



UNAP



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**“ENSAYO DE TRES MEDIOS DE CULTIVO PARA LA
MICROPROPAGACION DE *Croton lechleri* Muell Arg.**

“Sangre de grado”

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIOLOGA**

PRESENTADO POR:

KARINA VELA VÁSQUEZ

ASESORES:

Blgo. ROBERTO PEZO DÍAZ, Dr.

Ing. ITALO CARDAMA VASQUEZ, M.Sc.

IQUITOS, PERÚ

2011



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Iquitos, 01 de agosto de 2011

En la ciudad de Iquitos, al primer día del mes de agosto del 2011 y, siendo las 4.15 PM horas; se reunió en el sala de Conferencias de la Facultad de Ciencias Forestales, el Jurado Calificador y Dictaminador de tesis que suscribe, designado con Resolución Directoral N° 028-2000-DEFP-B-FCB-UNAP, presidido e integrado por; Blga. **FELICIA DIAZ JARAMA, M.Sc.**, (Presidenta); Blga. **TERESA DE JESÚS MORI DEL ÁGUILA, M.Sc.**, (Miembro) y Blgo. **MANUEL FLORES AREVALO, Dr.** (Miembro), para escuchar, examinar y calificar la sustentación y defensa de la tesis titulada: "**ENSAYO DE TRES MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MICROPROPAGACIÓN *Croton lechleri* Muell Arg. "Sangre de grado"** realizada por la Bachiller en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Biológicas-Escuela de Ciencias Biológicas, **KARINA VELA VASQUEZ**, de la promoción I-1999, graduada de Bachiller con R.R. N° 066-2001-UNAP de fecha 09 de enero 2001.

Luego de realizada la sustentación de la Tesis, la bachiller fue sometida a un interrogatorio sobre el tema en cuestión, habiéndose absuelto de manera SATISFACTORIO 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, dió como veredicto: APROBAR la tesis por UNANIMIDAD quedando la candidata apta para ejercer la profesión de Biólogo, previo otorgamiento de Título Profesional por la autoridad universitaria competente y, su correspondiente inscripción al Colegio de Biólogos del Perú.

Finalizado el acto, la Presidenta del Jurado Calificador y Dictaminador levantó la sesión siendo las 5.35 PM horas y en fe de lo cual, todos los integrantes suscriben la presente Acta de sustentación por triplicado.


Blga. **FELICIA DIAZ JARAMA, M.Sc.**
PRESIDENTA


Blga. **TERESA DE JESÚS MORI DEL ÁGUILA, M.Sc.**
MIEMBRO


Blgo. **MANUEL FLORES AREVALO, Dr.**
MIEMBRO



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

[Signature]
Blgo. Javier Sando Tecco M. S.
SECRETARIO ACADÉMICO



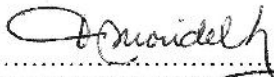
[Signature]
Euzelia Tejeda Del Carril
Jefe de Registro y Control Académico



JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



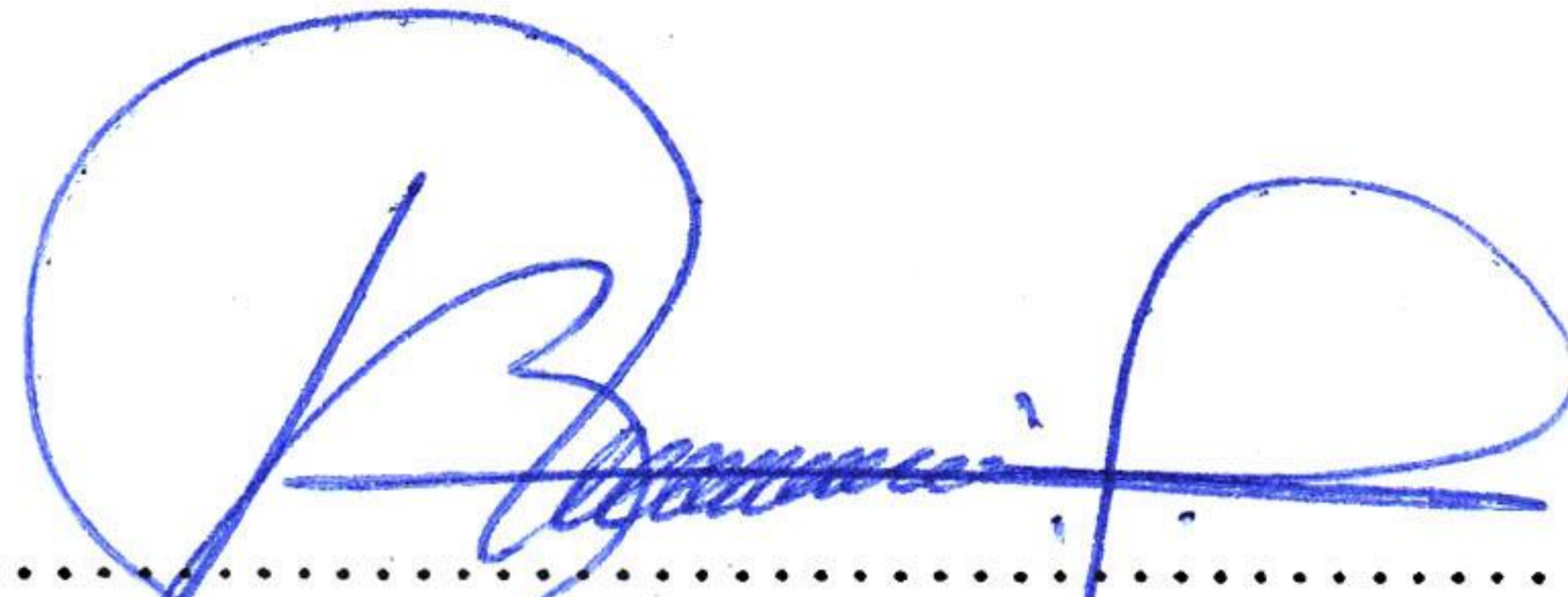
.....
Blga. FELICIA DIAZ JARAMA, Msc
PRESIDENTA



.....
Blga. TERESA DE JESUS MORI DEL AGUILA, Msc.
MIEMBRO

.....
Blgo. MANUEL FLORES ARÉVALO, Dr. †
MIEMBRO

ASESORES



.....
Blgo. ROBERTO PEZO DÍAZ, Dr.
ASESOR - UNAP



.....
Ing. ITALO CARDAMA VÁSQUEZ, MSc.
CO - ASESOR - INIA

DEDICATORIA

AL DIOS DE LA VIDA

A MIS PADRES

MARIA AGUEDA VASQUEZ RUIZ

ROQUE VELA LOPEZ y TODOS MIS HERMANOS

A ANGEL LUCAS

L. T. VELA

AGRADECIMIENTO

Agradezco al Ing. M.Sc. Italo O. Cardama Vásquez, Director de la Estación Experimental “San Roque” INIA, y en su persona al Instituto Nacional Investigación Agraria, por su apoyo en la parte de laboratorio de éste trabajo.

Mi agradecimiento al Ing. Guillermo Hidalgo Dávila, por su apoyo incondicional en el presente trabajo; al Biólogo Roberto Pezo Díaz Dr por su asesoría en el presente trabajo; al Biólogo Richard Huaranca Acostupa por su apoyo; al Biólogo Nelson Espinoza Ramírez (†) por apoyarme a inicios del trabajo; al Dr. Luis Campos Baca en representación al Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP); por las facilidades brindadas para la colecta del material vegetal.

Igualmente, debo reconocer sinceramente a todas aquellas personas que de alguna manera colaboraron e hicieron posible el desarrollo de éste trabajo de investigación.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS.....	ii
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR.....	iv
ASESORES.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
INDICE DE CONTENIDO.....	viii
INDICE DE CUADROS.....	xii
INDICE DE GRAFICOS.....	xvii
ANEXOS.....	xix
RESUMEN.....	xx
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo general.....	3
2.2. Objetivo específicos.....	3
III. REVISION DE LITERATURA.....	4
3.1. Generalidades.....	4
3.2. Medios de cultivo.....	4
3.3. Propagación in vitro.....	6
3.4. Propagación convencional.....	8
3.5. Aspectos generales de la especie.....	12
3.6. Distribución.....	13
3.7. Descripción botánica del genero <i>Croton</i>	15

3.8. Descripción dendrológica de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg.....	16
3.9. Características Ecológicas y Clima.....	17
3.10. Composición Química, Farmacológica y actividad biológica.....	18
IV. MATERIALES Y METODOS.....	22
4.1. Descripción del Área de Estudio.....	22
4.2. Material Biológico.....	22
4.3. Material de Campo.....	23
4.4. Material de Laboratorio y Equipos.....	23
A. EQUIPOS.....	23
B. MATERIALES DE VIDRIO.....	23
C. DESINFECTANTE.....	23
D. OTROS.....	24
4.5. Metodología.....	25
4.6. Desinfección del material vegetal.....	26
4.7. Siembra del material vegetal.....	27
4.8. Condiciones de cultivo.....	27
4.9. Diseño estadístico.....	28
4.10. Población y muestra.....	28
4.11. Experimento.....	28
4.12. Evaluaciones.....	34
4.13. Procesamiento de la muestra.....	34

V. RESULTADOS.....	35
5.1. Experimento 1: Germinación y brotamiento.....	35
A. CONTAMINACION.....	35
B. GERMINACION Y BROTAMIENTO.....	38
5.2. Experimento 2. Crecimiento y Desarrollo.....	42
A. CONTAMINACION.....	42
B. SOBREVIVENCIA DE LAS YEMAS APICALES.....	45
C. NUMEROS DE HOJAS.....	48
D. NUMERO DE NUDOS.....	52
E. ALTURA DE LA VITROPLANTA.....	55
F. NUMERO DE RAIZ.....	58
5.3. Experimento 3: Multiplicación o Proliferación.....	60
A. CONTAMINACION.....	60
B. SOBREVIVENCIA.....	60
C. NUMERO DE HOJAS.....	60
D. NUMERO DE NUDO.....	62
E. ALTURA DE LA VITROPLANTULA.....	66
5.4. Experimento 4: Erraizamiento.....	69
A. CONTAMINACION.....	69
B. SOBREVIVENCIA.....	69
C. OXIDACION.....	72

D. NUMERO DE HOJAS.....	73
E. NUMERO DE NUDOS.....	75
F. ALTURA DE LA VITROPLANTULA.....	77
G. NUMERO DE RAIZ.....	79
VI. DISCUSION.....	82
6.1. Experimento No. 1 Germinación y Brotamiento.....	82
6.2. Experimento No. 2 Crecimiento y Desarrollo.....	83
6.3. Experimento No. 3 Multiplicación o Proliferación.....	88
6.4. Experimento No. 4 Enraizamiento.....	89
VII. CONCLUSIONES.....	93
VIII. RECOMENDACIONES.....	94
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	95
X. ANEXO.....	101

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°1: Análisis de varianza de la variable contaminación sobre explantes de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para los factores A, B, C e interacciones AB, AC, BC, y ABC.....	35
Cuadro N°2: Prueba de Duncan para la contaminación sobre explantes de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, por tratamientos combinados.....	38
Cuadro N°3: Análisis de varianza de la germinación y brotación sobre explantes de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para el medio de cultivo (factor B) y niveles de hipocloritos de sodio (factor C) y tipo de explante(factor A).....	39
Cuadro N° 4: Prueba de Tukey de la variable Contaminación sobre explantes de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para los tratamientos combinados.....	42
Cuadro N°5: Análisis de Varianza de la Variable Contaminación sobre explantes (yemas apicales) de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para los factores medios de cultivo (A) y concentración de AG3 (B), y su interacción.....	43
Cuadro N°6: Prueba de Tukey de la contaminación sobre explantes(yemas apicales) de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, por tratamiento combinado.....	45
Cuadro N° 7: Análisis de varianza de la sobrevivencia sobre explantes de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para los factores medios de cultivo (A) y concentración de AG3 (B), y su interacción.....	46

Cuadro N° 8: Prueba de Tukey para el promedio de sobrevivencia sobre explantes yemas apicales de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para los tratamientos combinados.....	48
Cuadro N° 9: Análisis de varianza de la variable número de hojas sobre explantes yemas apicales de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para los factores medios de cultivo (A) y concentración de AG3 (B), y su interacción 3.....	49
Cuadro N° 10: Prueba de Tukey de la variable número de hojas sobre explantes de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para el tratamiento combinado entre el medio de cultivo y AG3.....	52
Cuadro N° 11: Análisis de varianza de la variable número de nudos sobre explantes de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para los factores medios de cultivo (A) y concentración de AG3 (B), y su interacción.....	53
Cuadro N° 12: Prueba de Tukey para el promedio del número de nudos sobre explantes de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, entre los tratamientos combinados del medio de cultivo y concentraciones de AG3.....	55
Cuadro N° 13: Análisis de varianza de la variable altura de la vitroplántula de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, entre factores y para la interacción con el medio de cultivo y concentración de AG3.....	56
Cuadro N° 14: Prueba de Tukey aplicado al promedio de altura de la vitroplántula de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para el tratamiento combinado.....	57

Cuadro N° 15: Análisis de varianza para el promedio de raíces formadas en vitroplántulas de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, entre factores (A y B) e interacción entre el medio de cultivo y concentración de AG3.....	58
Cuadro N° 16: Prueba de Tukey para el promedio de raíces formadas en vitroplántulas de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para el tratamiento combinado del medio de cultivo y concentraciones de AG3.....	60
Cuadro N° 17: Análisis de varianza del número promedio de hojas formadas en vitroplántulas de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, por factores y tratamiento combinado de la interacción con medios de cultivo y concentración de BAP.....	61
Cuadro N° 18: Prueba de Tukey del promedio del número de hojas formadas en vitroplántulas de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, por tratamiento combinado del medio de cultivo y concentraciones de Bencil aminopurina (BAP).....	63
Cuadro N° 19: Análisis de varianza de la variable número de nudos formadas en vitroplántulas de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, por factores y tratamiento combinado de la interacción con medios de cultivo y concentración de BAP.....	64
Cuadro N° 20: Prueba de Tukey para el número promedio de nudos Formadas en vitroplántulas de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, por tratamiento combinado entre el medio de cultivo y concentraciones de BAP.....	66

Cuadro N°21: Análisis de varianza para el promedio en altura de la vitroplantula de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, por factores e interacción de cultivo y concentración de BA(AB).....	67
Cuadro N° 22: Prueba de Tukey para la altura promedio de la vitroplántula de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para los tratamiento combinados del medio de cultivo y concentración de BAP.....	69
Cuadro N° 23: Análisis de varianza de la variable sobrevivencia de explantes de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, por factores A y B, y para la interacción con medios de cultivo y concentración de AIB (Int A*B).....	70
Cuadro N° 24: Prueba de Tukey para la sobrevivencia de explantes de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, por factores A y B, y para la interacción con medios de cultivo y concentración de AIB (Int A*B).....	71
Cuadro N° 25: Análisis de varianza de la variable oxidación de los explantes <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, por factores A y B, y para la interacción del medio de cultivo con la concentración de AIB.....	72
Cuadro N° 26: Análisis de varianza de la variable número de hojas formados en vitroplántulas de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para los medios de cultivo (factor A) y concentración de AIB (factor B) y para la interacción A*B.....	74
Cuadro N°27: Análisis de varianza para el número promedio de nudos formados en vitroplántulas de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, según el	

medio de cultivo (factor A) y concentración de AIB (factor B), y su interacción (AB).....	76
Cuadro N°28: Análisis de varianza de la variable altura de la vitroplántulas de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, según el medio de cultivo (factor A) y concentración de AIB (factor B), y su interacción (AB).....	78
Cuadro N°29: Análisis de varianza de la variable número de raíces formadas en vitroplántulas de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, según el medio de cultivo (factor A) y concentración de AIB (factor B), y su interacción (AB).....	80

INDICE DE GRÁFICOS

Grafico N° 1: Porcentaje de contaminación de los explantes (semillas y yemas apicales) de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para los tratamientos combinados.....	37
Grafico N° 2: Porcentaje de germinación y brotación de los explantes (semillas y yemas apicales) de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para los tratamientos combinados.....	40
Grafico N° 3: Porcentaje de contaminación de los explantes (yemas apicales) de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, por tratamiento combinado.....	44
Grafico N° 4: Porcentaje de sobrevivencia de los explantes de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para los tratamientos combinados.....	47
Grafico N° 5: Número de hojas formados por los explantes de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, en interacción con tipos de medio de cultivo y concentración de Ag3.....	51
Grafico N° 6: Número de nudos formados por los explantes de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para el tratamiento combinado entre el medio de cultivo y concentración de Ag3.....	54
Grafico N° 7: Altura de la vitroplántula de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg. los tratamientos combinados.....	57
Grafico N° 8: Número de raíces formadas en vitroplántulas de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para los tratamientos combinados del medio de cultivo y concentración de AG3.....	59
Grafico N° 9: Número de hojas formadas en vitroplántulas de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, en interacción con tipos de medio de cultivo y concentración de BAP.....	62

Grafico N° 10:Número de nudos formadas en vitroplántulas de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, por tratamiento combinado entre el medio de cultivo y concentración de BAP.....	65
Grafico N° 11:Altura promedio (mm) de la vitroplántula de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para los tratamiento combinados el medio de cultivo y concentración de BAP.....	68
Grafico N°12:Porcentaje de sobrevivencia de explantes de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, por tratamiento combinado con el medio de cultivo y concentración de AIB.....	71
Grafico N° 13:Porcentaje de oxidación de explantes de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, por tratamiento combinado entre el medio de cultivo y la concentración de AIB.....	73
Grafico N° 14:Número de hojas formadas en vitroplántulas de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para los tratamientos combinados entre el medio de cultivo y concentración de AIB.....	75
Grafico N°15:Número de nudos formadas en vitroplántulas de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para los tratamientos combinados entre el medio de cultivo y concentración de AIB.....	77
Grafico N°16:Altura de la vitroplántulas de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para los tratamientos combinados entre el medio de cultivo y concentración de AIB.....	79
Grafico N° 17: Número de raíces formadas en vitroplántulas de <i>Croton lechleri</i> Muell Arg, para los tratamientos combinados.....	81

ANEXOS

Anexo 1: Medio de cultivo de Gambor 1968 (B5).....	102
Anexo 2. Medio de cultivo de Woody Plant Medio (Mc Cown y Lloyd.1990.....	103
Anexo 3. Medio de cultivo de Murashige & Skoog 1962.....	104
Anexo 4: Formato de Evaluacion.....	105
Anexo 5: Flujograma de Trabajo de Laboratorio.....	106
Anexo 6: Certificación de la Muestra Botánica.....	107
Anexo 7: Lista de Fotografía del trabajo (N°1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16 y 17).....	108

RESUMEN

El estudio fue realizado en el Instituto Nacional de Investigación Agraria "San Roque", en el laboratorio de cultivo de tejido vegetal, con el objeto de establecer una metodología adecuada para la micropropagación de *Croton lechleri* Muell Arg, y diferentes explantos y medios de cultivo, se realizó cuatro experimentos: a) germinación y brotamiento, b) crecimiento y desarrollo, c) multiplicación o proliferación y d) enraizamiento.

Los tratamientos T11 (A1B3C3), T19 (A2B2C3), T8(A2B2C2), T23(A2B3C3) presentaron mayor contaminación por encima del 70%, mientras que los tratamientos T5 (A1B2C1), T6(A1B2C2), T9(A1B3C1), T12(A1B2C4) presentaron menor porcentaje de contaminación. El hipoclorito de sodio al 2% resulto más eficiente por permitir obtener el menor porcentaje de contaminación en los propágulos. La desinfección con hipoclorito de sodio al 2%, favoreció el mayor porcentaje de germinación y brotación a la vez permitió la sobrevivencia. Los mejores propágulos para el establecimiento in vitro fueron las yemas apicales de vitroplántulas. Para el crecimiento y desarrollo, los medios de cultivo óptimos fueron Murashige & Skoog y Gambor y diferentes concentraciones de ácido Giberèlico 0,0 - 0,5 - 1,0 ppm (GA3). Para la multiplicación y proliferación, los medios de cultivo óptimos fueron Murashige & Skoog y Gambor y diferentes concentraciones de Bencilamino purina 0,0 - 0,25 - 0,50 ppm (BAP). Y para el enraizamiento, los medios de cultivo fueron Murashige & Skoog y Gambor, diferentes concentraciones de ácido 3- lindolbutirico 2,0 - 5,0 ppm (AIB) y carbón activado. Las concentraciones de los antioxidantes favoreció el porcentaje de sobrevivencia y enraizamiento en los propágulos al impedir el aumento de la oxidación.

I. INTRODUCCIÓN

El Perú es reconocido por su gran diversidad en flora y fauna. Se sabe que por la variedad de climas presentes en el, muchas especies se desarrollan en las diversas regiones. La flora peruana cuenta con especies ornamentales, alimenticias y medicinales, entre otras. El presente trabajo trata de la Familia Euphorbiaceae presenta una variedad de especies de gran importancia medicinal y económica. La especie *Croton lechleri* Muell Arg. “sangre de grado”, el látex de esta planta tiene alta concentración de alcaloides con efecto antiinflamatorio y cicatrizante, es útil en el tratamiento de enfermedades, úlceras de la garganta, amigdalitis, hemorragias y antiséptico vaginal **Mejia & Rengifo (1995)**.

Del látex de esta planta se ha logrado aislar una proantocinina oligomérica denominada SP-303, la cual ha demostrado tener actividad inmunológica contra la variedad de virus, respiratorio, influenza, parainfluenza, herpes, virus de la Hepatitis A y B, Sida. **Pieters (1993)**

Desde 1991 a 1998 exportaron el látex de “Sangre de grado” a varios países como España, Chile., Rusia, Ucrania, Italia, Lituania y Estados Unidos. El Perú exporto 1000 galones mensuales de látex. **Meza (2000)**.

Por la gran importancia económica y medicinal de *Croton lechleri* Muell Arg, se trabajó con tres medios de cultivo (Murashige & Skoog 1962 (M & S) por poseer en su composición química un contenido elevado de sales, Gambor Miller y Ojima 1968 (B5); Mc Cown-Lloyd 1990 (WPM), por ser una planta leñosa sensible a la salinidad mediante la técnica de cultivo in vitro de plantas, actualmente es una alternativa suplementaria para la manipulación, conservación, aplicación genética y el intercambio de germoplasma. El gran problema de esta especie en la micro propagación es la dormancia de las semillas y contaminación se multiplican lentamente, por tener ciclos de latencia complicados y con frecuencia se dan formas adultas y juveniles al mismo tiempo.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar una metodología adecuada para la micropropagación de *Croton lechleri* Muell Arg, utilizando diferentes explantos y medios de cultivo.

2.2. Objetivos específicos

- Obtener dosis optima de hipoclorito de sodio en la desinfección de propágulos de *Croton lechleri* Muell Arg, “sangre de grado” para el establecimiento in vitro.
- Determinar un medio de cultivo óptimo para el crecimiento y desarrollo de propágulos de *Croton lechleri* Muell Arg.
- Establecer una metodología de multiplicación de propágulos de *Croton lechleri* Muell Arg, utilizando diferentes concentraciones de hormonas, Bencil amino purina (BAP) en el medio de cultivo.
- Obtener un medio óptimo para el enraizamiento de propágulos de *Croton lechleri* Muell Arg, utilizando diferentes concentraciones de Ácido indol butirico (AIB) y Carbón activado.

III. REVISION DE LITERATURA

3.1. Generalidades:

El término cultivo de tejido vegetales o de plantas, se refiere al cultivo “in vitro” de cualquier estructura orgánica de una planta bajo condiciones asépticas. También se le conoce como micro propagación debido a la obtención de plantas en miniatura llamada plántulas **MEJIA & VITORELLY (1988)**. Mientras que **PIERIK (1990)**, define cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones, órganos, explantos, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores. También añade que la técnica de cultivos de tejidos, órganos y células vegetales, consiste en cultivar en medios nutritivos adecuados en forma aséptica, ápices de raíz y de tallo, primordios de hoja, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo y hoja, algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen.

