UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



01/08/16
BIBLIOTECA
CENTRAL

"EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BENCIL AMINOPURINA Y KINETINA EN LA MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DE DALE DALE (*Calathea allouia* (Aubl.) Lindl.), EN PUCALLPA"

TESIS

Para Optar el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

JAN KEY CHU LAO

PUCALLPA - PERÚ
2012

UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE AGRONOMIA

"EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BENCIL AMINOPURINA Y KINETINA EN LA MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DE DALE DALE (*Calathea allouia* (Aubl.) Lindl.), EN PUCALLPA"

T E S I S
PARA OPTAR EL TITULO DE

INGENIERO AGRÓNOMO

JAN KEY CHU LAO

PUCALLPA – PERU

2012

Los jurados de tesis designados por la Comisión de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Ucayali, son:

Ing. Fernando Pérez Leal, M.Sc.	..... Presidente
Ing. Felipe Alfonso Ramos Macedo	..... Secretario
Ing. Luis A. Díaz Sandoval	..... Miembro
Ing. Fredy H. Velasquez Ramírez, M.Sc.	..... Asesor
Bach. Jan Key Chu Lao	..... Tesista

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía, por haberme permitido llegar hasta este momento y darme y darme salud para lograr mis objetivos.

A mis padres Marcio y Alix, por sus consejos, sus valores y por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien.

A mi hermana Mai, para que así vea en mí un ejemplo a seguir.

A la memoria de mi gran amigo Frank, por su apoyo en mi formación profesional.

A mis amigos Gustavo, Luis, Giancarlos y Elvis, por su apoyo desinteresado.

AGRADECIMIENTO

Mi más sincero agradecimiento a las instituciones y personas que han colaborado para la culminación del presente trabajo de investigación:

- A la Universidad Nacional de Ucayali, mi Alma Mater, por haberme brindado la oportunidad de formarme como profesional.

- A la Facultad de Ciencias Agropecuarias que, por intermedio de sus docentes, quines me brindaron valiosas enseñanzas para lograr mi formación de Ingeniero Agrónomo.

- Al Ing. Fredy H. Velásquez Ramírez, M.Sc., por aceptar ser asesor de este estudio y darme todas las facilidades para realizarlo.

- Al Ing. Mg. Pedro Pablo Villegas Panduro, por el valioso asesoramiento del presente trabajo de investigación, por su paciencia, motivación, confianza y enseñanza durante la realización de esta tesis.

- A mis amigos Melvin Elvis Rodríguez Oré, Eric Graña Sandoval, por el apoyo desinteresado.

- A mis mejores amigos Erick Hinostroza Vega, Christopher Paúl Hernández Larrañaga, por el desinteresado respaldo, durante todo el proceso de estudio, por el apoyo constante durante nuestra formación profesional.

INDICE

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
I. INTRODUCCION	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. El dale dale	2
2.1.1. Origen y taxonomía	2
2.1.2. Descripción botánica y morfológica	3
2.1.3. Principales plagas y enfermedades	4
2.1.4. Ecología y adaptación	4
2.1.5. Métodos de propagación	4
2.1.6. Tecnología de cosecha y poscosecha	5
2.1.7. Diversidad genética	5
2.1.8. Disponibilidad de recursos genéticos	6
2.1.9. Prioridad de investigación	6
2.1.10. Formas de utilización	6
2.1.11. Aspectos de agroindustrialización a pequeña escala	9
2.2. Micropropagación de plantas	9
2.2.1. Concepto de micropropagación	9
2.2.2. Etapas de micropropagación	9
2.2.3. Beneficios de la micropropagación	10
2.2.4. Medios de cultivo	11
2.2.5. Establecimiento de cultivo in Vitro	14
2.2.6. Micropropagación	15
2.3. Reguladores de crecimiento	16
2.3.1. Citocininas	17
2.3.2. Bencil aminopurina	18

