

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Escuela de Formación Profesional
de Ciencias Biológicas

**“COLECCIÓN Y ESTABLECIMIENTO *in vitro* DE
MICROESTACAS DE *Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh
camu camu”**

TESIS

Requisito para optar el título profesional de:

BIÓLOGO

Autor:

Richard Rivera Vásquez

IQUITOS – PERÚ

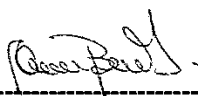
2012

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR:



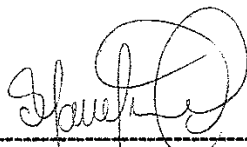
Blga. Felicia Díaz Jarama, M.Sc.

PRESIDENTE



Blga. Adriana del Pilar Burga Cabrera, M.Sc.

MIEMBRO



Blgo. Richard Javier Huaranca Acostupa, M.Sc.

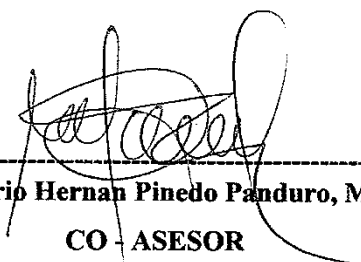
MIEMBRO

ASESOR Y CO-ASESORES



Blgo. Jorge Luis Marapara del Águila, Dr.

ASESOR



Ing. Mario Hernan Pinedo Panduro, M.Sc.

CO - ASESOR



Ing. Sergio Fernando Pinedo Freyre, M.Sc.

CO - ASESOR



UNAP

Dirección de Escuela
Profesional de
Biología - FCB

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Iquitos, 05 de julio de 2012

En la ciudad de Iquitos, a los cinco días del mes de julio del 2012 y siendo las 11:00 horas se reunieron en el auditorio de SECEDO, el Jurado Calificador y Dictaminador de Tesis que suscribe, designado con R.D. N° 032-2006-DEFP-B-FCB-UNAP, presidido e integrado por: Blga. **FELICIA DÍAZ JARAMA, M.Sc.**, Presidente; Blgo. **RICHARD JAVIER HUARANCA ACOSTUPA, M.Sc.**, Miembro; Blga. **ADRIANA DEL PILAR BURGA CABRERA, M.Sc.**, Miembro. El mencionado Jurado se constituyó en el auditorio para escuchar, examinar y calificar la sustentación y defensa de la tesis titulada: "**COLECCIÓN Y ESTABLECIMIENTO *in Vitro* DE MICROESTACAS DE *Myrciaria dubia* "camu camu" (HBK) Mc. Vaugh**", presentado por el bachiller de la Facultad de Ciencias Biológicas - Escuela de Biología **RICHARD RIVERA VÁSQUEZ** de la Promoción II-2004, graduado de Bachiller con R.R. N° 1644-2010-UNAP de fecha 14 de julio del 2010, figurando como asesor el **Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL ÁGUILA, Dr.**

Luego de realizada la sustentación de la Tesis, el bachiller fue sometido 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. Caso de aprobar, el candidato quedo apto para ejercer la profesión de Biólogo, previo el 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 12:23 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

Adriana del Pilar Burga Cabrera
MIEMBRO

DEDICATORIA

A Dios, por darme la confianza necesaria en los momentos difíciles y por permitirme ser parte del milagro de su creación.

Con amor a mis padres, la Sra. *María Vásquez Yaicate* y al Sr. *Wilson Rivera Sías*, por el apoyo incondicional a lo largo de mi carrera, por su comprensión, paciencia, confianza y fortaleza; por el abnegado sacrificio en lograr lo que ahora se cumple.

AGRADECIMIENTO

Al **Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP)** por permitirme realizar y facilitar el presente trabajo de investigación, a través del Fondo de Innovación y Competitividad para el Agro Peruano (**INCAGRO**), por el financiamiento del Proyecto “Mejoramiento genético del Camu camu *Myrciaria dubia* arbustivo”.

Al **Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA)** a través del Programa Nacional de Investigación en Biotecnología, específicamente al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, en la utilización de los equipos y materiales.

Al Dr. **Jorge Luis Marapara Del Águila**, por su asesoramiento en las formulaciones de los experimentos y la corrección del presente trabajo.

Al Ing. **Mario Hernán Pinedo Pандero** M.Sc., por proporcionarla idea de este trabajo, la dirección del mismo y su apoyo en el conocimiento de la especie, sin los cuales no habría sido posible la obtención de resultados satisfactorios, y desde luego por su amistad eterna.

Al Ing. **Sergio Fernando Pinedo Freyre** M.Sc., por su co-asesoramiento en todo momento, su conocimiento científico, por contestar muchas dudas acerca del cultivo *in vitro* y en el replanteamiento de los experimentos. Le agradezco sinceramente su confianza.

Al Blgo. **Cesar Augusto Delgado Vásquez** M.Sc., por la gentileza en la revisión de los manuscritos del proyecto de tesis y por su apoyo en la incorporación como tesista del mencionado proyecto que dignamente dirige.

Al Ing. **Sixto Alfredo Imán Correa** M.Sc., por su asesoramiento de campo y base científica sobre la especie fueron valiosos para fortalecer mis conocimientos.

De igual modo agradezco a la Técnica **Eloiza Celis Morey**, por toda la buena disposición en el apoyo técnico. A mis compañeros de tesis **Erika María Rodríguez Sanjurjo**, **Ivonne Vásquez Briones** y **Mario Ávalos Tello**, por su apoyo y compañerismo en el trabajo de laboratorio y campo.

Además el presente trabajo no se habría podido desarrollar sin la colaboración de muchas familiares y amigos, que me han brindado su apoyo, orientación y sus conocimientos e hicieron posible el inicio y culminación de este trabajo. Quiero hacer extensivo mi más sincero agradecimiento a todos ellos en cuanto han hecho por mí, para que este trabajo saliera delante de la mejor manera posible.

CONTENIDO

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR	ii
ASESOR Y CO-ASESORES	iii
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
CONTENIDO	vii
LISTA DE CUADROS	iix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE FOTOS	xi
ABREVIATURAS	xii
GLOSARIO	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1. Aspectos generales del cultivo	4
2.2. Propagación vegetativa	10
2.3. Micropropagación <i>in vitro</i>	11
2.4. Medios de cultivo	12
2.5. Reguladores de crecimiento	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Localización del estudio	15
3.2. Tiempo de duración	15
3.3. Material vegetal	15
3.4. Medios de cultivo utilizados	18

3.5. Cultivo <i>in vitro</i> de segmentos nodales -----	18
3.6. Factores en estudio por experimento -----	23
IV. RESULTADOS -----	24
4.1. Desinfección de segmentos nodales -----	24
4.2. Control de la oxidación en segmentos nodales -----	26
4.3. Crecimiento y desarrollo de segmentos nodales -----	28
V. DISCUSIÓN -----	34
5.1. Contaminación -----	34
5.2. Oxidación -----	35
5.3. Crecimiento y desarrollo de segmentos nodales en medios de cultivo -----	35
VI. CONCLUSIONES -----	37
VII. RECOMENDACIONES -----	38
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	39
IX. ANEXOS -----	46
Anexo 1 -----	47
Anexo 2 -----	48
Anexo 3 -----	49
Anexo 4 -----	50
Anexo 5 -----	57

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro N° 1. Experimento N° 01. Prueba de Homogeneidad de Varianzas.	25
Cuadro N° 2. Experimento N° 01. Análisis de Varianza de la variable Desinfección, Prueba de Significancia para los tratamientos.	25
Cuadro N° 3. Experimento N° 01. Prueba de significancia de Tukey y Duncan	25
Cuadro N° 4. Experimento N° 02. Prueba de Homogeneidad de Varianzas	26
Cuadro N° 5. Experimento N° 02. Análisis de Varianza, Prueba de Significancia para los tratamientos	27
Cuadro N° 6. Experimento N° 02. Prueba de significancia de Tukey y Duncan de la variable Control de la Oxidación.	27
Cuadro N° 7. Análisis de Varianza de los factores Medio de cultivo y Accesiones promisorias en relación a la variable Establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales.	29
Cuadro N° 8. Experimento N° 03. Análisis de Varianza de los factores Medio de Cultivo y Accesiones Promisorias con respecto a las variables N° de Brotes, N° de Hojas, N° de Nudos y Longitud del brote.	31
Cuadro N° 9. Experimento N° 03. Prueba T (Tukey) para el análisis estadístico de medios de cultivo.	31
Cuadro N° 10. Experimento N° 03. Prueba T (Tukey) para el análisis estadístico de accesiones promisorias.	32
Cuadro N° 11. Experimento N° 03. Promedios totales del crecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales.	32

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura N° 1. Porcentaje de contaminación de segmentos nodales de <i>Myrciaria dubia</i> cultivados in vitro	24
Figura N° 2. Porcentaje de sobrevivencia de los segmentos nodales con los niveles de carbón activado	28
Figura N° 3. Porcentaje de establecimiento de las dos accesiones MD=014 y MD-015 inoculados en los medios de cultivo Murashige&Skoog (MS) y Woody Plant Media (WPM). 30	30
Figura N° 4. Crecimiento in vitro de los segmentos nodales de las dos accesiones MD=014 y MD-015 inoculados en los medios de cultivo Murashige & Skoog (MS) y Woody Plant Media (WPM).	33

LISTA DE FOTOS

		Pág.
Foto N° 1.	Campo Experimental “El Dorado” - INIA, Colección Nacional de Camu camu.	57
Foto N° 2.	Accesión Promisoria MD - 014, C.E. “El Dorado” - INIA.	57
Foto N° 3.	Selección y colecta de varas yemeras Accesión MD - 014	58
Foto N° 4.	Transporte de muestras al laboratorio.	58
Foto N° 5	Brotes jóvenes de 25 días después de la instalación del experimento	59
Foto N° 6.	Estacas con brotes jóvenes a los 35 días después de la instalación del experimento.	58
Foto N° 7.	Brote segmentado.	60
Foto N° 8.	Desinfección de los brotes con NaOCl en cámara de flujo laminar.	60
Foto N° 9.	Enjuague de los brotes con agua destilada estéril.	60
Foto N° 10.	Eliminación de hojas y obtención de los segmentos nodales.	61
Foto N° 11.	Inoculación de los segmentos nodales en medio de cultivo basal.	61
Foto N° 12.	Evaluación en crecimiento de los segmentos a los 60 días después de la inoculación al medio basal.	62
Foto N° 13.	Crecimiento de segmentos nodales en medio de cultivo, apreciación de hojas y nudos.	62
Foto N° 14.	Vista de la elongación <i>in vitro</i> que alcanzan los segmentos nodales en el medio de cultivo basal.	63
Foto N° 15.	Problemas de contaminación de los explantes en el medio de cultivo basal.	63

ABREVIATURAS

AIA	:	Ácido 3 - Índol Acético
CA	:	Carbón Activado
DCA	:	Diseño Completamente Aleatorizado
GA ₃	:	Ácido Giberélico
H.B.K.	:	Humboldt, Bomplant & Kunt.
MD	:	<i>Myrciaria dubia</i>
M&S	:	Murashige & Skoog
NaOCl	:	Hipoclorito de Sodio (Lejía)
pH	:	Potencial Hidrógeno
PVP	:	Polyvinilpirrolidona
Solución Stock A	:	Macronutrientes
Solución Stock B	:	Micronutrientes
Solución Stock C	:	Macronutrientes (Calcio)
Solución Stock D	:	EDTA - Hierro
Solución Stock E	:	Vitaminas
WPM	:	Woody Plant Medium

GLOSARIO

Accesión	:	Plantación selecta traídas de las localidades de importancia en la cuenca amazónica y establecidas en una determinada área para realizar evaluaciones periódicas en su desarrollo.
Agar	:	Polisacárido polímero de la galactosa que se extrae de <i>Rodophyta</i> , es utilizado en bacteriología para solidificar medios de cultivo y en la alimentación por su propiedad de gelificar, además no se disuelve por el efecto de las sales, ni se consume por la acción de la mayoría de los microorganismos.
Auxina	:	Hormona natural o sintética que actúa en el crecimiento causando principalmente la elongación celular.
Brote vegetativo	:	Emisiones nuevas jóvenes en cualquier parte de la planta.
Endogamia	:	Cruzamiento entre individuos de una raza, comunidad o población aislada genéticamente.
Explante	:	Cualquier parte segmentada de la planta madre.
Fenotipo	:	Manifestación visible del genotipo de la planta en un determinado ambiente (porte de la planta, tamaño de frutos, producción, etc.)
Fructificación	:	Acción y efecto de fructificar. Aparición de los primeros frutos en la planta.
Genotipo	:	Conjunto de los genes de un individuo que son heredados de la planta madre, incluida su composición alélica.
Inoculación	:	Siembra de explantes en medios de cultivo basales.
In vitro	:	Producido en el laboratorio por métodos experimentales.

Oxidación	:	Reacción química a partir de la cual un átomo, ión o molécula, metal o no metal cede electrones; entonces se dice que aumenta su estado de oxidación.
Perenne	:	Planta que continua creciendo luego de haberse reproducido, significando generalmente que vive por varios años.
Polaridad	:	Posición de la planta de acuerdo a la ubicación de los nudos.
Plántula	:	Planta joven, al poco tiempo de brotar de la semilla.
Recalcitrante	:	Partes pequeñas de una planta, llámese explantes o segmentos nodales de difícil incorporación a condiciones in vitro, debido a la estructura de celular.
Recultivo	:	Paso de los explantes a un medio de cultivo fresco.
Segmento nodal	:	Sección de los brotes correspondiente a los entrenudos.
Subcultivo	:	Seccionar en varias partes un mismo explante para ser inoculados en medio de cultivo nuevo.
Vecería	:	Dícese de las plantas que dan mucho fruto en un año, y poco o ninguno en otro.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo establecer una metodología adecuada de colección y establecimiento bajo condiciones *in vitro* de microestacas de *M. dubia*. Se indujo múltiples brotes mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales de 02 genotipos. Se estableció un sistema de inducción rápida de brotes *ex vitro* en condiciones de laboratorio, utilizando un Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial con análisis de varianza, pruebas de comparaciones múltiples de Tukey y significancia de Duncan. Para el inicio de los ensayos se utilizaron los medios de cultivo Murashige & Skoog (M&S) y Woody Plant Medium (WPM) completo, suplementado con sacarosa 20 g/L y, fitagel 2 g/L. Se evaluaron las variables desinfección, oxidación y medios de cultivo. Con el tratamiento 2 de desinfección (T₂=Hipoclorito de sodio (NaOCl) 0,05% + M&S) logró un 85% de sobrevivencia de los segmentos inoculados y, el tratamiento con carbón activado (0,5 g/L + M&S) evitó los procesos de oxidación y fenolización en un 72% de las muestras. Finalmente, la mejor respuesta al crecimiento y desarrollo *in vitro* se logró utilizando el medio de cultivo M&S completa, suplementado con sacarosa 20 g/L, fitagel 2 g/L, ácido índol acético 0,25 mg/L y ácido giberélico 1,5 mg/L. Asimismo, con las accesiones MD-014 y MD-015 se obtuvieron un 75% y 60% respectivamente en el establecimiento de todos los explantes inoculados, permitiéndonos obtener las primeras plántulas con desarrollo y los datos biométricos a los 60 días después de la transferencia al medio de cultivo.

