 mm de largo y 5,5 a 11 mm de ancho, de una a tres unidades, conspicuamente aplanadas y cubiertas por una malla de fibrillas.

El "camu camu" inicia la floración cuando alcanzan un diámetro basal de 2,0 cm, que corresponde a los arbustos que tienen entre dos y tres años de edad aproximadamente. 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. (Peters y Vásquez 1986). El color de las hojas varía de acuerdo a su edad. Las hojas jóvenes son marrón claro y verde claro, mientras que las adultas son verde oscuro. Asimismo, los frutos se les clasifica de acuerdo al estado de maduración, y el porcentaje de coloración rojiza de la cáscara: verdes (<25%), verde-pintón (25 a 50%), pintón (50 a 75%) y maduro (>75%). El tamaño y peso del fruto están muy relacionados, clasificándolos en grandes (> 3 cm de ϕ y >12 g), medianos (2.5 a 3 cm de ϕ y 8 a 12 g) y pequeños (< 2.5 cm de ϕ y < 8.0 g). (Imán 2000),

3.3. Metodología

3.3.1 Colecta y transporte del material vegetal

a) Varas yemeras

Se colectaron varas yemeras de *M. dubia* en los meses de marzo a junio del 2011, teniendo en cuenta el buen estado de la planta (sin rastros de daño mecánico), considerando el tercio superior de cada rama. Las varas (material biológico) seleccionadas se cortaron a una longitud promedio de 35 cm y diámetros de 1.0 a 1.3 cm, se envolvieron en papel periódico húmedo para evitar la deshidratación y fueron colocados en recipientes con hielo que mantienen una temperatura promedio de $18^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ para ser transportadas al Laboratorio de Biotecnología del CIRNA.

b) Frutos

Se colectaron frutos verdes y pintones de *M. dubia*, en buen estado (sin rastro de daño mecánico). Para su transporte al Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonia se los sumergió en un frasco con ácido ascórbico a 0.5 g/l para evitar la oxidación. Una vez llegado al laboratorio se utilizaron al momento para la experimentación.

3.3.2. Instalación de las varas yemeras y obtención de brotes en el laboratorio.

Para poder instalar las varas yemeras en laboratorio, se procedió de acuerdo al protocolo de Rivera (2012), con algunas modificaciones, que consistieron en instalar las varas yemeras en botellas descartables de

plástico, llenadas con agua de grifo la que era cambiada cada 3 días, además las varas fueron tratadas con el antifúngico Benomex (metil 1 {butilcarbamoil } 2-bencimidazol-b-carbamato) 0.5 g/l y un estimulante foliar Bayfolan (nitrógeno, fosforo y potasio) 0.2 %. Fueron instalados dentro del Laboratorio, al costado de una ventana para que tenga aireación, además con luz indirecta y artificial. Cuando las varas mostraron crecimiento de brotes (15-20 días) fueron puestas en oscuridad por 12 h a temperatura ambiente para su uso *in vitro*.

3.3.3. Preparación de medio de cultivo y fitohormonas.

a) Medio de cultivo

Para la preparación del medio se utilizó la formulación química del medio basal de Murashige y Skoog(1962) (M&S) a su concentración completa, para ello se tomó un matraz Erlenmeyer de 1000 ml de capacidad y se agregó 500 ml de agua destilada para ir incorporando una a una las soluciones stock A: 40 ml, B, C, y D:10 ml respectivamente, ver concentraciones (Anexo, tabla 5), suplementado con glicina (400mg/l), piridoxina, tiamina y Ac. Nicotínico (100mg/l) y completado con sacarosa (30 g/l), mioinositol (100mg/l) y Polivinilpyrrolidona (PVP) (4mg/l). Con la ayuda de un agitador magnético se homogenizaron las soluciones y se enrazó a un volumen total de 1000 ml. El pH fue ajustado en 5,8 y se adicionó 8,0 g/l de agar agar. La esterilización de los medios se realizó en autoclave (Yamato, SM 510), a 15 libras de presión atmosférica y a 121°C, durante 15 minutos.

El medio de cultivo se preparó previamente antes de la siembra de explantes y se mantuvieron en refrigeración hasta su uso.

b) Fitohormonas

Las fitohormonas se prepararon a una concentración stock de 1mg/ml (1000 ppm). Las citoquininas (Bencilaminopurina: BAP y Kinetina: K) se les disolvieron con algunas gotas de NaOH y la auxina (2,4-Diclorofenoxiacético: 2,4-D) se disolvió con algunas gotas de etanol 96% para enrazar a 1 ml de solución.

Las fitohormonas fueron agregadas al medio cuando la temperatura aproximada era de 50°C las que fueron esterilizadas con filtros de 0.45 µm. Una vez que el medio de cultivo tenía las fitohormonas respectivas, se procedió a dispensar en placas petri (15 ml por placa). (Ver flujograma en Anexo 2).

Para determinar los tratamientos fitohormonales se realizó una revisión bibliográfica, de donde se tomaron los mejores tratamientos, además de experimentos previos con la cual se determinó trabajar con las combinaciones mostradas en la Tabla 1 y 2.

Tabla 1. Tratamientos con fitohormonas para la inducción de callos en hojas y nudos de *M. dubia* "camu camu"

Tratamiento	2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)	Kinetina (mg/l)
1	2	0,1	—
2	2	0,5	—
3	3	0,1	—
4	5	2	—
5	5	—	0,1
6	—	1,2	—

Leyenda: 2,4-D: 2,4-Diclorofenoxiacético; BAP: 6-Benciladenina purina

Tabla 2. Tratamientos con fitohormonas para la inducción de callos en pulpa de frutos verdes y pintones de *M. dubia* "camu camu"

Tratamiento	2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)
1	1	0.1
2	1	0.5
3	2	0.1
4	2	0.5

3.3.4 Desinfección de las muestras y obtención de explantes

a) Brotes

Para la desinfección de brotes se procedió de acuerdo al protocolo de López (2010). Cuando las varas yemeras tuvieron un buen crecimiento de brotes (hojas y nudos tiernos) fueron extraídos para ser sumergidos

en PVP (2 mg/l). Posteriormente, en una cabina de purificación de aire (Labconco, Logic) los brotes fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril. Después, fueron sumergidos en alcohol al 70% por 30 segundos y luego enjuagados con agua destilada estéril. A continuación, fueron sumergidos en 2 % de NaOCl por 10 min en constante agitación lenta. Finalmente, las muestras fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril.

Posterior a esto, se procedió a realizar los cortes en los brotes para extraer hojas y nudos, para lo que se utilizó bisturí y pinzas estériles. Las hojas fueron cortadas en segmentos de 1 cm² (incluyendo la nervadura central). Los nudos se obtuvieron realizando cortes de las ramas a 0.5 cm arriba y debajo de la yema axilar.

b) Frutos

Se les enjuaga con agua de grifo, luego en la cabina de purificación de aire se enjuaga tres veces con agua estéril, para luego ser tratados con alcohol al 96% por 30 segundos y enjuagados con agua destilada estéril. Luego, fueron tratados 5% de NaOCl por 5 min en constante agitación lenta. Finalmente, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

3.3.5 Siembra de explantes.

a) Hojas

Los explantes de 1 cm² fueron sembrados con el haz en contacto con el medio de cultivo.

b) Nudos

Los nudos se sembraron en posición erguida

c) Pulpa

Se procedió a realizar los cortes en frutos con un bisturí y pinzas estériles. Para extraer la pulpa, se hizo un corte transversal de los frutos y separó segmentos de pulpa de 1 cm². Los explantes se sembraron sobre el medio.

3.3.6 Evaluaciones

Luego de la siembra, los cultivos fueron mantenidos en oscuridad por 15 días a 25 ± 2 °C. Después, fueron sometidos a un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad (ver flujograma en anexo 3).

Semanalmente, por observación directa y con ayuda de un estereoscopio se evaluó: contaminación, oxidación, expresión callogénica. Los datos fueron registrados en una ficha (Anexo 4).

La contaminación se evaluó por la presencia o ausencia de contaminantes, hongos (Micelio), bacterias, contaminantes mixtos.

Contaminación

Sin contaminar	1
Contaminado	2

Para evaluar la oxidación se tomo en cuenta el cambio de color o ennegrecimiento del explante, de acuerdo con ello se le podría clasificar:

Oxidación

sin oxidación	0
25% del explante oxidado	1
50% del explante oxidado	2
75% del explante oxidado	3
100% del explante oxidado	4

En el caso de expresión de callos se consideró el aumento de la masa callogénica en el explante, para ello se determinó la siguiente clasificación.

Expresión callos

Sin callos	1
25% de tejido callogénico cubriendo el explante	2
50% de tejido callogénico cubriendo el explante	3
75% de tejido callogénico cubriendo el explante	4
100% de tejido callogénico cubriendo el explante	5

3.3.7 Diseño experimental

Los tratamientos se aplicaron bajo la estructura de diseño completamente al azar con 06 tratamientos para nudos y hojas respectivamente (Tabla 03) seguido de 8 tratamientos en caso de pulpa verde y pintón (Tabla 04) con 10 placas por tratamiento.

Como unidad experimental se consideró al número de explantes por placa (04) con un total de 10 placas por tratamiento, y como unidad muestral se seleccionó a cada explante individual.

a) Experimento 01

Tabla 03. Tratamientos utilizados para hojas y nudos

Tratamiento	Explante	Hormonas
T1	H/N	2-4, D(2 mg/l) + BAP(0.1 mg/l)
T2	H/N	2-4, D (2 mg/l) + BAP(0.5mg/l)
T3	H/N	2-4, D (3 mg/l) +BAP(0.1mg/l)
T4	H/N	2-4, D (5 mg/l) + BAP(2 mg/l)
T5	H/N	2-4, D (5 mg/l) + K (0.1 mg/l)
T6	H/N	BAP(1.2 mg/l)

H: hoja N: nudo

b) Experimento 02

Tabla 04. Tratamientos utilizados para pulpa

Tratamiento	plante	Hormonas
T1	PV/PP	2-4, D (1 mg/l) + BAP (0.1mg/l)
T2	PV/PP	2-4, D (1 mg/l) + BAP (0.5mg/l)
T3	PV/PP	2-4, D (2 mg/l) + BAP (0.1mg/l)
T4	PV/PP	2-4, D (2 mg/l) + BAP (0.5mg/l)

PV: pulpa verde PP: pulpa pintón

3.3.8. Análisis e interpretación de datos

Se utilizó un diseño completamente aleatorio con arreglo factorial con Análisis de Varianza (ANOVA), pruebas de comparaciones múltiples de Tukey a través del paquete estadístico IBM SPSS Statistics Vs. 19.0 y además se utilizó el programa Microsoft Office Excel 2007. Los datos se registraron en la ficha de evaluación (Anexo 6).

IV. RESULTADOS

4.1. Contaminación de los explantes

La contaminación fue uno de los problemas con el que se tuvo que lidiar, porque causó pérdida de una cierta parte de explantes de hojas, nudos y pulpa, siendo inferior al 31 %)(Figura 1), pero la mayoría no mostró este problema; es así que al comparar la contaminación por tipo de explantes no mostro diferencias significativas ($P > 0.05$).

La contaminación fue causada principalmente por hongos (hasta un 90 %), lo cual se verificó por la presencia de micelios (Fig. 2) y un menor porcentaje por contaminantes mixtos (hongos, bacterias, otros). De tal modo que al comparar los porcentajes de las muestras contaminadas por tipo de explante en la primera semana con la segunda a octava semana se encontraron diferencias significativas en hojas ($F = 88,42$, $P < 0,05$), nudos ($F = 44,75$, $P < 0,05$) y pulpa ($F = 69,08$, $P < 0,05$) (Tabla 5 y 6).