2.3.3. Kinetina..... 19
2.4. Fenolizacion u oxidación..... 19
2.4.1. Origen y factores desencadenantes..... 20
2.4.2. Problemática y su desarrollo in Vitro..... 22
2.4.3. Factores externos del cultivo..... 23
III. MATERIALES Y MÉTODOS..... 25
3.1. Ubicación y duración del experimento..... 25
3.2. Ecología y clima..... 25
3.3. Materiales..... 27
3.4. Tratamientos en estudio..... 29
3.5. Variables a medir..... 29
3.6. Del trabajo experimental..... 30
3.6.1. Introducción de plántulas de dale dale a condiciones de in vitro..... 30
3.6.2. Efecto de concentraciones de las citocininas (Bencil aminopurina y Kinetina) en explantes de dale dale.... 34
3.7. Diseño experimental..... 35
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES..... 36
4.1. Porcentaje de contaminación..... 36
4.2. Elongamiento de tallo..... 38
4.3. Número hojas..... 42
4.4. Número de yemas..... 45
4.5. Número de raíces y porcentaje de callos..... 49
V. CONCLUSIONES..... 51
VI. RECOMENDACIONES..... 52
VII. BIBLIOGRAFÍA..... 53
VIII. ANEXOS..... 58
IX. ICONOGRAFÍA..... 65

LISTA DE CUADROS

En el texto **Pág.**

Cuadro 01. Valor nutricional de 100 g de tubérculo de dale dale..... 07

Cuadro 02. Contenido de aminoácidos (g/100 de proteína) en los tubérculos de dale dale y relación a la referencia de proteínas de la FAO..... 08

Cuadro 03. Datos climatológicos observados en la cámara de incubación del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la U.N.U., agosto – noviembre del 2012. Pucallpa, Perú, 2012..... 26

Cuadro 04. Tratamiento de desinfección con hipoclorito de sodio..... 31

Cuadro 05. Porcentaje de contaminación y explantes sanos y porcentaje de fenolización de dale dale en condiciones in Vitro. Pucallpa, Perú, 2012..... 36

Cuadro 06. Análisis de promedios de Duncan para las variables elongamiento de tallo, de explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in vitro. Pucallpa, Perú, 2012..... 38

Cuadro 07. Análisis de promedios de Duncan para las variables elongamiento de tallo de explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in vitro. Pucallpa, Perú, 2012..... 40

Cuadro 08. Análisis de promedios de Duncan para las variables número de hojas de explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in Vitro, para las diferentes concentraciones de Bencil aminopurina. Pucallpa, Perú, 2012..... 42

Cuadro 09. Análisis de promedios de Duncan para las variables número de hojas de explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in Vitro, para las diferentes concentraciones de Kinetina. Pucallpa, Perú, 44

Bencil aminopurina. Pucallpa, Perú, 2012..... 46
Cuadro 11. Análisis de promedios de Duncan para las variables número de yemas de explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in Vitro, para las diferentes concentraciones de Kinetina. Pucallpa, Perú, 2012..... 47
Cuadro 12. Análisis de promedios de Duncan para las variables número de raíces y porcentaje de callos de explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in Vitro, para las diferentes concentraciones de Bencil aminopurina. Pucallpa, Perú, 2012..... 49
Cuadro 13. Análisis de promedios de Duncan para las variables número de raíces y porcentaje de callos de explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in Vitro, para las diferentes concentraciones de Kinetina. Pucallpa, Perú, 2012..... 50

En el anexo **Pág.**

Cuadro 13. ANVA para el elongamiento de tallo a los 60 días de incubación, con tratamiento de Bencil aminopurina..... 58
Cuadro 14. ANVA para el elongamiento de tallo a los 68 días de incubación, con tratamiento de Bencil aminopurina..... 58
Cuadro 15. ANVA para el elongamiento de tallo a los 60 días de incubación, con tratamiento de Kinetina..... 58
Cuadro 16. ANVA para el elongamiento de tallo a los 68 días de incubación, con tratamiento de Kinetina..... 58
Cuadro 17. ANVA para el número de hojas a los 60 días de incubación, con tratamiento de Bencil aminopurina..... 59
Cuadro 18. ANVA para el número de hojas a los 68 días de incubación, con tratamiento de Bencil aminopurina..... 59
Cuadro 19. ANVA para el número de hojas a los 60 días de incubación, con tratamiento de Kinetina..... 59
Cuadro 20. ANVA para el número de hojas a los 68 días de incubación, con tratamiento de Kinetina..... 59
Cuadro 21. ANVA para el número de yemas a los 60 días de incubación, con