Palabras clave: Microestacas, propagación, medio de cultivo.

I. INTRODUCCIÓN

El Perú por su ubicación geográfica y condiciones ecológicas especiales cuenta con variables climas y microclimas, encontrándose en su territorio 84 zonas de vida de los 114 existentes, situándole entre los primeros países del mundo con gran diversidad biológica. **(Imán, 2000).**

En la región amazónica abarca extensas aéreas de nuestro continente y cuenta que una gran cantidad de recursos naturales de excelente potencial productivo, siendo los frutales nativos uno de los recurso de importancia para la alimentación de la población y la preservación de la fauna silvestre **(Peters & Vásquez, 1988).**

El “camu camu” *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh, un frutal nativo de la Amazonia peruana con gran potencial económico para la agroindustria y agro exportación; su importancia está basada en el alto contenido de ácido ascórbico (hasta 3133 mg /100 g de pulpa **(Veiga & Yuyama, 2005.)**); el que constituye la materia prima para la industria farmacéutica, cosmética y la elaboración de bebidas gaseosas. **(Flores, 1997)**, característica que ha despertado el interés nacional e internacional. Hasta el primer semestre del 2006 se exportó 1130 TM de pulpa, que ascienden a \$1'723,000 millones **(Pinedo et al., 2006).**

El contenido de ácido ascórbico en *Myrciaria dubia* es mayor en comparación con otros frutales tropicales llegando a ser hasta 60 veces superior al jugo del limón. **(Villachica, 1996)**, despertando gran interés en el mercado mundial, dentro del cual Japón, Francia y Estados Unidos son los principales importadores **(Weiss, 1998).**

Crece de manera natural a orillas de los ríos, cochas y cursos de agua. Su distribución natural indica que la mayor concentración de poblaciones y de diversidad se encuentra en la Amazonía peruana, a lo largo de los ríos y afluentes del Ucayali y el Amazonas, en el sector ubicado entre las localidades de Pucallpa (sobre el río Ucayali) y Pebas (sobre el río Amazonas) **(Villachica, 1996).**

La especie representa una opción de gran potencia para el establecimiento de sistemas agrícolas de producción sostenible en zonas inundables de la Amazonía peruana y que su aprovechamiento comercial a mediano y largo plazo requiere el establecimiento de plantaciones utilizando material genético seleccionando. **(Dávila, 2000).**

La propagación de plantas leñosas a través del cultivo de tejidos ha sido lograda en varias especies de frutales y forestales cultivadas con el fin de multiplicar genotipos de interés. En la actualidad el cultivo in vitro es utilizado cada vez más para la propagación de especies amenazadas con el fin de aumentar rápidamente el número de individuos, superar problemas de fertilidad y de biología reproductiva, así como proporcionar material para su reintroducción en la naturaleza y contribuir a la conservación de la diversidad a mediano y largo plazo. La aplicación del cultivo de tejidos, que a su vez comprende a la micropropagación ha sido una técnica muy difundida y con muchas aplicaciones prácticas comprobadas, por lo que puede contribuir a solucionar esta problemática. **(Sotolongo, 2003).**

En la actualidad se han desarrollado nuevas técnicas que permiten solucionar problemas básicos y 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 (explante) sea ésta una célula, un tejido o un órgano para cultivarlo en un medio nutritivo, artificial y aséptico. **(Roca & Mrogrinski, 1993).** La principal ventaja como vía de propagación, es la producción uniforme de plantas que conservan los mismos caracteres de la planta de origen. **(López, 2003).**

El establecimiento y crecimiento de las estacas del camu camu en los medios de cultivos artificiales permitirá obtener una utilización adecuada del método de micropropagación en la producción de explantes en condiciones in vitro, ya que es una técnica básica esencial para los programas de mejoramiento genético, y esto con la finalidad de conservar el germoplasma y obtener plántulas en un tiempo corto y realizar una rápida multiplicación vegetativa. En un mundo globalizado, se hace necesario determinar de manera adecuada la conservación y multiplicación de este recurso por el valor que representa para la región, el país y el mundo, y de esta manera asegurar su futuro **(Gómez & Huaranca, 1997).**

La micropropagación, permite clonar genotipos de plantas seleccionadas por sus características de alto rendimiento, resistentes a estrés y enfermedades, pudiéndose obtener una alta tasa de plantas libres de plagas y por ende, semilla de alta calidad fitosanitaria; además, se pueden obtener plantas en cualquier época del año ya que se trabaja bajo condiciones controladas (**López, 2003**).

En consecuencia los objetivos que se persigue en este presente trabajo de tesis son los siguientes:

GENERAL

- Establecer una metodología adecuada para la colección y establecimiento *in vitro* de microestacas de la especie *Myrciaria dubia* "camu camu "(H.B.K) McVaugh.

ESPECIFICOS

- Colectar y establecer microestacas de *Myrciaria dubia* "camu camu" (H.B.K) McVaugh para el cultivo *in vitro*.
- Determinar concentración de hipoclorito de sodio (NaOCl) para la desinfección de microestacas de *Myrciaria dubia* "camu camu" (H.B.K.) McVaugh.
- Determinar concentración de carbón activado (CA) en el control de procesos oxidativos en medios basales de microestacas en *Myrciaria dubia* "camu camu" (H.B.K.) McVaugh
- Comparar el crecimiento y desarrollo de microestacas empleando dos medios de cultivo a diferentes concentraciones: Wood Plant Médium (1960) y Murashige & Skoog (1962).

II. ANTECEDENTES

2.1. Aspectos generales del cultivo

2.1.1. Origen y distribución geográfica natural

Myrciaria dubia (Myrtaceae) es un frutal arbustivo silvestre de la Amazonía. 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 ó 5 meses (**Peters & Vásquez, 1986**). El hábitat principal son las zonas naturales inundables, aunque se da en suelos de altura en forma de sembríos manejados. En el departamento de Loreto, las poblaciones naturales se encuentran en los ríos Putumayo, Napo, Curaray, Tigre, Marañón, Yavarí, Ucayali y muchos otros ríos como el Itaya y Nanay(**Pinedo, 2002**).

El área cultivada en la Amazonía peruana, sigue incrementándose año tras año. Existen 1,320 Ha distribuidas en las principales cuencas de los ríos amazónicos; Nanay, Ucayali, Marañón, Napo, Yavari, Curaray, Tigre, Amazonas y Putumayo. (**PACC – IIAP, citado por Picón & Acosta, 2000**), además en los ríos Tahuayo, Pintuyacu, Ampiyacu, Apacayu, Manatí, Oroza y Curaray (**Rodríguez et al., 2001**).

Se la encuentra en las riberas de los ríos Solimoes (Amazonas), Negro, Trombetas, Xingu, Tocantines, Madeira, Tapajos, Acre, Yavarí, Macangana y Urupé, en el Brasil; Amazonas, Ucayali, Marañón, Napo, Tigre, Curaray, Yavarí y Tahuayo, en el Perú; Putumayo e Inírida, en Colombia; así como también en la cuenca superior del Orinoco, en Venezuela. La mayor concentración y diversidad de las poblaciones se encuentra en la amazonía peruana (**Peters & Vásquez, 1986; Chávez, 1993; SEBRAE, 1995**).

Existe una notable concentración de la diversidad de esta especie en la amazonía peruana y brasileña; algunos informes revelan la existencia de

poblaciones naturales en la amazonía colombiana (río Putumayo e Inírida) y en Venezuela (ríos Orinoco, Caciqueare, Oreda, Pargueni y Caura) **(Pinedo et al., 2004)**.

Así mismo, 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 tipo arbustivo, sino en asociación con otras especies forestales como capirona, quinilla, shimbillo entre otras, a una densidad que oscila entre 20 a 50 individuos por ha. **(López, 2003)**. Se agrupó el camu camu mediante características morfogénicas en cinco ecotipos, los cuales son: **(Vásquez, 2000)**

- Ecotipo 1: Camu camu arbusto hoja ancha.
- Ecotipo 2: Camu camu arbusto hoja chica.
- Ecotipo 3: Camu camu árbol Supay.
- Ecotipo 4: Camu camu árbol Iricahua.
- Ecotipo 5: Camucamillo.

2.1.2. Clasificación taxonómica

La especie estudiada en el presente trabajo en base a los estudios taxonómicos actuales del Angiosperm Phylogeny Group en donde se clasifica como sigue: **(APG, 2003)**

Grupo Informal : Eudicots
Grupo Informal : Coreeudicots
Grupo Informal : Rosiidae
Orden : Myrtales Rchb.
Familia : Myrtaceae Juss.
Género : Myrciaria O. Berg
Especie : Myrciaria dubia
Nombre científico: Myrciaria dubia (Kunth) Mc Vaugh
Nombre común : camu camu (arbusto)

2.1.3. Descripción botánica

El camu camu arbustivo *Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh alcanza normalmente una altura de 3 a 4 m; sin embargo, en algunos casos puede llegar a medir 6 a 8 m con diámetro de 15 cm se ramifica desde la base de varios tallos secundarios, que a su vez ramifican muy poco y en forma abierta; las ramas son delgadas de color marrón rojizo, a veces verdosa y de corteza liza (**Mendoza et al., 1989**).

Es un arbusto que mide 4 a 8 m de altura, con una ramificación que se inicia desde la base. El tallo y las ramas son glabros, cilíndricas, lisos de color marrón claro a rojizo, con una corteza que se desprende cumplido su ciclo. Las hojas son simples, de borde liso, opuestas, ovaladas, elípticas, lanceoladas y algo asimétricas. La raíz principal es de forma cónica, y muchos pelos absorbentes. Los frutos son globosos, de superficie lisa y brillante, de color rojo oscuro hasta negro púrpura al madurar, miden de 2 a 4 cm de diámetro, con 1 a 4 semillas por fruto, siendo la más común de 2 a 3 semillas. Las semillas son reniformes, aplanadas, cubiertas por una vellosidad blanca rala de menos de 1 mm de longitud (**Alvarado, 1969; Villachica, 1996; Picón & Acosta, 1999; Pinedo et al., 2001; Rodríguez et al., 2001**).

La aparición de los primeros brotes floríferos a manera de cabeza de alfiler hasta el proceso mismo de maduración de la fruta, transcurren 56 días, además se ha determinado que este proceso puede durar también 77 días, la diferencia se podría explicar por las influencias ambientales y genéticas. Además reporta que en un rodal natural, que la especie en estudio se encuentra en asociación con otra especie, el "fanache" (*Eugenia inundata*) en la que se encuentra compitiendo con el camu camu. (**Vásquez, 2000**).

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 & Vásquez, 1986**).

La inflorescencia es axilar. Las flores, agrupadas de 1 a 12, son subsésiles y hermafroditas. El cáliz tiene 4 lóbulos ovoides y la corola, 4 pétalos blancos. El ovario es ínfero, androceo y cuenta con 125 estambres. La fecundación ocurre por alogamia facultativa y la polinización es realizada por la acción del viento o de los insectos **(Peters & Vásquez, 1986; Barriga, 1994; Villachica, 1996 y Flores, 1997)**.

2.1.4. Reproducción y fenología

Pese a que las flores de *Myrciaria dubia* son hermafroditas, la endogamia sería en parte prevenida por la falta de sincronía entre el desarrollo del gineceo y al androceo, conduciendo a la alogamia facultativa. Es decir, la especie tendría un sistema reproductivo que combina, en proporciones aun no determinadas, la autofecundación y la fecundación cruzada. La polinización se produce principalmente por insectos de la especie *Melipona fuscopilara* y *Trigona portica* **(Peters & Vásquez, 1987)**.

El camu camu es una planta perenne, y como todas las plantas superiores tienen 2 grandes fases en su ciclo biológico: *Fase Vegetativa*; que se inicia con la germinación de las semillas, emergencia de las plántulas, brotamiento de las ramas basales y brotamiento de las ramas a lo largo del tallo, crecimiento y engrosamiento del tallo y ramas. *Fase Reproductiva*; que se inicia los tres años de edad, en esta fase se distinguen la defoliación (caída de hojas), foliación (25 días después de la defoliación), la floración (120 días), la fructificación (210 días) y la cosecha (240 días) **(Imán & Melchor, 2007)**. En las poblaciones naturales la floración se realiza entre los meses de setiembre a octubre y la fructificación entre diciembre y febrero, dependiendo de la localidad. En plantaciones de zonas aluviales cuidadosamente seleccionadas, con buen drenaje, menos afectadas por la inundaciones, la floración presenta dos picos en el año: el primero entre setiembre y octubre y el segundo entre marzo y abril, dando lugar, 2 a 3 meses más tarde a la fructificación correspondiente, observándose un

cambio marcado en los hábitos reproductivos y una ampliación del tiempo de producción de frutos (**Pinedo *et al.*, 2004**).

2.1.5. Ecología

El camu camu es típico del bosque húmedo tropical, caracterizado por temperaturas mínimas de 22 °C, máximas de 32 °C y promedio de 26 °C. La precipitación pluvial varía aproximadamente entre 1,600 a 4,000 mm, siendo los niveles adecuados de altitud inferiores a 300 msnm (**Pinedo *et al.*, 2001**).

Las poblaciones naturales están sometidas a las inundaciones estacionales de los ríos, y pueden permanecer completamente sumergidos en el agua durante 4 a 5 meses (**Peters & Vásquez, 1988**).