3.2. Medios de cultivo

Un medio de cultivo es una mezcla de sustancias sobre o en las cuales pueden crecer células, tejidos u órganos, con o sin agar **(PIERIK, 1990)**.

ROCA et al.(1991), MEJIA (1994) y HURTADO & MERINO (1987); refieren que los medios de cultivos Murashige y Skoog.1962, Gambor Miller y Ojima (1968) y Mc Cown (1980), en su composición química están compuestos de carbono, nitrógeno, sales inorgánicas, mezcla de sales compuestos orgánicos, aminoácidos, vitaminas, hormonas, azúcar y urea, ellos trabajaron en cultivo in vitro de tejidos vegetales con plantas leñosas obteniendo buenos resultados. En la actualidad existen innumerables formulaciones cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran:

1. Carbohidratos (sacarosa).
2. Nutrientes minerales (macro y micronutrientes),
vitaminas.
3. Agente gelificante (agar, gelrite, phytigel, etc.)
4. Reguladores de crecimiento (hormonas), aminoácidos.
5. Suplementos u otros compuestos (agua de coco,
extracto de malta, extracto de levadura, antioxidante,
absorbente).

La principal diferencia entre WPM y MS es relativamente la mínima cantidad de iones sodio y cloro y con 60% de potasio recomendado en MS.

3.3. Propagación in vitro

RAO & LEE (1992), sugieren que cuanto más joven sea el tejido de una planta, mejor será su crecimiento al cultivarse “*in vitro*”, los tejidos u órganos de plantas adultas tienen un potencial morfogénico limitado.

Pero, uno de los problemas de mayores consecuencias en el cultivo de tejidos vegetales es la contaminación bacteriana que se presenta en las etapas de multiplicación y/o enraizamiento.

El agente desinfectante debe ser determinado para el material vegetal con el que se trabaja. Casi siempre se usan soluciones de hipoclorito de calcio o de sodio, los cuales liberan al cloro como agente desinfectante activo. Las concentraciones empleadas son de 0.1 a 2 % y 2 a 10 % respectivamente.

HURTADO *et al* (1987).

QUINTERO & PACHON (1987), refieren que el cultivo “*in vitro*” de árboles han aparecido más tarde que en herbáceos. Este es resultado no sólo del escepticismo por esta nueva área en relación con la posibilidad de aplicarla a la producción sino del escaso número de investigadores dedicados a estas especies y que éstas no respondían a las técnicas que se aplicaban con buen éxito en el laboratorio, a las especies herbáceas. Las dificultades que se presentan para las especies de importancia

forestal se encuentran principalmente para las fases de enraizamiento, sobre todo cuando los explantes provienen de plantas maduras, lo mismo que para la fase de adaptación primaria de explantes en medios de cultivo; en esta última fase debido a la existencia de grandes cantidades de compuestos polifenólicos, inhibidores de crecimiento y diferenciación.

La micropropagación por cultivo de tejidos se ha convertido en una herramienta de gran ayuda para la producción rápida de plantas de interés económico para el hombre. Las condiciones medio ambientales del cultivo "*in vitro*" (luz, temperatura, fitohormonas, nutrientes) favorecen en gran medida, esa tendencia porque son controlables y facilitan por ello el aprendizaje de los procesos biológicos involucrados en el desarrollo de las plantas. **ROCA et al.(1991).**

La propagación de una especie vegetal puede realizarse a través de la fase sexual y asexual. En el ciclo sexual, las plantas se originan después de la fusión de los gametos progenitores y como consecuencia se desarrolló la semilla; en muchos casos las plantas pueden ser genéticamente variables, y cada una de ellas podría representar una nueva combinación de genes ocurridos durante la meiosis. En contraste al ciclo sexual, en ciclo vegetativo asexual las características de la planta

individual (planta madre) se perpetúan a través de la multiplicación celular, donde los genes son copiados exactamente en cada división celular (mitosis). Un grupo de plantas reproducidas asexualmente son llamadas como un clon (MEJÍA, 1992).

SKIRVIN (1981) y ZIMMERMAN (1985), reconocieron que las plantas leñosas son difíciles de manipular “*in vitro*”. En general, los árboles se multiplican lentamente, tienen ciclos de latencia complicados y con frecuencia se dan formas adultas y juveniles al mismo tiempo.

3.4. Propagación convencional

CALZADA (1993), menciona que la propagación sexual (semillas) y asexual (estacas) de las plantas tropicales y subtropicales; las semillas, no requieren de un periodo de reposo para germinar, muchas de ellas germinan inmediatamente de extraídas del fruto, perdiendo rápidamente, a partir de ese momento, su poder germinativo, al mismo tiempo se hace más lenta la germinación. La demora de la germinación de algunas especies se debe a la epidermis o endocarpio que protege al embrión, en estos casos eliminar total o parcialmente rompiendo al endocarpio o cáscara, escarificando las semillas.

Por estacas; es el sistema más antiguo si son, de planta joven y tienen algunas hojas, estas deben reunir ciertas condiciones apropiadas y estar en un enraizador adecuado, al medio ambiente, con este sistema se evita la incompatibilidad que se presente algunas veces con el injerto. Se usa una parte del tallo, raíz o de la hoja; se separa de la planta madre y se coloca bajo condiciones ambientales favorables para inducir la formación de raíces, tallos y hojas, produciendo así una nueva planta idéntica a la planta madre.

HARTMANN *et al* (1981), mencionan que el propósito de remojar las semillas en agua es modificar las cubiertas duras, remover los inhibidores, ablandar las semillas y reducir el tiempo de germinación. En algunos casos este tratamiento supera la latencia de las cubiertas de la semilla y estimula la germinación. Algunas cubiertas impermeables pueden suavizarse colocando las semillas de cuatro a cinco veces su volumen en agua caliente (de 77° a 100°C).

HUDSON & DALE (1981), indican que la propagación de plantas, las mayores dificultades se encuentran en las semillas de árboles y arbustos de plantas silvestres o de reciente introducción al cultivo. Es muy difícil tener resultados confiables en las pruebas de viabilidad de semillas, en especial cuando se

intenta hacer poco después que se han cosechado. Ecológicamente, se piensa que los mecanismos para la supervivencia en la naturaleza, los requerimientos específicos de germinación están relacionados con las condiciones ambientales en que las especies vegetales han evolucionado.

MEZA et al (1990), indican que las semillas de “sangre de grado” que caen naturalmente germinan después de 15 o 20 días, cuando las plántulas alcanzan entre 25 y 35 cm aproximadamente a los tres meses pueden ser transplantada a otra parte del terreno. Se puede asociar con otros cultivos perennes y anuales, la capacidad del área en hectárea y la distancia de planta a planta puede ser de 5m x 5m; 10m x 10m; 15m x 15m al mismo tiempo esta planta fortifica el suelo, ayuda a evitar erosiones y plagas.

FLORES (1997), menciona el comportamiento fenológico de *Croton lechleri* Muell Arg., la floración ocurre entre junio y octubre, durante la época seca, los frutos, son pequeñas cápsulas triloculares agrupados en espigas, maduras en 2–3 meses. La dispersión de las semillas ocurre por explosión violenta del fruto y tiene lugar entre Octubre y Noviembre, a principios de la época lluviosa y la germinación es epigea, cotiledones opuestos, foliáceos.

PINEDO & RENGIFO (1997), afirman que el poder germinativo de “sangre de grado” fresca pueden alcanzar un 80% en 14 días. Empleado nebulizador se ha logrado su propagación mediante estacas de tallo. El trasplante se realiza a raíz desnuda, en hoyos de 30cm de diámetro y 30cm de profundidad, cuando los plántones tienen una altura de 20 cm. En plantaciones de regeneración natural con una altura mayor de 20cm; se obtiene un prendimiento del 80%.

QUEVEDO & GIL (1998), realizaron un experimento para determinar la germinación de semillas de *Croton lechleri* Muell Arg., en condiciones variadas de intensidad de Luz (100, 60 y 30%, del método de conservación (temperatura ambiente y refrigerado) y del tiempo de almacenamiento (0, 30, 60, 90, 120 y 150 días), en condiciones de vivero. Se encontró que 30 y 60% de luz tienen el mismo efecto en la germinación (35 % y 37 % respectivamente), y fueron superiores a los obtenidos con 100% de luz (23 %). El método de conservación en refrigeración fue mejor (47%) que la conservación a temperatura ambiente (16%). La intensidad de luz y el tiempo de almacenamiento tuvieron efecto en la germinación, debido a que las semillas son menos sensibles a la luz a mayor tiempo de almacenamiento. El método de conservación en función del tiempo de almacenamiento

expresó que las semillas mantienen su viabilidad hasta 150 días bajo refrigeración, pero cuando se almacenó a temperatura ambiente se redujo a 90 días. Es conveniente almacenar las semillas inmediatamente después de haber sido cosechadas o almacenarlas en refrigeración para obtener una germinación aceptable.

IMET (2000), reportan sobre aspectos agronómicos de *Croton lechleri* Muell Arg. La propagación es por semilla botánica y la siembra es indirecta, distancia 7m x 7m, la cosecha del látex a nivel comercial es a partir del octavo año.

3.5. Aspectos generales de la especie

Clasificación Taxonómica de la Especie. Andrade(1981)

REINO : VEGETAL
DIVISIÓN : ANGIOSPERMAE
CLASE : DICOTILEDONEA
SUB-CLASE : ARCHICHLAMIDAEA
ORDEN : GERANIALES
SUB-ORDEN : EUPHORBIINEAE
FAMILIA : EUPHORBIACEAE
SUB-FAMILIA : EUPHORBIOIDEAE
TRIBU : CROTONEAE

GENERO : Croton

ESPECIE : *Croton lechleri* Muell Arg.

SINONIMO BOTANICO

Croton drago var. cordatus Muell Arg.

NOMBRES COMUNES O VERNACULARES

En el Perú, se le conoce con el nombre de “sangre de grado”, en los diferentes grupos nativos según su lengua: Eshape y Jata akui (ese eja), Ginmunaji (piro, yine), Irare, Jimi mosho y Shawan Karo (Shipibo), Kosamáti (matsigenka), Masikamboya (amahuaca), Palo de grado, Procuré, Racurana, “sangre de drago” (Ecuador), Uksavakiro, Widnku (amarakaeri), Yawar wiki ((kichwa).cortiseina, tachi de flor amárela (Brasil). **PINEDO &**

RENGIFO(1997)

3.6. Distribución

RUTTER (1990), indica que en el Perú se encuentra distribuida en toda la Amazonía y se reportan cuatro especies, *Croton erythrochilus*, *Croton lechleri*, *Croton palonostigma*; *Croton draconoides* y *Croton lechleri* son dos especies botánicamente muy similares, siendo su diferenciación muy difícil. El desarrollo de la “sangre de grado” se favorece en áreas disturbadas, en las riberas de los ríos, por los cambios de curso y por la

reforestación, encontrándose en los bosques secundarios. Sus resinas se emplean con propiedades medicinales iguales. El método tradicional usual de obtención de látex con fines comerciales es cortar el árbol y “sangrarlo” totalmente haciendo anillos. El rendimiento está en función del tamaño del árbol, a mayor diámetro, mayor rendimiento, siendo 20 cm el diámetro, mínimo de aprovechamiento.

PINEDO & RENGIFO (1997), reportan que en América tropical y subtropical se encuentra distribuido el género ***Crotón***, en el Perú, se encuentra en los departamentos de Loreto, Llachapa, río Napo, Indiana, río Amazonas, Padre Cocha y Momón, río Nanay, San Martín, Huánuco, Cerro de Pasco, Oxapampa, Satipo, Puerto Bermúdez, Iscozacín, Villa Rica, Junín, Chanchamayo, Cusco y Puno.

NALVARTE et al (1993), refieren que “sangre de grado” es una planta nativa de la Amazonía peruana con uso medicinal con un valor comercial importante. Principalmente se aprovecha su látex, aunque también la corteza, *Croton draconoides* y *Croton lechleri*, son dos especies que poseen propiedades cicatrizantes por su contenido de taspina en el látex. Últimamente se está probando para controlar la diarrea de enfermos con SIDA. Se estima que en 1995, se extrajeron 5,915 litros de látex,

proveniente principalmente de Junín, Loreto, Pasco y Ucayali. La “sangre de grado” es una medicina tradicional muy popularizada en Perú, Ecuador y Colombia, el látex se expende en mercados, puestos de ventas, ambulantes y farmacias naturistas. También se vende en bebidas y elixires.

MEZA (2000), refiere que “sangre de grado” es un producto forestal no maderable de origen amazónico cuyo uso tradicional medicinal parte de las comunidades Indígenas y que estas aplicaciones se han difundido desde los años 1960 al mundo occidental, el cual ha puesto interés en las actividades farmacológicas y ha sido estudiada por investigadores nacionales y extranjeros hasta la actualidad.

3.7. Descripción Botánica del genero Croton

WEBSTER (1993), indica que el género *Croton* pertenece a la Familia Euphorbiaceae (una de las características relevantes es poseer látex en la mayoría de los casos de color blanco), el género está dividido en 40 secciones, la sección Cyclostina tiene entre 40-50 especies, las cuales han sido descritas e incluidas en tres subsecciones, *Croton lecheri* Muell Arg. pertenece a la subsección Cyclostigma.

De acuerdo a **GENTRY (1993)**, el género cuenta con 400 especies en el nuevo Mundo, constituyéndose en un taxón extremadamente diverso y numeroso; la mayoría de las especies son arbustos de regiones secas o árboles también de hábitat secos o de crecimiento secundario. Cinco especies de este género producen látex de color rojo: *Croton lechleri* Muell Arg., nativo de Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Brasil; *Croton sordidus* de la región Andina; *Croton urucurana* de Brasil y Paraguay, *Croton draco* y *Croton xalapensis* de México y Centroamérica.

3.8. Descripción Dendrológica de *Croton lechleri* Muell Arg.

Según **LAO (1972)**, es un árbol de 8 a 20 cm de alto; fuste de 15 a 30 cm de diámetro; de látex rojizo al cortar; el tipo de raíz es pivotante y ramificado; la forma de la copa es amplia globosa; la corteza externa tiene un color grisáceo blanquecino y la interna un color rosado crema de sabor astringente, textura coriácea fibrosa; las hojas son alternas a veces opuestas o verticilados con dos glándulas en la base, 12 a 40 cm de longitud, 5 a 14 cm de ancho, tiene una inflorescencia terminal en racimos (espigas), alcanza hasta 30 cm de longitud, las flores son monoicas de color blanco amarillento, olor astringente; el

fruto es una cápsula con tres monocarpas bivalvos elásticamente dehiscente con un promedio de 4,5 mm de longitud por 3 mm de ancho; las semillas son pequeñas de color gris oscuro, parecido al dorso de la garrapata, con carúncula y endospermo oleaginoso.

GAVIRIA (1993), menciona que el diámetro a la altura del pecho (DAP) se alcanza a los 10 años de edad, pero que la producción de cada árbol es difícil de estimar. En la selva central durante la época lluviosa, en una zona inundable y en una jornada de mañana, un árbol de 20 cm puede proporcionar 65 ml de látex, uno de 35 cm da 250 ml y de uno de 50 cm se puede obtener hasta dos litros. Sin embargo, en el valle del Huallaga que es un lugar muy lluvioso, se obtiene 2 litros por árbol de 5 años de edad.

MEZA et al (1998), mencionan que el volumen total de látex cosechado puede empezar a partir del sétimo y octavo año. Cuando el árbol mide aproximadamente 30 cm de diámetro a la altura del pecho.

3.9. Características Ecológicas y Clima

El tipo de bosque donde aparece esta especie de acuerdo a la clasificación de **HOLDRIGE (1978)**, corresponde a la formación

ecológica de Bosque Húmedo Tropical y Bosque muy Húmedo Premontano Tropical con temperatura media anual es de 25,42° C y precipitación promedio anual de 1773,44 mm y una humedad relativa de 84,47%. **BALDOCEDA(1993)**.

FLORES (1997), refiere que *Croton lechleri* Muell Arg, se encuentra en zonas cercanas a ríos y quebradas y en bosques secundarios.

HABITAT: Su hábitat es en tierra firme, sobre suelos arcillosos, principalmente en las depresiones de las quebradas y actualmente en cultivo. **VASQUEZ (1997)**.

3.10. Composición Química, Farmacológica y Actividad Biológica

NALVARTE et al (1993), mencionan que la composición química se viene estudiando desde 1960, se ha aislado 30 alcaloides del género ***Croton***, de los cuales 22 tienen estructura conocida. Los principales son taspina, solutaridina, sinoacutina, esparciflorina; además de taninos, ácido benzoico, pigmentos y otros.

Desde 1987 se conoce que la “sangre de grado” tiene un alcaloide llamado TASPINA, que es el responsable de las propiedades cicatrizantes del látex que se obtiene de esta planta. La taspina es un alcaloide de propiedades cicatrizantes en una dosis de 0,375 mg/kg de peso. Las investigaciones

también demostraron que la taspina no es tóxica para el ser humano y que en una concentración de 150 mg/ml y que más bien tiene un efecto de propiciar la migración de fibroblastos en la piel.

PIETERS (1993), aisló dos lignanos: Los dihidrobenzofuranos 3'4-O- dimetilcedrusina y 4-O-metilcedrusina. Tanto la taspina como el lignano 3'4-O-dimetilcedrusina son bioactivos. Se han reportado también derivados de Catequinas y Procianidina β -1 y β -4. Así mismo, antraquinonas, triterpenoides, epoxiácidos grasos, ácidos grasos insaturados, alcaloides del tipo aporfin, piridona y quinolina. Del género ***Croton*** se han aislado 30 alcaloides, 2 con estructura conocida, siendo los principales: solutaridina, taspina, sinoacutina, sparciflorina. También se encuentran ácido benzoico, pigmentos, taninos, y otros compuestos. Se ha aislado del látex un olí gomero de la pro antocianina (SP-303) con una amplia actividad contra una variedad de virus de ADN y ARN. El SP-303, en estudios de laboratorio, exhibe una potente actividad contra virus respiratorios sinetales (RSV), virus de la influenza A (FLU- A) y virus de la parainfluenza (PIV); también muestra actividad contra herpes virus (HSV) de los tipos 1 y 2, y contra virus de la hepatitis A y B.

UBILLAS et al (1994), indican que en *Croton lechleri* Muell Arg., la taspina, es responsable de la cicatrización, ha logrado ser aislada y se ha podido probar su efecto cicatrizante en estudios in vivo con ratones. Además, se ha trabajado con sistemas de cultivo de células y se ha demostrado que el alcaloide no es tóxico para los fibroblastos de la piel humana, sino que más bien tiene el efecto de aumentar la concentración de los mismos. Este aumento de la concentración de fibroblastos de la piel, dado por su migración, explica el mecanismo que acelera la cicatrización de las heridas.

Los experimentos “*in vitro*” en ratas, para evaluar la actividad curativa de las heridas, confirmaron el efecto de la sangre de grado crudo. Se ha visto que el efecto de los ungüentos preparados con 3'-4-O dimetil drucina (compuesto que se vio era activo “*in vitro*”) es inferior al de un producto crudo. Esto se debe al efecto de los poli fenoles que se encuentran en la “sangre de grado” que causa la formación de costras que cubren la herida y que están ausentes en estas cremas. Mediante estudios cromatográficos y de resonancia magnética nuclear.

PIETERS (1993), concluyó que la “sangre de grado” no contiene cantidades significantes de ésteres diterpénicos promotores de

tumores y que por lo tanto no había justificación para detener su uso.

Además, **VAISBERG (1989)**, ya había sostenido que no había ningún efecto carcinogénico o promotor de tumores en la resina extraída de *Croton lechleri* Muell Arg. de aquí, que su uso no tiene contraindicación.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Descripción del Área de Estudio

El presente trabajo de investigación se realizó en el Instituto Nacional de Investigación Agraria “San Roque”, en el Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. Ubicado en el asentamiento humano San Roque No.209 del distrito de San Juan Bautista. Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, cuyas coordenadas geográficas son latitud Sur 3° 45' 18", longitud Oeste 73° 14' 00", con altitud de 126 msnm.

4.2. Material Biológico

Semillas maduras de plantas de 7 a 8 años aproximadamente y yemas de plantas de vivero y de plántulas in vitro de *Croton lechleri* Muell Arg. de “sangre de grado” (Foto No.1) provenientes de la zona reservada Allpahuayo-Mishana, ubicada hacia el suroeste de la ciudad de Iquitos del km. 26.5 de la carretera Iquitos Nauta, cuya georeferencia es 3° 61' 35. 5" de latitud Sur y 74°25'55.5" de longitud oeste y altitud de 135,5 metros. (Foto No.1 y 2).

4.3. Material de Campo

Para la colecta de semillas se usó una tijera podadora y se colocó en un pequeño tapers y para la colecta de yemas apicales se usó un balde con agua destilada, como medio de transporte ácido ascórbico 50mg/L y ácido cítrico 50 mg/L

4.4. Material de laboratorio y Equipos

A. EQUIPOS

- Cámara de flujo laminar-Marca Labconco
- Balanza analítica: Fisher Scientific XA
- Autoclave: Electric Pressure stem sterizer Model 25x
- Agitador magnético: CAT MB
- Estufas: Imperial IV Lab. Line Instruments. Inc.
- pH metro: Canlab.
- Refrigerador mediana: Sanyo.
- Destilador de agua: Wheaton.

B. MATERIALES DE VIDRIO

- Tubos de ensayo (25 x 150 mm)
- Fiolas: 250ml, 200ml
- Erlenmeyer: 500ml, 1000ml....
- Pipetas graduadas: 50ml, 100ml.
- Vasos de precipitados: 1000ml, 50 ml.

C. DESINFECTANTES

- Alcohol de 96°
- Hipoclorito de sodio (NaOCl)
- Benlate (Benomyl)

D. OTROS

- Gradilla de plástico
- Mecheros
- Algodón
- Papel periodito estéril
- Espátulas
- Parafilm
- Pipetas
- Pinza
- Hojas de bisturís
- Tijeras, tijerillas
- Escobillas
- Baldes
- Sobre de papel
- Fósforo
- Papel bond
- Papel bulki
- Ácido clorhídrico

- Hidróxido de sodio

4.5. Metodología

Los medios de cultivo que se utilizaron para el ensayo de la micropropagación de *Croton lechleri* Muell Arg. fue Murashige & Skoog (1962) (M & S), Gambor Miller y Ojima (1968) (B5), McCown Lloyd (1990) (WPM). Se usó Erlenmeyer de 500ml de capacidad, en ello se adicionaron alícuotas de soluciones madre o stock de los compuestos químicos del medio (Ver anexo N° 01,02,03) Se adicionó 20 g/l de azúcar como fuente de energía y 2 g/l de phytigel como agente gelificante.

Se mezclaron los componentes con ayuda de un agitador magnético y se enrazó el volumen final con agua destilada, se midió el pH de los medios de cultivo a 5.7 ± 0.1 y se niveló con hidróxido de sodio (Na OH) o ácido clorhídrico (Cl OH) 0.5 N. Se agregó al medio de cultivo ácido cítrico 50 mg/l y ácido ascórbico 50 mg/l y en la fase 2 crecimiento y desarrollo: ácido giberelico (GA3) 0,0; 0,5; 1.0 ppm, fase 3: multiplicación o proliferación, Citokinina: (N6 bencil amino purina (BAP); 0,0; 0.25; 0.50 ppm, y fase 4: Enraizamiento, auxina ácido 3-indolbutirico (AIB) 2; 5 ppm.

Se cocinó los medios de cultivo en una cocina eléctrica y se dispensaron en alícuotas de 4cc de medio de cultivo en tubos de ensayo de 25x 150 mm, se colocó tapas y luego fueron selladas con plástico (Cling Wrap). Para evitar la contaminación y pérdida de agua del medio de cultivo se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión y 121°.

Luego se dejó enfriar la autoclave y se sacó los tubos conteniendo los medios de cultivo.