tratamiento de Bencil aminopurina..... 60
Cuadro 22. ANVA para el número de yemas a los 68 días de incubación, con tratamiento de Bencil aminopurina..... 60
Cuadro 23. ANVA para el número de yemas a los 60 días de incubación, con tratamiento de Kinetina..... 60
Cuadro 24. ANVA para el número de yemas a los 68 días de incubación, con tratamiento de Kinetina..... 60
Cuadro 25. Composición química de la solución de Murashige & Skoog (1962)..... 61
Cuadro 26. Preparación de medio de cultivo para el proceso de introducción de plántulas de dale dale..... 62
Cuadro 27. Preparación de medio de cultivo para el ensayo de concentración con Bencil aminopurina en explantes de dale dale..... 63
Cuadro 28. Preparación de medio de cultivo para el ensayo de concentración con Kinetina en explantes de dale dale..... 63

LISTA DE FIGURAS

En el texto **Pág.**

Figura 01. Datos de temperatura registrados dentro de la cámara de incubación del Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales y meristemas – UNU, Agosto – Noviembre, 2012. Pucallpa, Perú, 2012..... 27

Figura 02. Porcentaje de contaminación, explantes sanos y fenolizados, observado en los explantes de dale dale en condiciones de in Vitro..... 37

Figura 03. Elongamiento de tallos de dale dale a los 60 y 68 días de incubación, con Bencil aminopurina..... 39

Figura 04. Elongamiento de tallos de dale dale a los 60 y 68 días de incubación, con Kinetina..... 41

Figura 05. Número de hojas de dale dale a los 60 y 68 días de incubación, con Bencil aminopurina..... 43

Figura 06. Número de hojas de dale dale a los 60 y 68 días de incubación, con Kinetina..... 45

Figura 07. Número de yemas de dale dale a los 60 y 68 días de incubación, con Bencil aminopurina..... 47

Figura 08. Número de yemas de dale dale a los 60 y 68 días de incubación, con Kinetina..... 48

Iconografía **Pág.**

Foto 01. Lavado de plántulas de dale dale..... 65

Foto 02. Preparación del explante de dale dale..... 65

Foto 03. Adición de antibióticos y fungicidas al medio de cultivo y desinfección de explantes..... 65

Foto 04. Explantes de dale dale sembrados in Vitro..... 66

Foto 05. Explantes de dale dale en crecimiento in Vitro..... 66

RESUMEN

El presente trabajo de investigación titulado "EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BENCIL AMINOPURINA Y KINETINA EN LA MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DE DALE DALE (*Calathea allouia* (Aubl.) Lindl.), EN PUCALLPA", fue realizado en la las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Meristemas de la U.N.U., ubicado en la Carretera Federico Basadre Km. 6, en el distrito de Callería, provincia de Coronel Portillo, departamento de Ucayali, para los cuales, se estudió diferentes protocolos de desinfección para tratar las plántulas de dale dale utilizadas como explantes, los cuales fueron sembrados en un medio de cultivo constituido por sales de Murashige & Skoog, suplementados con 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de phytoagar, sin agregar reguladores de crecimiento, para posteriormente, preparar un medio de cultivo constituido por sales de Murashige & Skoog, suplementado con 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de phytoagar y la aplicación de diferentes concentraciones de Bencil aminopurina en estudio (0, 1, 3, 6 ppm), y las concentraciones de Kinetina en estudio (0, 1, 3, 6 ppm), concluyendo que: la utilización de solución de tetraciclina y Estreptomicina en el medio de cultivo líquido y el uso de antioxidantes como el ácido ascórbico y el ácido cítrico incorporado al medio de cultivo aplicado a los explantes de dale dale en los primeros 7 días de introducción nos permitió obtener 66% de explantes libres de contaminantes. Además, para la elongación de tallos, la concentración de 3 ppm de BAP y también, 3 ppm de KIN mostraron los mejores promedios, así mismo, para el número de hojas, las concentraciones de 6 ppm de BAP y también, 6 ppm de KIN, mostraron los mejores promedios, para el número de yemas, 1 ppm de BAP, mostró los mejores promedios, así mismo, para esta misma variable, 3 ppm de KIN, mostró los mejores promedios, siendo, además, las concentraciones de Kinetina, los que lograron los mejores valores absolutos para todas las variables. Finalmente, para el BAP y el KIN, en todas sus concentraciones estudiadas, no hubo formación de raíces y tejido calloso.