Luego de la vaciante de los ríos, se observa gran cantidad de raíces adventicias a lo largo del tallo, el cual es muy ramificado y presentan arquitecturas diferentes. El tronco es delgado con diámetros diferentes, la corteza es lisa y coriácea, las cuales presentan laminillas que se desprenden fácilmente (**Vásquez, 2000**).

Desde 1995, la expectativa sobre el camu camu ha crecido notoriamente. El interés por aprovechar las poblaciones naturales, por utilizarlo o por efectuar investigación de diversa índole se incremento sosteniblemente en estos últimos años. Asimismo 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 a marzo. (**Pinedo *et al.*, 2001**).

Bajo las condiciones de la Región Loreto, las plantas que forman rodales naturales, viven varios meses sumergidos durante la época de creciente de los ríos. Por su rusticidad, la especie se ha adaptado fácilmente a condiciones de suelos de restinga (Sistemas inundables) y hasta en suelos de tierra firme o altura (Sistemas no inundables). Además mencionan, que el camu camu es una planta heliófita, es decir, que requiere de abundante

luz para favorecer los procesos de fotosíntesis; bajo condiciones de sombra, se detiene el metabolismo y las plantas no crecen. **(Imán & Melchor, 2007).**

La propagación por estacas es el método asexual artificial, que consiste en obtener una nueva planta utilizando una parte cualquiera del vegetal y que separa de la planta madre y puesta en condiciones convenientes emitan raíces y desarrolle un brote que más tarde originara una planta idéntica a la planta a la cual procede **(Calzada, 1971).**

2.1.6. Importancia y usos

El camu camu ha despertado gran interés en la agroindustria nacional e internacional, debido a que sus frutos tienen alto contenido de ácido ascórbico (2000 a 3000 mg/100 g de pulpa fresca) **(Ferreira, 1959; Roca, 1965; Pinedo *et al.*; 2001).**

La pulpa, por su 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 **(Imán & Melchor, 2007).**

En Brasil los frutos son procesados y expedidos en forma de refresco, jugos, jarabes, jabones, champús, cosméticos y otras variedades de productos que son expedidos en los principales supermercados de Manaus, Belén y Río de Janeiro. Otros países como Japón, Francia y Estados Unidos ofrecen al mercado algunos productos transformados, pero solo a nivel exploratorio como tónicos, bebidas cápsulas, etc. **(Delgado & Couturier, 2004).**

Las bondades que presenta el camu camu, hace que muchos científicos y empresarios de diversas partes del mundo, visiten nuestro país con miras a su estudio e industrialización, produciendo una gran demanda del producto que no puede abastecer grandes mercados por falta de materia prima. Hasta donde ha sido posible investigar parece que el camu camu es exclusivamente nativo de algunos afluentes peruanos del río Amazonas, incluyendo Brasil, al sur de este país hay varias Myrciarias entre las que destaca *Myrciaria cauliflora* (Berg.) que se la conoce con el nombre de “jaboticaba” - “sabasara”, esta tiene un parecido a nuestro camu camu, sin embargo, en la bibliografía consultada se menciona que tiene bajo contenido de vitamina “C”. (Calzada, 1980).

2.2. Propagación vegetativa

En trabajos realizados en campo se determinaron 39,5% de persistencia de los frutos de camu camu. Después de 19 años, en el mismo sitio, se encontró un valor de 27%, lo que podría ser atribuido al tamaño de la muestra y a las variaciones ambientales (Peters & Vásquez, 1986).

Las evaluaciones realizadas en el germoplasma de camu camu en suelos de altura, indican para este cultivo la presencia del fenómeno de alternancia o vecería (alternancia anual de la fructificación). A una intensa fructificación de un año, corresponde una reducción de la actividad vegetativa que provoca la ausencia o disminución de la fructificación del año siguiente y así sucesivamente. Para contrarrestar el efecto de la vecería se recurre a la práctica de podas, aclareo de frutos, fertilización racional y oportuna (Imán, 1996).

En la actualidad, la micropropagación se práctica con éxito en especies hortícolas y más recientemente en especies leñosas. En algunas especies el mismo autor menciona que ésta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales (Roca & Mrogrinski, 1993).

2.3. Micropropagación *in vitro*

Los mejores resultados para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo *Psidium salutare* Kunth. (Myrtaceae) en los medios donde fue adicionado cisteína 25 mg/L, el efecto antioxidante de este compuesto fue independiente a la concentración utilizada (Sotolongo, 2003), resultados similares se reportan para el establecimiento de explantes del café *Coffea arabica* (Rubiáceae). (Santana & González, 1988).

En micropropagación *in vitro* del tornillo *Cedrelinga cateniformis* Ducke. Ducke (Fabáceae) donde se reportan 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 1 minuto. (Salinas, 1995).

Se ha demostrado la posibilidad de propagar *in vitro* la guayaba *Psidium guajaba* L. (Myrtáceae) en varios estudios utilizando ápices (Papadadatou & Pontikis, 1990), segmentos nodales (Amin & Jaiswal, 1988; Mohamed-Yassee *et al.*, 1995), hojas jóvenes, hipocotilos (Loh & Rao, 1989; Singh *et al.*, 2002).

En la actualidad, el establecimiento y estandarización de protocolos *in vitro* con tejidos de alta respuesta de regeneración en especies leñosas se considera fundamental para procesos de Micropropagación masiva y para facilitar la tecnología de transformación genética. En muchas especies frutales y forestales se han hecho estudios para obtener plantas *in vitro* por medio de organogénesis indirecta (Pérez-Tornero *et al.*, 2000) y embriogénesis somática (Toribio *et al.*, 2004).

La propagación *in vitro* de guayaba por brotes adventicios es posible. Sin embargo, aun no existen estudios que demuestren los efectos de la micropropagación en plantaciones comerciales. (Loh & Rao, 1989; Amin & Jaiswal, 1988; Ramírez & Salazar, 1997; Pérez-Tornero *et al.*, 2000)

Las técnicas de micropropagación in vitro en vegetales presentan las siguientes características de ventajas y desventajas: **(Marayanas, 1977; Pierik, 1990)**.

- a) Empleo de “explantes” de dimensiones pequeñas.
- b) Asepsia completa del material biológico, medios de cultivo, herramientas y procedimientos.
- c) Medios de cultivo más o menos complejos.
- d) Control de las condiciones ambientales del cultivo.

Ventajas de la técnica de propagación in vitro:

- 1) Los cultivos son pequeños segmentos de órganos y tejidos; se necesita poco espacio para reproducir muchas plantas.
- 2) La propagación se hace en condiciones asépticas; las plantas obtenidas están libres de hongos y bacterias.
- 3) Se puede regenerar y/o producir un mayor número de plantas en menor tiempo; muy importante en el fitomejoramiento, porque reduce el periodo entre la obtención y la difusión de un nuevo cultivo.
- 4) El proceso conviene hacerse durante la transferencia o recultivo.

Desventaja de la técnica de propagación in vitro:

- 1) Se necesita de personas hábiles para que las operaciones tengan éxito.
- 2) El procedimiento puede ser costoso; especialmente si se compara con la propagación convencional.
- 3) Pérdida de la capacidad morfogénica de los explantes; luego de muchos subcultivos o recultivos.

2.4. Medios de cultivo

El papel principal del medio nutritivo es proveer las condiciones óptimas para el crecimiento del explante. Estas condiciones están determinadas por factores físicos, como la concentración de los nutrientes reguladores de crecimiento; pH, estado del

medio (líquido o semilíquido) y la temperatura (**Bellen, 1985**). El medio de cultivo es una mezcla de sustancias sobre o en las cuales pueden crecer células, tejidos u órganos con o sin la adición de agar (**Pierik, 1990**).

En la actualidad existen innumerables formulaciones de medio de cultivo; cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran: carbono, nutrientes minerales, vitaminas y gelificantes (**Roca & Mroginski, 1991**).

No existe un medio de cultivo universal, cada género, especie a cultivar e inclusive cada segmento proveniente de diferentes partes de la misma planta, tienen distintos requerimientos para alcanzar un buen crecimiento y desarrollo (**Locy, 1984**).

El éxito del cultivo de tejidos de plantas está muy influenciado por la composición química de los medios de cultivo utilizados y otros factores ambientales. (**Hurtado & Merino, 1994**).

Un medio de cultivo básico es el conjunto de macro y microelementos necesarios para el desarrollo de la plántula. Los medios específicos son variaciones de los medios básicos de acuerdo a las necesidades de una determinada especie. Los medios básicos más usados para cultivo de especies perennes son el medio M&S (Murashige & Skoog) para plantas herbáceas (**Fontúrbel, 2001**).

El medio desarrollado por Murashige & Skoog (1962), es particularmente rico en nitrógeno y contiene una buena proporción de N-NO₃, con respecto a N-NH₄ (aprox. 2:1). Su adecuada composición ha hecho que sea un medio ampliamente usado para la micropropagación de plantas herbáceas (**Seeman, 1993**).

2.5. Reguladores de crecimiento

Las moléculas reguladores de crecimiento pueden promover o inhibir determinados procesos, que pueden ser: (**Barcillo, 1992**).

- Las que promueven una respuesta, esta dado por 4 grupos principales de compuestos que ocurren en forma natural, cada una de los cuales exhibe fuertes propiedades de regulación del crecimiento en plantas. Se incluyen grupos principales: Auxinas, Giberelinas, Citoquininas y Etileno.
- Los que inhiben: el Ácido Abscísico, los inhibidores, morfictinas y retardantes de crecimiento, cada una con su estructura particular y activos a muy bajas concentraciones de la planta. Mientras que cada fitohormona ha sido implicada en un arreglo relativamente diverso de papeles fisiológicos dentro de las plantas, y secciones cortadas de estas, el mecanismo preciso a través del cual funciona no es aun conocido.

El desarrollo normal de una planta depende de la interacción de factores externos: luz, nutrientes, agua y temperatura, entre otros, e internos: como la acción de las hormonas. Las hormonas se han definido como compuestos naturales que poseen la propiedad de regular procesos fisiológicos en concentraciones muy por debajo de la de otros compuestos (nutrientes, vitaminas) y que en dosis más altas los afectarían. Regulan procesos de correlación, es decir, que recibido el estímulo en un órgano, lo amplifican, traducen y generan una respuesta en otra parte de la planta (**Azcon, 2000**).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del estudio

El trabajo de investigación se desarrolló en los ambientes de la Subdirección de Recursos Genéticos y Biotecnología (SUDIRGEB), Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) - Estación Experimental “San Roque”, ubicado en el Distrito de San Juan Bautista, cuyas coordenadas geográficas son: latitud sur $03^{\circ} 45' 05''$, longitud oeste $73^{\circ} 14' 40''$ y una altura de 126 msnm (Pinedo, 1998).

3.2. Tiempo de duración

El trabajo de investigación tuvo una reprogramación de 08 meses y validación de los resultados, siendo necesario extender el plazo establecido debido a que la especie *Myrciaria dubia*, siendo una planta leñosa, es difícil de llevar a condiciones *in vitro*. El seguimiento, monitoreo y evaluación de los primeros ensayos se fue adecuando la metodología hasta definir el protocolo de colección y establecimiento *in vitro* para esta especie.

3.3. Material vegetal

3.3.1. Ubicación del germoplasma

La colección nacional de camu camu, es la fuente del material parental que se utilizó en el presente trabajo. El germoplasma de camu camu, se encuentra instalado en el Campo Experimental “El Dorado”, ubicado en el Km. 25 + 380 de la carretera Iquitos - Nauta; en las siguientes coordenadas geográficas: $03^{\circ} 57' 09''$ de latitud sur, $73^{\circ} 25' 01''$ de longitud oeste; 123 msnm con temperaturas promedio anuales de 26°C , 3000 mm de precipitación pluvial anual y 85% de Humedad relativa. (Ver Foto 1, 2; Anexo 5).

3.3.2. Colecta del material vegetal

El material vegetal que se utilizó fueron ramas o varas yemeras tomados de una parcela de plantas de 10 años de edad, las muestras colectadas corresponden al tercio superior de cada rama, estas plantas se seleccionaron según el genotipo, estado fenológico y fitosanitario mediante la observación y evaluación directa, tratando de mantener la uniformidad en la colecta del material biológico (Ver Foto 3; Anexo 5)

Las ramas seleccionadas se cortaron a una longitud de 35 cm. y diámetros entre 1.0 a 1.3 cm. respectivamente, durante los cortes en la colecta del material, se priorizó aquellas ramas que fueran lo más recto posible y con vernier se tomaron las medidas biométricas; se eliminaron la totalidad de hojas a nivel del peciolo en forma manual o con tijera podadora (Ver Foto 4; Anexo 5)

10 ramas colectadas se envolvieron en papel secante humedecida en agua destilada, por cada genotipo y se colocaron en caja tecnopor para su transporte al laboratorio.

3.3.3. Lavado y desinfección de las muestras biológicas

El lavado del material colectado en campo se realizó con agua destilada, jabón líquido al 5% e hipoclorito de sodio al 0.03%, con una inmersión de 10 minutos. Terminado el tiempo de inmersión se removió las sustancias orgánicas e inorgánicas adheridas en el material biológico, evitando lastimar las yemas visibles y posteriormente se lavan con agua destilada.

Posteriormente las estacas fueron cortadas en cada extremo a 2.5 cm dejando exactamente a 30 cm el tamaño final para su instalación en los tubos de ensayo, conteniendo solamente agua tratada en un volumen de 50 ml por tubo, luego se aplicó una pasta antifúngica de composición química

Panzil en cada corte apical de las estacas con un hisopo o algodón, actuando como inhibidor al ataque de hongos ambientales.

Una solución de Vitavax en concentración de 0.5 g/L se aplicó por aspersión a las muestras en estudio. Este tratamiento es semanal, hasta observar la emergencia de los primeros brotes en las estacas. Las muestras biológicas en estudio fueron colocadas en un ambiente con buena ventilación, entrada de luz suficiente para favorecer la fotosíntesis y el cuidado adecuado para la toma posterior de los datos.

Cada 2 días desde el momento de la instalación del experimento se va agregando agua fresca a los tubos. Así mismo, se realizó semanalmente el lavado de los tubos y las estacas evitando la predisposición de microorganismos oportunistas (bacterias y hongos).