4.6. Desinfección del Material Vegetal

La desinfección de las semillas y yemas apicales se realizó en la cámara de flujo laminar bajo condiciones estériles. Las semillas y yemas apicales se colocaron en un vaso precipitado de 500 ml por separado y se adicionó jabón líquido por 5 minutos, se lavó 3 veces con agua destilada estéril, en seguida se adicionó hipoclorito de sodio al 2%, 4%, 6% y 8% (“margot“ cloro activo 8.2%) por 15 minutos, se lavó 3 veces con agua destilada estéril. Seguidamente se hizo otra desinfección con Benlate 2 g/l por espacio de 10 minutos, luego se lavó 3 veces con agua destilada estéril (Foto No. 3 y 4).

4.7. Siembra del material vegetal

La siembra se realizó en la cámara de flujo laminar bajo condiciones de asepsia, las semillas y yemas apicales desinfectadas fueron colocados sobre papel bulki estéril y con ayuda de un mechero, con ayuda de pinzas y bisturí previamente esterilizados se obtuvo las yemas apicales de 1.5 cm de longitud, semillas. Finalmente fueron sembradas en tubos de ensayo de 25 x 150 mm, las cuales contenían 4cc de medio de cultivo de Murashige & Skoog (1962) (MS), Gambor (1968) (B5), y Lloyd and Mc Cown (1980) (WPM) (Foto No.6). Por último los tubos fueron sellados con plástico (Cling Wrap) para evitar la contaminación y pérdida de agua del medio de cultivo, luego se colocaron en gradillas plásticas, para luego ser colocados en la cámara de incubación.

4.8. Condiciones de cultivo

Los tubos conteniendo semillas, yemas apicales, se colocaron en la cámara de crecimiento de cultivo o cámara de incubación, con las siguientes condiciones:

Temperatura : 25 ± 1 ° C

Humedad : 70 %

Foto periodo : 16 / 8 horas (luz / osc)

4.9. Diseño estadístico

Se usó el modelo aditivo lineal (MAL) del diseño completamente al azar por cada experimento, arreglado a un experimento factorial.

$$X_{ij} = \mu + t_{ij} + E_{ij}$$

Donde:

μ =Media poblacional

t_{ij} = Efecto del tratamiento i-ésimo; j-ésimo

E_{ij} = Efecto aleatorio

4.10. Población y muestra

La población estuvo conformado por árboles adultos de *Croton lechleri* Muell Arg." Sangre de grado" identificado y certificado por el Herbarium Amazonense UNAP. Y la muestra estuvo constituida 12 semillas viables y 12 yemas terminales (apicales) procedente del vivero.

4.11. Experimentos:

Se realizaron cuatro experimentos factoriales durante la investigación:

EXPERIMENTO N° 1: GERMINACIÓN Y BROTACIÓN

Se estudiaron los siguientes factores:

Factor A: Tipo de explante

A1: Semillas

A2: Yemas terminales

Factor B: Medios de cultivo.

B1 = MS (Murashige & Skoog)

B2 = B5 (Gamborg Miller y Ojima)

B3 = WPM (Mc Cown - Lloyd)

Factor C: Concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl %)

C1 = 2%

C2 = 4%

C3 = 6%

C4 = 8%

El análisis de varianza fue realizado con la prueba de F del diseño estadístico completamente al azar, arreglado a un ensayo factorial de 3x4x2. Donde la unidad experimental correspondió a un propágulo por tubo. Se usaron 10 repeticiones por tratamiento

Factor constante: pH = 5.7±01

TRATAMIENTOS COMBINADOS EN EL EXPERIMENTO No.1

Tratamiento	Combinación	Concentración
T1	A1B1C1	Semilla x MSc x2.0% Na0cl
T2	A1B1C2	Semilla x MSc x4.0% Na0cl
T3	A1B1C3	Semilla x MSc x6.0% Na0cl
T4	A1B1C4	Semilla x MSc x8.0% Na0cl
T5	A1B2C1	Semilla x B5cx2.0% Na0cl
T6	A1B2C2	Semilla x B5cx4.0% Na0cl
T7	A1B2C3	Semilla x B5cx6.0% Na0cl
T8	A1B2C4	Semilla x B5cx8.0% Na0cl
T9	A1B3C1	Semilla x WPMc x2.0% Na0cl
T10	A1B3C2	Semilla x WPMc x4.0% Na0cl
T11	A1B3C3	Semilla x WPMc x6.0% Na0cl
T12	A1B3C4	Semilla x WPMc x8.0% Na0cl
T13	A2B1C1	Yema terminal x MSc x2.0% Na0cl
T14	A2B1C2	Yema terminal x MSc x4.0% Na0cl
T15	A2B1C3	Yema terminal x MSc x6.0% Na0cl
T16	A2B1C4	Yem aterminal x MSc x8.0% Na0cl
T17	A2B2C1	Yema terminal x B5c x2.0% Na0cl
T18	A2B2C2	Yematerminal x B5c x4.0% Na0cl
T19	A2B2C3	Yematerminal x B5c x6.0% Na0cl
T20	A2B2C4	Yematerminal x B5c x8.0% Na0cl
T21	A2B3C1	Yematerminal x WPMc x2.0% Na0cl
T22	A2B3C2	Yematerminal x WPMc x4.0% Na0cl
T23	A2B3C3	Yematerminal x WPMc x6.0% Na0cl
T24	A2B3C4	Yematerminal x WPMc x8.0% Na0cl

EXPERIMENTO No. 2 CRECIMIENTO Y DESARROLLO

Factor A: Medios de cultivo

A1 = MS (Murashige & Skoog)

A2 = B5 (Gamborg Miller y Ojima)

A3 = WPM (Mc Cown-Lloyd)

Factor B: Concentraciones de ácido giberelico (GA3)

B1 = 0,0 ppm

B2 = 0,5 ppm

B3 = 1, 0 ppm

Fue evaluado con el diseño estadístico completamente al azar, involucrando un arreglo factorial de 3X3. La unidad experimental fue 1 propágulo por tubo, y se empleó 10 repeticiones (tubos) por tratamiento.

Factor constante: pH = 5.7±01

TRATAMIENTOS COMBINADOS EN EL EXPERIMENTO No.2

Tratamiento	Combinación	Concentración
T1	A1 B1 MS completo	yema apical x 0,0 GA3 ppm
T2	A1 B2 MS completo	yema apical x 0,5 GA3 ppm
T3	A1 B3 MS completo	yema apical x 1,0 GA3 ppm
T4	A2 B1 B5 completo	yema apical x 0,0 GA3 ppm
T5	A2 B2 B5 completo	yema apical x 0,5 GA3 ppm
T6	A2 B3 B completo	yema apical x 1,0 GA3 ppm
T7	A3 B1WPM completo	yema apical x 0,0 GA3ppm
T8	A3 B2WPMcompleto	yema apical x 0,5 GA3 ppm
T9	A3B3WPMcompleto	yema apical x 1,0 GA3 ppm

EXPERIMENTO N° 3: MULTIPLICACIÓN O PROLIFERACIÓN

Factor A: Medios de cultivo

A1= MS (Murashige & Skoog)

A2 = B5 (Gamborg Miller y Ojima)

A3 = WPM (Mc Cown-Lloyd)

Factor B: Concentraciones de N6 bencil aminopurina (BAP)

B1 = 0,0 ppm

B2 = 0,25 ppm

B3 = 0,50 ppm

Este ensayo fue evaluado con el diseño estadístico completamente al azar, involucrando un arreglo factorial de 3X3.

La unidad experimental fue 1 propágulo por tubo, y se empleó 10 repeticiones (tubos) por tratamiento.

Factor constante: pH = 5.7±01

TRATAMIENTOS COMBINADOS EN EL EXPERIMENTO No. 3

Tratamiento	Combinación	Concentración
T1	A1 B1 MS completo	yema apical + 0,0 ppm BAP
T2	A1 B2 MS completo	yema apical + 0,25 ppm BAP
T3	A1 B3 MS completo	yema apical + 0,50 ppm BAP
T4	A2 B1 B5 completo	yema apical + 0,0 ppm BAP
T5	A2 B2 B5 completo	yema apical + 0,25 ppm BAP
T6	A2 B3 B5 completo	yema apical + 0,50 ppm BAP
T7	A3 B1 WPM completo	yema apical + 0,0 ppm BAP
T8	A3 B2 WPM completo	yema apical + 0,25 ppm BAP
T9	A3B3 WPM completo	yema apical + 0,50 ppm BAP

EXPERIMENTO N° 4: ENRAIZAMIENTO

Factor A: Medios de cultivo

A1= MS (Murashige & Skoog)

A2= B5 (Gamborg Miller y Ojima)

Factor B: Concentraciones de ácido 3- indolbutirico (AIB)

B1= 2 ppm

B2= 5 ppm

El ensayo fue evaluado con el diseño estadístico completamente al azar, involucrando un arreglo factorial de 2x2. La unidad experimental fue 1 propágulo por tubo, y se empleó 10 repeticiones (tubos) por tratamiento.

Factor constante: pH = 5.7±01

TRATAMIENTOS COMBINADOS EN EL EXPERIMENTO No.4

Tratamiento	Combinación	Concentración
T1	A1 B1 MS completo	2,0 ppm AIB
T2	A1 B2 MS completo	5,0 ppm AIB
T3	A2 B1 B5 completo	2,0 ppm AIB
T4	A2 B2 B5 completo	5,0 ppm AIB

4.12. Evaluaciones

Las evaluaciones se realizaron cada 7 días y se utilizó formatos en el cual se consigna las variables evaluadas (Anexo No.04) y se transformaron a la raíz cuadrada de $x+1$. Los experimentos, que no tuvieron respuestas favorables se replantearon en el actual experimento. Además, los tubos contaminados fueron desechados y los no contaminados sirvieron para continuar con las evaluaciones.

4.13. Procesamiento de la muestra

Se usó el programa estadístico M-STAT y Excel para el respectivo análisis.

V. RESULTADOS

5.1. Experimento 1: Germinación y brotamiento

A. CONTAMINACIÓN:

El análisis de varianza de la contaminación sobre explante de "Sangre de grado" *Crotón lechleri* Muell Arg, con el medio de cultivo y niveles de hipoclorito de sodio se muestra en el cuadro N° 01, los resultados muestran que los medios de cultivo (factor A) y la interacción AC no son significativos, mientras que el efecto de los niveles de hipoclorito de sodio (factor B), del tipo de explante (factor C), la interacción de los factores ABC y AB resultan altamente significativos al 0,05%. El coeficiente de variación fue de 14.54% e indica baja dispersión de los datos obtenidos.

Cuadro N°1: Análisis de varianza de la variable contaminación sobre explantes de *Crotón lechleri* Muell Arg, para los factores A, B, C e interacciones AB, AC, BC, y ABC.

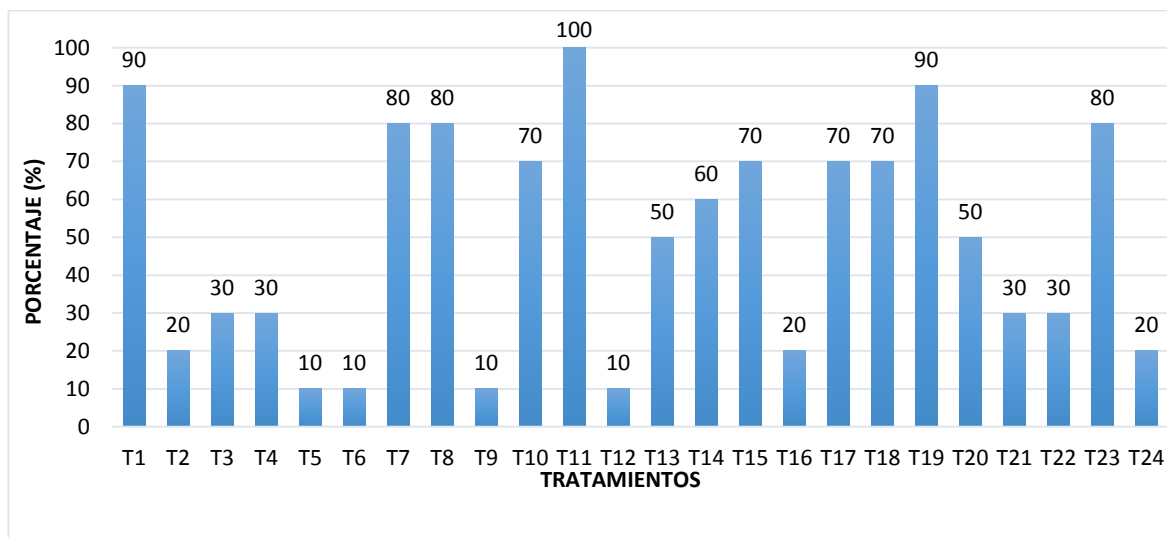
F.V	G.L	S.C	C.M	FV	Prob.	Sig
Factor A	2	0.085	0.043	1.4005	0.2487	N.S.
Factor B	3	0.434	0.145	4.7449	0.0032	**
AB	6	0.923	0.154	5.0434	0.0001	***
Factor C	1	0.403	0.403	13.2245	0.0001	***
AC	2	0.013	0.006	0.2066	---	N.S.
BC	3	0.415	0.138	4.5306	0.0042	**
ABC	6	1.220	0.203	6.6658	0.0000	***
Error	216	6.590	0.031	---	----	----
Total	239	6.590	---	---	----	----

Leyenda:

- *** : Alta significancia estadística al 1% de probabilidad
- ** : Significativo al 5% de probabilidad
- N.S :. No significativo.

La prueba de Duncan aplicado al porcentaje de contaminación sobre explantes de “sangre de grado” *Croton lechleri* Muell Arg., la interacción con el medio de cultivo y niveles de Hipoclorito de sodio, se muestra en el cuadro N° 02. , indica que el tratamiento (T5) de la semilla con B5c y 2.0% NaOcl (A1B2C1), el T6(A1B2C2) correspondiente a semillas tratadas con B5c y 4.0% NaOcl, el T9(A1B3C1) que corresponde a semilla tratadas con WPMc y 2.0% NaOcl, y T12 (A1B3C4) semillas tratadas con WPMc y 8.0% NaOcl presentaron menor porcentaje de contaminación. En cambio los tratamientos T11(A1B3C3), semillas tratadas con WPMc y 6.0% NaOcl, T1(A1B1C1) que son semillas tratadas con MSc y 2.0% NaOcl, T19(A2B2C3) que son yemas terminales tratadas con B5c y 6.0% NaOcl, T8(A2B2C2) semillas tratadas con B5c y 8.0% NaOcl y el tratamiento T23(A2B3C3), yema terminal con WPMc y 6.0% NaOCl fueron los que presentaron elevada contaminación por encima del 70 % hasta llegar a un 100 % como se aprecia en el Gráfico N° 01.

Grafico N°1: Porcentaje de Contaminación de los explantes (semillas y yemas apicales) de *Croton lechleri* Muell Arg, para los tratamientos combinados.



Leyenda:

Donde	Código	Concentración	Donde	Código	Concentración
T1	A1B1C1	Semilla x MSc x2.0% Na0cl	T2	A1B1C2	Semilla x MSc x4.0% Na0cl
T3	A1B1C3	Semilla x MSc x6.0% Na0cl	T4	A1B1C4	Semilla x MSc x8.0% Na0cl
T5	A1B2C1	Semilla x B5cx2.0% Na0cl	T6	A1B2C2	Semilla x B5cx4.0% Na0cl
T7	A1B2C3	Semilla x B5cx6.0% Na0cl	T8	A1B2C4	Semilla x B5cx8.0% Na0cl
T9	A1B3C1	Semilla x WPMc x2.0% Na0cl	T10	A1B3C2	Semilla x WPMc x4.0% Na0cl
T11	A1B3C3	Semilla x WPMc x6.0% Na0cl	T12	A1B3C4	Semilla x WPMc x8.0% Na0cl
T13	A2B1C1	Yema terminal x MSc x2.0% Na0cl	T14	A2B1C2	Yema terminal x MSc x4.0% Na0cl
T15	A2B1C3	Yema terminal x MSc x6.0% Na0cl	T16	A2B1C4	Yema terminal x MSc x8.0% Na0cl
T17	A2B2C1	Yema terminal x B5c x2.0% Na0cl	T18	A2B2C2	Yema terminal x B5c x4.0% Na0cl
T19	A2B2C3	Yema terminal x B5c x6.0% Na0cl	T20	A2B2C4	Yema terminal x B5c x8.0% Na0cl
T21	A2B3C1	Yema terminal x WPMc x2.0% Na0cl	T22	A2B3C2	Yema terminal x WPMc x4.0% Na0cl
T23	A2B3C3	Yema terminal x WPMc x6.0% Na0cl	T24	A2B3C4	Yema terminal x WPMc x8.0% Na0cl

Cuadro N°2: Prueba de Duncan para la contaminación sobre explantes de *Croton lechleri* Muell Arg, por tratamientos combinados.

O.M	CLAVE	TRAT.	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA (*)
1	A1B3C3	11	1.420	a
2	A1B1C1	1	1.370	ab
3	A2B2C3	19	1.370	ab
4	A1B2C4	8	1.330	ab
5	A1B2C3	7	1.330	ab
6	A2B3C3	23	1.330	ab
7	A2B1C3	15	1.290	abc
8	A2B2C2	18	1.290	abc
9	A1B3C2	10	1.290	abc
10	A2B2C1	17	1.290	abc
11	A2B1C2	14	1.250	abcd
12	A2B1C1	13	1.210	bcde
13	A2B2C4	20	1.210	bcde
14	A2B3C1	21	1.130	cde
15	A1B1C3	3	1.130	cde
16	A1B1C4	4	1.130	cde
17	A2B3C2	22	1.130	cde
18	A2B3C4	24	1.090	de
19	A1B1C2	2	1.090	de
20	A2B1C4	16	1.090	de
21	A1B2C2	6	1.050	e
22	A1B3C1	9	1.050	e
23	A1B2C1	5	1.050	e
24	A1B3C3	12	1.050	e

* Promedio con letras diferentes difieren estadísticamente.

B. Germinación y brotación

El análisis de varianza de la germinación y brotación del explantes de "Sangre de grado" *Croton lechleri* Muell Arg se muestra en el cuadro N° 03. La germinación y brotación a la 9^{na} semana de evaluación, indica que tanto las concentraciones de hipoclorito de sodio (factor C) y tipo de explante (factor A) e interacción medios de cultivo x tipo explante, resultaron altamente significativa al 0.05 %, mientras que el efecto de la interacción AC, BC y ABC no fueron significativamente diferentes. El

coeficiente de variación de 15.17% indica relativa dispersión para los datos obtenidos.

Cuadro N°3: Análisis de varianza de la germinación y brotación sobre explantes de *Croton lechleri* Muell Arg, para el medio de cultivo (factor B) y niveles de hipocloritos de sodio (factor C) y tipo de explante (factor A).

F.V	G.L	S.C	C.M	FV	Prob.	Sig
Factor A	2	1.088	0.544	18.2585	0.0000	***
Factor B	3	0.176	0.059	1.9661	0.1201	NS
AB	6	1.074	0.179	6.0078	0.0000	***
Factor C	1	0.001	0.001	0.0235	---	*
AC	2	0.018	0.009	0.3055	---	N.S
BC	3	0.030	0.010	0.3368	---	N.S
ABC	6	0.195	0.032	1.0888	0.3701	N.S
Error	216	6.438	0.030	---	----	----
Total	239	9.021	---	---	----	----

Leyenda:

C.V : 15.17%

*** : Alta significancia estadística al 1% de probabilidad

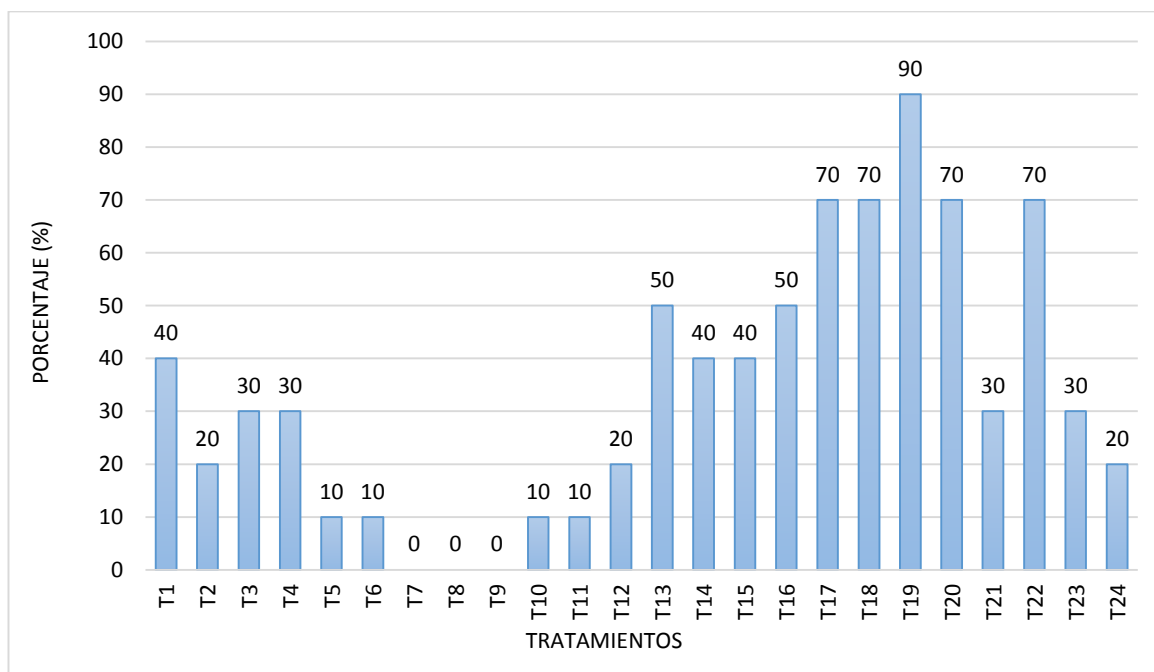
* : Significativo al 5% de probabilidad

N.S. : No significativo

Con la prueba de Tukey aplicada a la germinación y brotación (Cuadro N° 4), se pudo determinar que los tratamientos en yemas terminales (A2) presentaron mayor porcentaje de brotación, tal como se observa en los tratamientos aplicados a la yema terminal con el medio de cultivo B5c al 6% NaOCl (T19:A2B2C3), a 8% NaOCl (T20: A2B2C4), 4% de NaOCl (T18: A2B2C2), a 2% NaOCl (T17: A2B2C2), seguido del porcentaje de brotación y germinación de las yemas terminales con

WPMc con 4% NaOCl (T22: A2B3C2). En cambio en los tratamientos aplicado a las semillas (A1) se obtuvo el menor porcentaje de germinación, siendo el menor cuando se usa como medio de cultivo WPMc con 2% de NaOCl (T9: A1B3C1), seguido del tratamiento que usa como medio de cultivo B5c con 8% de NaOCl (T8: A1B3C1), del tratamiento que usa como medio de cultivo B5c con 6% de NaOCl (T7: A1B2C3), del tratamiento que usa como medio de cultivo B5c con 4% de NaOCl (T6(A1B2C2), del tratamiento que usa como medio de cultivo WPMc con 6% de NaOCl (T11: A1B3C3), del tratamiento que usa como medio de cultivo WPMc con 4% de NaOCl (T10: A1B3C2) tal como se aprecia en el gráfico N° 02.

Gráfico N°2: Porcentaje de Germinación y Brotación de los explantes (semillas y yemas apicales) de *Croton lechleri* Muell Arg, para los tratamientos combinados.