I. INTRODUCCION

El dale dale *Calathea allouia* es un cultivo que cuenta con un gran potencial productivo que se encuentra altamente distribuido por toda la amazonia del Perú y que es usado como parte de la dieta alimenticia de los poblados quienes consumen las raíces tuberosas cocidas y su textura se mantiene crujiente incluso después de largo tiempo de cocinado, característica que lo hace muy apetecible. Su cocción en agua demora de 15 a 20 minutos y su sabor se parece al del maíz verde cocido.

Además en América del Sur, en la medicina tradicional; la tintura de las hojas se utiliza para el tratamiento de la cistitis y como diurético. Las hojas frescas se empleaban para la confección de ropas para bebés, por ser resistentes y durables.

En la actualidad este cultivo se encuentra gravemente amenazado, esto debido a que cada vez se siembra menos el dale dale, perdiendo así gran cantidad de material genético que más adelante nos permitiría hacer mejoramiento genético de esta especie de gran importancia.

La utilización de las técnicas de micropropagación nos permitirá propagar in Vitro eficientemente la especie dale dale permitiéndonos multiplicar y conservar este importante material genético.

Por este motivo, el presente trabajo de investigación pretende Estudiar diferentes concentraciones de Bencil aminopurina y Kinetina en la micropropagación in Vitro del dale dale.

II. REVISIÒN BIBLIOGRÀFICA

2.1. El Dale Dale

León (1968) menciona que el dale dale está distribuido por todo el mundo donde ha sido bien aceptado, pero no ha llegado a ser un cultivo importante en ningún lugar. En la Amazonia brasileña, el creciente abandono parece haber sido provocado por dos factores principales: su ciclo vegetativo muy largo (10-12 meses); y su sustitución en la dieta de los pequeños productores rurales por otros tipos de alimentos (camote, cará, iñame o por productos industrializados como el pan y los bizcochos de trigo). Incluso en su región de origen donde su cultivo es milenario, el dale dale se utiliza en la actualidad solamente en una agricultura de supervivencia practicada por agricultores tradicionales y por las poblaciones indígenas.

Villachica (1996), menciona que el dale dale se propaga por rizomas. Las raíces tuberosas se mantienen en lugar seco y fresco después de cosechadas, hasta el momento de la siembra. También se propaga por plántulas formadas en la base del tallo.

León (1968) menciona que habitualmente, el cultivo del dale dale se realiza en pequeñas áreas dónde se practica una agricultura de subsistencia, frecuentemente asociado con yuca, plátano o árboles frutales. En Puerto Rico se siembra aprovechando la sombra del café. La asociación con especies leñosas se debe a que la sombra total o parcial es necesaria para el buen desarrollo vegetativo.

2.1.1. Origen y Taxonomía

León (1968) menciona que su origen es posiblemente de la Amazonia central y norte y en las Antillas.

Villachica (1996), menciona la taxonomía del dale dale

Familia: Marantaceae
Género: Calathea
Especie: Calathea allouia (Aubl.) Lindl.
Nombre común:
"Dale dale", "agua bendita", "cocurito", "leren", "sewi", "lairen", "yairen", "topi-tambu" (español), "ariá", "láirem" (portugués), "guinea arrow root", "sweet corn root" (inglés), "alléluia", "touple nambours" (francés).
Sinónimos aceptados: Maranta allouia Aublet.