3.3.4. Obtención de los segmentos nodales

Los segmentos nodales que se emplearon para el cultivo *in vitro* se obtuvieron de las estacas que presentaban hojas abiertas a los 35 días, formados a partir de los brotes foliares. A los segmentos extraídos, se eliminaron la masa foliar y estos pequeños tallos fueron depositados en recipiente de vidrio con solución de transporte Polyvinilpirrolidona (PVP) de 0.5%, estando sumergido durante el tiempo que se requiera la toma de las muestras y fueron trasladados a la cámara de siembra. (Ver Foto 5, 6; Anexo 5)

El material biológico en esta etapa tiene un crecimiento celular muy activo, es particularmente limpio y sano, por lo que sirvieron para la secuencia de los ensayos, descritos según los diferentes experimentos propuestos.

3.4. Medios de cultivo utilizados

El medio de cultivo que se empleó para los ensayos preliminares fue la formulación química propuesta por Murashige & Skoog (1962), en adelante M&S (Ver Anexo N° 1), a su concentración completa donde 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,D y E: 10 ml respectivamente, como fuente de carbono se empleó sacarosa 30 g/L y gelificante fitagel 2.0 g/L, con agitador magnético se homogenizaron las soluciones y se enrazó a un volumen total de 1000 ml. El pH fue ajustado antes de la adición del gelificante a 5.7 con Hidróxido de Sodio (NaOH) y/o Ácido Clorhídrico (HCl) para estabilizar el pH del medio basal.

El medio de cultivo se dispuso en tubos de ensayo de 25 x 150 mm, en un volumen de 8 ml por tubo aproximadamente y se esterilizaron en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos a 15 libras de presión atmosféricas.

El medio de cultivo fue procesado días previos al momento de la siembra de acuerdo a la tabla de preparación de medios de cultivos y cuando no fueron empleados se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta el momento de la inoculación de los explantes.

3.5. Cultivo *in vitro* de segmentos nodales

3.5.1. Desinfección y siembra de segmentos nodales

Para evitar la contaminación durante la siembra de los explantes se utilizó una cámara de flujo laminar horizontal, en donde se trabajó bajo condiciones asépticas y se expusieron las muestras a una primera desinfección con alcohol al 70° por 30 segundos, y una segunda desinfección a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio: 0.04, 0.05, 0.06 y 0.07% con la adición de jabón líquido a 0.05% por 10 minutos, luego se enjuagó con abundante agua destilada estéril por tres veces en

diferentes tiempos: 15, 10 y 5 minutos respectivamente.(Ver Foto N° 7, 8, 9, 10 y 11; Anexo 5).

Para calcular el volumen de cada concentración desinfectante a utilizar en los tratamientos por cada litro de agua, se aplicó la ley de la volumetría, mediante la siguiente fórmula:

Donde:

C₁: es la concentración conocida de cloro activo.

V₁: es el volumen de cloro activo que se debe utilizar

C₂: es la concentración al cual se quiere titular.

V₂: es el volumen de agua que quiero utilizar en la desinfección.

Ejemplo: (5.25% NaOCl) (V₁) = (0.05%) (1000 ml. de agua)

Los segmentos nodales desinfectados fueron sometidos a cortes longitudinales de 3 cm aproximadamente, obteniendo las microestacas; estas fueron inoculadas en condiciones asépticas en los tubos de ensayo conteniendo el medio de cultivo basal gelificado para su primera fase de desarrollo, para ello se emplearon instrumental estéril como papel, placas petri, pinzas, tijeras, bisturí, mechero y alcohol de 96°, teniendo finalmente una muestra por tubo y sellados exteriormente con parafina.

Finalmente estos tubos fueron acondicionados en una cámara de crecimiento en donde la temperatura se mantuvo a 24 °C ± 2, 4000 lux, humedad relativa de 70% y fotoperiodo de 16 horas luz x 8 horas de oscuridad.

Se estudiaron los siguientes factores:

Factor A: Concentraciones de Hipoclorito de Sodio (NaOCl)

A1 = 0.04%

A2 = 0.05%

A3 = 0.06%

A4 = 0.07%

Factor B: Segmento nodal

B1 = 2 yemas

Diseño: Completamente Aleatorizado (DCA)

Repeticiones: 40

Unidad Experimental: 1 muestra con 2 yemas por tubo.

N° de tubos por experimento: 4 x 1 x 40 = 160 tubos con un explante.

Distribución de los tratamientos:

T₁ = 0.04 % + 1 muestra con 2 yemas (T1 = A1 B1)

T₂ = 0.05 % + 1 muestra con 2 yemas (T2 = A2 B1)

T₃ = 0.06 % + 1 muestra con 2 yemas (T3 = A3 B1)

T₄ = 0.07 % + 1 muestra con 2 yemas (T4 = A4 B1)

Variables respuesta:

1. Contaminación: Prioridad del ensayo

1 : No contaminado

2 : Contaminado

3.5.2. Control de la oxidación

Se empleó carbón activado (C.A.) como antioxidante en el medio de cultivo basal Murashige & Skoog (1962), y se aplicaron cuatro niveles de antioxidante.

Se estudiaron los siguientes factores:

Factor A: Concentraciones de Carbón Activado (g/L):

A1 = 0.25 g/L.

A2 = 0.50 g/L.

A3 = 0.75 g/L.

A4 = 1.00 g/L.

Factor B: Segmento nodal

B1 = 2 yemas

Diseño: Completamente Aleatorizado (DCA)

Repeticiones: 40

Unidad Experimental: 1 muestra con 2 yemas por tubo.

Nº de tubos por experimento: $4 \times 1 \times 40 = 160$ tubos con un explante.

Distribución de los tratamientos:

T1 = 0.25 + 1 muestra con 2 yemas (T1 = A1 B1)

T2 = 0.50 + 1 muestra con 2 yemas (T2 = A2 B1)

T3 = 0.75 + 1 muestra con 2 yemas (T3 = A3 B1)

T4 = 1.00 + 1 muestra con 2 yemas (T4 = A4 B1)

Variables respuesta:

1. Contaminación:

1 : No contaminado

2 : Contaminado

2. Oxidación: Prioridad del ensayo

1 : 0 % Oxidación

2 : 25 % Oxidación

3 : 50 % Oxidación

4 : 100 % Oxidación

3.5.3. Crecimiento y desarrollo de segmentos nodales en medios de cultivo

Se utilizaron dos medios de cultivo, Murashige & Skoog (M&S, 1962) y Medio para plantas leñosas (WPM, 1960) (Ver Anexo 2), ambos medios a concentraciones completas, el pH fue ajustado a 5.7 y 3.2 respectivamente. Los datos que se tomaron para las evaluaciones fueron: crecimiento en longitud de microestaca (cm), crecimiento del brote de la microestaca (cm); número de brotes, número de hojas y número de nudos. Se realizó repique en medios de cultivos frescos M&S y WPM cada semana. (Ver Foto N° 12, 13, 14 y 15)

Se estudiaron los siguientes factores

Factor A: Medios de cultivo:

A1 = M&S, 1962

A2 = WPM, 1960

Factor B: Acciones promisorias:

B1 = MD: 14

B2 = MD: 15

Diseño: Completamente Aleatorizado (DCA) con arreglo factorial 2 x 2

Repeticiones: 40

Unidad Experimental: 1 muestra con 2 yemas por tubo.

N° de tubos por experimento: 2 x 2 x 40 = 160 tubos con un explante.

Distribución de los tratamientos:

T1 = MS + 1 muestra con 2 yemas acción MD-14 (T1 = A1 B1)

T2 = MS + 1 muestra con 2 yemas acción MD-15 (T2 = A1 B2)

T3 = WPM + 1 muestra con 2 yemas acción MD-14 (T3 = B1 A1)

T4 = WPM + 1 muestra con 2 yemas acción MD-15 (T4 = B2 A2)

Variables respuesta:

1. Crecimiento y desarrollo: Prioridad del ensayo

Longitud de microestaca (cm)

Longitud de brotes en microestaca (cm)

Número de brotes (conteo)

Número de hojas y nudos (conteo)

Cada siete días se realizó las evaluaciones de los experimentos, en donde se observó la adaptación de las microestacas en medios de cultivo ensayados; en cada evaluación se descartó el material contaminado/oxidados evitando el riesgo de contaminación en la cámara de crecimiento. Los registros se plasmaron en una ficha de evaluación (Anexo N° 3).

3.6. Factores en estudio por experimento

Para el análisis biométricos se utilizo un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial con análisis de varianza, pruebas de comparaciones múltiples de Tukey y prueba de significancia de Duncan a través del paquete estadístico Statistical Package for Social Science para Windows Versión 15.0 (SPSS).

IV. RESULTADOS

4.1. Desinfección de segmentos nodales

El material vegetal (brotes) obtenidos en laboratorio obtuvo una mejor respuesta al protocolo de desinfección, en donde se optó por utilizar hipoclorito de sodio (NaOCl) como desinfectante, puesto que es un producto de fácil manejo y no toxico para el material de siembra (Ocampo & Núñez, 2007).

Realizando consecutivos ensayos, se utilizaron diferentes concentraciones de desinfectante en donde los explantes tuvieron diferentes respuestas; a concentraciones bajas se observó un alto porcentaje de contaminación hasta un 100%; posteriormente se elevaron estas concentraciones teniendo como resultado el ennegrecimiento o quema de 95% de los explantes por acción del desinfectante.

Después de dos semanas de evaluación, para el ensayo de desinfección de los segmentos nodales, se determino que la concentración al 0.05% de hipoclorito de sodio fue el adecuado para el control de la contaminación en los explantes, obteniendo como resultado un 85% de sobrevivencia de todos los explante inoculados (Figura N° 1).

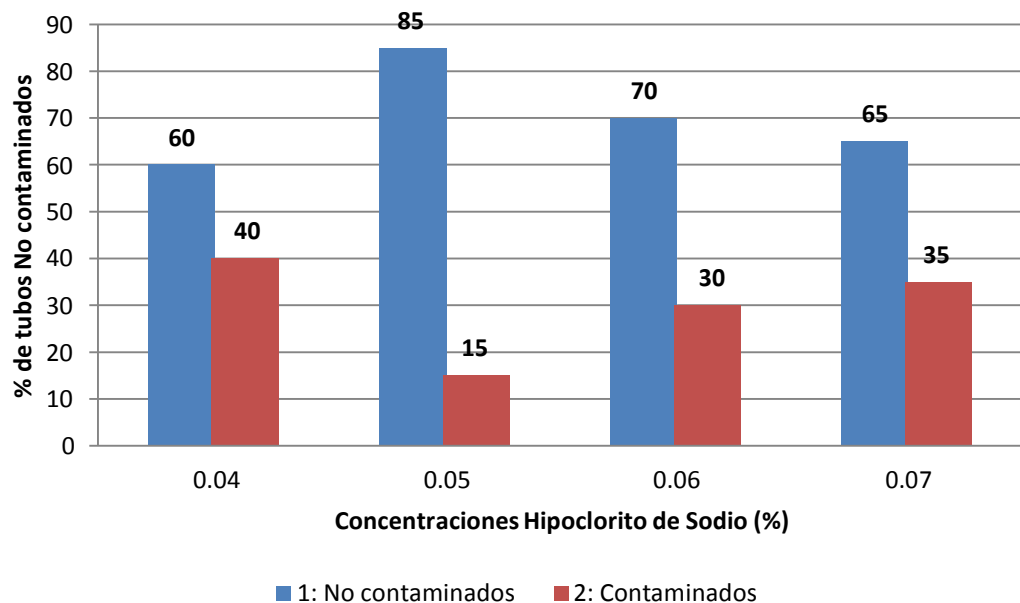


Figura N° 1. Porcentaje de contaminación de segmentos nodales de *Myrciaria dubia* cultivados *in vitro*.

Según la estadística de Levene, el Cuadro N° 1, muestra que existe homogeneidad entre los tratamientos. Al realizar el Análisis de Varianza para la variable desinfección, nos muestra que existe una alta significancia de 0.001 entre los tratamientos (Cuadro N° 2).

Cuadro N° 1. Experimento N° 01. Prueba de Homogeneidad de Varianzas.

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
.170	3	12	.915

Cuadro N° 2. Experimento N° 01. Análisis de Varianza de la variable Desinfección, Prueba de Significancia para los tratamientos.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Intergrupos	633.513	3	211.171	10.054	.001
Error	252.056	12	21.005		
Total	885.569	15			

En el Cuadro N° 03, se observa los resultados de la prueba de Tukey y Duncan donde se muestra que existe una significancia de 0.001 para el tratamiento N° 02 (0.05% de NaOCl) con respecto a los tratamiento aplicados (ver Anexo 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5)

Cuadro N° 3. Experimento N° 01. Prueba de significancia de Tukey y Duncan

Prueba	Tratamientos	
HSD de Tukey^a	0.05% NaOCl	67.5000 a
	0.06% NaOCl	56.9475 b
	0.07% NaOCl	53.7800 b
	0.04% NaOCl	50.8325 b
	Sig.	1.000
Duncan^a	0.05% NaOCl	67.5000 a
	0.06% NaOCl	56.9475 b
	0.07% NaOCl	53.7800 b
	0.04% NaOCl	50.8325 b
	Sig.	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
a: usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000

En el Anexo N° 4.6, se muestra la tendencia del T2 con 0.05% de hipoclorito de sodio en el control de la contaminación, y tiene una curva de estimación de tipo Cúbica para los tratamiento aplicados (Anexo N° 4.7). Todas las muestras inoculadas en el medio de cultivo basal que no presentaron contaminación alguna fueron separadas y recultivadas a un medio de cultivo fresco para continuar con las evaluaciones correspondientes.

4.2. Control de la oxidación en segmentos nodales

Se utilizó carbón activado (C.A.) para el control de la oxidación y fenolización en la siembra *in vitro* de segmentos nodales, se optó por este recurso por ser de fácil obtención y manejo, siendo un derivado del carbón, es un material extremadamente poroso y por lo tanto posee un área superficial muy alta que torna muy eficiente los fenómenos de adsorción a las reacciones químicas (Menéndez & Gullón, 2008).

Se incorporó C.A. como complemento del medio de cultivo basal M&S, por lo que se realizaron ensayos preliminares con diferentes niveles a lo encontrado como mejor respuesta en el establecimiento *in vitro* de esta especie. Al igual que en el experimento anterior, las evaluaciones demostraron resultados con mayor respuesta a la oxidación de los explantes con un nivel de 0.5 g/L de C.A., siendo significativamente menor con los demás niveles utilizados.

Según la estadística de Levene, existe homogeneidad entre los tratamientos (Cuadro N° 4).