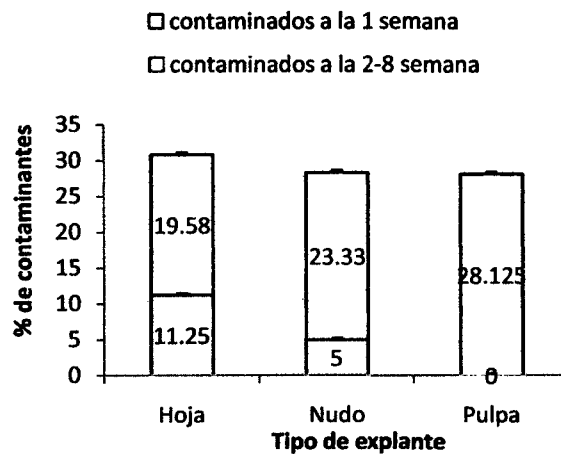


Figura 1. Porcentaje de contaminación por tipo de explantes de *M. dubia* para la inducción de callos.

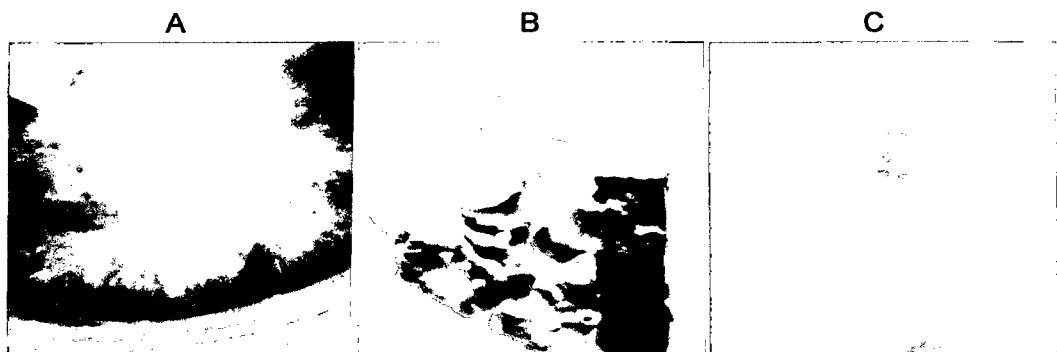


Figura 2. Contaminación en hoja (A) nudo (B) y pulpa (C) de *M. dubia* durante la

Tabla 5. Análisis de la varianza (ANOVA) de la variable contaminación en los tres tipos de explantes de *M. dubia*.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
hoja	Inter-grupos	1882.333	2	941.167	88.419	.000
	Intra-grupos	159.667	15	10.644		
	Total	2042.000	17			
nudo	Inter-grupos	1925.333	2	962.667	44.752	.000
	Intra-grupos	322.667	15	21.511		
	Total	2248.000	17			
pulpa	Inter-grupos	1977.333	2	988.667	69.084	.000
	Intra-grupos	214.667	15	14.311		
	Total	2192.000	17			

Tabla 6. Análisis con la Prueba de Tukey de la contaminación por semanas en los 3 tipos de explante.

Variable dependiente	(I) semana1	(J) semana1	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Contaminación 1 semana	hoja	nudo	-3.33333	1.88365	.213	-8.2261	1.5594
		pulpa	-23.16667	1.88365	.000	-28.0594	-18.2739
	nudo	hoja	3.33333	1.88365	.213	-1.5594	8.2261
		pulpa	-19.83333	1.88365	.000	-24.7261	-14.9406
	pulpa	hoja	23.16667	1.88365	.000	18.2739	28.0594
		nudo	19.83333	1.88365	.000	14.9406	24.7261
contaminación 2 a 8 semana	hoja	nudo	-7.33333	2.67775	.038	-14.2887	-.3779
		pulpa	-24.66667	2.67775	.000	-31.6221	-17.7113
	nudo	hoja	7.33333	2.67775	.038	.3779	14.2887
		pulpa	-17.33333	2.67775	.000	-24.2887	-10.3779
	pulpa	hoja	24.66667	2.67775	.000	17.7113	31.6221
		nudo	17.33333	2.67775	.000	10.3779	24.2887

4.2. Oxidación de los explantes

Los resultados muestran que la mayoría de los tres tipos de explantes experimentaron oxidación en diferentes grados del 25 al 75 % (Fig.3 y 4). En la figura 3 se evidencia la oxidación en hojas y nudos por tratamiento, en las hojas el grado de oxidación fue variable es así T1 y T5 mostraron un alto número de explantes que se oxidaron solo en un 25 %, además el T2, T4 y T6 mostraron una mayor incidencia en el grado de oxidación 50 %. En nudos, los tratamientos T1 y T2 muestran una incidencia en la oxidación del 25 %, de la misma forma los T3, T4 y T5 tuvieron incidencia en la oxidación en 50 %, finalmente el T6 se observa todos los explantes experimentaron la más fuerte oxidación con un 75 % de la superficie oxidada. Aplicando el Anova ($P < 0,05$) (tabla 7) nos reporta que existe una diferencia altamente significativa entre tratamientos y explantes de hojas y nudos, ver análisis con la prueba de Tukey tabla 8 y 9.

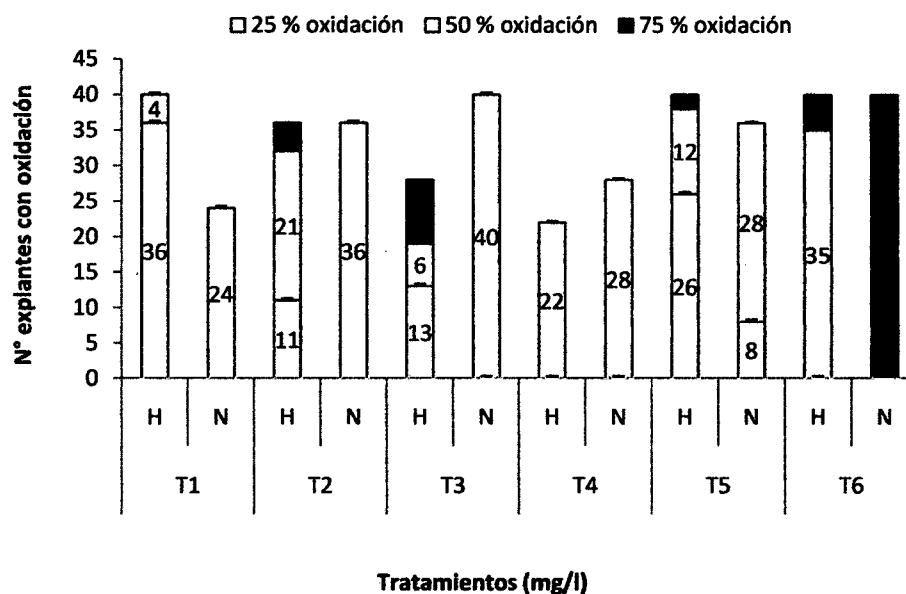


Figura 3. Oxidación por grados en explantes de hojas y nudos de *M. dubia* para la inducción de callos.

Tabla 07. Análisis de la varianza con ANOVA en la oxidación en hojas y nudos.

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Hojas	Inter-grupos	32.983	5	6.597	11.030	.000
	Intra-grupos	139.950	234	.598		
	Total	172.933	239			
Nudos	Inter-grupos	125.133	5	25.027	106.866	.000
	Intra-grupos	54.800	234	.234		
	Total	179.933	239			

Tabla 8. Análisis con la Prueba de Tukey de la oxidación por tratamiento en explante de hojas de *M. dubia*.

Variable dependiente	Tratamiento		Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Hoja	T1	T3	.700	.173	.001	.20	1.20
		T2	.525	.173	.032	.03	1.02
		T5	.600	.173	.008	.10	1.10
		T6	-.125	.173	.979	-.62	.37
		T4	.900	.173	.000	.40	1.40
	T2	T3	.175	.173	.914	-.32	.67
		T5	.075	.173	.998	-.42	.57
		T6	-.650	.173	.003	-1.15	-.15
		T4	.375	.173	.257	-.12	.87
		T1	-.525	.173	.032	-1.02	-.03
	T3	T2	-.175	.173	.914	-.67	.32
		T5	-.100	.173	.992	-.60	.40
		T6	-.825	.173	.000	-1.32	-.33
		T4	.200	.173	.857	-.30	.70
		T1	-.700	.173	.001	-1.20	-.20
	T4	T3	-.200	.173	.857	-.70	.30
		T2	-.375	.173	.257	-.87	.12
		T5	-.300	.173	.510	-.80	.20
		T6	-1.025	.173	.000	-1.52	-.53
		T1	-.900	.173	.000	-1.40	-.40
	T5	T3	.100	.173	.992	-.40	.60
		T2	-.075	.173	.998	-.57	.42
		T6	-.725	.173	.001	-1.22	-.23
		T4	.300	.173	.510	-.20	.80
		T1	-.600	.173	.008	-1.10	-.10
	T6	T3	.825	.173	.000	.33	1.32
		T2	.650	.173	.003	.15	1.15
		T5	.725	.173	.001	.23	1.22
		T4	1.025	.173	.000	.53	1.52
		T1	.125	.173	.979	-.37	.62

Tabla 9. Análisis con la Prueba de Tukey de la oxidación por tratamiento en explante de nudos de *M. dubia*.

Tratamiento		Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
					Límite inferior	Límite superior	
nudos	T1	T3	.000	.108	1.000	-.31	.31
		T2	.100	.108	.940	-.21	.41
		T5	-1.000	.108	.000	-1.31	-.69
		T6	.600	.108	.000	.29	.91
		T4	1.400	.108	.000	1.09	1.71
	T2	T3	.000	.108	1.000	-.31	.31
		T5	.100	.108	.940	-.21	.41
		T6	-1.000	.108	.000	-1.31	-.69
		T4	.600	.108	.000	.29	.91
		T1	1.400	.108	.000	1.09	1.71
	T3	T2	-.100	.108	.940	-.41	.21
		T5	-.100	.108	.940	-.41	.21
		T6	-1.100	.108	.000	-1.41	-.79
		T4	.500	.108	.000	.19	.81
		T1	1.300	.108	.000	.99	1.61
	T4	T3	1.000	.108	.000	.69	1.31
		T2	1.000	.108	.000	.69	1.31
		T5	1.100	.108	.000	.79	1.41
		T6	1.600	.108	.000	1.29	1.91
		T1	2.400	.108	.000	2.09	2.71
	T5	T3	-.600	.108	.000	-.91	-.29
		T2	-.600	.108	.000	-.91	-.29
		T6	-.500	.108	.000	-.81	-.19
		T4	-1.600	.108	.000	-1.91	-1.29
T1		.800	.108	.000	.49	1.11	
T6	T3	-1.400	.108	.000	-1.71	-1.09	
	T2	-1.400	.108	.000	-1.71	-1.09	
	T5	-1.300	.108	.000	-1.61	-.99	
	T4	-2.400	.108	.000	-2.71	-2.09	
	T1	-.800	.108	.000	-1.11	-.49	

En pulpa, la mayoría de explantes presentó daño oxidativo en el 25 % de su superficie. En la figura 4 es evidente que en los T2 y T3 mostraron un mayor número de explantes con oxidación del 50 %. Aplicando el Anova para la oxidación (tabla 10) entre tratamientos nos reporta que no existe diferencia significativa ($p > 0,05$).