2.1.2. Descripción botánica y morfológica

Villachica (1996), menciona que la planta que forma macollos de hasta 1,5 m de alto, con la parte subterránea y perenne constituida por un rizoma ramificado del que brotan pseudotallos aéreos y cortos, con follaje denso, que se seca al año. Los nuevos pseudotallos aparecen después del inicio de la estación lluviosa. La base de las hojas es envolvente y forma pseudotallos cortos, los pecíolos son largos y acanalados. La lámina, oblonga y asimétrica, con la lígula sólida y fuerte, mide entre 20 y 60 cm de largo y 5 a 20 cm de ancho. Los tallos floríferos tienen una hoja basal. La inflorescencia es una espiga de 5 a 10 cm de largo, con las flores insertadas en espiral, con brácteas verdes y corola amarilla o blanca.

De los nudos inferiores del rizoma salen muchas raíces fibrosas, duras y retorcidas, al final de las cuales se forman raíces tuberosas elipsoidales a ovoides que constituyen la parte comestible. Estas raíces tuberosas miden de 1 a 5 cm de largo por 0,5 a 3 cm de ancho, están cubiertos por una cáscara dura, amarilla y brillante, con protuberancias espinosas. Debajo de la cáscara se encuentra el tejido parenquimatoso color claro a blanquecino que contiene almidón, encontrándose el centro generalmente vacío.

2.1.3. Principales plagas y enfermedades.

Bueno (1981) menciona que la especie es tolerante al nematodo del nudo *Meloidogyne incognita*, puesto que tiene secreciones radiculares que perjudican la eclosión, penetración y reproducción del nematodo. Esporádicamente se observa ataque de larvas de coleópteros y lepidópteros en los rizomas y tubérculos y de ácaros en las hojas.

2.1.4. Ecología y adaptación

Villachica (1996), menciona que el dale dale, es originario de zonas con alta temperatura y humedad relativa durante todo el año. Requiere suelos de textura media, con buen drenaje y buen suministro de agua. Los suelos arcillosos limitan el desarrollo de las raíces y en los suelos arenosos, o cuando hay períodos secos, el crecimiento es deficiente. La sombra favorece el desarrollo en suelos de baja fertilidad y en plantaciones de baja densidad, pero rinde más cultivado a pleno sol, con altas densidades y buen abonamiento.

2.1.5. Métodos de propagación.

Villachica (1996), menciona que el dale dale se propaga por rizomas. Las raíces tuberosas se mantienen en lugar seco y fresco después de cosechadas, hasta el momento de la siembra. También se propaga por plántulas formadas en la base del tallo.

El cultivo es practicado por pequeños agricultores que utilizan la sombra de otras especies, generalmente yuca, plátano o árboles frutales. Su cultivo sin sombra en pequeñas áreas desboscadas, en Iquitos, ha dado buen resultado.

La densidad de siembra está entre 0,4 y 0,5 m entre plantas con 0,8 y 1,0 m entre líneas. Las plantaciones con mayor densidad deben hacerse en suelos con mayor fertilidad o donde se realizará un adecuado plan de

abonamiento. Los mejores suelos son los francos a franco arcilloso que retienen adecuada humedad, pero con buen drenaje. El desarrollo de la planta se reduce por efecto de la falta de lluvia. El principal cuidado cultural está en los deshierbos.

2.1.6. Tecnología de cosecha y poscosecha.

Villachica (1996), menciona que la cosecha se realiza entre ocho y doce meses después de la siembra, dependiendo del clima y la variedad. Para ello se cava alrededor de la planta, para luego retirar las raíces tubérculo. Algunos agricultores arrancan la planta sin cavar alrededor, produciendo pérdida por tubérculos que quedan en el suelo.