Cuadro N° 4. Experimento N° 02. Prueba de Homogeneidad de Varianzas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2.829	3	12	.083

El Cuadro N° 5 muestra el análisis de varianza para la variable control de la oxidación donde existe alta significancia de 0.001 entre los tratamientos.

Cuadro N° 5. Experimento N° 02. Análisis de Varianza, Prueba de Significancia para los tratamientos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Intergrupos	1260.696	3	420.232	12.011	.001
Error	419.860	12	34.988		
Total	1680.556	15			

Para la prueba de Tukey y Duncan muestran la significancia de 0.001 para el tratamiento N° 02 (0.5 g/L de C.A.) con respecto a los tratamientos aplicados (Cuadro N° 06). En el Anexo N° 4.13, se muestra la tendencia del T2 con 0.5 g/L de carbón activado en el control de la oxidación, y tiene una curva de estimación de tipo cúbica para los tratamientos aplicados (Anexo N° 4.14). (Ver Anexo 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12)

Cuadro N° 6. Experimento N° 02. Prueba de significancia de Tukey y Duncan de la variable Control de la Oxidación.

Prueba	Tratamientos	
HSD de Tukey^a	0.50 g C.A.	58.4525 a
	0.25 g C.A.	42.1150 b
	1.00 g C.A.	37.4425 b
	0.75 g C.A.	36.2200 b
	Sig.	1.000
Duncan^a	0.50 g C.A.	58.4525 a
	0.25 g C.A.	42.1150 b
	1.00 g C.A.	37.4425 b
	0.75 g C.A.	36.2200 b
	Sig.	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
a: usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000

En la Figura N° 2 se puede observar un 72% de segmentos nodales que no se oxidaron para el nivel de antioxidante con 0.5% g/L, seguido de 65% para el nivel de 0.75 g/L de C.A. respectivamente.

Se muestra una tendencia mayor en el control de la oxidación, por acción de la absorción de los metabolitos tóxicos que afectan o inhiben parcial o totalmente el desarrollo de los segmentos nodales en el medio de cultivo.

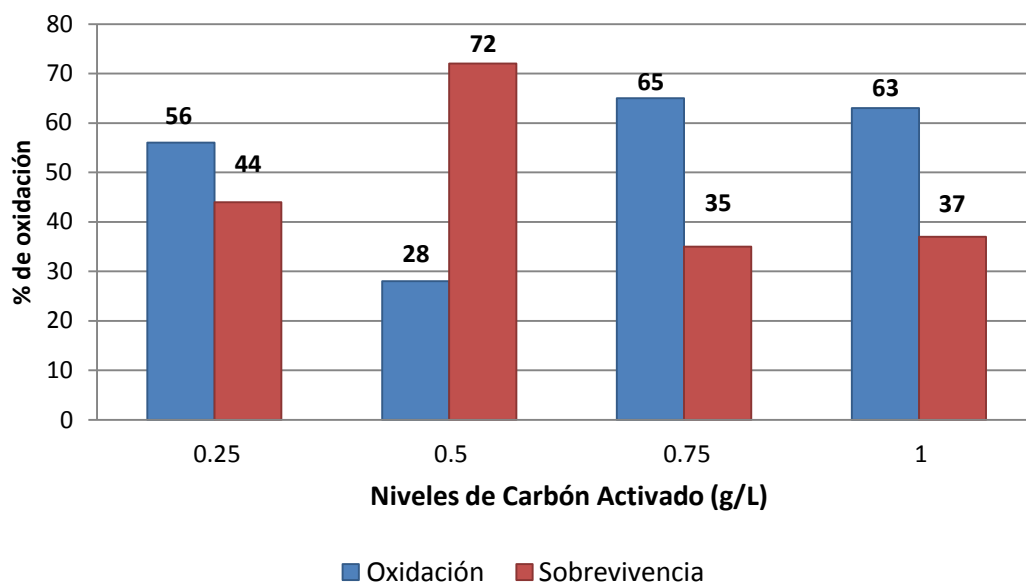


Figura N° 2. Porcentaje de supervivencia de los segmentos nodales con los niveles de carbón activado

4.3. Crecimiento y desarrollo de segmentos nodales

Se utilizaron dos medios de cultivo para la inoculación de los explantes en la fase de establecimiento (crecimiento y desarrollo), el primer medio estuvo constituido por el medio de cultivo basal Murashige & Skoog (M&S, 1962) suplementado con sacarosa 20 g/L, gelificante Phytigel 2 g/L; el segundo medio de cultivo basal Wood Plant Médium (WPM, 1960) suplementado con sacarosa 20 g/L, gelificante Phytigel 2g/L, se agregó a ambos medios 0.5 g/L de C.A., Ácido Índol Acético (AIA) 0.25 mg/L y Ácido Giberélico (GA3) 1.5 mg/L, ajustando el pH a 5.7 y se procedió a aplicar el protocolo de desinfección con concentración de 0.05% de NaOCl.

En este ensayo se utilizaron 2 accesiones promisorias para la obtención de los brotes jóvenes para la siembra *in vitro*: MD-014 y MD-015 (MD: *Myrciaria dubia*). El Cuadro N° 7, muestra el Análisis de Varianza de la interacción de los factores Medios de cultivo y Accesiones promisorias donde se observa que no existen diferencias significativas para la variable establecimiento *in vitro*.

Cuadro N° 7. Análisis de Varianza de los factores Medio de cultivo y Accesiones promisorias en relación a la variable Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales.

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	,725 ^a	3	,242	1,040	,377
Intersección	65,025	1	65,025	279,832	,000
Medio de cultivo	,225	1	,225	,968	,327
Accesión promisorias	,400	1	,400	1,721	,191
Medio * Accesoión	,100	1	,100	,430	,513
Error	36,250	156	,232		
Total	102,000	160			
Total corregida	36,975	159			

a. R cuadrado = ,020 (R cuadrado corregida = ,001)

En la Figura N° 3, se indican los valores porcentuales de sobrevivencia, donde el medio de cultivo basal M&S obtuvo mejor respuesta con un 75% de sobrevivencia de los explantes para la accesoión MD-014, seguido de un 60% para el mismo medio accesoión MD-015 respectivamente.

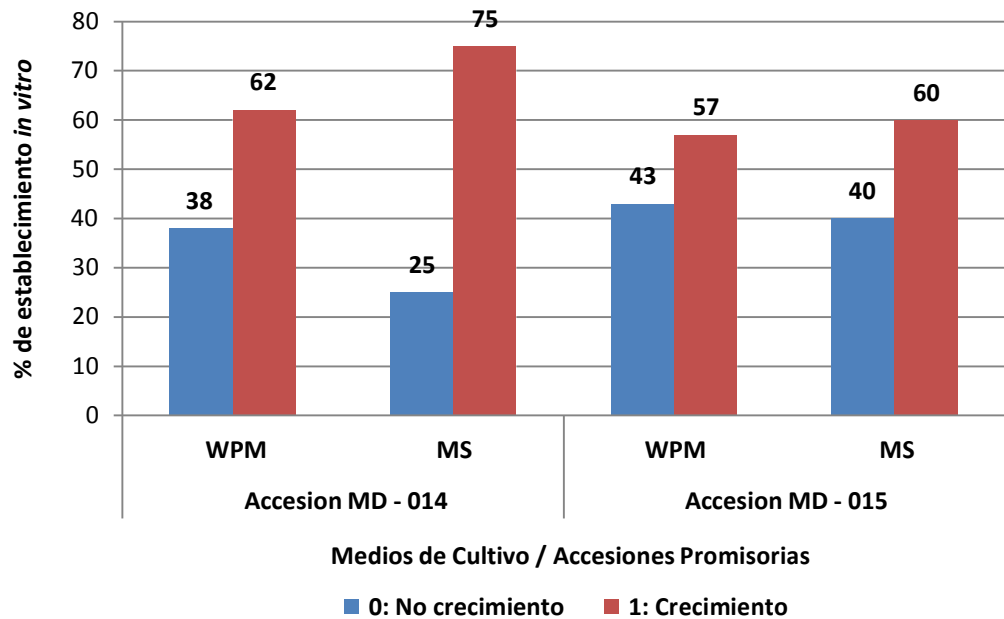


Figura N° 3. Porcentaje de establecimiento de las dos accesiones MD-014 y MD-015 inoculados en los medios de cultivo Murashige & Skoog (M&S) y Woody Plant Medium (WPM).

El Cuadro N° 08 muestra el Análisis de Varianza de los factores Medio de Cultivo y Accesiones prioritarias con respecto a las variables N° de Brotes, N° de Hojas, N° de Nudos y Longitud del brote. La estadística indica que existe alta significancia con respecto al factor Medio de Cultivo para las variables N° de Hojas y Longitud de brote y no es tan significativo para las variables N° de brotes y N° de nudos. Con respecto al factor Accesiones promisorias no existe significancia estadística para las variables N° de Brotes, N° de Hojas, N° de Nudos y Longitud del brote.

Cuadro N° 8. Experimento N° 03. Análisis de Varianza de los factores Medio de Cultivo y Accesiones Promisorias con respecto a las variables N° de Brotes, N° de Hojas, N° de Nudos y Longitud del brote.

Fuente	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Repeticiones	N° de brotes	.082	3	.027	7.529	.006
	N° de hojas	2.586	3	.862	2.363	.133
	N° de nudos	.035	3	.012	.047	.986
	Longitud de brote	.296	3	.099	1.321	.322
Medios de cultivo	N° de brotes	.006	1	.006	1.552	.241
	N° de hojas	11.526	1	11.526	31.602	.000
	N° de nudos	1.823	1	1.823	7.290	.022
	Longitud de brote	1.749	1	1.749	23.427	.001
Accesiones Promisorias	N° de brotes	.016	1	.016	4.310	.065
	N° de hojas	.003	1	.003	.008	.929
	N° de nudos	.563	1	.563	2.250	.165
	Longitud de brote	.000	1	.000	.002	.964
Error	N° de brotes	.036	10	.004		
	N° de hojas	3.647	10	.365		
	N° de nudos	2.500	10	.250		
	Longitud de brote	.747	10	.075		
Total	N° de brotes	29.030	16			
	N° de hojas	1508.108	16			
	N° de nudos	691.360	16			
	Longitud de brote	759.179	16			
Total corregido	N° de brotes	.139	15			
	N° de hojas	17.762	15			
	N° de nudos	4.920	15			
	Longitud de brote	2.792	15			

La prueba de Tukey muestra que existe una ligera diferencia significativa entre los medios de cultivo Woody Plant Medium (WPM) y Murashige & Skoog (M&S) (Cuadro N° 09), donde el medio WPM obtiene una media de 55.44 y el medio MS una media de 50.80.

Cuadro N° 9. Experimento N° 03. Prueba T (Tukey) para el análisis estadístico de medios de cultivo.

	Medios de cultivo	N	Media	Desviación típica	Error típico de la media
Valores t	MS	8	50.8013	3.15154	1.11424
	WPM	8	55.4425	5.59184	1.97701

La prueba de Tukey muestra que existe una ligera diferencia significativa entre el factor Accesiones promisorias representado por MD-14 y MD-15 (Cuadro N° 10), donde la accesión MD-14 obtiene una media de 56.19 y la accesión MD-15 una media de 50.04 (Ver Anexo 4.15).

Cuadro N° 10. Experimento N° 03. Prueba T (Tukey) para el análisis estadístico de accesiones promisorias.

	Accesiones promisorias	N	Media	Desviación típica	Error típico de la media
Valores t	Accesión MD-14	8	56.1950	5.26897	1.86286
	Accesión MD-15	8	50.0488	2.04000	.72125

En cuanto al crecimiento *in vitro*, se realizaron las evaluaciones correspondientes (Cuadro N° 11) y se obtuvo promedios totales para cada medio de cultivo y accesión promisorio utilizado (Ver Anexo 4.16).

Cuadro N° 11. Experimento N° 03. Promedios totales del crecimiento *in vitro* de segmentos nodales.

Medios de cultivo	Accesiones promisorias	N° de brotes	N° de hojas	N° de nudos	Longitud de brotes
WPM	MD-14	1.35	8.95	6.08	6.48
	MD-15	1.30	8.66	6.35	6.61
M&S	MD-14	1.40	10.33	6.65	7.28
	MD-15	1.33	10.68	7.13	7.14

- **Número de brotes**, se obtuvo un promedio de 1.40 para el medio de cultivo basal M&S y de 1.35 para WPM ambos de la accesión MD-014.
- **Número de hojas**, se obtuvo un 10.68 en promedio para la accesión MD-015 y de 10.33 para MD-014, ambos para el medio de cultivo basal M&S.
- **Número de nudos**, se obtuvo un 7.13 en promedio para la accesión MD-015 y un 6.65 para la accesión MD-014, ambos para el medio de cultivo basal M&S.
- **Longitud de brote**, se obtuvo un 7.28 en promedio para la accesión MD-014 y un 7.14 para MD-015, ambos para el medio de cultivo basal M&S. (Figura N° 4).

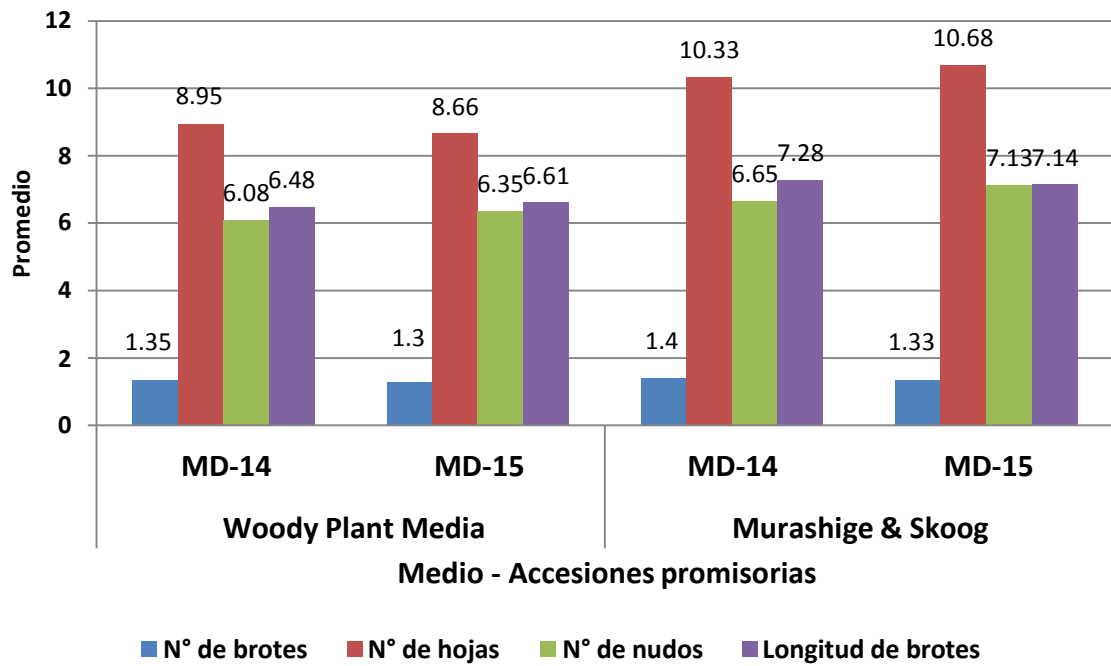


Figura N° 4. Crecimiento *in vitro* de los segmentos nodales de las dos accesiones MD-014 y MD-015 inoculados en los medios de cultivo Murashige & Skoog (MS) y Woody Plant Medium (WPM).