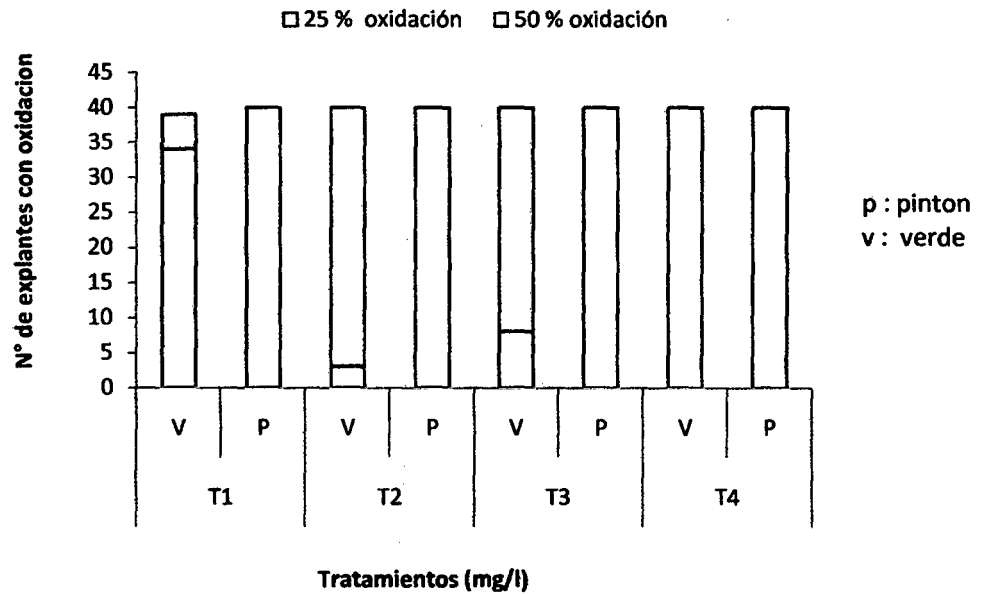


Figura 4. Oxidación por grados en explantes de pulpa de *M. dubia* para la inducción de callos.

Tabla. 10. Análisis de la varianza con ANOVA en la oxidación en pulpa

	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Sig.
Pulpa Inter-grupos	2.97	39	0.08	0.39	1
Intra-grupos	55.38	280	0.20		
Total	58.35	319			

La oxidación se evidencio por un ennegrecimiento de los explantes de hojas y nudos y el cambio de color crema a amarillo oscuro en explantes de pulpa (fig. 5). Cabe indicar que las áreas oxidadas de los explantes no expresaron callos. Sin embargo, las áreas no oxidadas lograron expresar callos en la mayoría de los explantes evaluados.



Figura 5. Áreas de oxidación(indicadas por las flechas) en hoja con un grado de 25 % de oxidación (A), nudos con un grado de 75 % de oxidación (B), pulpa con un grado de 25 % de oxidación (C)en *M. dubia* empleados para la inducción de callos en cultivos *in vitro*.

4.3. Inducción de Calogénesis

En los tres tipos de explantes de *M. dubia* (Hojas, Nudos y Pulpa) se ha inducido la calogénesis con la mayoría de los tratamientos fitohormonales.

Al evaluar la respuesta calogénica de los explantes tratados con diferentes tratamientos fitohormonales se notó que una proporción alta de auxina/citoquinina favoreció la calogénesis en los tres tipos de explantes evaluados (Figura 6 y 7). Es Así que el T1 (hojas, nudos) y T3 (pulpa) fueron tratados con 2,4-D (2 mg/l) y BAP (0.1 mg/l) (proporción auxina/citoquinina = 20) generó callos en los tres explantes. Los otros tratamientos fitohormonales indujeron diferentes respuestas en los explantes evaluados.

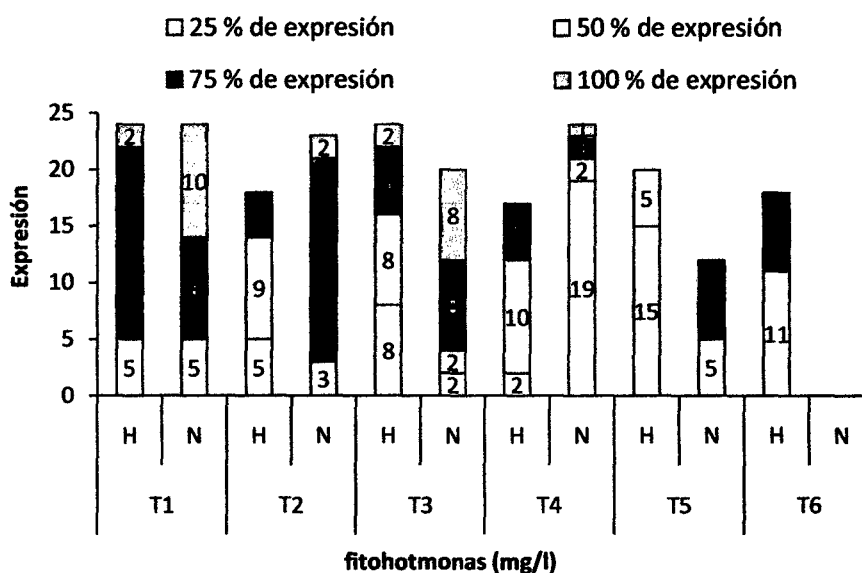


Figura 6. Inducción de calogénesis en explantes de hojas y nudos de *M. dubia* con los tratamientos fitohormonales evaluados

En el caso de explantes de hojas y nudos se observa que al evaluar el aumento de la masa calogénica por tratamiento fitohormonal, varío desde el 25 % a 100 % de cubrimiento total del explante con callos, además es evidente que en el T1 todos los explantes evaluados mostraron expresión en diferentes grados (25% a 100 %). En general todos los tratamientos expresaron calogénesis para los explantes de hojas y nudos, excepto el T6 que no formó callos. Es así que al comparar la expresión de hojas no muestran diferencias significativas ($F = 1,634$, $+P > 0,05$ tabla 11). Asimismo al evaluar la respuesta calogénica de los explantes de nudos muestran una alta diferencia significativa ($F = 274,10$, $P < 0,05$ ver tabla 11 y 12).

Tabla 11. Análisis de la varianza con ANOVA en expresión de callos en hoja y nudos.

Explante		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
hoja	Inter-grupos	13.17	5	2.63	1.63	0.23
	Intra-grupos	19.33	12	1.61		
	Total	32.50	17			
nudo	Inter-grupos	152.28	5	30.46	274.10	0.00
	Intra-grupos	1.33	12	0.11		
	Total	153.61	17			

Tabla 12. Análisis con la prueba Tukey de la expresión en nudos

tratamiento hormonal		Diferencia de medias	E. t	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
T1	T2	.33333	.27217	.817	-.5808	1.2475
	T3	1.33333	.27217	.004	.4192	2.2475
	T4	.00000	.27217	1.000	-.9142	.9142
	T5	4.00000	.27217	.000	3.0858	4.9142
	T6	8.00000	.27217	.000	7.0858	8.9142
T2	T1	-.33333	.27217	.817	-1.2475	.5808
	T3	1.00000	.27217	.029	.0858	1.9142
	T4	-.33333	.27217	.817	-1.2475	.5808
	T5	3.66667	.27217	.000	2.7525	4.5808
	T6	7.66667	.27217	.000	6.7525	8.5808
T3	T1	-1.33333	.27217	.004	-2.2475	-.4192
	T2	-1.00000	.27217	.029	-1.9142	-.0858
	T4	-1.33333	.27217	.004	-2.2475	-.4192
	T5	2.66667	.27217	.000	1.7525	3.5808
	T6	6.66667	.27217	.000	5.7525	7.5808
T4	T1	.00000	.27217	1.000	-.9142	.9142
	T2	.33333	.27217	.817	-.5808	1.2475
	T3	1.33333	.27217	.004	.4192	2.2475
	T5	4.00000	.27217	.000	3.0858	4.9142
	T6	8.00000	.27217	.000	7.0858	8.9142
T5	T1	-4.00000	.27217	.000	-4.9142	-3.0858
	T2	-3.66667	.27217	.000	-4.5808	-2.7525
	T3	-2.66667	.27217	.000	-3.5808	-1.7525
	T4	-4.00000	.27217	.000	-4.9142	-3.0858
	T6	4.00000	.27217	.000	3.0858	4.9142
T6	T1	-8.00000	.27217	.000	-8.9142	-7.0858
	T2	-7.66667	.27217	.000	-8.5808	-6.7525
	T3	-6.66667	.27217	.000	-7.5808	-5.7525
	T4	-8.00000	.27217	.000	-8.9142	-7.0858
	T5	-4.00000	.27217	.000	-4.9142	-3.0858

En cuanto a explantes de pulpa, se observa una baja expresión de callos en los diferentes tratamientos evaluados (fig.7). Frecuentemente, los explantes obtenidos de pulpa de frutos verdes dieron mejor respuesta mostrando callos en un 25 % de cubrimiento del área del explante, es así que al comparar la respuesta callogénica con los tratamientos hormonales mostraron diferencias significativas ($F = 7,599$, $P < 0,05$, ver tabla 13 y 14).

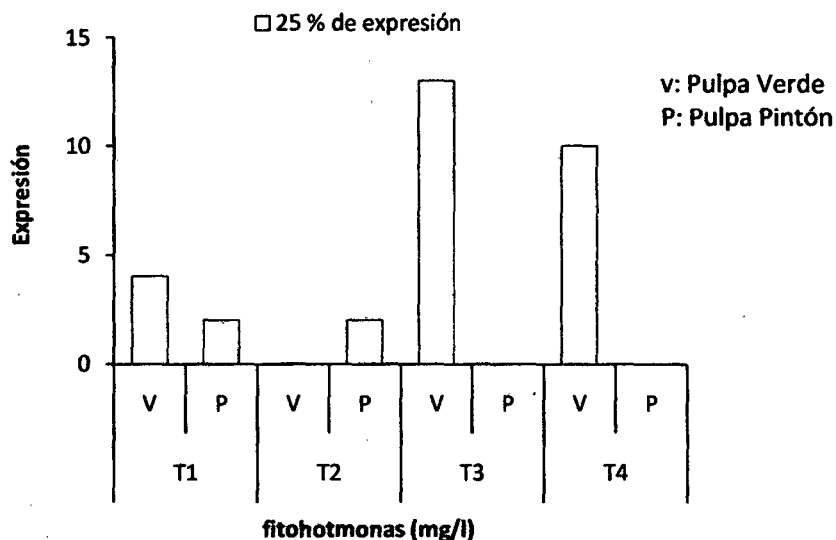


Figura 7. Inducción de calogénesis en explantes de pulpa verde y pinton en frutos de *M. dubia* con los tratamientos fitohormonales evaluados

Tabla. 13. Análisis de la varianza con ANOVA en expresión de callos en pulpa

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	57.625	7	8.232	7.599	.000
Intra-grupos	17.333	16	1.083		
Total	74.958	23			

Tabla 14. . Análisis con la prueba Tukey de la expresión en pulpa verde y pulpa pintón