Las raíces tubérculos pueden ser guardados por hasta diez semanas en ambientes abiertos y ventilados, pero se produce pérdida de peso. Un método de almacenaje es utilizar canastas de fibra vegetal, forradas externamente con hojas secas. En este caso, la pérdida de peso llega hasta 29% en diez semanas. El almacenamiento en conservadores debe ser estudiado, porque si bien reduce la pérdida de peso, produce cambio en las características del tubérculo.

2.1.7. Diversidad genética.

Villachica (1996), menciona que la diversidad genética se manifiesta en la variada morfología de las plantas y en el tamaño de los tubérculos. Existen localidades en la Amazonia donde el cultivo aún se practica, especialmente, en las poblaciones indígenas, pero el dale dale está siendo sustituido por otras fuentes de carbohidratos como el camote, pituca, fíame, o por productos industrializados como el pan o derivados de la harina del trigo.

El género tiene más de 100 especies. Una especie relacionada es *C. lutea* ("bijao", "cauasú", "casupo", "hoja blanca"), arbusto utilizado para la producción de cera por las hojas y como envoltura para cocinar

comidas regionales. *C. macrantha*, otra especie del mismo género, es utilizada en América Central por la inflorescencia que se come en sopas.

2.1.8. Disponibilidad de recursos genéticos

Villachica (1996), indica que, existen colecciones limitadas de algunos ecotipos en el INPA, Manaus, Brasil (tres accesos), el INIA, Iquitos, Perú (tres accesos) y el Instituto de Agricultura Tropical en Mayaguez, Puerto Rico. Sin embargo, la mayor parte de los recursos genéticos se encuentra en las propiedades de los agricultores de la Amazonia y de las poblaciones nativas.

2.1.9. Prioridades de investigación

Villachica (1996), indica que, el cultivo podría ser mejorado mediante la colección y evaluación de germoplasma, buscando identificar genotipos agronómicamente superiores. La especie tiene buenas posibilidades en los sistemas agroforestales por su tolerancia a la sombra. Asimismo, la posibilidad de uso industrial en tinturas y su acción nematicida deben ser investigadas.

2.1.10. Formas de utilización.

Villachica (1996), menciona que las raíces tuberosas se consumen cocidas, con la particularidad de mantener textura crocante aún después de largo tiempo de cocinado. Esta crocancia de la raíz cocinada, así como su sabor parecido al maíz verde, la hace muy apetecible. También se utiliza en la preparación de ensaladas y como acompañante de muchos platos a base de pescado. De las hojas se fabrican empaques y se obtienen fibras. La medicina tradicional emplea la tintura de las hojas para el tratamiento de la cistitis y como diurético.

Las inflorescencias tiernas son comestibles. Las hojas son usadas para envolver tamales y otros alimentos.

Cuadro 01. Valor nutritivo de 100 g de tubérculo de dale dale. Villachica (1996).

Componente	Unidad	Valor
Agua	g	88,0
Valor energético	cal	40,0
Proteínas	g	0,5
Grasas	g	0,8
Carbohidratos	g	9,0
Fibra	g	0,8
Ceniza	g	0,8
Calcio	mg	15,0
Fósforo	mg	34,0
Fierro	mg	3,1
Tiamina	mg	0,04
Riboflavina	mg	0,03
Niacina	mg	0,04
Acido ascórbico	mg	4,00

Calathea allouia (Aubl.) Lindl. tiene el valor nutritivo presentado en el cuadro 01.

Cuadro 02. Contenido de aminoácidos (g/100 g de proteína) en los tubérculos de dale dale y relación a la referencia de proteínas de la FAO (Martin y Cabanillas, 1976), mencionado por Villachica (1996).

Componente	Cantidad	Referencia FAO
Alanina	5,91	--
Valina	7,64	4,2
Glicina	6,53	--
Isoleucina	5,72	4,2
Leucina	7,40	4,8
Prolina	4,35	--
Treonina	4,69	2,8
Serina	5,14	--
Metionina	2,36	2,2
Hidroxiprolina	0,00	--
Fenilalanina	5,54	2,8
Acido aspártico	12,75	--
Acido glutámico	14,71	--
Tirosina	3,01	2,8
Lisina	6,35	4,2
Histidina	1,80	--
Arginina	5,64	--
Triptófano	No med.	2,7
Cisteína	0,04	--

La materia seca de las raíces tuberosas contiene 13 a 15% de almidón y 6,6% de proteínas. Entre los aminoácidos solamente tiene deficiencia de cisteína, no conociéndose el contenido de triptófano, con todos los demás aminoácidos presentes en cantidades altas. En el cuadro 02 se presenta el contenido de proteínas en los tubérculos, en relación a los requerimientos recomendados por la FAO.