V. DISCUSIÓN

5.1. Contaminación

La desinfección superficial utilizada generalmente fue una limitante para la obtención de material aséptico libre de patógenos, por lo que es difícil establecer a condiciones *in vitro* los segmentos nodales de esta especie, coincidiendo con el trabajo realizado por **Ramírez et al. (1999)**, en donde mencionan el mismo problema para el cultivo *in vitro* de guayaba (*Psidium guajaba*). De igual modo **Gómez y Huaranca (1997)**, concluyen que el uso de hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones no resulto favorable para la desinfección de estacas de camu camu.

El seguimiento de los ensayos fue constante, destacando el protocolo con mejor respuesta en la desinfección de segmentos nodales de camu camu para el establecimiento *in vitro*. Según **Baus et al. (1996)**, mencionan que se trata de una especie arbustiva que, dentro de su estructura contiene células lignificantes, además está clasificada como una especie recalcitrante o difícil de ser propagada *in vitro*, debido a los problemas de remanentes de contaminación y oxidación (**Colque, 1989**).

La concentración de hipoclorito de sodio al 0.05% fue capaz de controlar la contaminación de los explantes siendo expuestas a tiempo de inmersión de 10 minutos, lo que contradice este resultado con el trabajo realizado por **Bhojwani & Razdan (1983)**, que mencionan que una concentración de 0.3 a 0.6% de hipoclorito de sodio durante 15 a 30 minutos es suficiente para descontaminar la mayoría de los tejidos.

Los resultados encontrados en el presente trabajo, demuestran que el camu camu siendo una planta leñosa es muy difícil de llevar a condiciones *in vitro*, incluso obtener material limpio, lo que se concuerda con los trabajos realizados por **Pierik (1990)**, que menciona que el material vegetal, a pesar de ser esterilizado antes de su aislamiento, no siempre es completamente estéril.

5.2. Oxidación

Con una dosis de 0.5 g/L de carbón activado se pudo controlar los problemas de oxidación en los explantes inoculados en el medio de cultivo basal, el C.A. produce específicamente una superficie interna muy grande (entre 500 - 1500 m²/g.) (**Holder, 1991**), debido a la formación de microporos proporcionando las condiciones para que tenga lugar el proceso de absorción (**Menéndez y Gullon, 2008**).

El C.A. permitió la absorción de los metabolitos tóxicos al contacto con el medio de cultivo, además por las reacciones químicas producidas por la presencia del ácido ascórbico, ya que la oxidación fenólica, aparece como consecuencia de los cortes durante la preparación de los explantes y de la acción de los desinfectantes sobre el tejido dañado, lo que constituye un serio problema para la sobrevivencia (**Sotolongo, 2003**), sobre todo de especies leñosas como el camu camu. Estos compuestos oxidados son altamente reactivos y fototóxicos (**Hu & Wang, 1983**), lo cual resulta letal para los explantes.

El efecto de C.A. suplementado al medio basal tuvo un 72% significativo en el control de la oxidación de los explantes y no se reportan trabajos similares en donde el antioxidante utilizado en el presente trabajo haya sido incorporado a un medio de cultivo.

5.3. Crecimiento y desarrollo de segmentos nodales en medios de cultivo

La alta tasa de mortalidad obtenida a inicio de los experimentos se asocia a la actividad de agentes fúngicos y bacterianos, que se alojan en los tejidos internos de los explantes extraídos (**Pierik, 1990**). El material vegetal crecido en laboratorio respondió al protocolo de desinfección y oxidación utilizadas, posiblemente por tener menos carga microbiana (**Ocampo y Núñez, 2007**).

Se determinó que la Accesoión MD-014 tuvo los índices las altos en cuanto al establecimiento in vitro (crecimiento y desarrollo) con un 75% en el medio de cultivo basal M&S sobre un 62% del medio WPM; para la Accesoión MD-15 se registro un

60% de establecimiento en el medio basal M&S y un porcentaje de 40% para el medio basal WPM para todos los explantes inoculados, esto podría deducirse por la respuesta del genotipo utilizado como explante.

Los mejores resultados se obtuvieron en el medio de cultivo basal M&S el cual permitió obtener las primeras plántulas con un desarrollo y crecimiento, en donde fue posible tomar los datos biométricos a los 60 días después de la transferencia al medio de cultivo basal. Los resultados obtenidos difieren con los de **Ocampo y Núñez (2007)**, que obtuvieron plántulas con mayor número de brotes a los 30 días con segmentos nodales de guayaba (*Psidium guajaba*) en el medio basal WPM, confirmando que este medio de cultivo basal es adecuado para especies leñosas debido a las sales minerales presentes en su composición.

El análisis estadístico muestran una alta significancia en cuanto a la longitud de brotes y N° de hojas que están interrelacionados entre sí en ambos medios de cultivo utilizado (Cuadro N° 11).

VI. CONCLUSIONES

- Los segmentos nodales de camu camu provenientes de estacas cultivadas en laboratorio lograron establecerse asépticamente, resultando con mejor respuesta que los explantes extraídos directamente de campo.
- Una concentración de hipoclorito de sodio (NaOCl) a 0.05% resulto más efectiva en el control de la contaminación sobre los explantes extraídos al ser expuesta a inmersión por un periodo de 10 minutos en la fase de desinfección profunda en cámara de flujo laminar.
- Existe una alta incidencia de microorganismos patógenos que están presentes en cualquier parte de la planta donante, que son principalmente hongos y bacterias de tipo endógeno, de difícil control y desinfección en laboratorio.
- La incorporación de carbón activado (C.A.) a 0.5 g/L al medio de cultivo basal fue favorable en el control de la oxidación debido a la alta tasa de absorción de los metabolitos tóxicos presentes en el medio basal o en los segmentos nodales inoculados.
- El medio de cultivo basal M&S tuvo una mejor respuesta a la adaptación, crecimiento y desarrollo de los explantes, no descartando la utilización del medio de cultivo basal WPM para trabajos con especies de la familia Myrtaceae, ya que este medio de cultivo está clasificado como específico para plantas leñosas.
- La aplicación de Panzil en la parte apical de las estacas como pasta impermeable y la aplicación por aspersión de Vitavax 0.5 g/L, permitió obtener brotes jóvenes con menos carga microbiana, adecuados para la extracción e inoculación en los medios de cultivo basales.

VII. RECOMENDACIONES

- Se requiere desarrollar otras investigaciones en cuanto a las composiciones minerales de los medios de cultivos basales que se emplean en el cultivo *in vitro* y los tipos de reguladores de crecimiento aplicados en los experimentos.
- Se debe tener en cuenta la dosificación y periodos de inmersión de los explantes en las concentraciones de desinfectantes a utilizar, ya que muchos de estos productos son tóxicos para los tejidos vegetales.
- Estudiar los efectos de otros compuestos antioxidantes que se pudieran incorporar a los medios de cultivo basales, y teniendo en cuenta que los explantes de camu camu son muy susceptibles a cambios mínimos de manejo e incluso el protocolo aplicado en nueva para esta especie en nuestra región.
- La aplicación mediante aspersion con Vitavax a las estacas en ambientes cerrados como un laboratorio, deben realizarse en días no laborables, ya que es un producto irritante al contacto con los ojos y la piel produciendo complicaciones alérgicas.
- La propagación vía organogénesis directa en la especie camu camu a partir de segmentos nodales jóvenes apicales, es recomendable para obtener con poca cantidad de explantes tasas altas en el establecimiento *in vitro* (crecimiento y desarrollo) al ser estas partes apicales una zona de alta actividad meristemática.
- Se debe evitar la inestabilidad de los explantes (segmentos nodales) inoculados en los medios de cultivo basales, mediante la utilización de adecuadas concentraciones de compuestos minerales y desinfectantes recomendables en trabajos previos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARADO VÉRTIZ, M.A.; 1969.** Posibilidades del cultivo del camu camu en el Perú Myrciaria dubia. Monografía, Pontífica Universidad Católica del Perú.
- AMIN, M.N. AND V.S. JAISWAL.; 1988.** Micropropagation as an aid to rapid cloning of guava cultivar. *Scientia Horticulturae* 36: 89 – 95 pp.
- APG II (The Angiosperm Phylogeny Group). 2003.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. The Linnean Society of London, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141: 399-439.
- AZCON, J.; 2000.** Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc Graw Hill Interamericana, Madrid.
- BARRIGA, R.; 1994.** Plantas Útiles de la Amazonía Peruana: Características, Usos y Posibilidades. Lima (Perú): CONCYTEC. 80 - 84 pp.
- BARCILLO, A., 1992.** Fisiología Vegetal. Editorial Pirámide. Madrid – España.
- BHOJWANI, S.S. AND M.K. RAZDAN. 1983.** Plant Tissue Culture. Theory and Practice. Elsevier. New York. 235 pp.
- CALZADA B. J.; 1980.** Frutales nativos. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Agronomía. 1^{era} Edición. Edit “El Estudiante”. Lima –Perú. 316 pp.
- CRONQUIST, A.; 1988.** The Evolution and Classification of Flowering Plants. 2^o Ed. The New York Botanical Garden. Brown. New York – USA.

- CHÁVEZ, W.; 1993.** Camu camu. En: Clay, C.W.; Clement, C.R. (ed.). *Selected species and strategies to enhance income generation from Amazonian forest* FO: Misc.93/6. Working Paper. Rome: FAO. pp. 39 -146.
- DÁVILA, F.S.; 2000.** Determinación del método de colección y conservación In vitro del grano de polen de camu camu (*Myrciaria dubia*) Mc Vaugh, Iquitos – Perú. 80 pp.
- DELGADO, C. & COUTURIER, G. 2004.** Manejo de insectos plagas en la Amazonía: Su aplicación en camu camu. IIAP – Iquitos/ IRD – Francia. Lima - Perú. 147 p.
- FERREIRA, R.; 1959.** Camu camu, nueva fuente nacional de vitamina C. Boletín Experimental Agropecuario, 7 : 28 pp.
- FONTÚRBEL, F.; 2001.** Micropropagación de un cultivo perenne Revista Biología. Pág. 6.
- FLORES, S.; 1997.** Cultivo de Frutales Nativos Amazónicos. Manual para el Extensionista. En: *Tratado de Cooperación Amazónica*. Lima (Perú): Secretaría Pro Tempore. pp. 55-62.
- GÓMEZ, A. M. J.; HUARANCA, A. R. J.; 1997.** Establecimiento In vitro de propágulos de camu camu *Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh. Tesis para optar el título de Biólogo– UNAP. Iquitos – Perú. 43 pp.
- HOLDING B.V. 1991.** Wastewater Engineering; Metcalf & Hedí. Agua Residual & Purificación del aire. Tercera edición. Rotterdamseweg 402 M. 2629 HH Delft, Holanda. Pág. 317.
- HURTADO, M. D. V. y MERINO, M. M. E.; 1994.** Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas. Tercera reimpresión. Impreso en México, 232 pp.
- HU, C. V. & WANG, J. 1983.** Meristem Shoot tip and bud cultura. En: Handbook of plant cell. (Eds) Evans, D.A.; P.V. Ammirato and Y. Yameda. Pág. 256 - 290.

- IMAN, C.S.; 1996.** Bancos de germoplasma vegetal. Programa Nacional de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología. Estación Experimental. San Roque – INIA - Iquitos. Mecnografiado. 19 pp.
- IMAN, C. S.; 2000.** Cultivo del camu camu *Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh en la región Loreto. Serie manual N° 01 – 00. Iquitos – Perú. 32 pp.
- IMAN, C. S. & MELCHOR, A. M.; 2007.** Tecnología para la producción del camu camu *Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh en la región Loreto. Serie Manual N° 1 - 07. Lima – Perú. 51 p.
- LOCY, R. D.; 1984.** Notes on principles and applications; state of the art. ATAS Bulletin (EE. UU.) 1: 8 - 13 pp.
- LOH, C.S. Y A.N. RAO. 1989.** Clonal propagation of guava (*Psidium guajava*) from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formation *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 39: 31 – 39 pp.
- LÓPEZ, A.; 2003.** Dinámica poblacional y caracterización biofísica de camu camu árbol (*Myrciaria* spp.) en Ucayali. IIAP-PET.
- MARAYANAS, S.; 1977.** Regeneration of plants from tissue culture. In: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. (J. Reinert y P. S. Bajaj Eds.) Springer Verlag. Berlín. 179 – 206 pp.
- MENDOZA, R.O.; PICON, C.; GONZALES, J.; CARDENAS, R.; PADILLA, T.; MEDIAVILLA, G.M.; ILERAS, E.; & DELGADO, F.E.1989.** Expedición de recolección de Germoplasma de Camu camu (*Myrciariadubia*) Mc Vaugh en la Amazonía Peruana. Informe Técnico N° 11. Programa Nacional en Cultivos Tropicales. INIA. Lima, 19 pp.
- MENÉNDEZ, D. A. & GULLON, I. M. 2008.** Activated carbón surfaces In Environmental Remediation. Charpter 1.Types of carbon adsorbents and their production.