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
T1 pulpa Verde	T2 V	.66667	.84984	.992	-2.2756	3.6089
	T3V	1.33333	.84984	.761	-1.6089	4.2756
	T4 V	.66667	.84984	.992	-2.2756	3.6089
	T1 P	-3.00000	.84984	.044	-5.9423	-.0577
	T2 P	1.33333	.84984	.761	-1.6089	4.2756
	T3P	-2.00000	.84984	.325	-4.9423	.9423
	T4 P	1.33333	.84984	.761	-1.6089	4.2756
T2 pulpa Verde	T1 V	-.66667	.84984	.992	-3.6089	2.2756
	T3V	.66667	.84984	.992	-2.2756	3.6089
	T4 V	.00000	.84984	1.000	-2.9423	2.9423
	T1 P	-3.66667	.84984	.010	-6.6089	-.7244
	T2 P	.66667	.84984	.992	-2.2756	3.6089
	T3P	-2.66667	.84984	.091	-5.6089	.2756
	T4 P	.66667	.84984	.992	-2.2756	3.6089
T3 pulpa Verde	T1 V	-1.33333	.84984	.761	-4.2756	1.6089
	T2V	-.66667	.84984	.992	-3.6089	2.2756
	T4 V	-.66667	.84984	.992	-3.6089	2.2756
	T1 P	-4.33333	.84984	.002	-7.2756	-1.3911
	T2 P	.00000	.84984	1.000	-2.9423	2.9423
	T3P	-3.33333	.84984	.021	-6.2756	-.3911
	T4 P	.00000	.84984	1.000	-2.9423	2.9423
T4 pulpa Verde	T1 V	-.66667	.84984	.992	-3.6089	2.2756
	T2V	.00000	.84984	1.000	-2.9423	2.9423
	T3 V	.66667	.84984	.992	-2.2756	3.6089
	T1 P	-3.66667	.84984	.010	-6.6089	-.7244
	T2 P	.66667	.84984	.992	-2.2756	3.6089
	T3P	-2.66667	.84984	.091	-5.6089	.2756
	T4 P	.66667	.84984	.992	-2.2756	3.6089

Continúa en la pág. siguiente

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
T1 pulpa Pintón	T1 V	3.00000	.84984	.044	.0577	5.9423
	T2V	3.66667	.84984	.010	.7244	6.6089
	T3 V	4.33333	.84984	.002	1.3911	7.2756
	T4 V	3.66667	.84984	.010	.7244	6.6089
	T2 P	4.33333	.84984	.002	1.3911	7.2756
	T3P	1.00000	.84984	.927	-1.9423	3.9423
	T4 P	4.33333	.84984	.002	1.3911	7.2756
T2 pulpa Pintón	T1 V	-1.33333	.84984	.761	-4.2756	1.6089
	T2V	-.66667	.84984	.992	-3.6089	2.2756
	T3 V	.00000	.84984	1.000	-2.9423	2.9423
	T4 V	-.66667	.84984	.992	-3.6089	2.2756
	T1 P	-4.33333	.84984	.002	-7.2756	-1.3911
	T3P	-3.33333	.84984	.021	-6.2756	-.3911
	T4 P	.00000	.84984	1.000	-2.9423	2.9423
T3 pulpa Pintón	T1 V	2.00000	.84984	.325	-.9423	4.9423
	T2V	2.66667	.84984	.091	-.2756	5.6089
	T3 V	3.33333	.84984	.021	.3911	6.2756
	T4 V	2.66667	.84984	.091	-.2756	5.6089
	T1 P	-1.00000	.84984	.927	-3.9423	1.9423
	T2P	3.33333	.84984	.021	.3911	6.2756
	T4 P	3.33333	.84984	.021	.3911	6.2756
T4 pulpa Pintón	T1 V	-1.33333	.84984	.761	-4.2756	1.6089
	T2V	-.66667	.84984	.992	-3.6089	2.2756
	T3 V	.00000	.84984	1.000	-2.9423	2.9423
	T4 V	-.66667	.84984	.992	-3.6089	2.2756
	T1 P	-4.33333	.84984	.002	-7.2756	-1.3911
	T2P	.00000	.84984	1.000	-2.9423	2.9423
	T3 P	-3.33333	.84984	.021	-6.2756	-.3911

V: verde

P: pintón

En los explantes de hojas se generaron callos verdes, friables y compactos. Estos se originaron principalmente en las nervaduras y en los bordes cubriendo hasta en un 75 % la superficie del explante foliar (Figura 8). Los explantes de nudos formaron callos semejantes al de los explantes foliares, pero los colores fueron de blanquecino a verde claro, friables y compactos. Los callos se expresaron frecuentemente en los extremos del explante (sitios de corte) y en los sitios de inserción del peciolo, llegando a cubrir el 100% de la superficie del explante. En contraste, los explantes de pulpa generaron callos transparentes poco friables llegando a cubrir en un 25 % el área del explante ver Anexo 5.

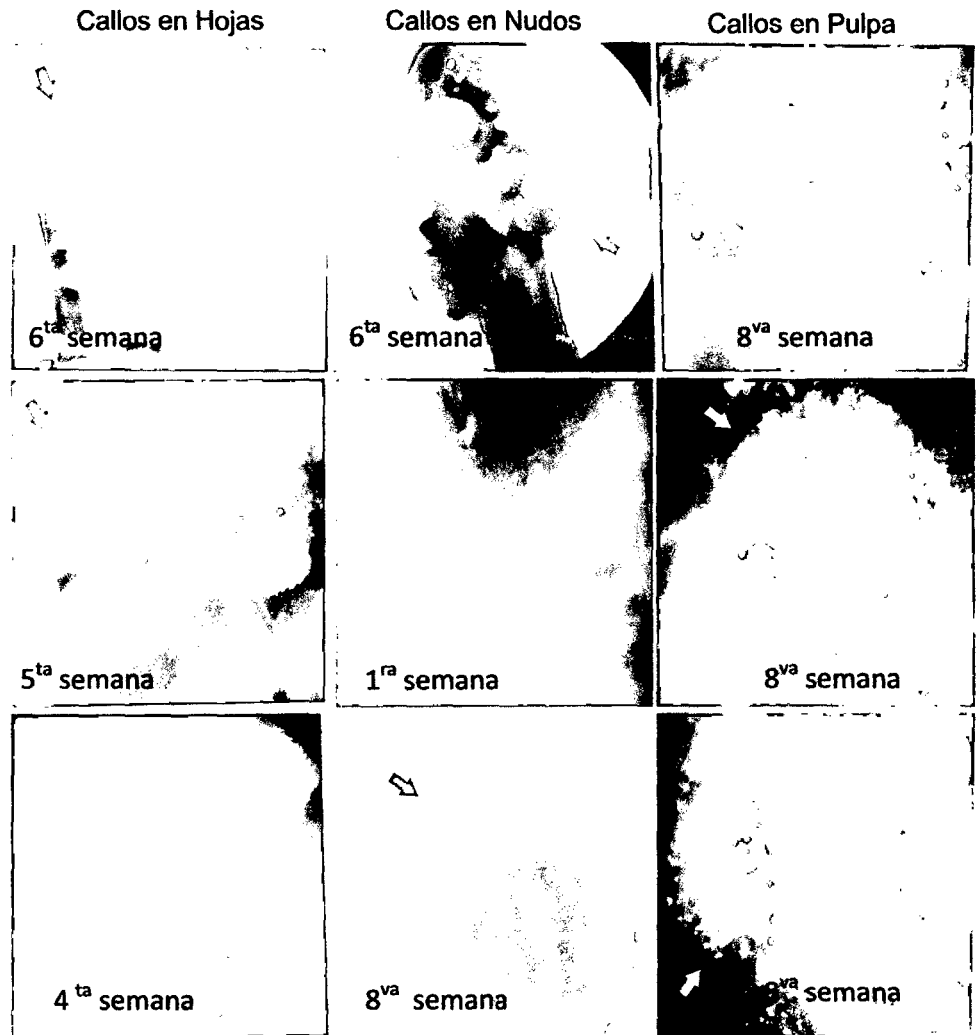


Figura 8. Callos obtenidos en explantes de hojas, nudos y pulpa de *M. dubia* tratados con 2,4-D (2mg/l) y BAP (0,1mg/l), excepto el obtenido a la primera semana en nudos que fue 2,4-D (2mg/l) y BAP (0,1mg/l).

La formación de callos en los tres tipos de explantes fue variable y dependió del tratamiento fitohormonal y el tiempo de cultivo (Figura 9).

En el caso de explantes de hojas se observa que en la cuarta semana tres tratamientos fitohormonales (T1, T2, T4) comenzaron a inducir callos. A partir de la quinta semana todos los tratamientos aplicados indujeron callos, aunque en diferentes proporciones. Asimismo, se evidencia que la expresión de callos se incrementó conforme transcurrió el tiempo de cultivo, mostrando la respuesta callogénica, diferencias estadísticas a partir de la cuarta semana de cultivo ($F > 4,00$, $P < 0,05$ ver Tabla 15).

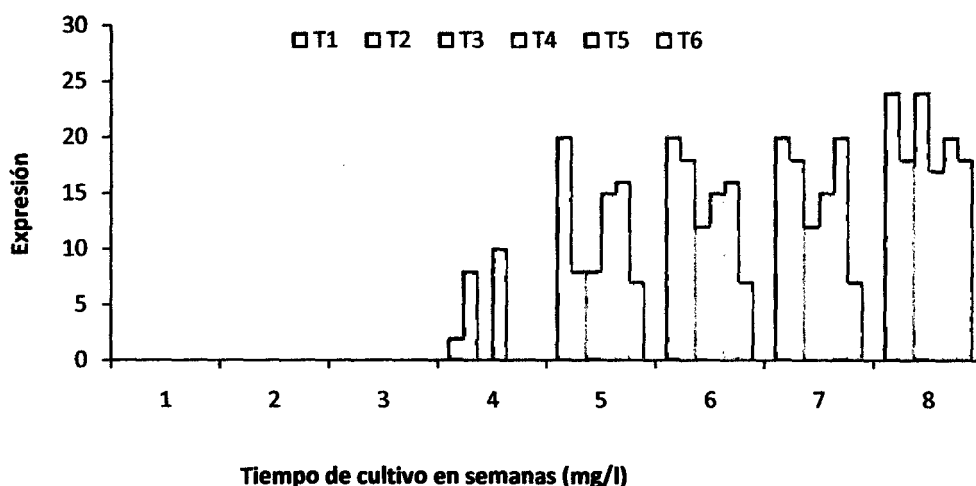
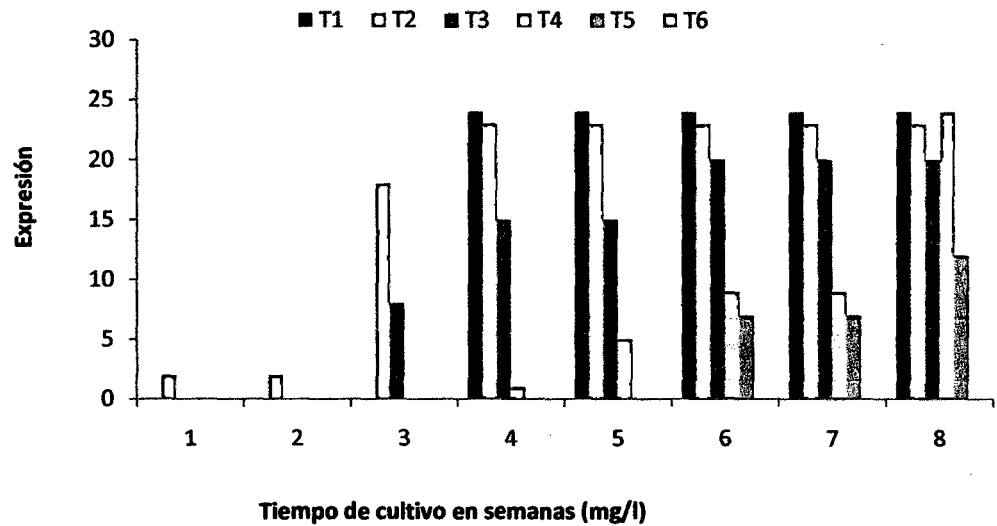