2.1.11. Aspectos de agro industrialización a pequeña escala

Villachica (1996), menciona que no se han estudiado, pero podría evaluarse la posibilidad de industrializar para la producción de harina o para almacenamiento.

El mercado de consumo es local. Sin embargo, los estudios pueden abrir mercados nuevos para productos como la tintura que se obtiene de las hojas.

2.2. Micropropagación de plantas

2.2.1. Concepto de micropropagación

Micropropagación se define como cualquier proceso aséptico que comprende la manipulación, en las plantas, de sus órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente. (Dublin, 1984).

2.2.2. Etapas de micropropagación

Murashige (1974) y otros determinan que las principales etapas en la micropropagación tenemos las siguientes:

Fase 0: Banco de plantas. Esta fase tiene como objetivo asegurar mediante un buen control fitosanitario, las plantas sanas en crecimiento activo y vigoroso para la obtención de explantes sanos a iniciar.

Fase 1: Es la de Iniciación que incluye la selección y aplicación de un esquema de desinfección y la inoculación de los explantes en un medio de iniciación con el objetivo de lograr una elevada taza de supervivencia y la respuesta deseada.

Fase 2: Etapa en la que se promueve y estimula la producción de brotes para incrementar y mantener las cepas Su objetivo es la obtención del mayor número de brotes con alta fidelidad genética en un corto período de tiempo.

Fase 3: Es la etapa de enraizamiento y elongación, que tiene como objetivo el alargamiento de los brotes, y la inducción y desarrollo de las raíces.

Fase 4: Es la etapa de transferencia de condiciones "in vitro" a condiciones medio ambientales controladas. Esta fase consiste en el trasplante de las vitro plantas a condiciones naturales. Ello implica la climatización bajo condiciones controladas para garantizar la supervivencia.

2.2.3. Beneficios de la micropropagación

Según Murashige & Skoog (1962), los beneficios son los siguientes:

- Los beneficios obtenidos mediante la micropropagación viene a ser la constante disponibilidad de plántulas de calidad certificada y rendimiento máximo sin tener que comprar semillero y plántulas de vivero.

- Permite la obtención de gran material vegetativo genéticamente homogéneo y libre de enfermedades (material certificado).

- Los agricultores obtuvieron una serie de ventajas en cuanto a rendimiento y control fitosanitario que se reflejan en los beneficios económicos obtenidos a mediano y largo plazo en los campos de cultivo.

- Las vitro plantas generadas por esta técnica dan un mayor rendimiento en campo por sus variedades, tipos o clones homogéneos de alta calidad y están libres de enfermedades, también permite utilizar el procedimiento para el fitomejoramiento.

- La técnica de cultivo de tejidos permite obtener clones de material vegetal élite de cultivo de manera constante, sin importar la estación del año a las condiciones climáticas.

- Si bien es posible realizar producción de plantas libres de virus mediante las técnicas convencionales, el proceso es costoso y riesgoso ya que una sola planta infectada puede ser causante de la propagación de la enfermedad. La micropropagación en cambio, asegura permanentemente que las plántulas estén libres de enfermedades virales y además tiene la ventaja de permitir eliminar los virus de las plantas infectadas.