Leyenda:

Donde	Código	Concentración	Donde	Código	Concentración
T1	A1B1C1	Semilla x MSc x2.0% Na0cl	T2	A1B1C2	Semilla x MSc x4.0% Na0cl
T3	A1B1C3	Semilla x MSc x6.0% Na0cl	T4	A1B1C4	Semilla x MSc x8.0% Na0cl
T5	A1B2C1	Semilla x B5cx2.0% Na0cl	T6	A1B2C2	Semilla x B5cx4.0% Na0cl
T7	A1B2C3	Semilla x B5cx6.0% Na0cl	T8	A1B2C4	Semilla x B5cx8.0% Na0cl
T9	A1B3C1	Semilla x WPMc x2.0% Na0cl	T10	A1B3C2	Semilla x WPMc x4.0% Na0cl
T11	A1B3C3	Semilla x WPMc x6.0% Na0cl	T12	A1B3C4	Semilla x WPMc x8.0% Na0cl
T13	A2B1C1	Yema terminal x MSc x2.0% Na0cl	T14	A2B1C2	Yema terminal x MSc x4.0% Na0cl
T15	A2B1C3	Yema terminal x MSc x6.0% Na0cl	T16	A2B1C4	Yema terminal x MSc x8.0% Na0cl
T17	A2B2C1	Yema terminal x B5c x2.0% Na0cl	T18	A2B2C2	Yema terminal x B5c x4.0% Na0cl
T19	A2B2C3	Yema terminal x B5c x6.0% Na0cl	T20	A2B2C4	Yema terminal x B5c x8.0% Na0cl
T21	A2B3C1	Yema terminal x WPMc x2.0% Na0cl	T22	A2B3C2	Yema terminal x WPMc x4.0% Na0cl
T23	A2B3C3	Yema terminal x WPMc x6.0% Na0cl	T24	A2B3C4	Yema terminal x WPMc x8.0% Na0cl

Cuadro N°4: Prueba de Tukey de la variable Contaminación sobre explantes de *Croton lechleri* Muell Arg, para los tratamientos combinados.

O.M	CLAVE	TRAT.	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA (*)
1	A2B2C3	19	1.370	a
2	A2B2C4	20	1.290	ab
3	A2B2C2	18	1.290	ab
4	A2B2C1	17	1.290	ab
5	A2B3C2	22	1.270	ab
6	A2B1C1	13	1.210	ab
7	A2B1C4	16	1.210	ab
8	A2B1C3	15	1.170	ab
9	A2B1C2	14	1.170	ab
10	A1B1C1	1	1.170	ab
11	A2B3C1	21	1.130	ab
12	A2B3C3	23	1.130	ab
13	A1B1C3	3	1.130	ab
14	A1B1C4	4	1.130	ab
15	A1B1C2	2	1.090	ab
16	A1B3C4	12	1.090	ab
17	A2B3C4	24	1.090	ab
18	A1B2C1	5	1.050	b
19	A1B3C2	10	1.050	b
20	A1B3C3	11	1.050	b
21	A1B2C2	6	1.050	b
22	A1B2C3	7	1.000	b
23	A1B2C4	8	1.000	b
24	A1B3C1	9	1.000	b

* Promedio con letras diferentes difieren estadísticamente.

5.2. Experimento 2: Crecimiento y Desarrollo

A. CONTAMINACIÓN

El análisis de varianza de la contaminación sobre explantes de "Sangre de grado" *Croton lechleri* Muell Arg, por los factores medio de cultivo (factor A) y concentraciones de GA3 (factor B) y la interacción con medios de cultivo y concentración de AG3 se observa en el cuadro N° 05. Por el ANVA se demuestra que los promedios de contaminación entre medios de cultivo y la interacción con las concentración de GA3

son estadísticamente diferentes; mientras que el promedio de la contaminación entre concentraciones de GA3 son estadísticamente similares, es decir las concentraciones de fitohormona (GA3) no tuvieron un efecto significativo sobre el tratamiento. El coeficiente de variación 13.76% indica relativa dispersión para los datos obtenidos.

Cuadro N°5: Análisis de Varianza de la Variable Contaminación sobre Explantes (yemas apicales) de *Croton lechleri* Muell Arg. Para los factores medios de cultivo (A) y concentración de AG3 (B) y su interacción.

F.V	G.L	S.C	C.M	FV	Prob.	Sig
Factor A	2	0.235	0.118	3.8311	0.0257	*
Factor B	2	0.146	0.073	2.3716	0.0998	NS
AB	4	0.493	0.123	4.0135	0.0051	**
Error	81	2.488	0.031	--	--	--
Total	89	3.362	--	--	--	--

Leyenda:

C.V. : 13.76%

** : Alta significancia estadística al 1% de probabilidad

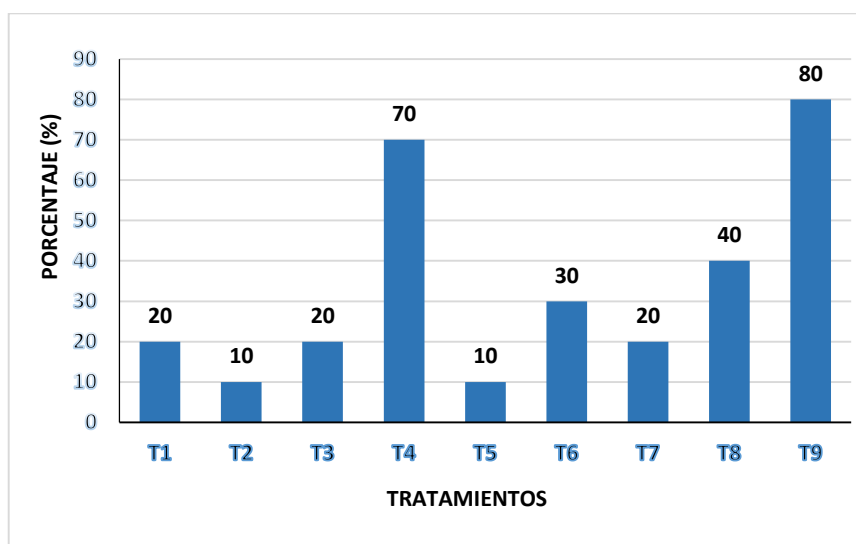
* : Significativo al 5% de probabilidad

NS : No significativo

La prueba de Tukey para el promedio de contaminación sobre explantes de “Sangre de grado” *Croton lechleri* Muell Arg, del Cuadro N° 06, que los promedios más bajos de contaminación en el experimento con yemas apicales con 0 ppm de AG3 y como medio de cultivo B5c (T2: A1B2) y a 0,5 ppm de AG3 y como medio de cultivo B5c (T5: A2B2), con un promedio de 10% y los más altos porcentajes de contaminación se observaron en el tratamiento T4 con 70% que

corresponde a con 0 ppm de AG3 y como medio de cultivo B5c (T4: A2B1) y T9 con 80% respectivamente que corresponde a con 1 ppm de AG3 y como medio de cultivo WPM (T9: A3B3) tal como se puede apreciar en el Gráfico N° 03.

Gráfico N°3: Porcentaje de contaminación de los explantes (yemas apicales) de *Croton lechleri* Muell Arg, por tratamiento combinado



Leyenda:

Tratamiento	Combinación	Concentración
T1	A1 B1 MScompleto	Yema apical x 0,0 GA3 ppm
T2	A1 B2 MScompleto	Yema apical x 0,5 GA3 ppm
T3	A1 B3 MScompleto	Yema apical x 1,0 GA3 ppm
T4	A2 B1 B5completo	Yema apical x 0,0 GA3 ppm
T5	A2 B2 B5completo	Yema apical x 0,5 GA3 ppm
T6	A2 B3 B5completo	Yema apical x 1,0 GA3 ppm
T7	A3 B1WPMcompleto	Yema apical x 0,0 GA3ppm
T8	A3 B2WPMcompleto	Yema apical x 0,5 GA3 ppm
T9	A3B3WPMcompleto	Yema apical x 1,0 GA3 ppm

CUADRO N°6: Prueba de Tukey de la contaminación sobre explantes(yemas apicales) de *Croton lechleri* Muell Arg, por tratamiento combinado

O.M.	CLAVE	TRAT.	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA (*)
1	A2B2B5c	T5	1.370	a
2	A1B2MSc	T2	1.370	a
3	A1B3MSc	T3	1.330	ab
4	A1B1MSc	T1	1.330	ab
5	A3B1WPMc	T7	1.330	ab
6	A2B3B5c	T6	1.290	ab
7	A3B2WPMc	T8	1.250	ab
8	A2B1WPMc	T4	1.130	ab
9	A3B3WPMc	T9	1.090	b

B. SOBREVIVENCIA DE LAS YEMAS APICALES

El análisis de varianza de la sobrevivencia del explante yemas apicales de "Sangre de grado" *Croton lechleri* Muell Arg, se observa en el cuadro N° 07. Mediante el ANVA se detectaron que el medio de cultivo tuvo un efecto altamente significativo en el promedio de la sobrevivencia del explante. La concentración de la fitohormona AG₃ no mostró influencia significativa en el promedio de la sobrevivencia del explante; similar se observa para la interacción de estos factores (AB). El coeficiente de variación de 14.71 % indica relativa dispersión para los datos obtenidos.

Cuadro N°7: Análisis de varianza de la sobrevivencia sobre explantes de *Croton lechleri* Muell Arg, para los factores medios de cultivo (A) y concentración de AG3 (B), y su interacción.

F.V	G.L	S.C	C.M	FV	Prob.	Sig.
Factor A	2	0.474	0.237	7.0123	0.0016	**
Factor B	2	0.194	0.097	2.8712	0.0624	NS
AB	4	0.187	0.047	1.3804	0.2481	NS
Error	81	2.740	0.034			
Total	89	3.595				

Leyenda:

C.V. : 14.71%

** : Alta significancia estadística al 1% de probabilidad

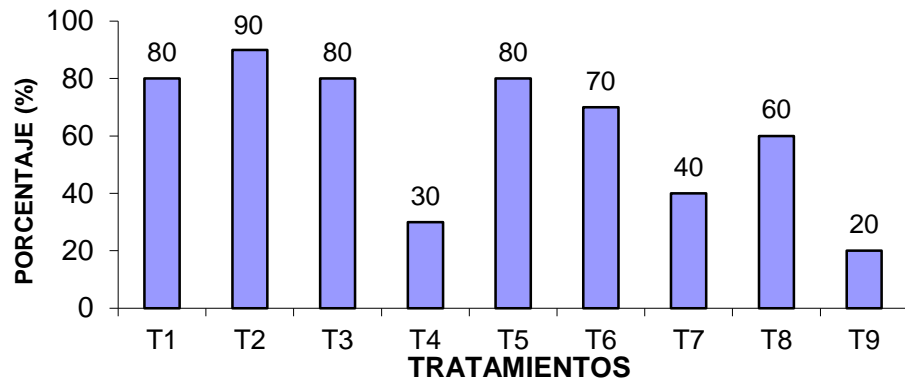
* : Significativo al 5% de probabilidad

NS : No significativo.

La prueba de Tukey de la variable sobrevivencia sobre explante yemas apicales de “Sangre de grado” *Croton lechleri* Muell Arg, se observa en el cuadro Cuadro N° 08; y muestra que los promedios del porcentaje de sobrevivencia más altos de los explantes yemas apicales ocurrieron en los tratamientos T2(A1B2MSc) es decir cuando se aplicaron 0 ppm de AG3 y como medio de cultivo B5c la sobrevivencia fue del 90%, cuando se aplican 0 ppm de AG3 y como medio de cultivo MS T1(A1B1MSc) la sobrevivencia fue 80%, similar resultados se obtuvo en los tratamientos, T3(A1B3MSc) cuando se aplica a 1 ppm de AG3 y como medio de cultivo MSc y con el tratamiento T5(A2B2B5c) es decir aplicando 0,5 ppm de AG3 y como medio de cultivo B5c. En cambio la más baja sobrevivencia se obtuvo con el tratamiento T4(A2B1B5c) con

30%, es decir con 0 ppm de AG3 y medio de cultivo B5c y T9(A3B3WPMc) con 20% con la dosis 1 ppm de AG3 y como medio de cultivo WMP, tal como se aprecia en el Gráfico N° 04.

Gráfico N°4: Porcentaje de sobrevivencia de los explantes de *Croton lechleri* Muell Arg, para los tratamientos combinados.



Leyenda:

Tratamiento	Combinación	Concentración
T1	A1 B1 MScompleto	yema apical x 0,0 GA3 ppm
T2	A1 B2 MScompleto	yema apical x 0,5 GA3 ppm
T3	A1 B3 MScompleto	yema apical x 1,0 GA3 ppm
T4	A2 B1 B5completo	yema apical x 0,0 GA3 ppm
T5	A2 B2 B5completo	yema apical x 0,5 GA3 ppm
T6	A2 B3 B5completo	yema apical x 1,0 GA3 ppm
T7	A3 B1 WPMcompleto	yema apical x 0,0 GA3ppm
T8	A3 B2 WPMcompleto	yema apical x 0,5 GA3 ppm
T9	A3B3 WPMcompleto	yema apical x 1,0 GA3 ppm

Cuadro N°8: Prueba de Tukey para el promedio de sobrevivencia sobre explantes yemas apicales de *Croton lechleri* Muell Arg, para los tratamientos combinados.

O.M	CLAVE	TRAT.	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA(*)
1	A1B2MSc	T2	1.370	a
2	A1B1MSc	T1	1.330	ab
3	A1B3MSc	T3	1.330	ab
4	A2B2B5c	T5	1.330	ab
5	A2B3B5c	T6	1.290	ab
6	A3B2WPMc	T8	1.250	ab
7	A3B1WPMc	T7	1.170	ab
8	A2B1B5c	T4	1.130	ab
9	A3B3WPMc	T9	1.090	b

* Promedio con letras diferentes difieren estadísticamente.

C. NÚMERO DE HOJAS

El análisis de varianza del cuadro N° 09 para número promedio de hojas del explante yemas apicales de “Sangre de grado” *Croton lechleri* Muell Arg, muestra que el medio de cultivo tuvo un efecto altamente significativo en el promedio de la del número de hojas del explante. La concentración de la fitohormona AG₃ no mostró influencia significativa en el promedio de hojas del explante; similar se observa para la interacción de estos factores (AB). El coeficiente de variación de 14.63% indica relativa dispersión para los datos obtenidos.

Cuadro N°9: Análisis de varianza de la variable número de hojas sobre explantes yemas apicales de *Croton lechleri* Muell Arg, para los factores medios de cultivo (A) y concentración de AG3 (B), y su interacción 3.

F.V	G.L	S.C	C.M	FV	Prob.	Sig
Factor A	2	91.622	45.811	7.9221	0.0007	***
Factor B	2	23.022	11.511	1.9906	0.1432	NS
AB	4	30.511	7.628	1.3191	0.2699	NS
Error	81	468.400	5.783			
Total	89	613.556				

Leyenda:

C.V. : 14.63%

*** : Alta significancia estadística al 1% de probabilidad

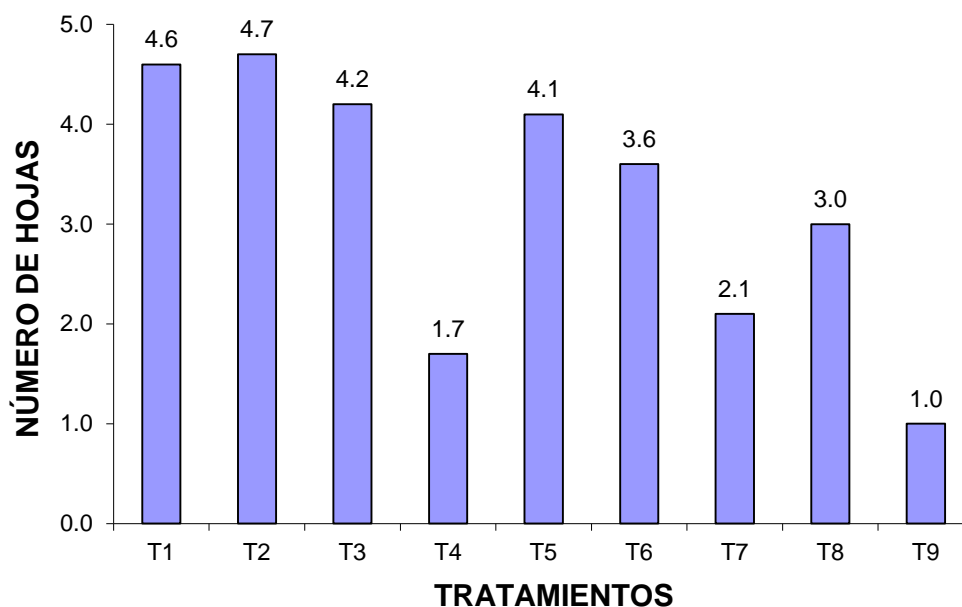
* : Significativo al 5% de probabilidad

NS : No significativo

La prueba de Tukey para el promedio del número de hojas sobre explantes de *Croton lechleri* Muell Arg, se observa en el cuadro Cuadro N° 10; y muestra que los promedios más altos del número de hojas de los explantes yemas apicales ocurrieron en los tratamientos T2(A1B2MSc) es decir cuando se aplicaron 0 ppm de AG3 y como medio de cultivo B5c el promedio del número de hojas del explante fue 4,7 hojas, cuando se aplican 0 ppm de AG3 y como medio de cultivo MS T1(A1B1MSc) el promedio del número de hojas del explante fue 4,6 hojas, similar resultados se obtuvo en los tratamientos, T3(A1B3MSc) cuando se aplica a 1 ppm de AG3 y como medio de cultivo MSc con 4,2 hojas en promedio y con el tratamiento

T5(A2B2B5c) es decir aplicando 0,5 ppm de AG3 y como medio de cultivo B5c con 4,1 hojas en promedio. En cambio la más baja sobrevivencia se obtuvo con el tratamiento T4(A2B1B5c) con 1,7 hojas en promedio, es decir con 0 ppm de AG3 y medio de cultivo B5c y T9(A3B3WPMc) con 1 hoja en promedio con la dosis de 1 ppm de AG3 y como medio de cultivo WMP, tal como se aprecia en el Gráfico N° 05.

Grafico N°5: Número de hojas formados por los explantes de *Croton lechleri* Muell Arg, en interacción con tipos de medio de cultivo y concentración de AG3.



Leyenda:

Tratamiento	Combinación	Concentración
T1	A1 B1 MScompleto	yema apical x 0,0 GA3 ppm
T2	A1 B2 MScompleto	yema apical x 0,5 GA3 ppm
T3	A1 B3 MScompleto	yema apical x 1,0 GA3 ppm
T4	A2 B1 B5completo	yema apical x 0,0 GA3 ppm
T5	A2 B2 B5completo	yema apical x 0,5 GA3 ppm
T6	A2 B3 B5completo	yema apical x 1,0 GA3 ppm
T7	A3 B1WPMcompleto	yema apical x 0,0 GA3ppm
T8	A3 B2WPMcompleto	yema apical x 0,5 GA3 ppm
T9	A3B3WPMcompleto	yema apical x 1,0 GA3 ppm

Cuadro N°10: Prueba de Tukey de la variable número de hojas sobre explantes de *Croton lechleri* Muell Arg, para el tratamiento combinado entre el medio de cultivo y AG3.

O.M	CLAVE	TRAT.	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA (*)
1	A1B2MSc	T2	4.700	a
2	A1B1MSc	T1	4.600	a
3	A1B3MSc	T3	4.200	ab
4	A2B2B5c	T5	4.100	ab
5	A2B3B5c	T6	3.600	ab
6	A3B2WPMc	T8	3.000	ab
7	A3B1WPMc	T7	2.100	ab
8	A2B1B5c	T4	1.700	ab
9	A3B3WPMc	T9	1.000	b

*Promedio con letras diferentes difieren estadísticamente.

D. NUMERO DE NUDOS

El análisis de varianza para el promedio del número de nudos sobre explantes de “Sangre de grado” *Croton lechleri* Muell Arg, se muestra en cuadro N° 11. Mediante el ANVA se detectaron que el medio de cultivo (factor A) tuvo un efecto altamente significativo en el promedio del número de nudos del explante; similar se observa en la interacción AB, indicando que las concentraciones de AG3 interacciona con el medio de cultivo. La concentración de la fitohormona AG₃ no mostró influencia significativa en el promedio de nudos. El coeficiente de variación de 15.24 % indica relativa dispersión para los datos obtenidos.

Cuadro N°11: Análisis de varianza de la variable número de nudos sobre explantes de *Croton lechleri* Muell Arg, para los factores medios de cultivo (A) y concentración de AG3 (B), y su interacción.

F.V	G.L	S.C	C.M	FV	Prob.	Sig
Factor A	2	110.067	55.033	15.9774	0.0000	***
Factor B	2	11.667	5.833	1.6935	0.1903	NS
AB	4	5.667	1.417	0.4113	0.0051	***
Error	81	279.000	3.444	-	-	-
Total	89	406.400	-	-	-	-

Leyenda:

C.V. : 15.24%

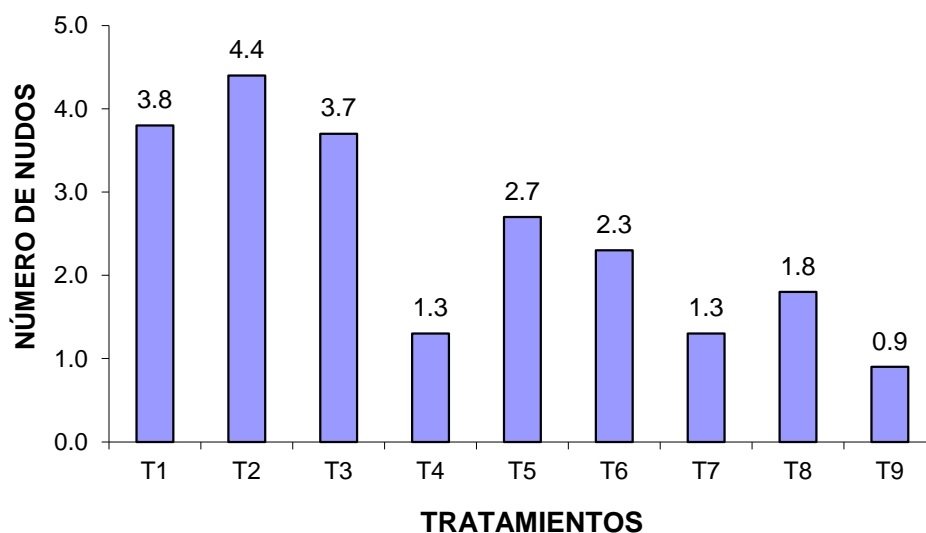
*** : Alta significancia estadística al 1% de probabilidad

* : Significativo al 5% de probabilidad

N.S. : No significativo

La prueba de Tukey para el promedio del número de nudos del cuadro N° 12, muestra que los promedios del número de nudos más altos de los explantes yemas apicales ocurrieron en los tratamientos T2(A1B2MSc) es decir cuando se aplicaron 0 ppm de AG3 y como medio de cultivo B5c con un promedio de 4,4 nudos; cuando se aplican 0 ppm de AG3 y como medio de cultivo MS T1(A1B1MSc) el promedio de nudos fue 3,8. En cambio el promedio de nudos más bajo se observó en T9(A3B3WPMc) con 0,9 nudos con la dosis 1 ppm de AG3 y como medio de cultivo WMP, tal como se aprecia en el Gráfico N° 06.

Grafico N°6: Número de nudos formados por los explantes de *Croton lechleri* Muell Arg, para el tratamiento combinado entre el medio de cultivo y concentración de AG3.



Leyenda:

Tratamiento	Combinación	Concentración
T1	A1 B1 MScompleto	yema apical x 0,0 GA3 ppm
T2	A1 B2 MScompleto	yema apical x 0,5 GA3 ppm
T3	A1 B3 MScompleto	yema apical x 1,0 GA3 ppm
T4	A2 B1 B5completo	yema apical x 0,0 GA3 ppm
T5	A2 B2 B5completo	yema apical x 0,5 GA3 ppm
T6	A2 B3 B5completo	yema apical x 1,0 GA3 ppm
T7	A3 B1WPMcompleto	yema apical x 0,0 GA3ppm
T8	A3 B2WPMcompleto	yema apical x 0,5 GA3 ppm
T9	A3B3WPMcompleto	yema apical x 1,0 GA3 ppm

Cuadro N°12: Prueba de Tukey para el promedio del número de nudos sobre explantes de *Croton lechleri* Muell Arg ,entre los tratamientos combinados del medio de cultivo y concentraciones de AG3.