Fig.9. Respuesta de los explantes de hojas de *M. dubia* por tratamiento fitohormonal en el tiempo

Tabla 15. Análisis de la varianza con ANOVA en expresión de callos en el tiempo de hojas

hojas		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
sema1	Inter-grupos	.000	5	.000	.	.
sema2	Inter-grupos	.000	5	.000	.	.
sema3	Inter-grupos	.000	5	.000	.	.
sema4	Inter-grupos	33.778	5	6.756	13.511	.000
sema5	Inter-grupos	105.778	5	21.156	14.646	.000
sema6	Inter-grupos	27.778	5	5.556	9.091	.001
sema7	Inter-grupos	4.444	5	.889	4.000	.023
sema8	Inter-grupos	50.667	5	10.133	22.800	.000

La inducción de callos en nudos fue más precoz (Figura 10), particularmente con el tratamiento con (2-4, D 2 mg/l + BAP 0.5mg/l) la callogénesis fue desde la primera semana (5 días) de cultivo. Los demás tratamientos fitohormonales iniciaron la formación de callos en las sucesivas semanas de cultivo. También, se observa que la expresión de callos se incrementó en función al tiempo de cultivo. Al comparar la inducción callogénica por tratamiento hormonal en función al tiempo se encontró diferencias significativas en la primera semana y en las semanas 3 a 8 ($F > 4,96$, $P < 0,05$, ver tabla 16).



fitohormonal en el tiempo

Tabla 16. Análisis de la varianza con ANOVA en expresión de callos en nudos

nudos		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
S1	Inter-grupos	1.111	5	.222	4.000	.023
S2	Inter-grupos	.000	5	.000		
S3	Inter-grupos	91.778	5	18.356	82.600	.000
S4	Inter-grupos	15.611	5	3.122	18.733	.000
S5	Inter-grupos	6.944	5	1.389	25.000	.000
S6	Inter-grupos	15.167	5	3.033	4.964	.011
S7	Inter-grupos	.000	5	.000		
S8	Inter-grupos	61.111	5	12.222	16.923	.000

Finalmente, en los explantes de pulpa se observa letargo en la respuesta calogénica (Figura 11), en comparación con los explantes de hojas y nudos, de tal modo que recién a la sexta semana de cultivo se observa la formación de callos con los cuatro tratamientos fitohormonales evaluados y la cantidad de explantes con callos no se incrementó en el tiempo de cultivo, mostrando diferencias significativas sólo en la sexta semana de cultivo ($F= 3,65$, $P< 0,05$ ver tabla 17).

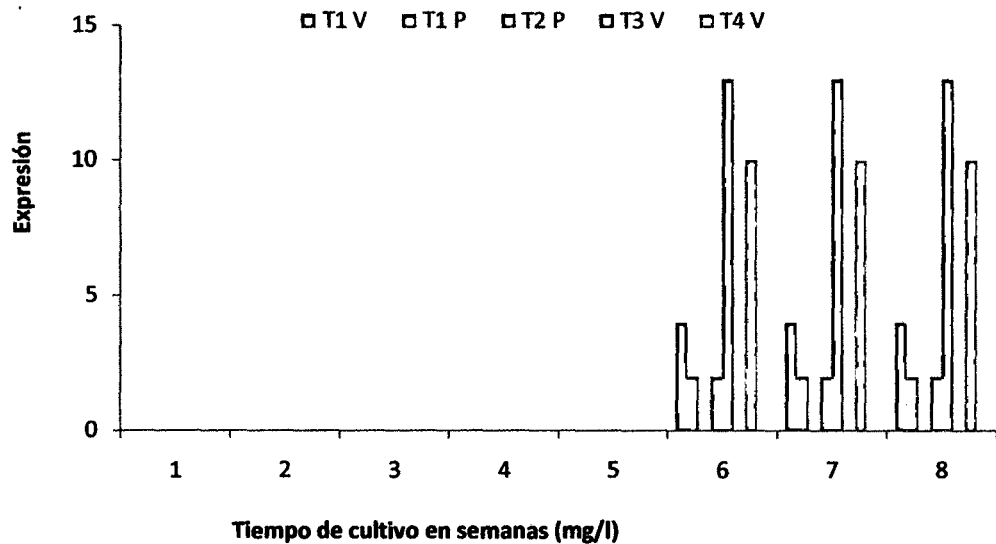


Fig.11 Respuesta de los explantes de pulpa de *M. dubia*. por tratamiento fitohormonal en el tiempo

Tabla 17. Análisis de la varianza con ANOVA en expresión de callos en pulpa

pulpa		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
SE1	Inter-grupos	.000	7	.000	.	.
SE2	Inter-grupos	.000	7	.000	.	.
SE3	Inter-grupos	.000	7	.000	.	.
SE4	Inter-grupos	.000	7	.000	.	.
SE5	Inter-grupos	.000	7	.000	.	.
SE6	Inter-grupos	82.000	7	11.714	3.651	.015
SE7	Inter-grupos	.000	7	.000	.	.
SE8	Inter-grupos	.000	7	.000	.	.

V. DISCUSIÓN

5.1. Contaminación de los explantes

La contaminación de los explantes de *M. dubia* empleados para la obtención de callos fue otro inconveniente al inicio y durante el cultivo. La contaminación en la primera semana en los explantes de hoja y nudo se deben a una deficiente desinfección, porque los contaminantes, predominantemente hongos, se desarrollaron a partir de los explantes. Al respecto, Verde (2005) aisló, a partir de hojas, frutos y raíces del "camu camu", hongos parásitos de los géneros *Colletotrichum* sp., *Marssonina* sp., *Curvularia* sp., *Pestalotia* sp., *Fusarium* sp. y *Lasiodiplodia theobromae* y tres hongos no parásitos de los géneros *Fumago* sp., *Capnodium* sp. y *Dinemasporium* sp. El problema de contaminación inicial no se observa en la pulpa, debido a su esterilidad y menor exposición a microorganismos contaminantes del ambiente. Las contaminaciones aparecidas en las semanas subsiguientes fueron causadas por hongos ambientales que lograron ingresar a las placas de cultivo, probablemente por las manipulaciones realizadas y su insuficiente hermeticidad. Según Capó (2002), las contaminaciones por bacterias endofíticas, las cuales conviven con la planta en su hábitat natural, se manifiestan durante la micropropagación de los explantes, debido al ambiente favorable para su crecimiento. Además, Cassells (2012), manifiesta que muchas plantas, especialmente las perennes, son colonizadas por bacterias a nivel intercelular e intracelular

Otros trabajos realizados en la propagación *in vitro* del "camu camu" también reportan problemas de contaminación microbiana, pero no indican el tipo de agente causal. En el caso de Gómez y Huaranca (1997), reportan hasta un 66.6 % de contaminación en sus cultivos. Asimismo, Gonzáles (2002) muestra altos porcentajes de contaminación (hasta 55 %) y concluye que la variable contaminación juega un papel importante para la sobrevivencia de los microinjertos del "camu camu". Además, Rivera (2012) registra contaminación que afecta aproximadamente al 15 % de sus explantes de "camu camu".

5.2. Oxidación de los explantes

La oxidación de los explantes de *M. dubia* empleados para la obtención de callos es un problema común al inicio y durante el cultivo. Este daño afectó principalmente a los explantes de hojas y nudos con un 25 a 75 % del explante oxidado, y en menor grado (25 %) a los explantes de pulpa; las áreas oxidadas no lograron formar callos, pero si las que no sufrieron este daño.

Esto puede deberse a la exposición directa de los explantes de hojas y nudos al hipoclorito de sodio (NaOCl), mientras que la pulpa no estuvo expuesta directamente a este compuesto oxidante. También, estas diferencias se pueden atribuir a la mayor capacidad antioxidante de la pulpa, por su alto contenido de vitamina C, en comparación con los otros explantes (Córdova y colaboradores. 2010). También, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) producidas por los explantes pueden ser responsables del daño oxidativo observado. Según Bray y colaboradores (2000) y van Staden y colaboradores(2006), la escisión de explantes, la composición del medio, la proporción de citoquininas/auxinas y otras condiciones estresantes al que se exponen los explantes desencadenan el estrés oxidativo y nitrosativo. Por ejemplo, los iones metálicos del medio M & S como el Fe^{2+} pueden generar el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) mediante la reacción de Fenton y provocar más daño oxidativo. Las especies reactivas mencionadas, especialmente el OH^{\bullet} destruye por oxidación a los lípidos, polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, conduciendo a la muerte de las células del explante (Bray y colaboradores. 2000, Mittler y colaboradores. 2004). Adicionalmente, bajo las condiciones de estrés los explantes expresan varias enzimas oxidasas como las polifenol oxidasas, fenolasas, tirosinasas y peroxidasas que al actuar sobre sus sustratos generan radicales libres que causan el ennegrecimiento y eventualmente la muerte del explante (Pompeu y colaboradores. 2008, Abdelwahd y colaboradores. 2008). Estos hechos sustentan porque las áreas oxidadas de los explantes de las hojas, nudos y pulpa del "camu camu" no generaron callos, a diferencia de las áreas que no han sufrido daño oxidativo, que si han producido callos. En cuanto al cubrimiento de la superficie del explante por la oxidación, la pulpa fue la menor afectada (25 %), sin embargo estos explantes fueron los que menor % de expresión mostraron, esto

posiblemente se deba a diversos factores entre ellos: el uso de fitohormonas fueron autoclavadas, Concentraciones hormonales utilizadas, estado fisiológico de la planta donadora.

Otros estudios en cultivos *in vitro* del "camu camu" también encuentran altos porcentajes de oxidación. Así, Gómez y Huaranca (1997) reportan hasta el 73.3 % de oxidación de cotiledones, en especial los que sufrieron cortes, en el establecimiento *in vitro* de propágulos. Además, Huaranca *et al.* (2000), muestran altos porcentajes de oxidación en microestacas las que no pudieron ser micropropagadas. También, Gonzáles (2002) muestra hasta un 95 % de oxidación de microinjertos sometidos al cultivo *in vitro* en medio M&S completo.

5.3. Inducción de callogénesis

La combinación de la auxina sintética (2,4-D) con una citoquinina (K ó BAP) favorece la callogénesis en los tres tipos de explantes de *M. dubia*, particularmente empleando una proporción alta de auxina/citoquinina (20:1). Lo cual es concordante con Roca y colaboradores. (1991), quienes afirman que usualmente se induce la formación de callos a partir de explantes en medios que contengan una proporción alta de auxina/citoquinina. Además, Montero (2001), mencionan que la presencia de una auxina como el 2,4-D es necesaria para la iniciación de callos.