- MOHAMED-YESSEN, M.Y., S.A. BARRINGER, R.J. SCHNELL Y W.E. SPLITTSTOESSER.1995.** *In vitro* shoot proliferation of guava (*Psidium guajava* L.) from germinated seedlings. Plant Cell Rep. 14: 525 – 528 pp.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F.; 1962.** A revised médium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture.In: Physiology Plantarum (Dinamarca). 15 (3). 473 – 497 pp.
- OCAMPO, F. & V. M., NÚÑEZ. 2007.** Propagación *in vitro* de *Psidium guajaba* mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. Artículo científico. Revista Corpoica – Ciencia y tecnología agropecuaria. 2007 – 8 (1), Pág. 22 – 27.
- PAPADADATOU, P. Y C.A. PONTIKIS. 1990.** Rapid multiplication of guava seedling by *in vitro* shoot tip culture. Science Horticulturae 45: 99 – 103 pp.
- PÉREZ-TORNERO, O., L. EGEA, A. VANOOSTENDE Y L. BURGOS. 2000.** Assessment o factor affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. Plant Science 158: 61 – 70 pp.
- PETERS, C. M.; VÁSQUEZ, M. A.; 1986.** Estudios Ecológicos de Camu camu *Myrciaria dubia*. I. Producción de Frutos en Poblaciones Naturales. En: *Acta Amazónica* 16 -17 (Número único). Brasil. pp. 161-174.
- PETERS, C. M.; VÁSQUEZ, M. A.; 1987.** Estudios Ecológicos de Camu camu *Myrciaria dubia*. I. Producción de Frutos en Poblaciones Naturales. *Acta Amazónica* 16 /17: 161-173.
- PETERS, C. M.; VÁSQUEZ, M. A.; 1988.** Estudios ecológicos de camu camu (*Myrciaria dubia*) Producción de frutos en poblaciones naturales. *Folia Amazónica*, 1: 83 - 98.
- PIERIK R. L.; 1990.** Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Edíc. Mundi. Prensa. España. 326 pp.

- PICON, B.C. & ACOSTA, V.A.; 1999.** Manual de los sistemas de producción de camu camu en la selva baja. Iquitos (Perú), Centro de estudio y promoción de tecnologías de especies nativas de la Amazonía, Iquitos, 20 pp.
- PICON, B. C. & ACOSTA, V. A.; 2000.** Cultivo de camu camu (*Myrciaria 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, F. S.; 1998.** Propagación *In vitro* de la Uña de Gato “*Uncaria guianensis* (Aubl) GMEL”. Tesis para optar el título de Ingeniero agrónomo. Iquitos - Perú. 148 pp.
- PINEDO, P.M.; RIVA, R.R.; RENGIFO, S.E.; DELGADO, V.C.; VILLACRÉS, V.J.; GONZALES, C.A.; INGA, S.H.; LÓPEZ, U.A.; FARROÑAY, P.R.; VEGA, V.R. & LINARES, B.C. 2001.** Sistema de producción de camu camu en restinga. IIAP/PET. Iquitos – Perú. 141 pp.
- 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 Amazonía Peruana (IIAP) – Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). Artículo Científico. 6 pp.
- PINEDO, P.M.; LINARES, C.; MENDOZA, H. & ANGUIZ, R.; 2004.** Plan de Mejoramiento Genético del Camu camu. IIAP. 52 pág. Iquitos – Perú.
- PINEDO, P.M.; LÓPEZ, U.A.; INGA, S.H.; OLIVA, C. & FARROÑAY, P.R. 2006.** Evaluación de coberturas y otras especies asociadas en plantaciones de camu camu *Myrciaria dubia* Mc Vaugh (H.B.K.) Enero. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP). Publicaciones Memoria Anual. Artículo de divulgación poster 2 - Enero.
- RAMIREZ - VILLALOBOS, M.C. & E. SALAZAR – YAMARTE. 1997.** Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajaba*). Revista Facultad de Agronomía (Universidad de Zulia) 14: 497 - 506 pp.

- RAMIREZ – VILLALOBOS, M.C.; S. LEÓN DE SIERRALTA & A. URDANETA. 1999.** Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajaba* L. y *Psidium friedrich-sthalianum*. Revista Facultad de Agronomía (Universidad de Zulia) 16: 243 - 255 Pág.
- ROCA, A.; 1965.** Estudio Bromatológico de *Myrciaria paraensis* Berg. Tesis, Facultad de Química, UNMSM, Lima, 54 pp.
- ROCA, W. M. & MROGRINSKI, L. A.; 1991.** Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Colombia. 968 pp.
- ROCA, W. M. & MROGRINSKI, L. A.; 1993.** Cultivo de Tejidos en la Agricultura. *Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Cali – Colombia. P. 127 – 141.*
- RODRIGUEZ, R.B.; DE MENEZES, H.C.; CABRAL, L.M.C.; DORNIER, M. & REYNES, M.; 2001.** An amazonian fruti with high potencial as a source of vitamin C: the camu camu (*Myrciaria dubia*). Fruits, 56 (5): Pág. 345 – 354.
- SÁNCHEZ, C.M. & SALAVERRÍA, J.L. 2004.** Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch). Revista Agrícola UDO Agrícola. Vol. 4, N° 01, Pág. 21 - 26.
- SANTANA, N. M. & GONZÁLES, M.; 1988.** Embriogénesis Somática en el cultivo del Café *Coffe arabica*. Parte I. Cultivos tropicales. 10 (2): 36 – 43.
- SALINAS, A.; 1995.** Desinfección y Determinación de explantes para la propagacion In vitro de *Cedrelinga cateniformes* (Ducke) Ducke. Tesis Ing. Forestal. UNAS Tingo Maria – Perú. 100 pp.
- SEEMAN; 1993.** Medios de cultivo. 2da. Edición. Editorial GARZA S.A. México D. F. Pág. 156

- SERVICIO DE APOIO AS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS DO ACRE (SEBRAE).; 1995.** *Camu camu: opcoes de investimento no Acre con produtos florestais nao madeireiros.* Río Branco (Brasil): SEBRAE. 28 pp.
- SINGH, S.K., R.R. MEGHWAL, H.C. SHARMA Y S.P. SINGH. 2002.** Direct shoot organogénesis on hypocotyl explants from *in vitro* germinated seedlings of *Psidium guajaba* L. c.v. Allahabad Safeda. *Scientia Horticulturae* 95: 213 – 221 pp.
- SOTOLONGO, R.S., CARCÍA, L.M. & JUNCO, C.L..; 2003.** **Micropropagación de *Psidium salutare* (Myrtaceae)** *Revista del Jardín Botánico Nacional* 24 (1-2): 245 - 250 pp.
- TORIBIO, M.; C. FERNANDEZ, C. CELESTINO, M.T. MARTINEZ, M.C. SANJOSE Y A.M. VIEITEZ. 2004.** Somatic Embryogenesis in mature *Quercus* rubber trees. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 76: 283 – 287 pp.
- UTIA, P.M.; 1979.** Propagación del Arazá (*Eugeniastipitata*) Mc Vaugh y Camu camu (*Myrciariaparaensis* BergSin. *Myrciariadubia* Mc Vaugh) (HBK) Tesis agronomía. UNAP. Iquitos – Perú. 81 pp.
- VÁSQUEZ, M. A.; 2000.** *El Camu Camu. Cultivo, Manejo e Investigaciones.* Iquitos (Perú): Editora Gráfica e Imprenta Universal S.R.L. 218 pp.
- VEIGA, J. B. & YUYAMA, K. 2005.** Producao de mudas de *Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh por meio de estacas submetidas a concentrações do ácido índol butírico (AIB). Propagacao vegetativa de *Myrciaria dubia*.
- VILLACHICA, L.H.; 1996.** El cultivo del camu camu (*Myrciariadubia*) Mc Vaugh en la Amazonía Peruana. TCA - Secretaria Pro Tempore. Lima N° 46 - 95 pp.
- WEISS, D. K.; 1998.** *Un estudio del mercado mundial para Camu camu.* Winrock International. Proyecto de Desarrollo Alternativo USAID/CONTRADROGAS. Convenio USAID - INADE. 18 pp.

IX. ANEXOS

Anexo 1

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 Manganeso	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. HCl	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.
Sacarosa			7.5 g./L.	15 g./L.	30 g./L.
Agar Agar			2 g./L.	2 g./L.	2 g./L.
pH			5.70	5.70	5.70

Anexo 2

COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL MEDIO DE CULTIVO WOOD PLANT MEDIUM (WPM, 1960).

Componentes	(mg./L)
Ácido Bórico	6.2
Cloruro de Calcio	72.5
Nitrato de Calcio	386.0
Sulfato de Cobre	0.25
Sal Sódica EDTA	37.3
Sulfato Ferroso	27.8
Sulfato de Manganeso	22.3
Molibdato de Sodio	0.25
Sulfato de Zinc	8.6
pH	3.2

Anexo 3

FICHA DE EVALUACIÓN EN EL ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE SEGMENTOS NODALES DE *Myrciaria dubia*

Ejecutor:

Fecha de Siembra:/...../.....

Número de Repeticiones:

Experimento N°...../ Fecha de Evaluación:/...../.....

Condiciones del Experimento		
Tratamiento	Medio de Cultivo	Condiciones del Cultivo

Evaluaciones										
Nº de Tubos	Nº de Brotes	Contaminación			Oxidación				Crecimiento	Observaciones
		B	H	B/H	1	2	3	4		
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										

Leyenda:

✓ **Contaminación:**

B: Bacterias.

H: Hongos.

B/H: Bacterias y hongos.

✓ **Oxidación:**

1: 25% de Oxidación.

2: 50% de Oxidación.

3: 75% de Oxidación.

4: 100% de Oxidación

Anexo 4

LISTA DE CUADROS Y GRÁFICOS ESTADÍSTICOS

Anexo N° 4.1 Experimento N° 01. Análisis de Varianza para el afecto del factor desinfectante sobre los segmentos nodales inoculados.

Concentraciones de desinfectante (NaOCl)	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
0.04 %	4	50.8325	4.81379	2.40689	43.1727	58.4923	45.00	56.79
0.05 %	4	67.5000	4.68808	2.34404	60.0402	74.9598	63.44	71.56
0.06 %	4	56.9475	5.17570	2.58785	48.7118	65.1832	50.77	63.44
0.07 %	4	53.7800	3.47565	1.73782	48.2495	59.3105	50.77	56.79
Total	16	57.2650	7.68362	1.92090	53.1707	61.3593	45.00	71.56

Anexo N° 4.2. Experimento N° 01. Prueba HSD de Tukey, comparaciones múltiples

	(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencias de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	0.04%	0.05% NaOCl	-16.66750(*)	3.24073	.001	-26.2889	-7.0461
		0.06% NaOCl	-6.11500	3.24073	.284	-15.7364	3.5064
		0.07% NaOCl	-2.94750	3.24073	.800	-12.5689	6.6739
	0.05%	0.04% NaOCl	16.66750(*)	3.24073	.001	7.0461	26.2889
		0.06% NaOCl	10.55250(*)	3.24073	.030	.9311	20.1739
		0.07% NaOCl	13.72000(*)	3.24073	.006	4.0986	23.3414
	0.06%	0.04% NaOCl	6.11500	3.24073	.284	-3.5064	15.7364
		0.05% NaOCl	-10.55250(*)	3.24073	.030	-20.1739	-.9311
		0.07% NaOCl	3.16750	3.24073	.765	-6.4539	12.7889
	0.07%	0.04% NaOCl	2.94750	3.24073	.800	-6.6739	12.5689
		0.05% NaOCl	-13.72000(*)	3.24073	.006	-23.3414	-4.0989
		0.06% NaOCl	-3.16750	3.24073	.765	-12.7889	6.4539

* La diferencia de medias es significativa al nivel .05

Anexo N° 4.3. Experimento N° 01. Estimación Curvilínea para el tratamiento desinfectante.

Nombre del modelo		Desinfectante (NaOCl)
Variable dependiente	1	No contaminación
Ecuación	1	Cúbico
Variable independiente		Tratamientos
Constante		Incluidos
Variable cuyos valores etiquetan las observaciones en los gráficos		Sin especificar
Tolerancia para la entrada de términos en ecuaciones		.0001

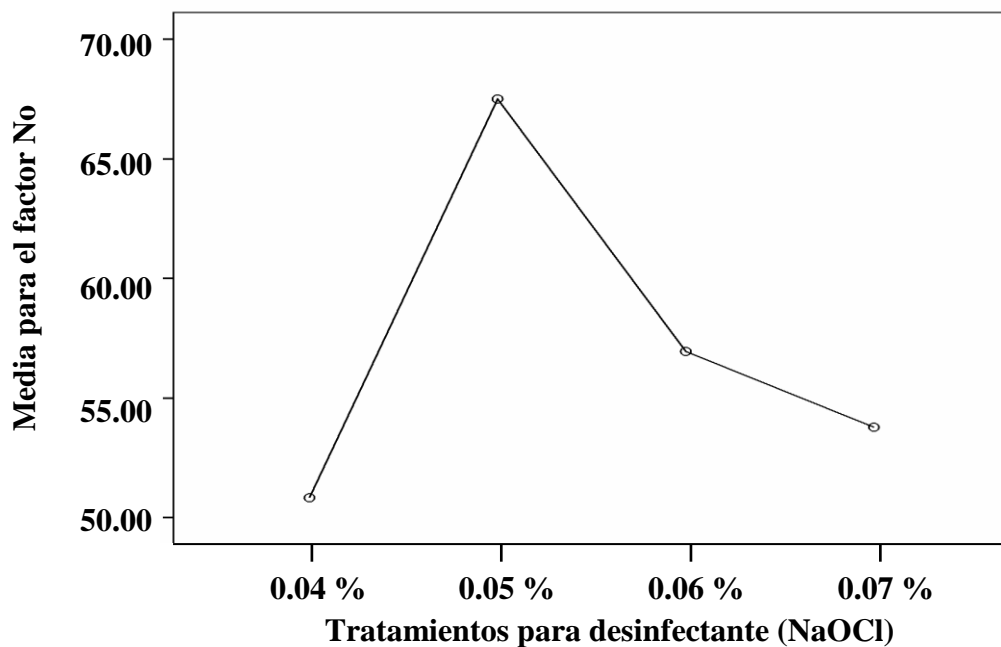
Anexo N° 4.4. Experimento N° 01. Resumen del modelo cúbico aplicado al tratamiento desinfectante.