O.M	CLAVE	TRAT.	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA(*)
1	A1B2MSc	T2	4.400	a
2	A1B1MSc	T1	3.800	ab
3	A1B3MSc	T3	3.700	ab
4	A2B2B5c	T5	2.700	abc
5	A2B3B5c	T6	2.300	abc
6	A3B2WPMc	T8	1.800	abc
7	A3B1WPMc	T7	1.300	bc
8	A2B1B5c	T4	1.300	bc
9	A3B3WPMc	T9	0.900	c

* Promedio con letras diferentes difieren estadísticamente.

E. ALTURA DE LA VITROPLANTA

El análisis de varianza para la altura promedio de la vitroplántula de *Croton lechleri* Muell Arg, se muestra en el Cuadro N° 13. Mediante el ANVA se detectaron que el medio de cultivo tuvo un efecto altamente significativo en el promedio de altura de la vitroplanta. La concentración de la fitohormona AG₃ no mostró influencia significativa en el promedio de altura de la vitroplanta; similar se observa para la interacción de estos factores (AB). El Coeficiente de variación de 13.34% indica relativa dispersión para los datos obtenidos.

Cuadro N°13: Análisis de varianza de la variable altura de la vitroplántula de *Croton lechleri* Muell Arg, entre factores y para la interacción con el medio de cultivo y concentración de AG3.

F.V	G.L	S.C	C.M	FV	Prob..	Sig
Factor A	2	3958.422	1979.211	9.686	0.0002	***
Factor B	2	867.489	433.774	2.1229	0.1263	NS
AB	4	1032.778	258.194	1.2637	0.2911	NS
Error	81	16549.800	204.319			
Total	89	22408.489	--			

Leyenda:

C .V. : 13.34%

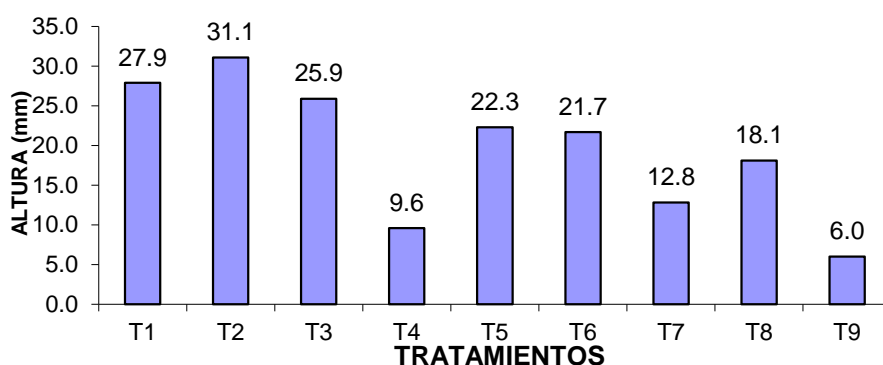
*** : Alta significancia estadística al 1% de probabilidad

* : Significativo al 5% de probabilidad

NS : No significativo

La prueba de Tukey aplicado al promedio de altura de la vitroplántula de *Croton lechleri* Muell Arg, se observa en el cuadro N° 14; y muestra que los promedios de la altura más altos de la vitroplanta (31,1 mm) ocurrieron sin el empleo de AG3, pero con el medio de cultivo B5c (T2: A1B2), cuando se usa el medio de cultivo MSc (T1: A1B1) el promedio en altura fue 27,9 mm. En cambio la altura promedio mas bajo (6 mm) se obtuvo aplicando AG3 al 1 ppm y como medio de cultivo WMP (T9A3B3WPMc), tal como se aprecia en el Gráfico N° 07.

Grafico N°7: Altura de la vitroplántula de *Croton lechleri* Muell Arg. los tratamientos combinados.



Leyenda:

Tratamiento	Combinación	Concentración
T1	A1 B1 MScompleto	yema apical x 0,0 GA3 ppm
T2	A1 B2 MScompleto	yema apical x 0,5 GA3 ppm
T3	A1 B3 MScompleto	yema apical x 1,0 GA3 ppm
T4	A2 B1 B5completo	yema apical x 0,0 GA3 ppm
T5	A2 B2 B5completo	yema apical x 0,5 GA3 ppm
T6	A2 B3 B5completo	yema apical x 1,0 GA3 ppm
T7	A3 B1WPMcompleto	yema apical x 0,0 GA3ppm
T8	A3 B2WPMcompleto	yema apical x 0,5 GA3 ppm
T9	A3B3WPMcompleto	yema apical x 1,0 GA3 ppm

Cuadro N°14: Prueba de Tukey aplicado al promedio de altura de la vitroplántula de *Croton lechleri* Muell Arg, para el tratamiento combinado.

O.M	CLAVE	TRAT.	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA (*)
1	A1B2MSc	T2	31.10	a
2	A1B1MSc	T1	27.90	ab
3	A1B3MSc	T3	25.90	abc
4	A2B2B5c	T5	22.30	abc
5	A2B3B5c	T6	21.70	abc
6	A3B2WPMc	T8	18.10	abc
7	A3B1WPMc	T7	12.80	abc
8	A2B1B5c	T4	9.60	bc
9	A3B3WPMc	T9	6.00	c

*Promedio con letras diferentes difieren estadísticamente.

F. NÚMERO DE RAÍCES

El análisis de varianza para el promedio del número de raíces formadas en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg, a nivel de factores e interacción se observa en el cuadro N° 15. Mediante el ANVA se detectaron que el medio de cultivo (factor A) tuvo un efecto altamente significativo en el promedio del número de raíces formadas en la vitroplanta; similar se observa en la interacción AB, indicando que las concentraciones de AG3 interacciona con el medio de cultivo, pues una mayor concentración de AG3 aunada al medio de cultivo influye negativamente en la formación de raíces. La concentración de la fitohormona AG₃ no mostró influencia significativa en el promedio de raíces de la vitroplanta. El coeficiente de variación de 17.69%, indica confianza experimental para los datos obtenidos.

Cuadro N°15: Análisis de varianza para el promedio de raíces formadas en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg, entre factores (A y B) e interacción entre el medio de cultivo y concentración de AG3.

F.V	G.L	S.C	C.M	FV	Prob..	Sig
Factor A	2	11.089	5.544	6.4993	0.0024	**
Factor B	2	4.356	2.178	2.5528	0.0841	NS
AB	4	3.244	0.811	0.9508	0.0051	**
Error	81	69.100	0.853			
Total	89	87.789	--			

Leyenda:

C .V. : 17.69%

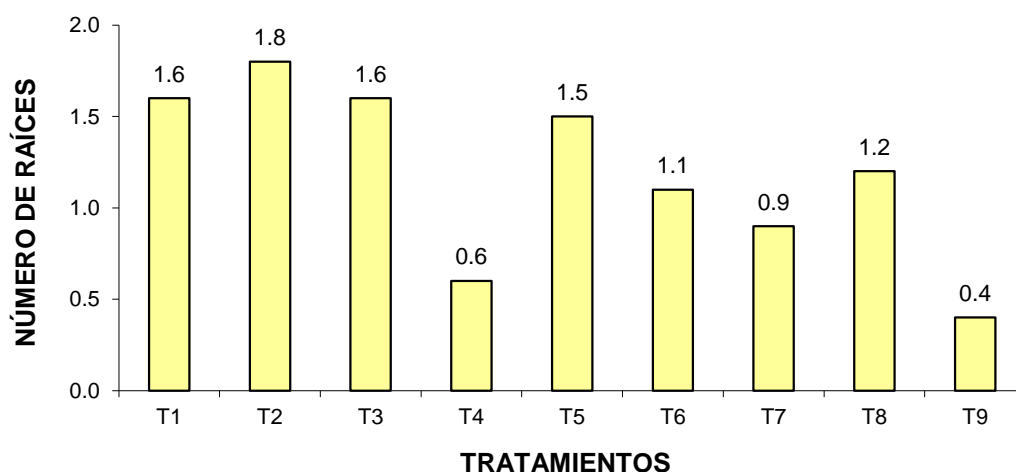
** : Alta significancia estadística al 1% de probabilidad

* : Significativo al 5% de probabilidad

N.S. : No significativo

La prueba de Tukey para el promedio del número de raíces formadas en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg, del cuadro N° 12, muestra que los promedios del número de raíces más altos de la vitroplanta ocurrieron sin aplicar AG3 (B1), así usando el medio de cultivo B5c tratamiento T2: A1B2MSc se obtuvo un promedio de 1,8 raíces; y usando como medio de cultivo el MS tratamiento T1: A1B1MSc el promedio de raíces fue 1,6. En cambio el promedio de raíces más bajo se observó en T9(A3B3WPMc) con 0,4 raíces por vitroplanta a 1 ppm de AG3 y como medio de cultivo WMP, tal como se aprecia en el Gráfico N° 08.

Gráfico N°8: Número de raíces formadas en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg, para los tratamientos combinados del medio de cultivo y concentración de AG3.



Leyenda:

Tratamiento	Combinación	Concentración
T1	A1 B1 MScompleto	yema apical x 0,0 GA3 ppm
T2	A1 B2 MScompleto	yema apical x 0,5 GA3 ppm
T3	A1 B3 MScompleto	yema apical x 1,0 GA3 ppm
T4	A2 B1 B5completo	yema apical x 0,0 GA3 ppm
T5	A2 B2 B5completo	yema apical x 0,5 GA3 ppm
T6	A2 B3 B5completo	yema apical x 1,0 GA3 ppm
T7	A3 B1WPMcompleto	yema apical x 0,0 GA3ppm
T8	A3 B2WPMcompleto	yema apical x 0,5 GA3 ppm
T9	A3B3WPMcompleto	yema apical x 1,0 GA3 ppm

Cuadro N°16: Prueba de Tukey para el promedio de raíces formadas en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg, para el tratamiento combinado del medio de cultivo y concentraciones de AG3.

O.M	CLAVE	TRAT.	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA (*)
1	A1B1MSc	T2	1.800	a
2	A1B1MSc	T1	1.600	ab
3	A1B1MSc	T3	1.600	ab
4	A2B2B5c	T5	1.500	ab
5	A3B3WPMc	T8	1.200	ab
6	A2B2B5c	T6	1.100	ab
7	A3B3WPMc	T7	0.900	ab
8	A2B2B5c	T4	0.600	ab
9	A3B3WPMc	T9	0.400	b

* Promedio con letras diferentes difieren estadísticamente.

5.3. Experimento 3: Multiplicación o Proliferación

A. CONTAMINACIÓN:

En este experimento no se observó contaminación en los tratamientos combinados.

B. SOBREVIVENCIA:

La sobrevivencia para todos los tratamientos fue 100 %.

C. NÚMERO DE HOJAS:

El análisis de varianza para número de hojas formadas en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg., por factores e interacción del medio de cultivo y concentración de Bencil amino purina (BAP) se muestra en el cuadro N° 17. Mediante el ANVA se detectó que el medio de cultivo tuvo un efecto altamente significativo en el promedio del número de hojas. La concentración de N6 bencil amino purina (BAP) no mostró influencia significativa en el promedio del número de hojas; similar se observa para la interacción de estos factores (AB)

El coeficiente de variación de 18.95% indica relativa dispersión para los datos obtenidos.

Cuadro N°17: Análisis de varianza del número promedio de hojas formadas en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg, por factores y tratamiento combinado de la interacción con medios de cultivo y concentración de BAP.

F.V	G.L	S.C	C.M	FV	Prob.	Sig
Factor A	2	5.000	2.500	3.6552	0.0302	*
Factor B	2	0.467	0.233	0.3412		N.S
AB	4	1.533	0.383	0.5605		N.S
Error	81	55.400	0.684			
Total	89	62.400				

Leyenda:

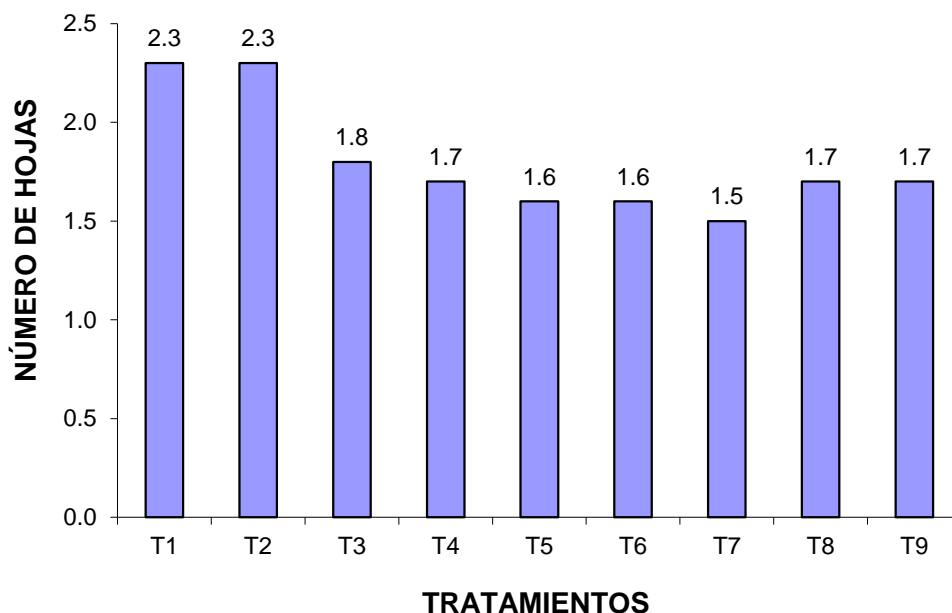
C. V. : 18.95%

* : Significativo al 1% de probabilidad

N.S. : No significativa

La prueba de Tukey para el promedio del número de hojas formadas en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg., para los tratamientos combinados del medio de cultivo y concentraciones de Bencil amino purina (BAP) se muestra en el cuadro N°18. Esta prueba muestra que no existe diferencias significativas entre los promedios de los tratamientos combinados. Ligeramente destacan por su mayor valor promedio del número de hojas el tratamiento T1, es decir cuando se trabaja con yema apical sin adición de BAP (T1: A1B1) y con adición de 0,25 ppm de BAP (T2:A1B2), ambos tuvieron en promedio 2,3 hojas por vitroplanta como se aprecia en el Gráfico N° 09.

Gráfico N°9 : Número de hojas formadas en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg, en interacción con tipos de medio de cultivo y concentración de BAP.



:

Leyenda:

Tratamiento	Combinación	Concentración
T1	A1 B1 MS completo	yema apical + 0,0 ppm BAP
T2	A1 B2 MS completo	yema apical + 0,25 ppm BAP
T3	A1 B3 MS completo	yema apical + 0,50 ppm BAP
T4	A2 B1 B5 completo	yema apical + 0,0 ppm BAP
T5	A2 B2 B5 completo	yema apical + 0,25 ppm BAP
T6	A2 B3 B5 completo	yema apical + 0,50 ppm BAP
T7	A3 B1 WPM completo	yema apical + 0,0 ppm BAP
T8	A3 B2 WPM completo	yema apical + 0,25 ppm BAP
T9	A3B3 WPM completo	yema apical + 0,50 ppm BAP

Cuadro N°18: Prueba de Tukey del promedio del número de hojas

**formadas en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg,
por tratamiento combinado del medio de cultivo y
concentraciones de Bencil Amino Purina (BAP).**

O. M	CLAVE	TRAT.	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA (*)
1	A1B1MSc	T1	2.300	a
2	A1B2MSc	T2	2.300	a
3	A1B3MSc	T3	1.800	a
4	A2B1B5c	T4	1.700	a
5	A3B3WPMc	T9	1.700	a
6	A3B2WPMc	T8	1.700	a
7	A2B2B5c	T5	1.600	a
8	A2B3B5c	T6	1.600	a
9	A3B1WPMc	T7	1.500	a

*Promedio con letras diferentes difieren estadísticamente.

D. NÚMERO DE NUDO

Análisis de varianza de la variable número de nudos formadas en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg., por factores e interacción del medio de cultivo y concentración de Bencil amino purina (BAP) se muestra en el cuadro N° 19. Mediante el ANVA se detectó que el medio

de cultivo tuvo un efecto altamente significativo en el promedio del número de nudos. La concentración de N6 bencil amino purina (BAP) no mostró influencia significativa en el promedio del número de nudos; similar se observa para la interacción de estos factores (AB).

El coeficiente de variación de 17.64 % indica relativa dispersión para los datos obtenidos.

Cuadro N°19: Análisis de varianza de la variable número de nudos formadas en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg, por factores y tratamiento combinado de la interacción con medios de cultivo y concentración de BAP.

F.V	G.L	S.C	C.M	FV	Prob.	Sig
Factor A	2	2.289	1.144	8.2035	0.0006	***
Factor B	2	0.556	0.278	1.9912	0.1432	N.S
AB	4	0.978	0.244	1.7522	0.1466	N.S
Error	81	11.300	0.140			
Total	89	15.122	---			

Leyenda:

C. V. : 17.64%

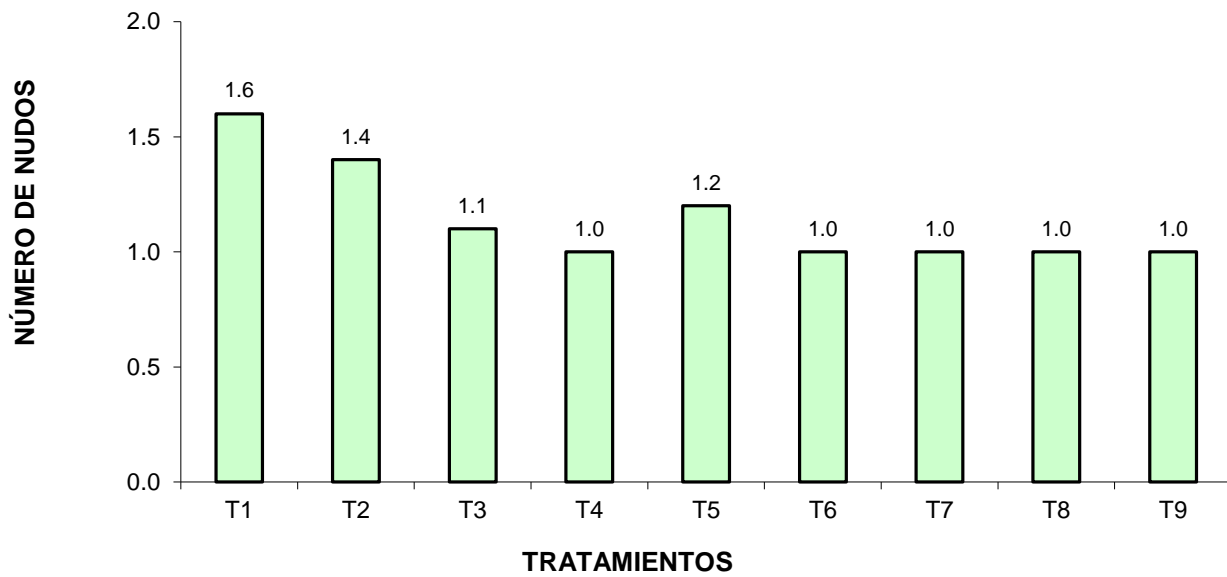
*** : Significativo al 1% de probabilidad

N.S. : No significativo

La prueba de Tukey para el promedio del número de nudos formados en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg., para los tratamientos combinados del medio de cultivo y concentraciones de Bencil amino purina (BAP) se muestra en el Cuadro N° 20. Esta prueba muestra que existe diferencias significativas entre los promedios de los tratamientos combinados, el mayor número promedio de nudos corresponde al tratamiento T1, es decir cuando se trabaja con yema apical sin adición

de BAP (T1: A1B1) con en promedio 1,6 nudos por vitroplanta (Gráfico N° 10).

Gráfico N°10: Número de nudos formados en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg, por tratamiento combinado entre el medio de cultivo y concentración de BAP.



Leyenda:

Tratamiento	Combinación	Concentración
T1	A1 B1 MS completo	yema apical + 0,0 ppm BAP
T2	A1 B2 MS completo	yema apical + 0,25 ppm BAP
T3	A1 B3 MS completo	yema apical + 0,50 ppm BAP
T4	A2 B1 B5 completo	yema apical + 0,0 ppm BAP
T5	A2 B2 B5 completo	yema apical + 0,25 ppm BAP
T6	A2 B3 B5 completo	yema apical + 0,50 ppm BAP
T7	A3 B1 WPM completo	yema apical + 0,0 ppm BAP
T8	A3 B2 WPM completo	yema apical + 0,25 ppm BAP
T9	A3B3 WPM completo	yema apical + 0,50 ppm BAP

Cuadro N°20: Prueba de Tukey para el número promedio de nudos Formadas en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg, por tratamiento combinado entre el medio de cultivo y concentraciones de BAP.

O.M.	CLAVE	TRAT.	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA (*)
1	A1B1MSc	T1	1.600	a
2	A1B2MSc	T2	1.400	ab
3	A2B2B5c	T5	1.200	ab
4	A1B3MSc	T3	1.100	ab
5	A2B1B5c	T4	1.000	b
6	A2B3B5c	T6	1.000	b
7	A3B1WPMc	T7	1.000	b
8	A3B2WPMc	T8	1.000	b
9	A3B3WPMc	T9	1.000	b

*Promedio con letras diferentes difieren estadísticamente.

E. ALTURA DE LA VITROPLÁNTULA

El análisis de varianza de la altura promedio de la vitroplántula de *Croton lechleri* Muell Arg, por factores A, Factor B, y la interacción A*B (medios de cultivo y concentración de BAP) se observa en el cuadro N° 21. El ANVA muestra que la altura promedio de las vitroplantas difiere estadísticamente cuando varía el medio de cultivo (factor A), similar ocurre cuando varía las concentraciones de N6 bencil amino purina (BAP) y que ambos factores interaccionan entre sí. El coeficiente de variación de 10.07% indica relativa dispersión para los datos obtenidos.

Cuadro N°21: Análisis de varianza para el promedio en altura de la vitroplantula de *Croton lechleri* Muell Arg, por factores e interacción de cultivo y concentración de BA(AB).

F.V	G.L	S.C	C.M	FV	Prob.	Sig
Factor A	2	15.089	7.544	5.0049	0.0089	**
Factor B	2	17.689	8.844	5.8673	0.0042	**
AB	4	22.911	5.728	5.7998	0.0070	**
Error	81	122.100	1.507			
Total	89	177.789	--			

Leyenda:

C. V. : 10.07%

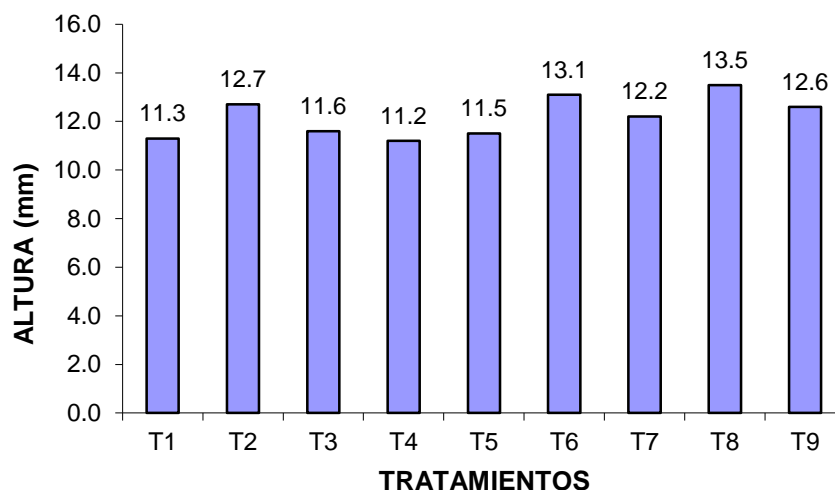
** : Significativo al 1% de probabilidad

* : No significativo

La prueba de Tukey para la altura promedio de la vitroplántula de *Croton lechleri* Muell Arg, por tratamiento combinado entre el medio de cultivo y concentraciones de BAP. Con la prueba se demuestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos, el tratamiento T8 (A3B2WPMc) alcanzó altura máxima con un promedio de 13.50 mm, que corresponde al medio de cultivo CMPC con 0,25 ppm BAP aplicadas a la yema apical (Gráfico N° 11).