La inducción de la callogénesis se atribuye a la acción de las fitohormonas empleadas en cultivo *in vitro*. Para que las auxinas induzcan el efecto fisiológico estas deben ser transportadas desde el medio de cultivo hasta las células blanco. Taiz y Zieger (1998), propusieron el modelo quimiosmótico que fundamenta el transporte polar de las auxinas, donde las bombas de H⁺ mantiene un gradiente de protones y pH ácido entre el citoplasma y la pared celular. Para que las auxinas induzcan el crecimiento celular estas deben unirse a receptores externos e internos, los que a la vez inducen la expresión de genes que codifican factores protéicos que incrementan la plasticidad y ablandamiento de la pared celular. Esto tiene como efecto la dilatación de la célula, debido a la presión del agua dentro de su vacuola (presión de

turgencia), de este modo continúa agrandándose hasta que la pared opone resistencia (Azcón-Bieto y Talón 2008). En el caso de las citoquininas, Müller y Sheen (2007), indican que la unión de la citoquinina a receptores tipo histidina quinasas (AHK) activan a las histidina fosfotransferasas (AHP) que transmiten la señal de la AHK a los reguladores nucleares de respuesta (ARRS), que pueden activar o reprimir la transcripción de genes que median las acciones fisiológicas de las citoquininas.

Investigaciones realizadas en el "camu camu" también manifiestan la inducción de callogénesis en diferentes explantes. Pinedo y colaboradores (2008), indican que obtienen callos a partir de explantes de hojas y nudos tratando solamente con la auxina 2,4-D a 8 y 10 mg/l, es decir de dos a cinco veces mayor concentración que el empleado en este trabajo. Pero, observan callos a los 45 días de cultivo, mientras que en nuestra investigación obtenemos callos incluso a partir de la segunda semana (nudos). Estas diferencias, pueden deberse a que nosotros empleamos una combinación de auxinas y citoquininas, esta última hormona estimula la división celular (Azcón-Bieto y Talón 2008). Además, cabe indicar que las fitohormonas empleadas no fueron autoclavadas con el medio, estas fueron esterilizadas por filtración (para cultivo de explantes de hojas y nudos). Pero, para el cultivo de los explantes de pulpa, las fitohormonas fueron autoclavadas con el medio, lo cual podría explicar el letargo en la respuesta callogénica (Figura 10). Experimentos iniciales realizados en el laboratorio nos muestran que al autoclavar las fitohormonas con el medio se obtuvo respuesta callogénica en explantes de hojas y nudos a partir de la octava semana de cultivo. Aparentemente cuando las fitohormonas son autoclavadas con el medio M&S, el cual tiene varios componentes orgánicos e inorgánicos, pueden perder su actividad fisiológica por reacciones químicas que sufren cuando son sometidas a elevadas temperaturas y presión, aunque varios autores indican que las fitohormonas empleadas no son termolábiles (2,4-D y BAP), a excepción de la kinetina que es ligeramente termolábil (Gamborg 1995). Otra explicación probable en la respuesta precoz que observamos con los nudos (5 días), es por el estado de la vara yemera donadora de donde se extrajeron los explantes. La vara yemera floreció en el laboratorio, y eso posiblemente incrementó su potencial de respuesta callogénica. De acuerdo a Alleweldt y

colaboradores (1962), el potencial organogénico de un explante es inversamente proporcional a su edad fisiológica. Además, Murashige (1974) indica el estado de la planta madre y la estación durante la cual es extraído también puede afectar notablemente el potencial organogénico. Asimismo Levitusy colaboradores (2010) mencionan un factor que suele tener mucha importancia en la micropropagación y que generalmente está asociado al grado de dormición que presentan ciertos explantes (yemas, por ejemplo) y también con la posibilidad de mayor o menor proliferación de microorganismos

Otros estudios con diferentes especies de plantas lograron inducir callos a partir de explantes con diversos tratamientos fitohormonales. Así, Montero (2001), obtiene callos entre 20 y 22 días de cultivo, a partir de explantes de hojas de *Echinea purpurea* tratados con 0,5 mg/l de 2,4-D. También, Pérez y colaboradores y colaboradores (2009), generan callos en explantes de arroz tratando con 2,5 mg/l de 2,4-D y 500 mg/l de L-prolina y L-glutamina en el medio de cultivo. En el caso Gómez y colaboradores (2006), obtienen callos embriogénicos a los 14 días de cultivo, en explantos de semillas maduras de *Eucalyptus globulus* tratados con 2 mg/l de 2,4-D y 1,0 mg/l de K. También, como en nuestra investigación, Alayón (2006), obtiene callos de pulpa de manzana a los 21 días de cultivo tratando los explantes con 1 mg/l de 2,4 D y 0,1 mg/l de BAP. Asimismo, indica que la obtención de callos fue de un 20 a 30 % mayor en explantes de frutos verdes que en explantes de frutos maduros.

El estudio realizado tuvo varias limitaciones. Faltó evaluar otros explantes como raíces, ápices caulinares, flores, cáscara de frutos, etc. No se evaluó explantes obtenidos en diferentes épocas del año o estados fisiológicos de la planta donadora (florescencia, fructificación). Además, no se determinó el efecto de otras concentraciones de las fitohormonas evaluadas o de distintas auxinas y citoquininas para evaluar la respuesta callogénica de los explantes. Finalmente, faltó el empleo de técnicas moleculares para la detección de probables patógenos intracelulares.

Los resultados de la investigación realizada sirven de base para realizar futuros estudios biotecnológicos del "camu camu". A partir de los callos obtenidos se podría inducir, bajo ciertos tratamientos fitohormonales, la embriogénesis, caulogénesis y rizogénesis. Asimismo, será factible realizar cultivos celulares para la obtención de diversas sustancias de interés farmacológico. También permitirá la implementación de técnicas de mejoramiento genético con el empleo de la tecnología del ADN recombinante, estudios fisiológicos, metabólicos y genéticos, entre otros.

VI. CONCLUSIONES

- La contaminación de los explantes hojas, nudos y pulpa no mostró diferencias significativas ($P > 0.005$), siendo menor de 31%, causado principalmente por hongos.
- La oxidación se evidenció en los tres tipos de explantes (hojas, nudos y pulpa) pero en diferentes grados, sin embargo esta elevada oxidación no interfirió en la formación de callos en la mayoría de explantes, excepto en el T6 de nudos que no formo callos.
- La oxidación afecto principalmente a los explante de nudos, variando desde 25 % hasta 75 % del explante oxidado.
- La mayoría de los tratamientos fitohormonales indujeron respuesta callogénica en las hojas (4^{ta} semana), nudos (1^{ra} a 5^{ta} semana) y pulpa (6^{ta} semana). El tratamiento con 2 mg/l de 2,4-D y 0,1 mg/l de BAP propició mayor callogénesis en los tres tipos de explantes.
- Se logró determinar que los explantes de hojas y nudos fueron más apropiados para generar callos friables en comparación con la pulpa.
- Se estandarizó un protocolo para inducir callogénesis en explantes de hojas de *M. dubia*, que consiste en: utilizar hojas jóvenes de brotes, medio de cultivo MS con la adición de las fitohormonas 2 mg/l de 2,4-D y 0,1 mg/l de BAP.

VII. RECOMENDACIONES

- Establecer protocolos de desinfección eficientes que no causen daño oxidativo de los explantes.
- Incluir antifúngicos y antibacterianos en los medios de cultivo, que no afecten la viabilidad de los explantes y permitan obtener cultivos libres de contaminantes ambientales y fitopatógenos.
- Evaluar la respuesta callogénica de otros explantes y varios tratamientos fitohormonales. Asimismo, inducir callos a partir de explantes obtenidos en diferentes épocas del año o estados fisiológicos del "camu camu".
- Establecer protocolos para inducir, a partir de los callos, la embriogénesis, caulogénesis y rizogénesis. Como también, para realizar cultivos celulares con fines de producción de sustancias de interés farmacológico como vitamina C y antocianinas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELWAHD R., HAKAM N., LABHILILI M., UDUPA S. 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of lea eached phenolics in vitro plantlet regeneration of fababeaan. *African Journal of Biotechnology* 7: 997-1002
- ALAYÓN, P.; TARRAGÓ, J.; MROGINSKI, L.; PAGANO, E.; SOZZI, G. 2006. Obtención de callos por cultivo in vitro de pulpa de manzana cv 'Anna': Detección de actividad de Alfa-L-arabinofuranosidasa. Universidad nacional del Comunicaciones Científicas y Tecnológicas
- ALLEWELDT, G. Y RADLER F.1962. Interrelationship between photoperiodic behavior of grapes and growth of plants tissue cultura. *Plants Physiol* 37:376-379.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (APG III). 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Grups classification for the orders and families of flowering plants.The Linnean Society of London , *Botanical Journal of the Linnean Society*,141: 399-439.
- ANDRADE J. 1993 el uso de atmosfera modificada y refrigeracion para mantener la calidad postcosecha de "Camu camu" (M. dubia (H.B.K) Mc Vaugh), 50p (Tesis)
- AZCON-BRIETO y TALON M. (eds).2008. *Fisiologia Y Bioquiminca Vegetal*. Madrid , McGraw-Hill/Interamericana.
- AZEVEDO-MELEIRO.; RODRIGUEZ-AMAYA. 2004. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS.*J.Food Comp.Anal.*;v.17,pp.385-396.
- BRAY, E.; BAI LEY-SE RRES, J.; WERETILNYK, E. 2000. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B; Gruissem, W; Jones, R. eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Ma Ryland, USA. p. 1158-1203.

- CASSELLS, AC. 2012. Pathogen and biological contamination management in plant tissue culture: phytopathogens, vitro pathogens, and vitro pests. Department of Zoology, Ecology and Plant Science, University of Cork, Cork, Ireland, a.cassells@ucc.ie. PMID:22610620 [PubMed - in process]
- CASTRO, J.; COBOS, M.; RAMIREZ, R.; EGOABIL, A.; TORRES, J.; GUTIERRES, F.; ROJAS, R.; SIGUAS, M.; CORDOVA, A.M.; IMAN, SA.; ADRIANSEN, PM.; MARAPARA, JL. 2011. Expresión de genes que codifican las enzimas de la vía biosintéticas mirnoff-Wheeler y su relación con la concentración de vitamina C en frutos de *M. dubia* (H.B.K) MC Vaugh camu-camu IQUITOS-PERU.
- CAPO, M. 2002. Principios de la Ecotoxicología .McGraw Hill. Madrid, España.314pp
- CÓRDOVA, AM. ; RAMÍREZ, R.; ADRIANZEN, P.; COBOS, M.; CASTRO, JC. 2010 Contenido de Ácido Ascórbico Total en hojas y en diferentes estados de maduración de frutos de *M. dubia* (H.B.K) Mc Vaugh "camu-camu". Loreto – Perú". Libro de resúmenes de investigaciones IX Asamblea General UNAMAZ. P-18.
- DAQUINTA, M.; RAMOS, L.; CAPOTE, I.; LEZCANO, Y.; RODRIGUEZ, R.; ESCALONA, M. 2002.Inducción De la callogénesis Y Regeneración De Plantas En *Tectona Grandis*L. Biotecnología vegetal vol.r 2: 15-19, enero-marzo.
- DODDS, J. y ROBERTS, L.1987.Experiments in plants tissue culture. Second Edition .New York.P-54
- GAMBORG OL, PHILLIPS G.C. (1995) Plant cell tissue organculture. Fundamental methods. Springer Verlag.
- GÓMEZ, M. y HUARANCA R. (1997).Establecimiento In Vitro De Propagulos De camu-camu *M. dubia* (H.B.K) Mc.Vaugh. TESIS, Universidad Nacional De La Amazonia Peruana-Ciencias Biológicas, Iquitos- Peru.