R	R cuadrado	R cuadrado corregido	Error típico de la estimación
.846	.715	.644	4.583

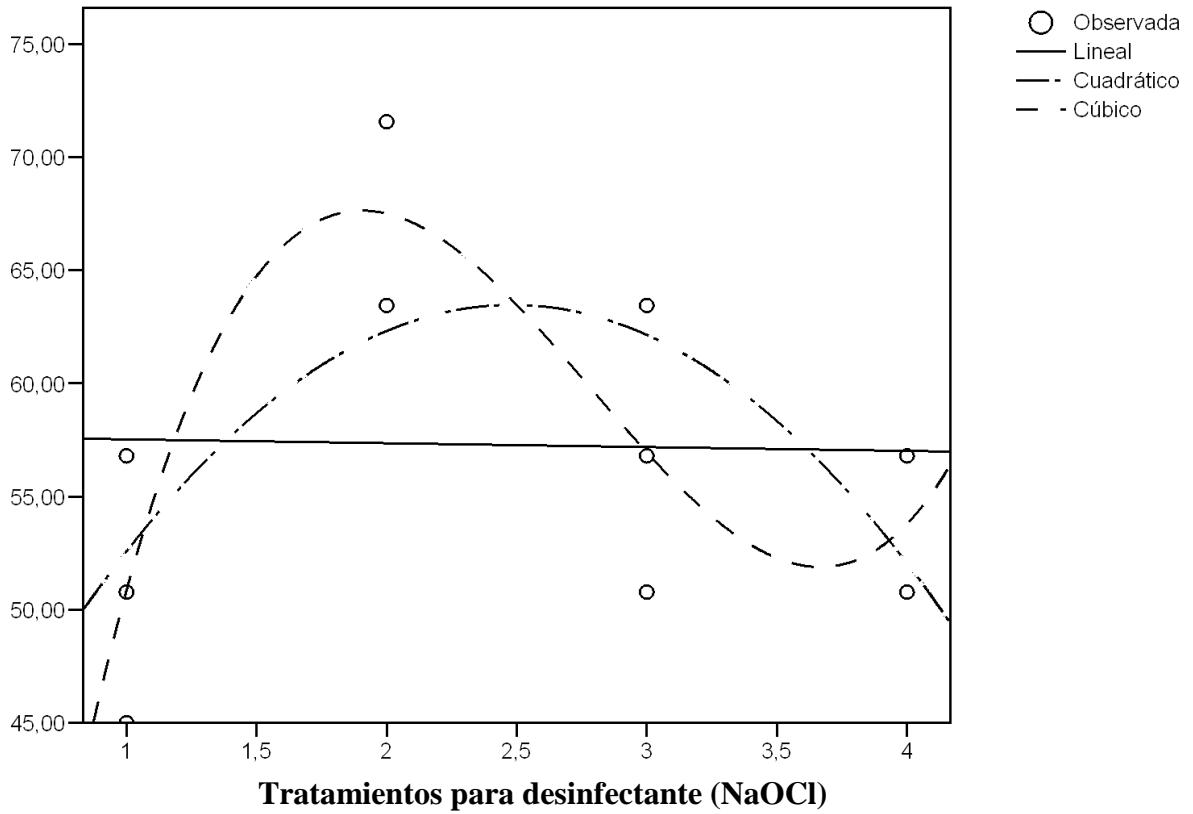
Anexo N° 4.5. Experimento N° 01. Coeficientes para la variable desinfectante.

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error típico	Beta	B	Error típico
Tratamiento	120.940	29.112	18.175	4.154	.001
Tratamiento**2	-48.215	12.861	-36.804	-3.749	.003
Tratamiento**3	5.767	1.708	18.950	3.377	.006
Constantes	-27.660	19.035		-1.453	.172

Anexo N° 4.6. Medias para el tratamiento desinfectante (NaOCl).



Anexo N° 4.7. Curva de estimación para el tratamiento desinfectante (NaOCl).



Anexo N° 4.8. Experimento N° 02. Análisis de Varianza para el afecto del factor antioxidante sobre los segmentos nodales inoculados.

Antioxidante (C.A.)	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
0.25 g	4	42.1150	3.33131	1.66566	36.8141	47.4159	39.23	45.00
0.50 g	4	58.4525	3.32500	1.66250	53.1617	63.7433	56.79	63.44
0.75 g	4	36.2200	3.47565	1.73782	30.6895	41.7505	33.21	39.23
1.00 g	4	37.4425	10.28203	5.14101	21.0815	53.8035	26.56	50.77
Total	16	43.5575	10.58476	2.64619	37.9173	49.1977	26.56	63.44

Anexo N° 4.9. Experimento N° 02. Prueba HSD de Tukey, comparaciones múltiples

	(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencias de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	0.25 g C.A.	0.50 g C.A.	-16.33750(*)	4.18261	.010	-28.7552	-3.9198
		0.75 g C.A.	5.89500	4.18261	.517	-6.5227	18.3127
		1.00 g C.A.	4.67250	4.18261	.686	-7.7452	17.0902
	0.50 g C.A.	0.25 g C.A.	16.33750(*)	4.18261	.010	3.9198	28.7552
		0.75 g C.A.	22.23250(*)	4.18261	.001	9.8148	34.6502
		1.00 g C.A.	21.01000(*)	4.18261	.001	8.5923	33.4277
	0.75 g C.A.	0.25 g C.A.	-5.89500	4.18261	.517	-18.3127	6.5227
		0.50 g C.A.	-22.23250(*)	4.18261	.001	-34.6502	-9.8148
		1.00 g C.A.	-1.22250	4.18261	.991	-13.6402	11.1952
	1.00 g C.A.	0.25 g C.A.	-4.67250	4.18261	.686	-17.0902	7.7452
		0.50 g C.A.	-21.01000(*)	4.18261	.001	-33.4277	-8.5923
		0.75 g C.A.	1.22250	4.18261	.991	-11.1952	13.6402

* La diferencia de medias es significativa al nivel .05

Anexo N° 4.10. Experimento N° 02. Estimación Curvilínea para el tratamiento antioxidante.

Nombre del modelo		Antioxidante
Variable dependiente	1	No oxidación
Ecuación	1	Cúbico
Variable independiente		Tratamientos
Constante		Incluidos
Variable cuyos valores etiquetan las observaciones en los gráficos		Sin especificar
Tolerancia para la entrada de términos en ecuaciones		.0001

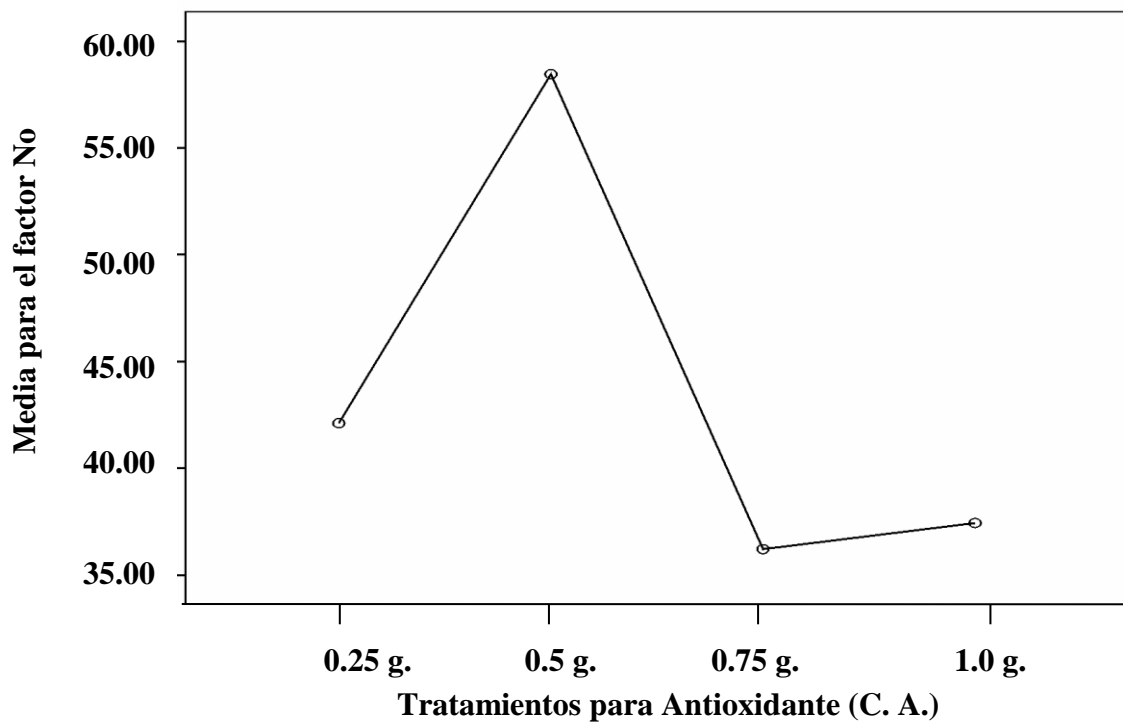
Anexo N° 4.11. Experimento N° 02. Resumen del modelo cúbico aplicado al tratamiento antioxidante.

R	R cuadrado	R cuadrado corregido	Error típico de la estimación
.866	.750	.688	5.915

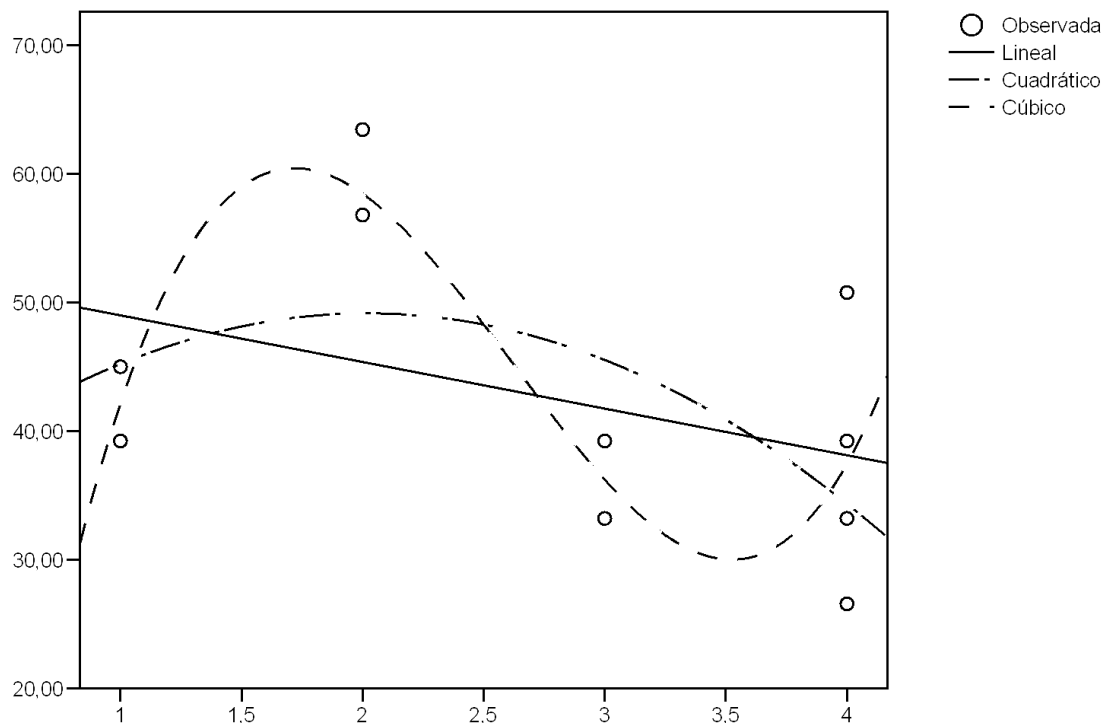
Anexo N° 4.12. Experimento N° 02. Coeficientes para la variable antioxidante.

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error típico	Beta	B	Error típico
Tratamiento	187.905	37.572	20.499	5.001	.000
Tratamiento**2	-81.310	16.599	-45.055	-4.898	.000
Tratamiento**3	10.338	2.204	24.646	4.689	.001
Constantes	-74.817	24.567		-3.045	.010

Anexo N° 4.13. Medias para el tratamiento antioxidante (C.



Anexo N° 4.14. Curva de Estimación para el tratamiento Antioxidante (C.A.)



Anexo N° 4.15. Experimento N° 03. Prueba de muestras independientes para medios de cultivo.

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencias de medias	Error típico de la diferencia	95% intervalo de confianza para la diferencia	
								Superior	Inferior
Se han asumido varianzas iguales	5.893	.029	-2.045	14	.060	-4.64125	2.26938	-9.50860	.22610
No se han asumido varianzas iguales			-2.045	11.039	.065	-4.64125	2.26938	-9.63396	.35146

Anexo N° 4.16. Experimento N° 03. Prueba de muestras independientes para accesiones promisorias.

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencias de medias	Error típico de la diferencia	95% intervalo de confianza para la diferencia	
								Superior	Inferior
Se han asumido varianzas iguales	5.635	.032	3.077	14	.008	6.14625	1.99761	1.86180	10.43070
No se han asumido varianzas iguales			3.077	9.053	.013	6.14625	1.99761	1.99761	10.66117

Anexo 5
LISTA DE FOTOS



Foto N° 01. Campo Experimental “El Dorado” - INIA, Colección Nacional de Camu camu.



Foto N° 02. Acceso Promisoria MD - 014, C.E. “El Dorado” - INIA.



Foto N° 03. Selección y colecta de varas yemas Accessión MD - 014



Foto N° 04. Transporte de muestras al laboratorio.



Foto N° 05. Brotes jóvenes de 25 días después de la instalación del experimento.



Foto N° 06. Estacas con brotes jóvenes a los 35 días después de la instalación del experimento.



Foto N° 07. Brote segmentado.



Foto N° 08. Desinfección de los brotes con NaOCl en cámara de flujo laminar.



Foto N° 09. Enjuague de los brotes con agua destilada estéril.



Foto N° 10. Eliminación de hojas y obtención de los segmentos nodales.



Foto N° 11. Inoculación de los segmentos nodales en medio de cultivo basal.



Foto N° 12. Evaluación en crecimiento de los segmentos a los 60 días después de la inoculación al medio basal.



Foto N° 13. Crecimiento de segmentos nodales en medio de cultivo, apreciación de hojas y nudos.



Foto N° 14. Vista de la elongación *in vitro* que alcanzan los segmentos nodales en el medio de cultivo basal.



Foto N° 15. Problemas de contaminación de los explantes en el medio de cultivo basal.