Grafico N°11: Altura promedio (mm) de la vitroplántula de *Croton lechleri*

Muell Arg, para los tratamiento combinados el medio de cultivo y concentración de BAP.



Legenda:

Tratamiento	Combinación	Concentración
T1	A1 B1 MS completo	yema apical + 0,0 ppm BAP
T2	A1 B2 MS completo	yema apical + 0,25 ppm BAP
T3	A1 B3 MS completo	yema apical + 0,50 ppm BAP
T4	A2 B1 B5 completo	yema apical + 0,0 ppm BAP
T5	A2 B2 B5 completo	yema apical + 0,25 ppm BAP
T6	A2 B3 B5 completo	yema apical + 0,50 ppm BAP
T7	A3 B1 WPM completo	yema apical + 0,0 ppm BAP
T8	A3 B2 WPM completo	yema apical + 0,25 ppm BAP
T9	A3B3 WPM completo	yema apical + 0,50 ppm BAP

Cuadro N°22: Prueba de Tukey para la altura promedio de la vitroplántula de *Croton lechleri* Muell Arg, para los tratamiento combinados del medio de cultivo y concentración de BAP.

O.M.	CLAVE	TRAT.	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA (*)
1	A3B2WPMc	T8	13.50	a
2	A2B3B5c	T6	13.10	ab
3	A1B2MSc	T2	12.70	abc
4	A3B3WPMc	T9	12.60	abc
5	A3B1WPMc	T7	12.20	abc
6	A1B3MSc	T3	11.60	bc
7	A2B2B5c	T5	11.50	bc
8	A1B1MSc	T1	11.30	c
9	A2B1B5c	T4	11.20	c

* Promedio con letras diferentes difieren estadísticamente

5.4. Experimento 4: Enraizamiento

A. CONTAMINACIÓN

En este experimento no se detectó contaminación alguna.

B. SOBREVIVENCIA

El análisis de varianza para la sobrevivencia de explantes de *Croton lechleri* Muell Arg, según el medio de cultivo (factor A), la concentración de AIB en la sobrevivencia (factor B) y para la interacción con medios de cultivo y concentración de AIB se muestra en el cuadro N° 23. En este cuadro se observa que el medio de cultivo (factor A), la concentración de AIB (factor B) e interacción entre estos factores (AB) que corresponde al medio de cultivo x concentración de AIB no tienen un efecto significativo en la sobrevivencia de las vitroplantas. El

coeficiente de variación de 10.87% indica relativa dispersión para los datos obtenidos.

Cuadro N°23: Análisis de varianza de la variable sobrevivencia de explantes de *Croton lechleri* Muell Arg, por factores A y B, y para la interacción con medios de cultivo y concentración de AIB (Int A*B).

F.V	G.L	S.C	C.M	FV	Prob.	Sig
Factor A	1	0.067	0.067	13.304	0.0853	*
Factor B	1	0.000	0.000	0.0000	--	N.S
AB	1	0.017	0.017	0.7826	--	N.S
Error	36	0.773	0.021			
Total	39	0.857	--			

Leyenda:

C.V. : 10.87%

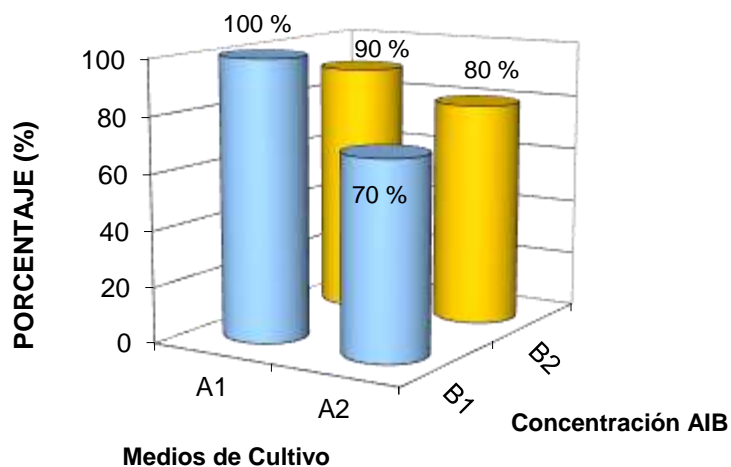
* : Significativo al 1% de probabilidad

N.S. : No significativo

La prueba de Tukey de la sobrevivencia de explantes de *Croton lechleri* Muell Arg, para el tratamiento combinado de la interacción con el medio de cultivo y concentraciones de AIB (Cuadro N° 24), muestra que no existen diferencias significativas en los cuatro tratamientos combinados, con todo el T1(A1B1MS) presentó mayor promedio de sobrevivencia (100%), en términos generales el porcentaje de sobrevivencia varió entre 70 a 100% (Gráfico N° 12).

Grafico N°12: Porcentaje de sobrevivencia de explantes de *Croton lechleri*

Muell Arg, por tratamiento combinado con el medio de cultivo y concentración de AIB.



Leyenda:

Tratamiento	Combinación	Concentración
T1	A1 B1 MS completo	2,0 ppm AIB
T2	A1 B2 MS completo	5,0 ppm AIB
T3	A2 B1 B5 completo	2,0 ppm AIB
T4	A2 B2 B5 completo	5,0 ppm AIB

Cuadro N°24: Prueba de Tukey para la sobrevivencia de explantes de *Croton lechleri* Muell Arg, por factores A y B, y para la interacción con medios de cultivo y concentración de AIB (Int A*B).

O.M.	CLAVE	TRAT.	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA (*)
1	A1B1MSc	T1	1.410	a
2	A1B2MSc	T2	1.370	a
3	A2B1B5c	T4	1.330	a
4	A2B2B5c	T3	1.290	a

*Promedio con letras diferentes difieren estadísticamente.

C. OXIDACIÓN

El análisis de varianza del promedio de la oxidación de explantes de *Croton lechleri* Muell Arg, según el medio de cultivo (factor A), la concentración de AIB (factor B) y la interacción con medios de cultivo y concentración de AIB se muestra en el cuadro N° 25. En este cuadro se observa que el medio de cultivo (factor A), la concentración de AIB (factor B) e interacción entre estos factores (AB) que corresponde al medio de cultivo x concentración de AIB no tienen un efecto significativo en la oxidación de los explantes. En el Gráfico N° 13, se observa los porcentajes de oxidación de los explantes por tratamiento el cual muestra T3(A2B1B5c) que corresponde al medio de cultivo B5c con 2 ppm de AIB presentó la mas alta oxidación (70%) y el menor porcentaje de oxidación fue observado en el tratamiento T2 (A1B2) con 4% que corresponde al medio de cultivo MS5 completo y 5 ppm de AIB. El coeficiente de variación de 20.84% indica relativa dispersión para los datos obtenidos.

Cuadro 25: Análisis de varianza de la variable oxidación de los explantes *Croton lechleri* Muell Arg, por factores A y B, y para la interacción del medio de cultivo con la concentración de AIB.

F.V	G.L	S.C	C.M	FV	Prob.	Sig
Factor A	1	0.129	0.129	0.7452	---	N.S
Factor B	1	0.348	0.348	2.0120	0.1647	N.S
AB	1	0.129	0.129	0.7452	--	N.S
Error	36	6.223	0.173			
Total	39	6.829	--			

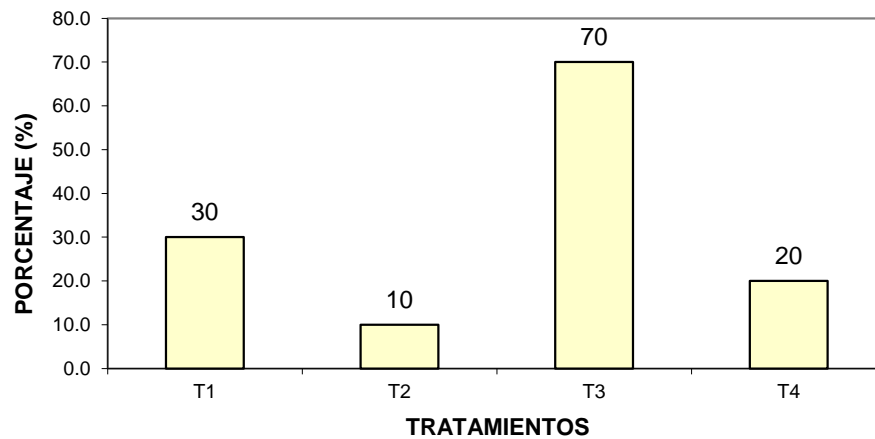
Leyenda:

C. V. : 20.84%

N.S. : No significativo

Grafico N°13: Porcentaje de oxidación de explantes de *Croton lechleri*

Muell Arg, por tratamiento combinado entre el medio de cultivo y la concentración de AIB.



Leyenda:

Tratamiento	Combinación	Concentración
T1	A1 B1 MS completo	2,0 ppm AIB
T2	A1 B2 MS completo	5,0 ppm AIB
T3	A2 B1 B5 completo	2,0 ppm AIB
T4	A2 B2 B5 completo	5,0 ppm AIB

D. NÚMERO DE HOJAS

El análisis de varianza para el número de hojas formadas en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg , por el número de hojas formados en vitroplántulas según el medio de cultivo (factor A), según la concentración de AIB (factor B) y para la interacción con medios de

cultivo y concentración de AIB se muestra en el cuadro N° 26. En este cuadro se observa que el medio de cultivo (factor A), la concentración de AIB (factor B), así como la interacción entre estos factores (AB) que corresponde al medio de cultivo x concentración de AIB no tienen un efecto significativo en el número promedio de hojas formados en vitroplántulas.

Con todo un mayor número de hojas formadas en vitroplántulas se observó en el tratamiento T1(A1B1MSc) con un promedio de 2.4 hojas por vitroplántula correspondiente a la aplicación del medio de cultivo MS completo con 2 ppm de AID, tal como se indica en el Gráfico N° 14. El coeficiente de variación 42.43 %, indica relativa dispersión para los datos obtenidos.

Cuadro N°26: Análisis de varianza de la variable número de hojas formados en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg, para los medios de cultivo (factor A) y concentración de AIB (factor B) y para la interacción A*B.

F.V	G.L	S.C	C.M	FV	Prob.	Sig
Factor A	1	1.600	1.600	2.4615	0.1254	N.S
Factor B	1	0.100	0.100	0.1538	--	N.S
AB	1	2.500	2.500	3.8462	0.0572	N.S
Error	36	23.400	0.650			
Total	39	27.700	--			

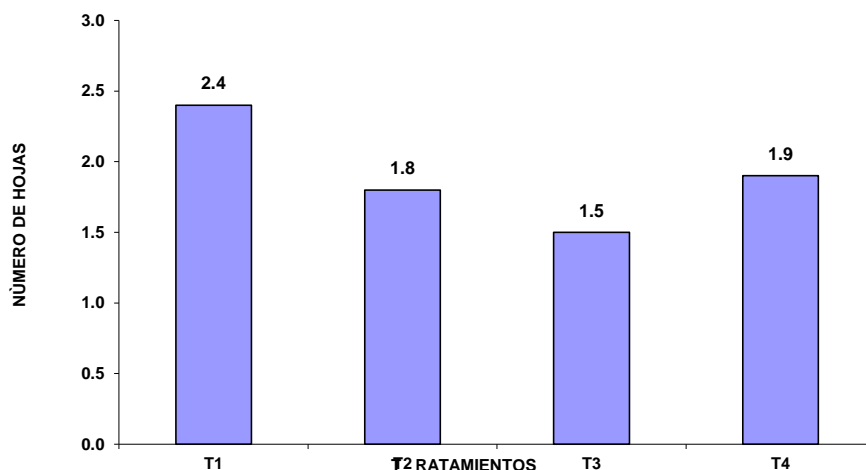
Leyenda:

C. V. : 42.43%;

* : Significativo al 1% de probabilidad

N.S : No significativo

Grafico N°14: Número de hojas formadas en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg, para los tratamientos combinados entre el medio de cultivo y concentración de AIB.



Leyenda:

Tratamiento	Combinación	Concentración
T1	A1 B1 MS completo	2,0 ppm AIB
T2	A1 B2 MS completo	5,0 ppm AIB
T3	A2 B1 B5 completo	2,0 ppm AIB
T4	A2 B2 B5 completo	5,0 ppm AIB

E. NÚMERO DE NUDOS

El análisis de varianza para el número de nudos formados en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg, según el medio de cultivo (factor A) y según la concentración de AIB (factor B) y para la interacción con medios de cultivo y concentración de AIB se muestra en el cuadro N° 27. En este cuadro se observa que el promedio de

nudos por medio de cultivo (factor A) difiere significativamente. Pero el promedio de nudos por concentraciones de AIB no difiere estadísticamente, así como la interacción entre estos factores (AB) que corresponde al medio de cultivo x concentración de AIB no tienen un efecto significativo en el número promedio de nudos formados en vitroplántulas.

Con todo un mayor número de nudos formados en vitroplántulas se observó en el tratamiento T1(A1B1MSc) con un promedio de 2.0 nudos por vitroplántula correspondiente a la aplicación del medio de cultivo MS completo con 2 ppm de AID, tal como se indica en el Gráfico N° 15. El coeficiente de variación de 38.33% indica relativa dispersión para los datos obtenidos.

Cuadro N°27: Análisis de varianza para el número promedio de nudos formados en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg, según el medio de cultivo (factor A) y concentración de AIB (factor B), y su interacción (AB).

F.V	G.L	S.C	C.M	FV	Prob.	Sig
Factor A	1	2.500	2.500	6.2500	0.0171	*
Factor B	1	0.100	0.100	0.2500	--	N.S.
AB	1	0.100	0.100	0.2500	--	N.S
Error	36	14.400	0.400	--	--	--
Total	39	17.100	--	--	--	--

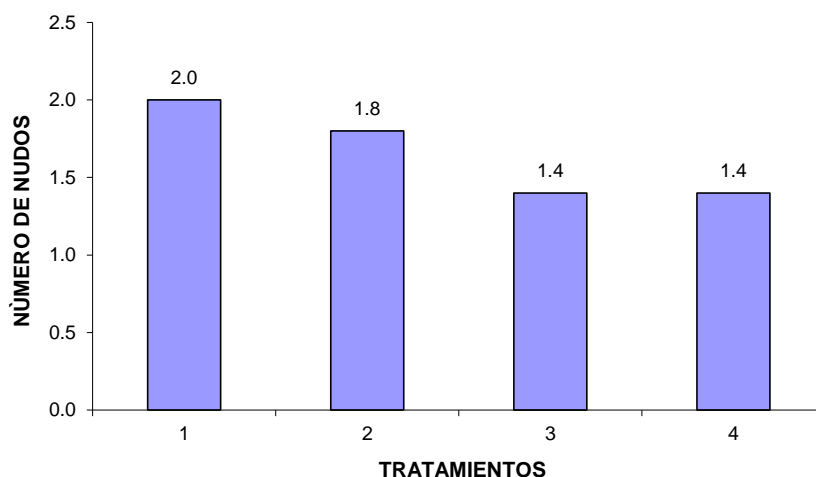
Leyenda:

C. V. : 38.33%

* : Significativo al 1% de probabilidad

N.S. : No significativo

Grafico 15: Número de nudos formadas en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg, para los tratamientos combinados entre el medio de cultivo y concentración de AIB.



Leyenda:

Tratamiento	Combinación	Concentración
T1	A1 B1 MS completo	2,0 ppm AIB
T2	A1 B2 MS completo	5,0 ppm AIB
T3	A2 B1 B5 completo	2,0 ppm AIB
T4	A2 B2 B5 completo	5,0 ppm AIB

F. ALTURA DE LA VITROPLÁNTULA

El análisis de varianza para la altura promedio de la vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg, según el medio de cultivo (factor A), la concentración de AIB (factor B) y para la interacción con medios de cultivo y concentración de AIB se muestra en el cuadro N° 28. En este cuadro se observa que el medio de cultivo (factor A), la concentración de AIB (factor B), así como la interacción entre estos factores (AB) que corresponde al medio de cultivo x concentración de AIB no tienen un efecto significativo en la altura promedio de las vitroplántulas. con

todo un mayor número de hojas formadas en vitroplántulas se observó en el tratamiento T1(A1B1MSc) con un promedio de 10,7 mm de longitud por vitroplántula correspondiente a la aplicación del medio de cultivo MS completo con 2 ppm de AID, tal como se indica en el Gráfico N° 16.

El coeficiente de variación 34.13% indica relativa dispersión para los datos obtenidos.

Cuadro N°28: Análisis de varianza de la variable altura de la vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg, según el medio de cultivo (factor A) y concentración de AIB (factor B), y su interacción (AB).

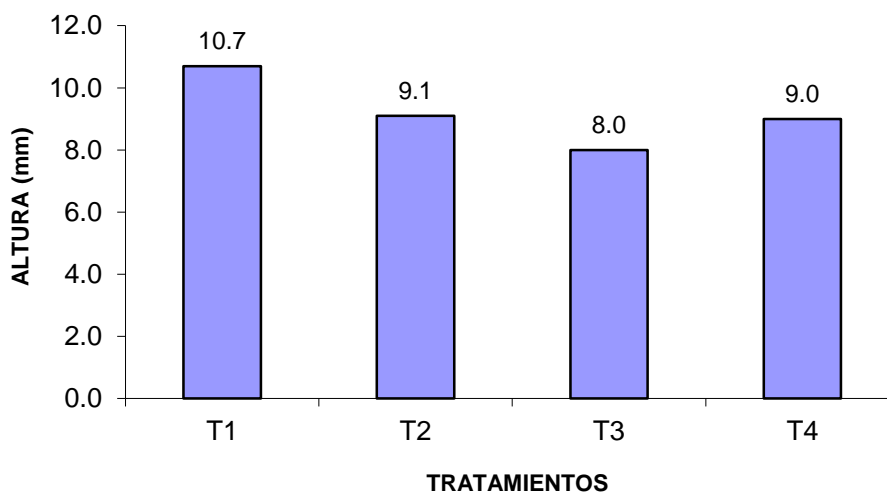
F.V	G.L.	S.C	C.M	FV	Prob.	Sig
Factor A	1	19.600	19.600	1.9876	0.1672	N.S
Factor B	1	0.900	0.900	0.0913	--	N.S
AB	2	16.900	16.900	1.7138	0.1988	N.S
Error	36	355.000	9.861	--	--	--
Total	39	392.400	--	--	--	--

Leyenda:

C.V. : 34.13%G

N.S. : No significativo

Grafico 16: Altura de la vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg, para los tratamientos combinados entre el medio de cultivo y concentración de AIB.



Leyenda:

Tratamiento	Combinación	Concentración
T1	A1 B1 MS completo	2,0 ppm AIB
T2	A1 B2 MS completo	5,0 ppm AIB
T3	A2 B1 B5 completo	2,0 ppm AIB
T4	A2 B2 B5 completo	5,0 ppm AIB

G. NÚMERO DE RAÍZ

El análisis de varianza para el número promedio de raíces de la vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg, según el medio de cultivo (factor A), la concentración de AIB (factor B) y para la interacción con medios de cultivo y concentración de AIB se muestra en el cuadro N° 29. En este cuadro se observa que el medio de cultivo (factor A), y la interacción entre estos factores (AB) que corresponde al medio de cultivo x concentración de AIB no tienen un efecto significativo en el número promedio de raíces de las vitroplántulas. Pero la concentración

de AIB (factor B) tiene un efecto estadísticamente significativo en el número promedio de raíces de las vitroplántulas.

Con todo un mayor número de raíces formados en vitroplántulas se observó que cuando se aplica 5 ppm de AIB aunada al medio de cultivo B5completo (T4: A2B2B5c) y medio de cultivo MS completo del tratamiento T2 (A1B2 MSc), estos presentaron un promedio de 1,3 y 1,2 raíces respectivamente tal como se indica en el Gráfico N° 17. El coeficiente de variación 19.71%, indica relativa dispersión para los datos.

Cuadro N°29: Análisis de varianza de la variable número de raíces formadas en vitroplántulas de *Croton lechleri* Muell Arg, según el medio de cultivo (factor A) y concentración de AIB (factor B), y su interacción (AB).

F.V	G.L	S.C	C.M	FV	Prob.	Sig
Factor A	1	0.225	0.225	0.4241	--	N.S
Factor B	1	3.025	3.025	5.7016	0.0223	*
AB	1	0.625	0.625	1.1780	0.2850	N.S
Error	36	19.1000	0.531	--	--	--
Total	39	22.975	--	--	--	--

Leyenda:

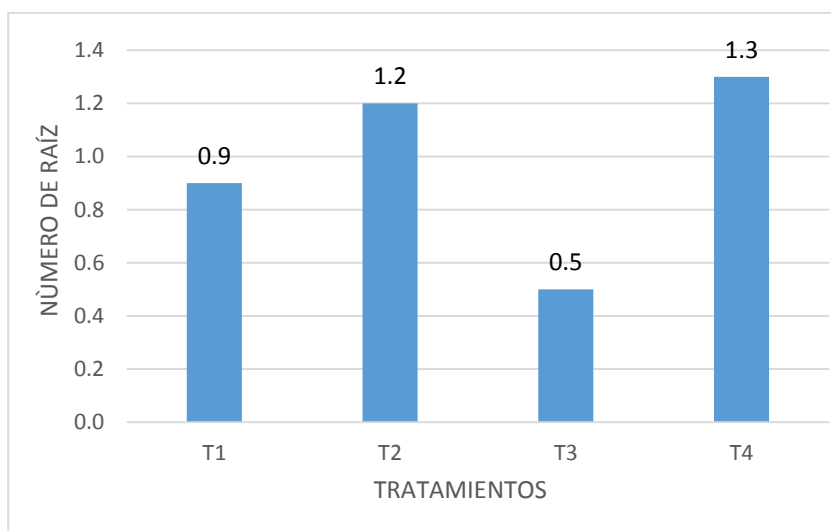
C. V : 19.71%

* : Significativo al 5% de probabilidad

N.S .: No significativo

Grafico N° 17: Número de raíces formadas en vitroplántulas de *Croton lechleri*

Muell Arg, para los tratamientos combinados



Leyenda

Tratamiento	Combinación	Concentración
T1	A1 B1 MS completo	2,0 ppm AIB
T2	A1 B2 MS completo	5,0 ppm AIB
T3	A2 B1 B5 completo	2,0 ppm AIB
T4	A2 B2 B5 completo	5,0 ppm AIB

VI. DISCUSION

6.1. Experimento No. 1 Germinación y Brotamiento

A. Contaminación: La contaminación de los explantos (semillas y yemas apicales) en los diferentes tratamientos, utilizando diferentes medios de cultivo Murashige & Skoog (1962) (MS), Gambor (1968) (B5) y Woody Plant Media (1980) (WPM o Mc Cown y Lloyd)(1990) y diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio 2%, 4%, 6% y 8%, la influencia de los medios de cultivos, tipo de explante y niveles de hipoclorito de sodio, fueron altamente significativos al 0,05 % así como al medio de cultivo y tipos de explante (cuadro 1, gráfico 01 y foto 03). De otro lado, el menor porcentaje de contaminantes se observó en los tratamientos T5(A1B2C1), T6(A1B2C2), T9(A1B3C1), y T12(A1B3C4) con respecto a los tratamientos T11(A1B3C3), T1(A1B1C1), T19(A2B2C3), T8(A2B2C2) y T23(A2B3C3) fueron los que presentaron elevada contaminación por encima del 70 % hasta llegar a un 100 % (gráfico 01, foto 03 y foto 04).