- GÓMEZ, C., URIBE, M., RÍOS, D., SÁNCHEZ-OLATE, M. 2006. Inducción De Callo Embriogénico En *Eucalyptus globulus* Labill. INCI vol.31 no.10 Caracas Oct.
- GONZALES, V.ME. 2003. Estudio del proceso de calogénesis en genotipos promisorios de cafeto (*Coffeacaneophora* P.). Revista colombiana de Biotecnología Vol. V. N° 1 JULIO 2003 16-22.
- GONZALES, R.; 2002. Microinjertación de camu camu *M. dubia* (HBK) Mc. Vaugh en dos patrones y cuatro medios de cultivo Loreto-Peru. Tesis para optar el título de Biólogo.
- GUTIERREZ, A. e INGUIL, E. 2003. Propagación clonar *in vitro* de plántulas de "camu camu" *M. dubia* (HBK) Mc. Vaugh. Universidad Nacional Agraria La Molina. Departamento de Biología. P.O. Box 456 La Molina, Lima. Perú.
- HUARANCA R., DIAZ F., LAY T. (2000) Micropropagación "*in vitro*" de algunas especies vegetales de interés para la Amazonia Peruana. Rev. Conoc [2000]6(1) ,63-76.
- IMAN C. S. 2000b. Caracterización y evaluación morfoagronómica del germoplasma de "camu- camu" *M. dubia* Mc Vaugh.
- IMAN, CS. y MELCHOR, AM. 2007. Tecnología para la producción del camu camu *M. dubia* (Kunth) McVaugh en la región Loreto Serie manual
- JIMÉNEZ, JP.; CHAPARRO, A.; BLANCO, J. 2009. Evaluación de diferentes combinaciones fitohormonales en la regeneración de *Solanum tuberosum* (Solanácea) Var. Pastusa Suprema a partir de explantes internodales. 66 Rev. Colombo. Biotecnol. Vol. XI No. 2 Diciembre 2009 66-74
- LEVITUS, G.; ECHENIQUE, V.; RUBINSTEIN, C.; HOPP, E.; MROGINSKI, L. 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II; Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; Argentina
- LAPEZ, A.; 2003. Dinámica poblacional y caracterización biofísica de camu-camu árbol (*Myrciaria* spp.) en Ucayali. IIAP_PET.

- LOPEZ, R.; MURCIA, C.; LOPEZ, P.; VALENCIA, J. 2010. Estandarización Del Protocolo De Desinfección De Disco De Hoja En La Inducción De Callogénesis De *Cordia Alliodora* (Ruiz & Pav.) Okén (Lamiales: Boraginaceae) Encondiciones In Vitro. *Rev. Invest. Univ. Quindío* (20): 120 - 125. Armenia – Colombia.
- MARTINEZ, M., HERNANDEZ, C.; RESTREPO, L. 2007. Estandarización de un Protocolo Para La Obtención Callos Friables De Borjo (*Borojo apatinoi* Cuarto.). Fase I. *Ver. Colomb. Biotecnología*. Vol. IX N°. 2 Diciembre 2007 /45-55.
- MITTLER, R; VANDERAUWERA, S; GOLLERY, M; BREUSEGEM, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490-498.
- MONTERO, W. 2001. Estudio morfológico e histológico de *Equinacea purpurea* in vitro (*Equinacea* sp). Vicerrectoría de Investigación y extensión. ITCR. Cartago, Costa Rica. 60 p.
- MORALES, E. 2008 Cultivos Celulares de *Jacaratia mexicana* en tres tipos de bioreactores para la producción de enzimas proteolíticas. Tesis para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Bioprocesos. Instituto Politecnico Nacional. Mexico DF-Abril 2008
- MUHAMMAD, Z., RIAZ-UR R. Y MUHAMMAD C. 2007. Hormonal Regulation for Callogenesis and Organogenesis of *Artemisia absinthium* L. *African Journal of Biotechnology* Vol. 6 (16), pp. 1874-1878, 20 August 2007. Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB> .ISSN 1684-5315 © 2007 Academic Journals.
- MÜLLER, B. AND SHEEN, J. 2007. Advances in Cytokinin Signaling. *Science* 318:68-69
- MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135 -166.
- PAZ, M.; VÁZQUEZ, F.; CHUQUI, C.; PAREDES, C.; SAUVAIN, M.; GIMÉNEZ A. 2006. Establecimiento de Cultivos In Vitro de *Galipea longiflora*, una Rutaceae de la Amazonia Boliviana. *Latin American Journal of Pharmacy* (formerly *Acta Farmacéutica Bonaerense*) *Lat. Am. J. Pharm.* 26 (1): 15-9 (2007) La Paz, Bolivia.

- PÉREZ, M., HERNÁNDEZ, C., TERESA, M., DELGADO, M., ARMAS. 2009. Expresión transitoria GUS en callos de arroz (var. J-104) mediante la optimización de las condiciones de cultivo in vitro ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XI No. 2 Diciembre 2009 75-84.
- PETERS, CH y VÁSQUEZ, A. 1986. Estudios Ecológicos de camu-camu *M. dubia*. I. Producción de Frutos en Poblaciones Naturales. En: Acta Amazónica-17 (Número único). Brasil. pp. 161-174
- PICON, B.C. y ACOSTA, V.A.; 2000. Cultivo de camu-camu (*M. dubia* H.B.K. Mc Vaugh) en la Selva Baja del Perú. Manual Técnico. Programa Nacional de Camu camu. Ministerio de Agricultura, Región Agraria Loreto. 73 p.
- PINEDO, P.M.; INGA, S.H.; PINEDO, F.S. & LINARES, B.C. 2002. Variación del contenido de vitamina "c" de camu-camu silvestre en Loreto-Perú. Programa de Ecosistemas Terrestres (PET). Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP) - Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). Artículo Científico. 6 pp.
- PINEDO, F.M.; LINARES, C.; MENDOZA, H.; ANGUIZ, R. 2004. Plan de Mejoramiento Genético del camu camu. IIAP. 52 pág. Iquitos _ Perú.
- PINEDO, M., RAMOS, J., MENDIETA, O., AVALOS, M., PAREDES, E., RODRÍGUEZ, E., RIVERAR. 2008. PROYECTO 1.Desarrollo Tecnológico Y Uso Sostenible De Productos De Bioexportacion (Bioexport) MEMORIAS –IIAP Iquitos - Perú pag. 42-43
- POSSO M., HUAMANI K.; CONDOR R. 2007. Inducción de callos in vitro en explantes de papa (*Solanum tuberosum*) y camote (*Pomoea batata*).LIBRO DE RESUMENES. ECI. V encuentro científico internacional de invierno.
- POMPEU, G, GRATÃO, P; VITORELLO, V; AZEVEDO, R. 2008. Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. Scientia Agricola 65: 548-552.

- RIVERA, R. 2012. COLECCION Y ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE MICROESTACAS DE *M. dubia* "camu camu" (HBK) Mc Vaugh. Tesis para optar el título profesional de Biólogo. UNAP. Iquitos – PERU.
- ELSA RENGIFO (2009). Monografía del cultivo Camu camu *M. dubia* (H.B. K) Mc Vaugh 15 de diciembre del
- RUIZ S.; RENDÓN C.A; HOYOS R., MEDINA M. RESTREPO LF. 2006. Estudios preliminares en La estandarización de un protocolo para La obtención de callos embriogénicos en dos clones de caucho (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) de diferentes orígenes geográficos. Revista colombiana de Biotecnología Vol. VII. N° 1 JULIO 2006. 32-47.
- RODRIGUEZ, R.B.; DE MENEZES, H.C.; CABRAL, L.M.C.; DORNIER, M. & REYNES, M.; 2001. An amazonian fruit with high potencial as a source of vitamin c: the camu camu (*M. dubia*). fruits, 56 (5): pág.345 – 354
- ROCA, W; MROGINSKI, L. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 143 – 160 p.
- SIGUAS J.; CARO J.; RAMÍREZ R.; COBOS M.; CASTRO JC. 2010 Determinación de vitamina C en frutos de la Amazonia peruana. Revista Científica UNAMAZ. Loreto-Perú
- SILVA, J.F.; COUTURIER, G.; MOTA, M.G.C.; PEREIRA JUNIOR, A.P. 1998. Caracterização e avaliação de germoplasma de camu camu zeiro *M. dubia* (H.B.K) McVeigh. Pesquisa em Andamio Centro de Pesquisa Agroforestal da Amazonia Oriental, n.190, p.1-4.
- TAIZ, L. AND ZIEGER, E., (1998), "Plant Physiology". 2nd ed., Sinauer Associates, Inc., Publishers].

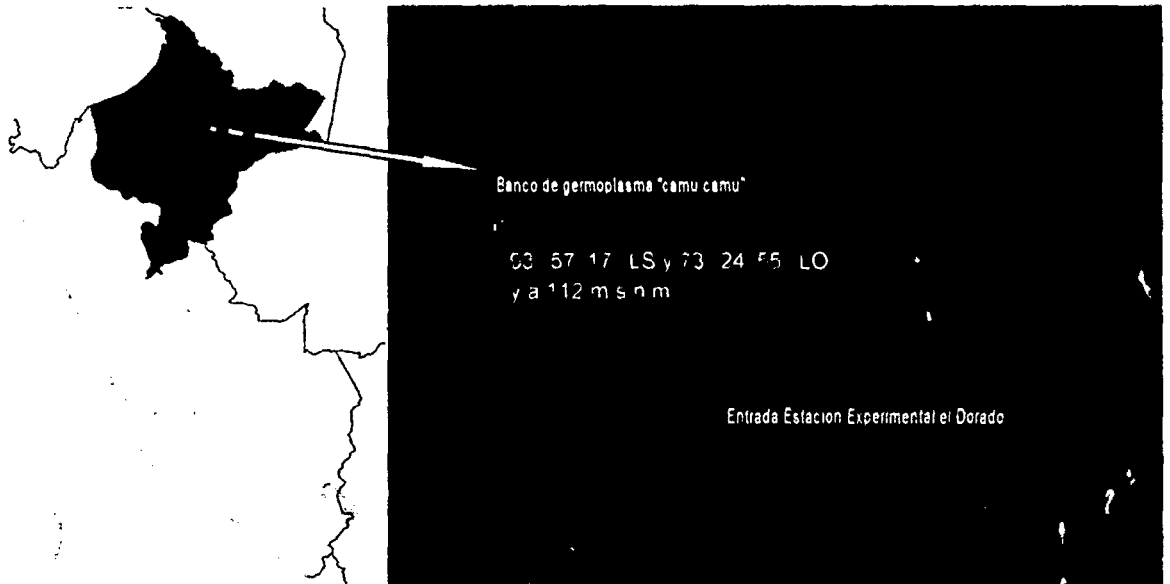
VASQUEZ, M. A.; 2000. El camu camu. Cultivo. Manejo e Investigaciones. Iquitos (Perú): Editora Grafica e Imprenta Universal S.R.L 218pp

VAN STADEN, C.W.; FENNELL, N.J.; TAYLOR. (2006) Plant Stress in Vitro: The Role of Phytohormones. *Ishts Acta Horticulturae 725: V International Symposium On In Vitro Culture and Horticultural Breeding*. After Login You Can Download the Full-Text Version of the Following Article