La desinfección del material vegetal con hipoclorito de sodio al 2% fue aceptable, esto coincide con los resultados obtenidos por Salinas (1995). El tiempo de exposición utilizado con hipoclorito de sodio (15 minutos) está en el rango mencionado por **Roca & Mroginski (1991)**, los resultados varían entre 10 y 20 minutos, utilizado en especies como *Hevea* los cuales han tenido resultados favorables en la desinfección de explantes con hipoclorito de calcio al 10%. De modo que coincide con **Ramírez et al (1999)** quienes

indicaron que ninguno de los tratamientos con hipoclorito de sodio al 5,25 % o hipoclorito de calcio a 10%, pudo eliminar completamente los microorganismos contaminantes en ambos explantes (nudos y yemas de *Psidium guajava* L).

B. Germinación y Brotamiento (semilla y yema apical): El cuadro 02 muestra que a la 9na semana de evaluación, la interacción de los factores (medios de cultivo y concentración de hipoclorito de sodio (NaOCl), resultan altamente significativa al 0.05 %. Debido a los diferentes niveles de desinfección, se nota mayor porcentaje de brotación, utilizando como explantes yemas apicales (Cuadro 02, gráfico02 y foto 09). En tanto que **Flores (1997)**, trabajando en propagación con semillas de sangre de grado, obtuvo 65- 84% de germinación. La resistencia a la germinación varió entre los 10 días y los 13 días **Gil (1995)**. El periodo de germinación varía de 18 a 20 días, el mayor porcentaje de semillas germinan durante los 6 a 8 días iniciales, el período total de germinación varía entre 31 y 33 días. El porcentaje de germinación de semillas frescas puede variar entre 80% **Pinedo et al, (1997)** y **Pasquel (1998)** y 50 – 55% **Gil (1995)**, dicho porcentaje disminuye cuando se almacena al medio ambiente (sin control de temperatura y de humedad), perdiendo totalmente su viabilidad en tres meses. Conservadas en envases cerrados y en una refrigeradora (a $6^{\circ} \text{C} \pm 4^{\circ} \text{C}$ y humedad controlada) pueden mantener su mismo poder germinativo por más de cinco meses **Gil, (1995)**. Desde el momento de la germinación, las plantas

crecen a un ritmo de 2 cm por semana, llegando a tener de 10-12 cm de largo al cabo de 6 semanas.

Por los resultados obtenidos se puede indicar que la propagación por estacas es difícil, característica que también se observa en otra especie conocida como “Sangre de grado” **Gaviria(1993)**. Las pseudo estacas según **Gudiño et.al. (1991)**, ofrecen mejores posibilidades de propagación, señala que en una prueba realizada con plantas con diámetros de 0,5 – 2 cm y 10 – 50 cm de largo y transplantadas sin ningún tratamiento, a 30 días se pudo observar un prendimiento del 80 %.

6.2. Experimento N° 2. Crecimiento y Desarrollo

A. Contaminación. El cuadro 05 indica que la interacción de los medios de cultivo y concentración de GA3 sobre la contaminación son muy significativas.

La interacción de los factores A y B de forma independiente fueron significativos, el coeficiente de variación fue 13.76 % indica relativa dispersión de datos. En el cuadro 06 se observa que los tratamientos T2 (A1B1MSc) y T5 (A2B2B5c) presentaron menor grado de contaminación a comparación con los otros tratamientos cuyos porcentajes de contaminación son elevados (gráfico 03). Esta contaminación podría deberse también a infecciones internas como lo menciona **Pierik (1990)**, que a pesar de una buena esterilización química del material vegetal, que pueden constituir un problema importante causadas por microorganismos que se encuentran

presentes en el interior de la misma planta y no pueden ser eliminados por esterilización externa.

Pierik (1990), indica que es necesario tanto para la investigación como para la aplicación práctica del cultivo in vitro, el disponer de una cámara de cultivo, en la que se puedan controlar luz, temperatura, humedad relativa, etc, los cuales son factores físicos que tienen mucha influencia en el crecimiento y desarrollo del cultivo in vitro.

B. Sobrevivencia. En los análisis de las diferentes fechas de evaluación se puede observar en los explantes que la interacción con los tipos de medios de cultivo y la concentración de las fitohormonas GA3 es muy significativo estadísticamente en la sobrevivencia de los explantes (cuadro 07, grafico 04 y foto 10), con respecto a los tratamientos con ácido giberélico GA3, indica que los mejores tratamientos estadísticamente fueron: T2(A1B2MSc), T1(A1B1MSc), T3(A1B3MSc), T5(A2B2B5c) y T6(A2B3B5c), en cambio los tratamientos T4(A2B1B5c) y T9(A3B3WPMc) presentaron baja sobrevivencia (gráfico 04). Según **Pierik (1999)**, el ácido giberélico tiene una pérdida de su actividad biológica del 90% después del autoclavado; por eso, recomienda añadir a los medios nutritivos concentraciones de 0.01- 10 mg/l de ácido indolacético (AIA). Así mismo, la falta de efectos del ácido giberélico se debió probablemente a la alta temperatura a que fue sometida.

C. Número de hojas.- Los análisis realizados en las diferentes fechas de evaluación, muestran que se obtuvo un promedio de 5 hojas, con un máximo de 6 hojas, detectándose diferencias estadísticas entre las medias. El tratamiento T2(A1B2MSc), T1 (A1B1MSc), T3 (A1B3MSc), T5(A2B2B5c) presentó mayor número de hojas y los tratamientos T4(A2B1B5c) y T9 (A3B3WPMc) presentaron menor número de hojas. El número de hojas en cada uno de los tratamientos se relaciona con la longitud del tallo y concentraciones de ácido Giberélico; **Bergman et al (1992)**, trabajando con *Salix* spp. originaron 1 a 3 brotes delgados y poco vigorosos en un periodo de 4 a 5 semanas (cuadros 09 y 10, gráfico 05 y foto 11 y 12).

D. Número de nudos.- Las evaluaciones realizadas con el análisis de varianza y prueba de Tukey (cuadro 11 y 12), se observó que en el tratamiento T2(A1B2MSc) en el medio de cultivo las sales de **Murashige & Skoog (1962,)** el número de nudos estaba relacionado con el número de hojas, existiendo 0.9 nudos en el tratamiento 9 cuyo medio de cultivo fue WPM, T1(A1B1MSc), T3(A1B3MSc) presentaron de 3 a 4 nudos por planta, en cambio los tratamientos T5(A2B2B5c), T6(A2B3B5c) , T7(A3B1WPMc) y T4(A2B1B5c) presentan sólo un nudo por planta. Siendo el tratamiento 9 el que presentó menor número de nudos con un promedio de 0.9 nudos por planta (gráfico 06). **Bergman et al (1992)**, al aplicar solo GA3 al medio, la mayoría de los ecotipos de

Salix spp originaron 3 brotes delgados en un periodo de 4-5 semanas (gráfico 06 y foto 11 y foto 12).

E. Altura de la vitroplanta.- Las evaluaciones realizadas (cuadro 13 y 14), indican que el T2(A1B2MSc) alcanzó mayor crecimiento con un promedio de 31.1 mm de longitud, en T1(A1B1MSc) fue 27.90 mm de longitud y el tratamiento T3(A1B3MSc) presentaron un crecimiento de 25.90 mm. El tratamiento que tuvo menor crecimiento en altura fue T9(A3B3WPMc) con un promedio de 6 mm (gráfico 07 y foto 11); a su vez contenía las sales del medio básico de M & S a su concentración completa; $\frac{1}{2}$ de concentración, tienen efectos parecidos para inducir el crecimiento de los explantes, por lo tanto se debe utilizar dosis de menor concentración para que la planta puede metabolizar.

F. Número de raíces.- Las evaluaciones realizadas (cuadro 15 y 16) indican que el T2(A1B2MSc) formó en promedio 1.8 raíces, que contenía en su medio de cultivo las sales de M & S y $\frac{1}{2}$ de su concentración y GA3, el número de raíces de los tratamientos estaba relacionada con las características óptimas de crecimiento y condiciones. En cambio, el T9(A3B3WPMc) no tuvo buena formación de raíces con un promedio de 0.4 raíces. **Ahuja (1987)**, al trabajar con *Salix* spp aplicando GA3 favoreció el desarrollo de raíces en todo los ecotipos; sin embargo, el crecimiento de éstas,

está asociada a un buen desarrollo de la parte aérea (gráfico 08 y foto 10, 11, 12.).

6.3. Experimento No. 3 Multiplicación o Proliferación

A. Contaminación y sobrevivencia: Las variables contaminación y sobrevivencia (foto 13, 14 y 15) no muestran contaminación de los explantes. Como consecuencia hubo sobrevivencia; esto debido a que se trabajó con material vegetal aséptico (vitroplantas). Según **Biondi et al (1982)**, el establecimiento in vitro de especies arbóreas es difícil de lograr por problemas de contaminación endofítica, sin embargo refieren que la obtención de las yemas, a partir de plántulas provenientes de semillas germinadas asépticamente resuelven estos problemas.

B. Número de hojas:- Los análisis realizados en las diferentes fechas de evaluación (cuadro 17, 18, gráfico 09 y foto 13) los tratamientos T1(A1B1MSc) y T2(A1B2MSc) muestran un promedio de 2.3 hojas, conteniendo en el medio de cultivo BAP. Al respecto **Gómez & Huaranca (1997)**, sostienen que el tipo de tapas tiene influencia significativa para la vigorosidad, tamaño y pigmentación de las hojas.

C. Número de nudos.- Las evaluaciones realizadas, indican que se obtuvo un promedio de 1.6 nudos por vitro plántulas en el tratamiento T1(A1B1MSc), la cual formó mayor número de nudos, con un promedio de 1,6 nudos por vitroplántula, existiendo diferencias significativas con los demás que contenían en su medio de cultivo sales de **Murashige & Skoog (1962)** y BAP, el número

de nudos de los tratamientos está relacionada con el número de hojas (cuadro 19, 20, gráfico 10 y fotos 13 y 14).

D. Altura de la vitroplanta.- Los resultados obtenidos en el tratamiento T8 (A3B2WPMc) alcanzó una altura máxima promedio de 13.50 mm, en el tratamiento T6(A2B3B5c) la altura promedio fue 13.10 mm, en cambio el resto de tratamientos presentaron alturas casi semejantes (cuadro 21, 22 y gráfico 11). A su vez contenía las sales del medio básico de M & S a su concentración completa y $\frac{1}{2}$ de concentración, tienen efectos parecidos para inducir crecimiento de los explantes, por lo tanto se debe utilizar dosis de menor concentración para que la planta pueda asimilar.

6.4. Experimento N° 4. Enraizamiento

A. Contaminación y B. Supervivencia.- Las variables contaminación y supervivencia (cuadro 23, 24, gráfico 12 y foto 16), no muestran contaminación de los explantes, como consecuencia hubo supervivencia porque se trabajó con material vegetal aséptico (vitroplantas), conteniendo en el medio de cultivo AIB. Según **Brown et al (1982)**, el establecimiento in vitro de especies arbóreas es difícil de lograr por problemas de contaminación, sin embargo refieren que la obtención de las yemas, a partir de plántulas provenientes de semillas germinadas asépticamente, resuelven estos problemas.

C. Oxidación:- De acuerdo a los resultados de las diferentes fechas de evaluación, se notó que se obtuvo un elevado porcentaje de

oxidación, en forma progresiva según avanzaba el tiempo, existiendo también plantas con poco porcentaje de oxidación, la cual no significó un impedimento para el enraizamiento (cuadro 25). En el gráfico 13 se observa los porcentajes de oxidación de los explantes por tratamiento, el cual muestra que el tratamiento T3 (A2B1B5c) presenta una alta oxidación (70%) y los demás tratamientos menor porcentaje (foto 16 y 17). Este problema se trató de solucionar agregándole al medio de cultivo 50 mg/l de ácido cítrico más 50 mg/l de ácido ascórbico. Según **Pierik (1990)**, la adición de los llamados antioxidantes como el ácido cítrico, ácido ascórbico, L-cistina, son compuestos que impiden la oxidación de los fenoles; una reducción de tejido herido también puede dar como resultado una disminución de la oxidación.

D. Número de hojas.- Los análisis realizados en las diferentes fechas de evaluación muestran que el tratamiento que tiene mayor promedio de crecimiento fue T1(A1B1MSc) con un promedio de 2.4 hojas por vitroplántula (cuadro 26, gráfico, foto 16). El número de hojas en cada uno de los tratamientos se relaciona con la longitud del tallo conteniendo en el medio de cultivo A1B. Esto concuerda con los resultados de **Gómez & Huaranca (1997)**, quienes sostienen que el tipo de tapas tiene influencia significativa para la vigorosidad, tamaño y pigmentación de las hojas.

E. Número de nudos.- Las evaluaciones realizadas, indican que se obtuvo un promedio de 2 nudos por vitroplántulas en el tratamiento T1(A1B1MSc) alcanzó mayor promedio de formación de número de

nudos (2 nudos), seguido del tratamiento T2(A1B2MSc), con 1.8 nudos por vitroplántula que contenía en su medio de cultivo las sales de **Murashige & Skoog (1962)**; el número de nudos de los tratamientos estaba relacionado con el número de hojas (cuadro 27, gráfico 15, fotos 16 y17).

F. Altura de la vitroplántula.- En las evaluaciones realizadas (gráfico 16) el tratamiento T1(A1B1MSc) alcanzó mayor promedio de crecimiento con 10.7 mm de longitud, seguido del tratamiento T2(A1B2MSc) con un promedio de 9.1 mm (cuadro 28, **Foto No.16**). Estos tratamientos contenían sales de medio Básico de M & S y B5 a su $\frac{1}{2}$ concentración, con efectos para inducir el crecimiento de los explantes, por lo tanto se debe usar estos medios de cultivo. **Pierik (1990)**, indica que es necesario tanto para aplicación práctica del cultivo in vitro, el disponer de una cámara de cultivo, en la que se pueden controlar luz, temperatura, humedad relativa, etc. Los cuales son factores físicos que tienen mucha influencia en el crecimiento y desarrollo in vitro.

G. Número de raíz. Las evaluaciones realizadas (cuadro 29 y gráfico 17), indican que los tratamientos T4(A2B2B5c) y T2(A1B2MSc), presentaron mayor número de raíces con un promedio de 1.3 y 1.2 respectivamente; siendo el tratamiento T3(A2B1B5c) el que presentó menor formación de raíces con un promedio de 0.6 raíces. El medio el medio de cultivo fue sales de (M&S y B5) $\frac{1}{2}$ de su concentración y A1B; el número de las raíces está relacionada con

las características óptimas de crecimiento y condiciones físicas y químicas del medio de cultivo (Foto 16 y 17).

VII. CONCLUSIONES

- El hipoclorito de sodio al 2% resulto más eficiente por permitir obtener el menor porcentaje de contaminación en los propágulos.
- La desinfección con hipoclorito de sodio al 2%, favoreció el mayor porcentaje de germinación y brotación a la vez permitió la sobrevivencia.
- Los mejores propágulos para el establecimiento in vitro fueron las yemas apicales de vitroplántulas.
- Para el crecimiento y desarrollo, los medios de cultivo óptimos fueron Murashige & Skoog y Gambor y diferentes concentraciones de ácido Giberélico 0,0 - 0,5 - 1,0 ppm (GA3).
- Para la multiplicación y proliferación, los medios de cultivo óptimos fueron Murashige & Skoog y Gambor y diferentes concentraciones de Bencilamino purina 0,0 - 0,25 - 0,50 ppm (BAP).
- Para el enraizamiento, los medios de cultivo fueron Murashige & Skoog y Gambor, diferentes concentraciones de ácido 3- lindolbutirico 2,0 - 5,0 ppm (AIB) y carbón activado.
- Las concentraciones de los antioxidantes favoreció el porcentaje de sobrevivencia y enraizamiento en los propágulos al impedir el aumento de la oxidación.

VIII. RECOMENDACIONES

- Utilizar la concentración de 2% de hipoclorito de sodio para el establecimiento de propágulos de *Croton lechleri* Muell Arg. acompañada de una desinfección previa por 2 minutos en alcohol etílico al 80% y 15 minutos en 20g/l de benlate.
- Aumentar la dosis de solución antioxidante de ácido cítrico más ácido ascórbico o probar otros antioxidantes para trabajos posteriores.
- Para posteriores ensayos estudiar otros medios de cultivo para acelerar la germinación.
- Ensayar nuevas concentraciones de ácido Giberélico para estimular el crecimiento en los propágulos.
- Ensayar nuevas concentraciones de Bencil amino purina para estimular la multiplicación y proliferación en los propágulos.
- Experimentar nuevas diluciones del medio de cultivo Murashige & Skoog, Gambor y Mc Cown en la reducción de la oxidación.
- Continuar las investigaciones de micro propagación referente a *Croton lechleri* Muell Arg. por la importancia medicinal que representa.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ANDRADE, C. E. 1,981. Estudio de la familia EUPHORBIACEAE en el Departamento de Loreto. Tesis, Biólogo. UNAP.70 pg.

AHUJA, M. R. 1987. In vitro propagación of poplar and aspen .207-22 p In: Bonga, J.M. y Durzan, D. J. (eds). Cell and tissue culture in Forestry. Case histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms V3. Martinus Nijhoff-of-Plant-Physiology. 143 (6):763-765.

BERGMAN, L. Arnold, S y Erikson, T.1984. Culture of Salix species in vitro.

BIONDI, S. THORPE, T. A.1982. Clonal propagation in relation to juvenility naturity And rejuvenation, In Tissue culture in Forestry. BN, Haya. 387- 412 pg.

BROWN, C. L. Sommer, H, E, 1982. Beget. Propagation of dicotiled.Trees. In: Tissue Culture of Foresty. La Haya. 109- 149 pg.

CALZADA, B. J. 1993. 143 Frutales Nativos. Edición Universidad Nacional Agraria La Molina. 1º Edic. Liberia "El estudiante", Lima Perú. 316 pg.

FLORES, B. Y. 1997. Comportamiento fenológico de 88 especies forestales de la Amazonia peruana. INIA. Lima-Perú. 124 pg.

GAVIRIA, G. 1993. Plan de manejo para el aprovechamiento de sangre de grado por las comunidades nativas de la zona del Perenne. Resumen de investigación apoyadas por fundeagro 1988- 92. Primera parte. Proyecto Fundeagro. Lima, Peru. 224-230 pg.

GENTRY, A. 1993. A Field guide to the Families and Genera of woody plants Of Northwest South America. Conservación internacional. Washington D.C. 411pg.

GIL, O, R. 1995. Intensidad de luz, método de conservación y tiempo de almacenamiento en la germinación de *Croton lechleri* Muell. Arg. Tesis para optar el título de Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Nacional de Ucayali-Pucallpa-Perú. 53 pg.

GOMEZ, A. M. J. & HUARANCA, A R .J. 1997. Establecimiento in Vitro de propágulos de “camu camu” *Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh. Tesis de Biología. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana .Perú. 43 pg.

GUDIÑO, E; F. GUTIERREZ, y F. Espinoza. 1991. Lineamientos preliminares para el manejo de *Croton sp.* En la Amazonia Ecuatoriana. Shaman Pharmaceuticals, Inc. Propetary Información Quito- Ecuador. 21 pg.

HARTMANN. T. H. et al. 1981. Propagación de Plantas. Principios y Prácticas Edit. Continental. México. 814 pg.

HOLDRIDGE, L.R. 1978. Ecología basada en las zonas de vida .IICA San José Costa Rica. 216 pg.

HUDSON, T. H & DALE, E. K. 1981. Propagación de plantas. Edit. Continental. México. 810 pg.

HURTADO. D. & MERINO, M. E. 1987. Cultivo de Tejidos vegetales 1er. Edic. Edit. Trillas. México. 232 pg.

IMET.2000. Plantaciones "Cultivo importancia y formas de uso. Essalud. Iquitos-Perú. 107 pg.

LAO. R; FLORES S.1972. Descripción de algunas especies forestales de Jenaro Herrera- Iquitos. Lima. UNA. La Molina –Cotesu. 195 pg.

MEJIA, A. R. & VITTORELLY, C. 1988. Cultivo in vitro de plantas de papa. Manual de laboratorio. Programa Nacional de papa. INIAA. 11 pg.

MEJIA, A. R.1992. Alternativa de equipamiento de laboratorio in vitro y tecnicas de micropropagación de plantas. La Molina pg.

MEJIA, A. R. 1994. Propagación Comercial 312 especies de plantas por cultivo in Vitro. La Molina Lima. 364 pg.

MEJIA, C. K. & RENGIFO, S. E. 1995. Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía Peruana. Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana (IIAP) .Lima, Perú.249 pg.

MEZA, .B. E; AYALA, F et.al 1998. El Manejo sostenible de Sangre de drago Sangre de grado. Material Educativo.Shaman Pharmaceuticals & The healing Forest conservancy.San Francisco. Estados Unidos. 29 pg.

MEZA, E. B. et al. 1990. El Manejo Sostenido de "Sangre de drago" o "Sangre de grado". Material Educativo. La cosecha del futuro se siembra hoy. Shaman pharmaceuticals. Lima- Perú. INC. 29 pg.

MEZA, E. B. et al. 1999. Desarrollando nuestra biodiversidad biocultural. "Sangre de grado". Y el Reto de su producción sustentable en el Perú . 259 pg.

MEZA, E.B. 2000 Látex medicinal de "Sangre de grado" en el mercado mundial. En bosques amazónicos. N^o 21 junio. 13-15 pg.

NALVARTE, W. KROLL, B. LOMBARDI, .1993. Plan maestro, unidad modelo de manejo y producción forestal. Datos. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. 148 pg.

PASPUEL, A. 1998. Análisis de sobrevivencia y crecimiento inicial de Sangre de grado. Bosques y desarrollo, 17: 49-50 pg.

PIERIK; R. L .M. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ed. Mundi. Prensa. Madrid. 301 pg.

PIETERS, L.1993. The Biologically Active constituents of sangre de drago. Traditinal south American Drug, Universities Antwerpen. Department, farmaceutische wetensschappen. Germany.

PINEDO; P. M. & RENGIFO; S. E. 1997. Plantas Medicinales de la Amazonía Peruana. Estudio de su Uso y Cultivo. Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana (IIAP) Diciembre. Iquitos. 304 pg.

PINEDO, F. S. 1998. Propagación in vitro de la "Una de gato" *Uncaria guianensis* (Aubl) GMEL. Tesis Ing.. Agr. Iquitos-Perú, UNAP. 148 pg.

QUEVEDO, G. A. & GIL, O. V. 1998. Efecto de la intensidad de luz, método de conservación y tiempo de almacenamiento en la germinación de *Croton lechleri* Muell. Arg. IIAP. Iquitos-Perù. Folia Amazônica. V: 9.1-2. 62 pg.

QUINTERO, C. O. & PACHON, O. G. 1987. Acevin Asociación colombiana de Aplicaciones centro internacional de cultura tropical colombiana. 99 pg.

RAMIREZ, M, León, S, URDANETA, A. 1999. Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento in vitro de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Nierdz. Facultad de Agronomía. 16: 243-255 pg.

RAO, A. N & LEE, S. K. 1992. Importance of tissue culture in tree propagation. In: International Congress of plant, Tissue and Cell Culture. Tokyo-Japon.ed. by a. Fujiwara. Japanese Association for Plant tissue culture. 715-718 pg.

ROCA .W. M. et al. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical Colombia. 969 pg.

RUTTER, R.1990. Catálogo de plantas útiles de la Amazonia Peruana. Ministerio de Educación. Instituto lingüístico de verano. Pucallpa. Perú.pg

SALINAS, A. 1995. Desinfección y determinación de explantes para la propagación in vitro de *Cedrelinga cateniformis* (Ducke) Ducke. Tesis Ing. Forestal. UNAS. Tingo Maria-Perú. 100 pg.

SKIRVIN, R. M. 1981. Fruit crops. In: Cloning agricultural plant via in vitro techniques. Ed. By. B. V. Conger. Boca Raton; Fla, Crc Press.139 pg.

UBILLAS, R; JOLAN, S. D. et al. 1994. SP-303, an Antiviral oligomeric proanthocyanidin from the latex of *Croton lechleri* (Sangre de drago) Phytomedicine 1(2).77-106 pg.

VAISBERG. A. J. Et al. 1989. Taspine is the cicatrizant principle in sangre de grado, Extracte from *Croton lechleri*. Plantas Médica. 55: 140-143 pg.

VASQUEZ, R. M.1997. Florula de las Reservas biológicas de Iquitos. Perú.U.S.A. ed. Missouri Botanical Garden.1046 pg.

WEBSTER, G. 1993. A provisional Synopsis of the Sections of the Genus *Croton* (Euphorbiaceae) Taxon 42: 794- 823 pg.

ZIMMERMAN, R. H. 1985. Aplicación of tissue culture propagation to woody plants. In: Tissue culture in forestry and agriculture. Ed. By R. R. Henke; K. W. Hughes; M. J. Constantín; A. Hollaender. New. York.. Plenum Press. 177 pg.

X. ANEXO

Anexo 1: Medio de Cultivo de Gambor (1968) (B5)

STOCK No. 1 10 X

KNO ₃	2,500mg/l	2.5 g/l	250mg/l = V=200ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	150mg/l	0.15g/l	15mg/l “
MgSO ₄ .7H ₂ O	250mg/l	0.25g/l	25mg/l “
(NH ₄) ₂ SO ₄	134mg/l	0.134g/l	13.4mg/l “
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	150mg/l	0.15g/l	15mg/l “

STOCK No. 2 100 X

H ₃ BO ₃	3,000mg/l	0.3g/l	3mg/l
MnSO ₄ .H ₂ O	10,000mg/l	1g/l	10mg/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,000mg/l	0.2g/l	2mg/l
NaMoO ₄ .7H ₂ O	0.25mg/l	0.00025g/l	0.0025mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025mg/l	0.000025g/l	0.00025mg/l
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025mg/l	0.000025g/l	0.00025mg/l

STOCK No. 3 100 X

KI	0,75mg/l	0.00075g/l	0.0075mg/l
----	----------	------------	------------

STOCK No. 4 100 X

FeSO ₄ .7H ₂ O	27,800mg/l	2.78g/l	27.8mg/l
Na ₂ EDTA	37,300mg/l	3.73g/l	37.3mg/l

STOCK No.5 100X

Tiamina HCL	10,000mg/l	10g/l	100mg/l
Piridoxina HCL	1,000mg/l	1g/l	10mg/l
Ac. Nicotínico	1,000mg/l	1g/l	10mg/l
Mio-Inositol	100,000mg/l	100g/l	1000mg/l

Anexo 2: Medio de Cultivo de Woody Plant Medio (Mc Cown y Lloyd 1990)

STOCK No. 1 10X V= 200ml

KNO ₃	2000mg/l	2 g/l	200 mg/l
KH ₃ PO ₄	270mg/l	0.27 g/l	27 mg/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	250mg/l	0.25 g/l	25 mg/l
(NH ₄) ₂ .SO ₄	400mg/l	0.4 g/l	40 mg/l
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	500mg/l	0.5 g/l	50 mg/l
KCl	150mg/l	0.15 g/l	15 mg/l

STOCK No. 2 100X

H ₃ BO ₃	1,500mg/l	0.15 g/l	1.5 mg/l
MnSO ₄ .H ₂ O	0,17mg/l	0.00017 g/l	0.0017 mg/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3,000mg/l	0.3 g/l	3 mg/l
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25mg/l	0.00025g/l	0.0025 mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025mg/l	0.000025g/l	0.00025 mg/l
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025mg/l	0.000025g/l	0.00025 mg/l
CH ₄ H ₂ O	150mg/l	0.15g/l	1.5mg/l

STOCK No. 3 100X

KI	0,25mg/l	0.00025g/l	0.25mg/l
----	----------	------------	----------

STOCK No. 4 100X

FeSO ₄ .7H ₂ O	14,000mg/l	1.4g/l	14mg/l
--------------------------------------	------------	--------	--------

STOCK No. 5 100X

Tiamina HCL	1,700mg/l	1.7g/l	17mg/l
Piridoxina – HCL	0,50 mg/l	0.0005g/l	0.005mg/l
Ácido Nicotínico	0,50mg/l	0.0005mg/l	0.005mg/l
Mio-Inositol	90,000mg/l	9g/l	90mg/l

Anexo 3: Medio de Cultivo de Murashige & Skoog 1962.

STOCK No. 1 10X V= 200ml

NH ₄ NO ₃	16,500mg/l	16,5 g/l	1650 mg/l
KNO ₃	19,000mg/l	19g/l	1,900 mg/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,700mg/l	3.7g/l	370mg/l
KH ₂ PO ₄	1,700mg/l	1.7g/l	170mg/l

STOCK No.2 100X

.2H ₂ O	4,400mg/l	44g/l	440mg/l
--------------------	-----------	-------	---------

STOCK No. 3 100X

FeSO ₄ .7H ₂ O	2,780 mg/l	2.78 g/l	27.8 mg/l
Na ₂ EDTA	3,730 mg/l	3.73 g/l	37.3 mg/l

STOCK No.4 100X

MnSO ₄ .4H ₂ O	2,230 mg/l	2.23 g/l	22.3 mg/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	860 mg/l	0.86 g/l	8.6 mg/l
H ₃ BO ₃	620 mg/l	0.62 g/l	6.2 mg/l
KI	83 mg/l	0.083 g/l	0.83 mg/l
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25 mg/l	0.025 g/l	0.25 mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,5 mg/l	0.0025 g/l	0.025 mg/l
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,5 mg/l	0.0025 g/l	0.025 mg/l

STOCK No.5 100X

Tiamina HCl	0.10 mg/l	0.0001 g/l	0.001 mg/l
Nicotinamida	0.50mg/l	0.0005 g/l	0.005 mg/l
Pyridoxina	0.50 mg/l	0.0005 g/l	0.005 mg/l
Mio- Inositol	100,000 mg/l	0.1 g/l	100 mg/l

Anexo 4: Formato de Evaluación

Nombre del proyecto:

Nombre del experimento:

Ejecutor:

Medio de cultivo:

No. de tratamiento:

No. de repeticiones:

Fecha de siembra:

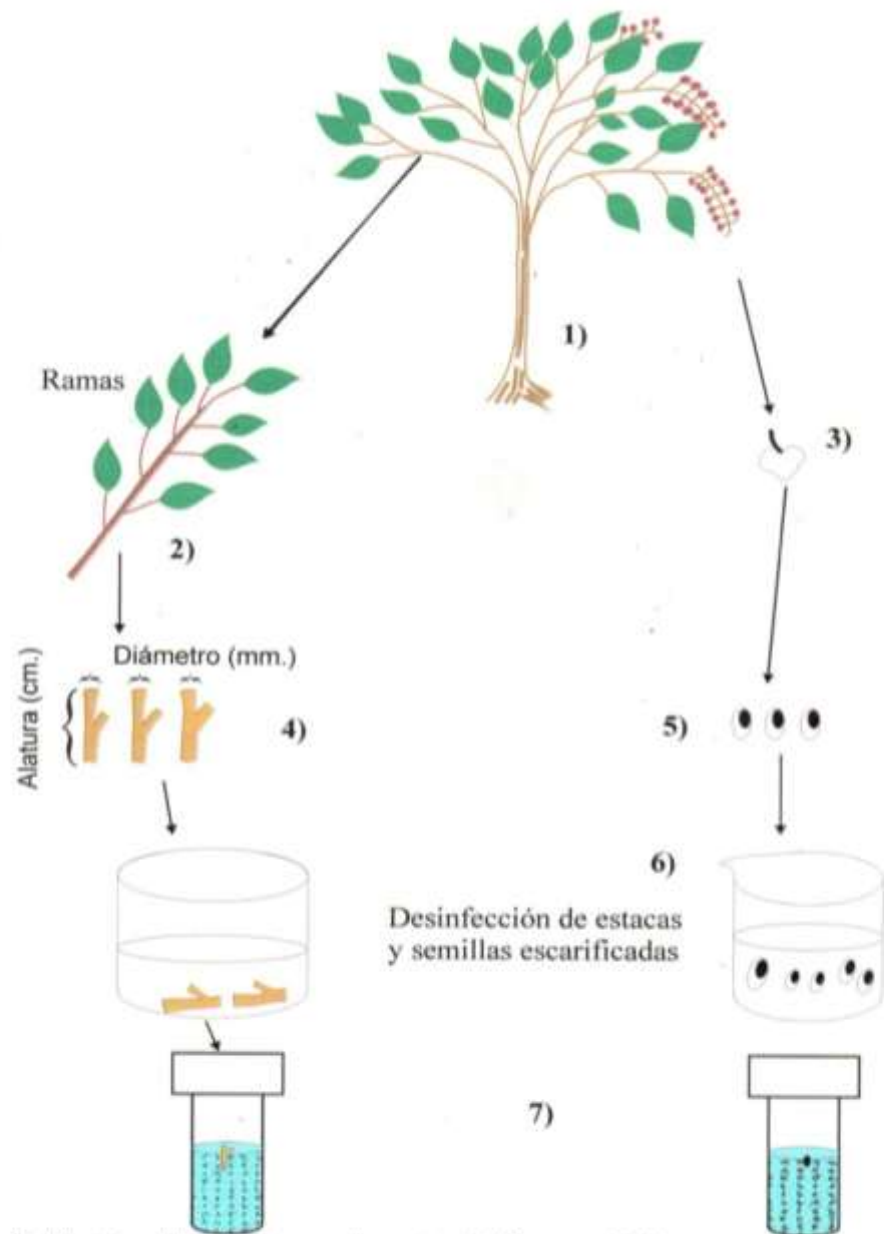
Fecha de evaluación:

N°.de tubo	Contam.	Oxid.	Sobrev	Germ	N°.nudo	N°.hojas	N°.brote	N°.raices
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
X								
SD								

Anexo 5: Flujo de Trabajo de Laboratorio.

FLUJOGRAMA DE TRABAJO EN EL LABORATORIO

Croton lechleri Muell. Arg. "Sangre de grado"



- 1). Planta adulta de Sangre de grato
- 2). Ramas
- 3). Fruto maduro
- 4). Nudos y yemas apicales de diferentes diámetros, altura
- 5). Semillas
- 6). Desinfección de nudos y semillas
- 7). Siembra.

Anexo 6: Certificado de la Muestra Botánica

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA**
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM AMAZONENSE (AMAZ)
Apartado Postal 326 - Telef. 22-2649
E-mail amaz@correo.dnet.com.pe
Iquitos-Perú

**LA DIRECTORA DEL HERBARIUM AMAZONENSE DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA**

CERTIFICA

Que, la muestra botánica enviada al Herbarium Amazonense por la tesista Br.
Karina Vela Vásquez, pertenece a:

FAMILIA	:	EUPHORBIACEAE
GENERO	:	Croton
NOMBRE CIENTIFICO	:	<i>Croton lechleri</i> Muell. Arg.
NOMBRE VERNACULAR	:	"sangre de grado"

Se expide el presente certificado a solicitud del interesado para los fines que
estime conveniente.

Iquitos, 10 de Agosto del 2001.


Blga. **FELICIA DÍAZ JARAMA**
Directora del Herbarium Amazonense (AMAZ)



Anexo 7: Lista de Fotografía del Trabajo.



Foto N° 1:Árbol de “Sangre de grado” *Croton lechleri* Muell Arg.

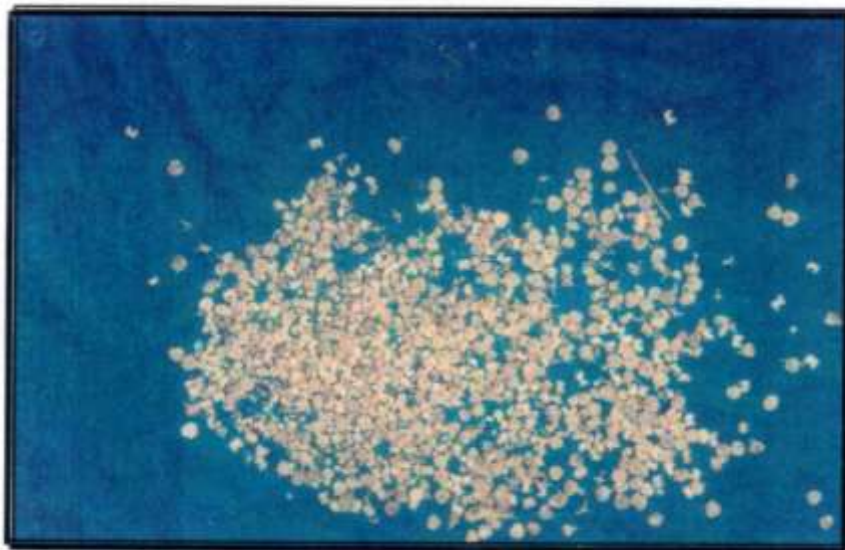


Foto N° 2:Semilla de “Sangre de grado” *Croton lechleri* Muell Arg



Foto N° 3: Desinfección de las semillas de "Sangre de grado *Croton lechleri* Muell Arg.



Foto N° 4 : Desinfección de los Esquejes de "Sangre de grado" *Croton lechleri* Muell Arg.



Foto N° 5: Obtención de los Esquejes de "Sangre de grado" *Croton lechleri*
Muell Arg.

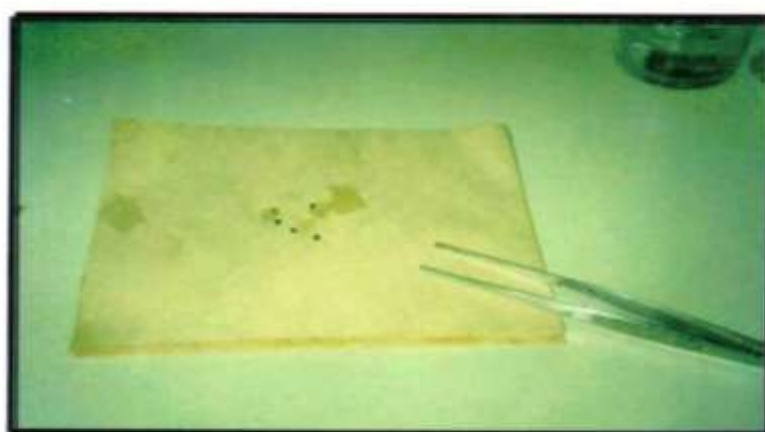


Foto N° 6: Obtención de las semillas de " Sangre de grado" *Croton lechleri*
Muell Arg.



Foto N° 7: Siembra de los propágulos de " Sangre de grado" *Croton lechleri* Muell Arg.



Foto N° 8: Establecimiento de cultivo de cámara de incubación



Foto N° 9: Germinación de las semillas de " Sangre de grado"



Foto N° 10: Crecimiento y desarrollo medio de cultivo Murashige & Skoog 1962



Foto N° 11: Crecimiento y desarrollo medio de cultivo Murashige & Skoog 1962

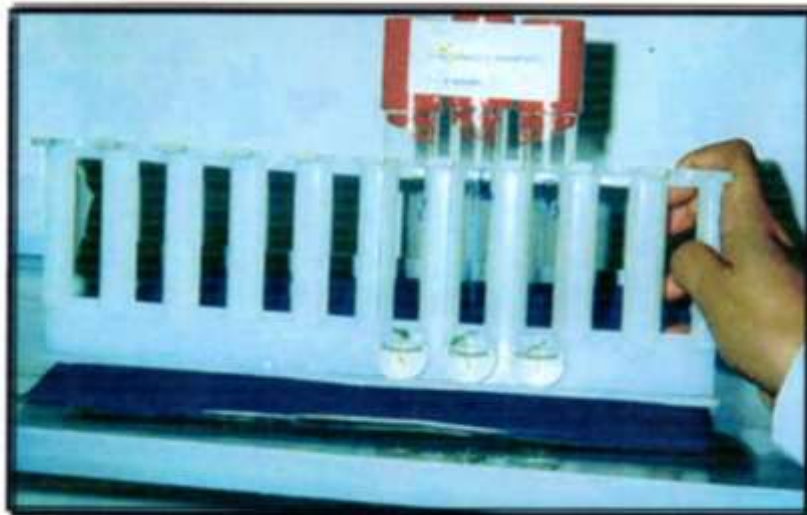


Foto N° 12: Crecimiento y desarrollo medio de cultivo Woody Plant Medio

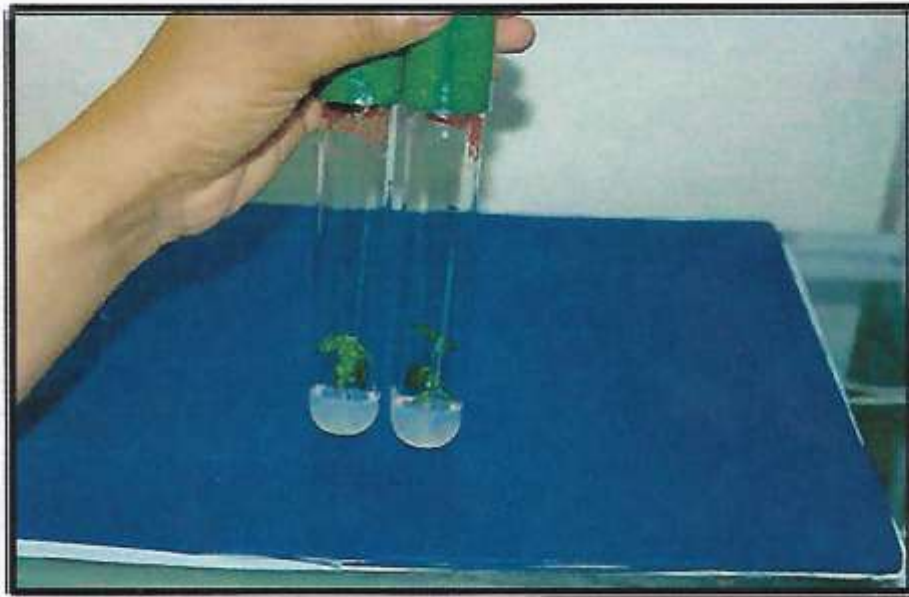


Foto N° 13: Multiplicación o proliferación en medio de cultivo Murashige & Skoog 1962

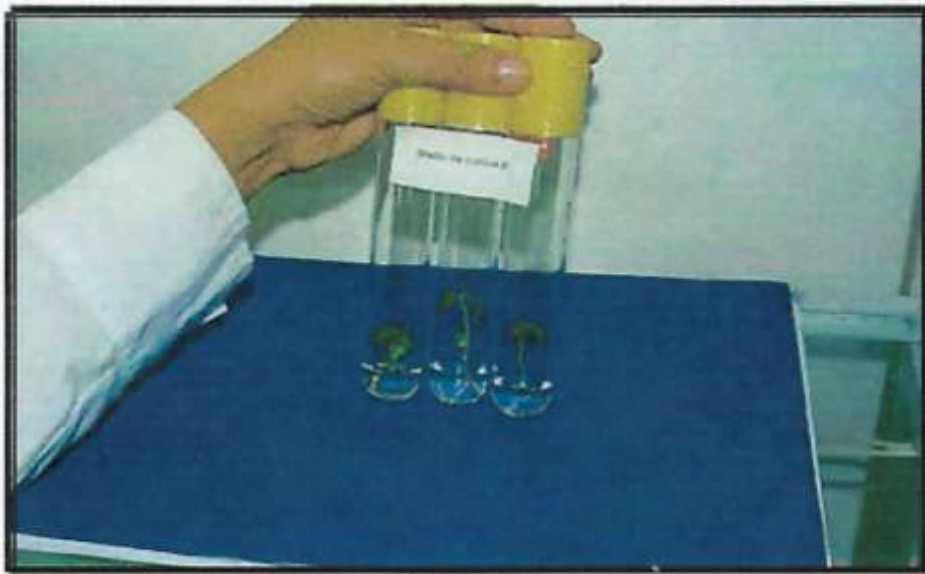


Foto N° 14: Multiplicación o proliferación en medio de cultivo Gambor.

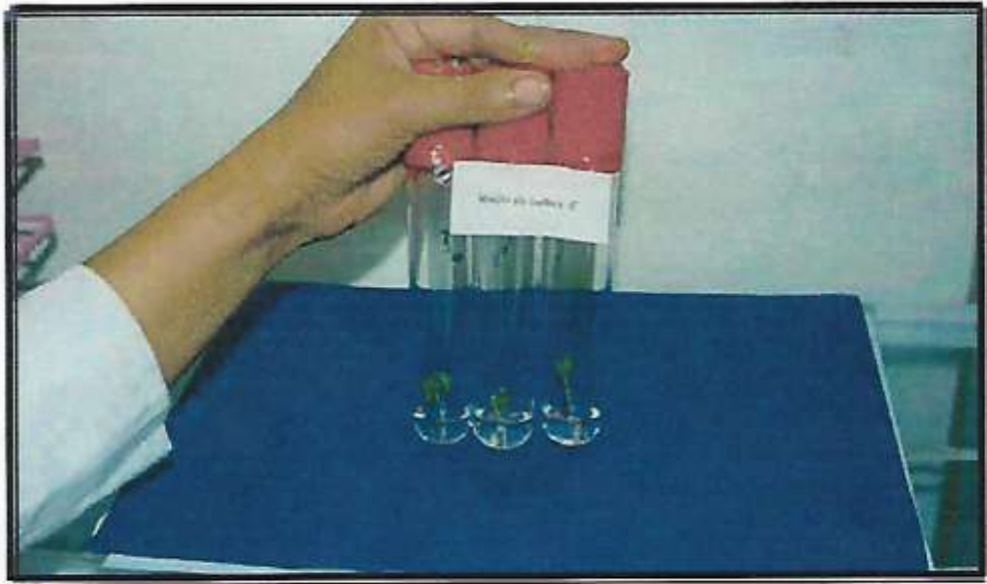


Foto N° 15: Multiplicación o proliferación en medio de cultivo Woody Plant Medio (Mc Cown y Lloyd 1990.)

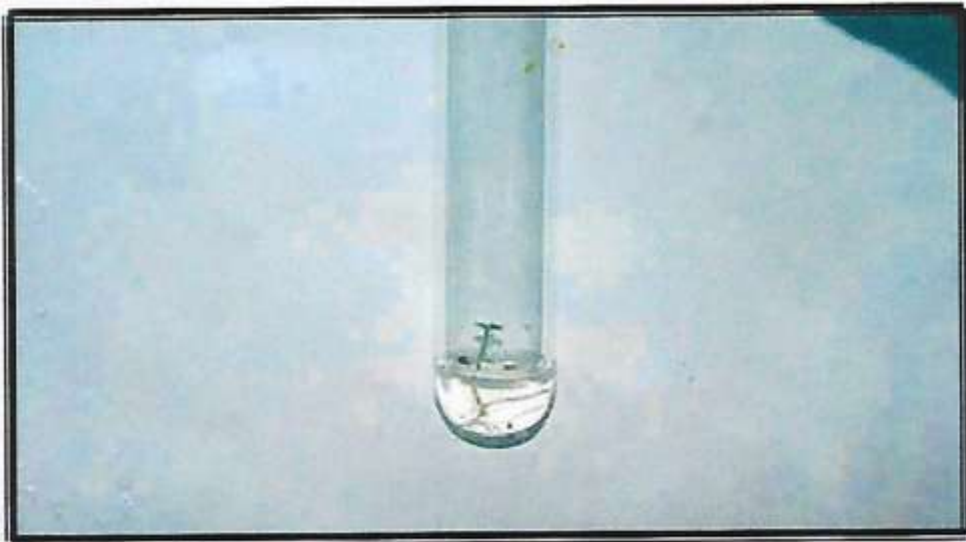


Foto N° 16: Enraizamiento en medio de cultivo Murashige & Skoog 1962



Foto N° 17:Enraizamiento en medio de cultivo Gambor y carbón activado.