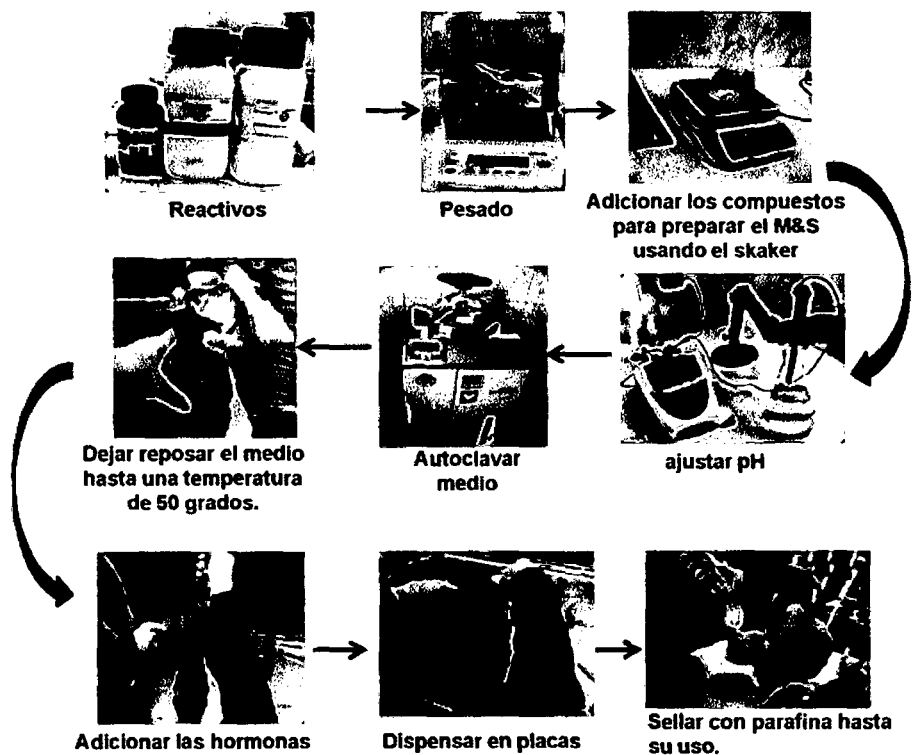
VERDE, W. 2005. Identificación y caracterización y aislamiento in vitro de hongos fitopatogenos del camu camu *M. dubia* (H.B.K) Mc Avugo en Pucallpa, Perú. Publicado 15 de abril 2009. *Monografias .com*

IX. ANEXOS

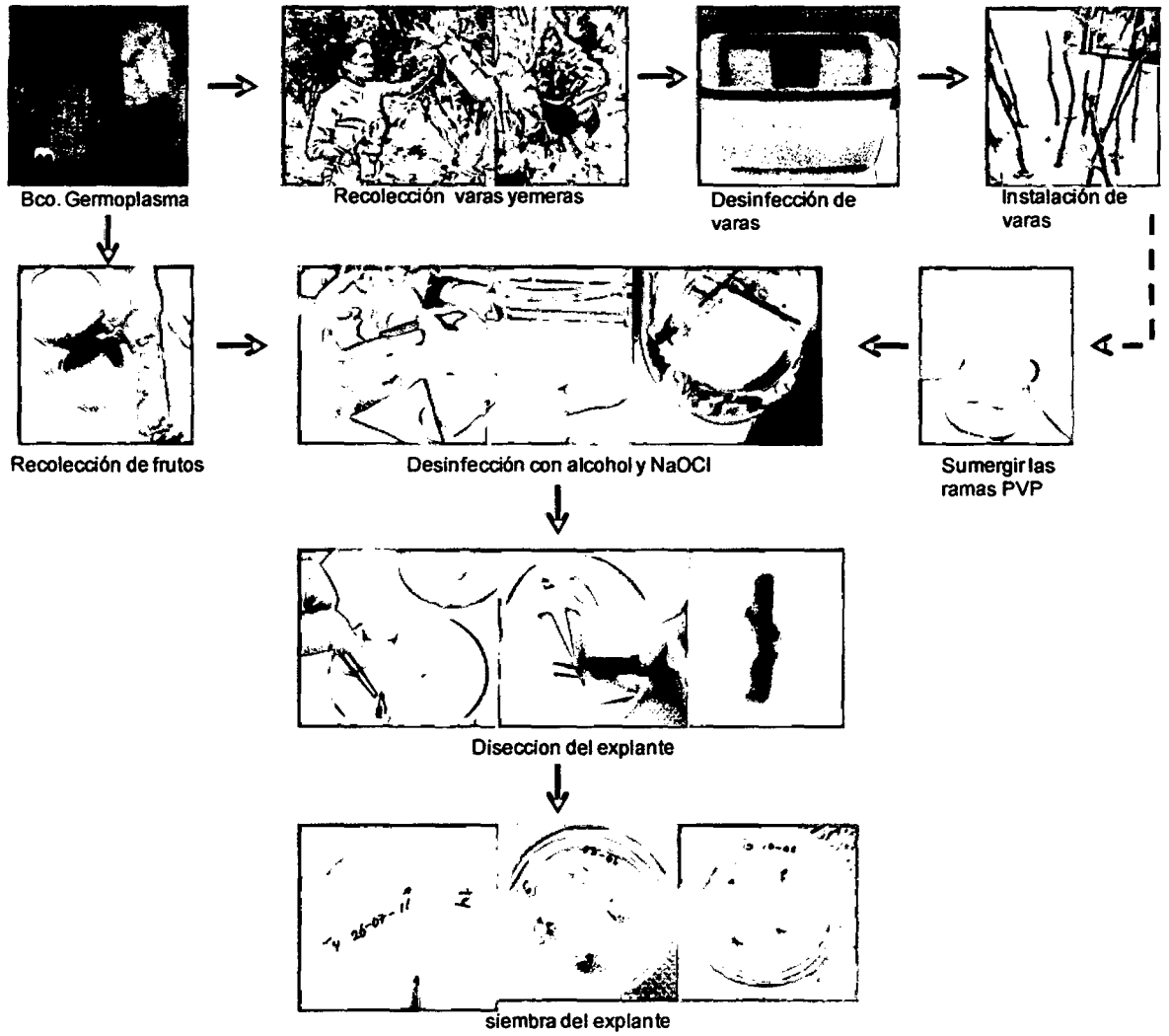
Anexo 1. Ubicación de la zona de muestreo



Anexo 2. Flujograma de preparación de medio M&S

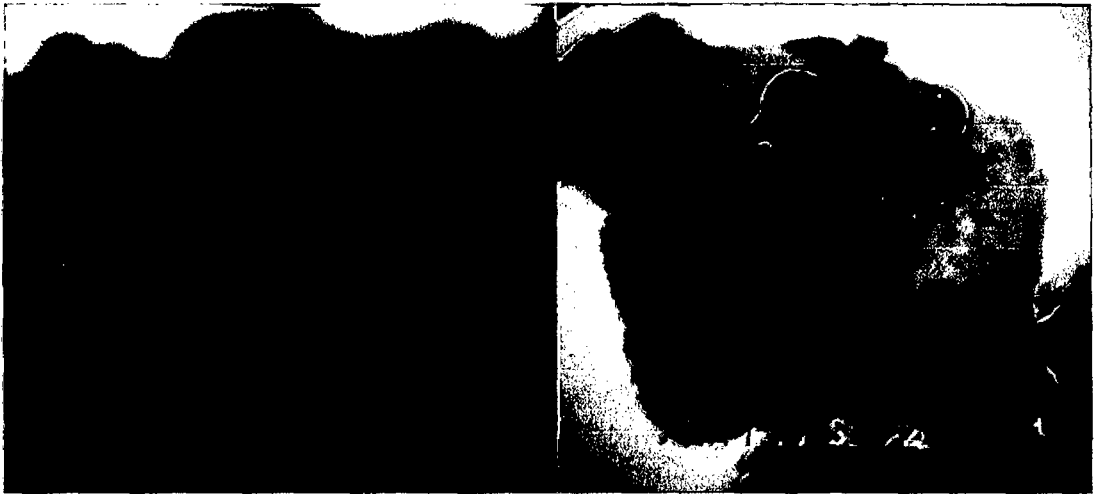


Anexo 3: Flujograma para la obtención de callos



Anexo 5. Figuras de la expresión callogénica según tratamiento fitohormonal

Tratamiento T2 hojas y nudos respectivamente



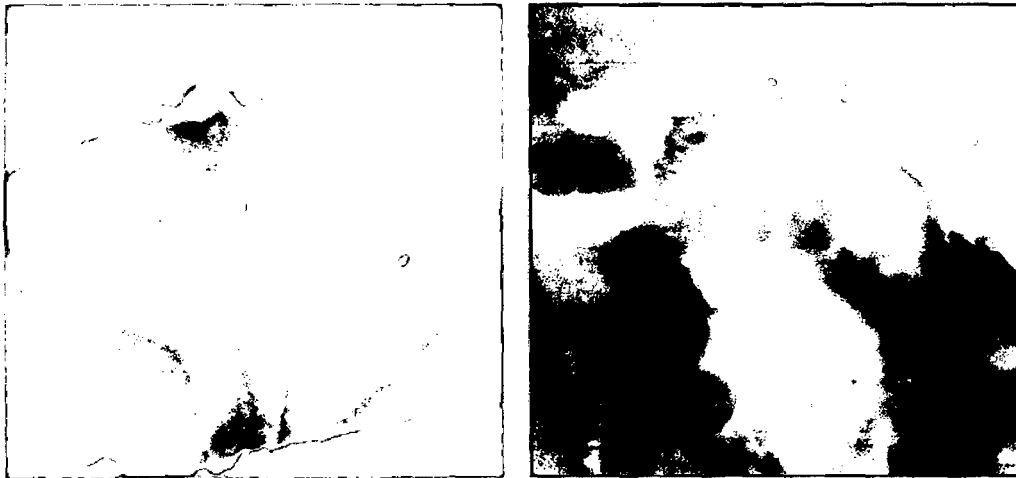
Tratamiento T3 hojas y nudos respectivamente



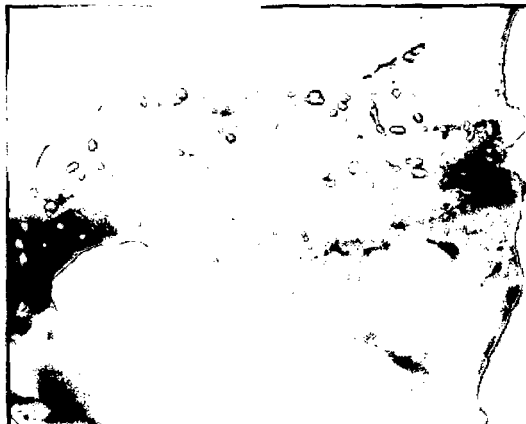
Tratamiento T4 hojas y nudos respectivamente



Tratamiento T5 hojas y nudos respectivamente



Tratamiento T6 hojas



Anexo 6. Stock de las Sales del medio de cultivo M&S, mostradas como sol. A, B, C y D

Componentes	Medio básico M&S (g/l)	
Sol A Stock (25 X)		40 ml / l
NH ₄ NO ₃	41, 25	
KNO ₃	47,5	
KH ₂ PO ₄	4	
CaCl ₂ 2H ₂ O	11	
MgSO ₄ 7H ₂ O	9,25	
Sol B Stock (100X)		10ml / l
KI	0,083	
H ₃ BO ₃	0,62	
MnSO ₄ .4H ₂ O	1.69	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,86	
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,025	
CuSO ₄ .4H ₂ O	0,0025	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0025	
Sol C (100 x)		10ml / l
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,78	
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	3,73	
sol D stock(100 x)		10 ml/l
Tiamina	0,04	
Piridoxina	0.05	
Acido nicotínico	0,05	
Mioinositol	0,1	
Sacarosa	30	
PH	5.7	