2.2.4. Medios de cultivo

Una vez definido el objetivo perseguido con el cultivo in vitro de un determinado explante, es necesario elegir un medio apropiado de cultivo, en el cual hay que considerar no sólo sus componentes sino su preparación. (Barcelo *et al.,* 2001).

a. Componentes del medio de cultivo

Según Barcelo *et al.* (2001), en la actualidad existen innumerables formulaciones cada una de las cuales contienen entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran:

- Carbono
- Nutrimentos minerales
- Vitaminas

- Agentes gelificantes (en el caso de medios semisólidos)
- Sustancias reguladoras del crecimientos
- Otros compuestos

1. Fuentes de Carbono

Muy pocos cultivos in vitro son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono. La sacarosa (2 a 5 %) es el azúcar que más se utiliza, y se puede reemplazar por glucosa y en menor medida por fructosa; en general, la maltosa y la galactosa son menos efectivas. La incorporación de Mioinositol al medio (100 mg/l) generalmente da como resultado un mejor crecimiento de los callos y suspensiones celulares. (Hurtado, 1994).

2. Nutrimentos minerales

Cualitativamente los medios de cultivo aportan los mismos elementos (macro y micronutrimentes) que se consideran esenciales para el crecimiento de plantas enteras. Los medios de cultivo contienen fósforo, calcio, magnesio y azufre en concentraciones de 1 a 3 micromoles. La adición de hierro conjuntamente con un agente quelante (Na_2EDTA) lo hace disponible en un amplio rango de pH. (Hurtado, 1994).

3. Vitaminas

Si bien los medios de cultivo contienen comúnmente varias vitaminas, es probable que en forma general sólo sea esencial la incorporación de tiamina. (Hurtado, 1994).

4. Agente gelificante

En los medios semisólidos comúnmente se adiciona agar (0,6 a 1,0 %). Se debe considerar especialmente la pureza del agar, ya que es frecuente la presencia de impurezas de naturaleza variada. (Hurtado, 1994).

5. Reguladores de crecimiento

En algunos casos se obtienen en los cultivos in vitro las respuestas deseadas mediante el empleo del Medio Base sin reguladores de crecimiento. Si embargo, en la mayoría de los casos se hace necesario agregar al medio, sustancias reguladoras de crecimiento generalmente del tipo de las auxinas o las citocininas. (Hurtado, 1994).

Las auxinas que más se utilizan en el establecimiento de los cultivos son: Ácido Naftalenacético (ANA), Ácido Indolacético (AIA) y Acido Indolbutírico (AIB); las citocininas que más se emplean son Kinetina (KIN), Bencil Aminopurina (BAP) y Zeatina (ZEA). (Hurtado, 1994).

6. Otros componentes

Existe una larga lista de componentes que se han adicionado ocasionalmente a los medios de cultivo, como fuentes de nitrógeno reducido, factores de crecimiento, carbohidratos y otros. Entre ellos están el agua de coco, el jugo de frutos de tomate, el extracto de levadura y el extracto de tubérculos de papa. (Hurtado, 1994).

El empleo de sustancias antioxidantes (ácido ascórbico, L-cisteina, polivinilpirrolidona) pueden ser de utilidad para el cultivo de explantes con alto contenido de polifenoles, cuya

oxidación produce oscurecimiento y eventual muerte de los explantes. En estos casos también es útil usar las soluciones antioxidantes durante la preparación del explante, como también incubar los cultivos en la oscuridad o a bajas intensidades de luz. También se suele acortar el intérvalo de tiempo entre subcultivos, como un medio para disminuir los efectos nocivos de la oxidación de polifenoles. (Hurtado, 1994).

El carbón activado (0,1 a 5 %), incorporado al medio, ha mostrado ser de utilidad en el cultivo de diferentes explantes, posiblemente por absorber metabolitos tóxicos. (Hurtado, 1994).

2.2.5. Establecimiento de cultivo in vitro

Rosell (1990), indica que, las plantas, siendo organismos foto autotróficos, son capaces de utilizar la energía luminosa para asimilar y convertir el CO_2, el agua y nutrientes inorgánicos en compuestos orgánicos necesarios para el crecimiento celular. Para el cultivo de material vegetal separado de la planta sería necesario adicionar al medio sintético todos aquellos nutrientes, vitaminas y reguladores del crecimiento que las células, tejidos u órganos recibirán a través de las raíces o de los órganos fotosintetizadores de la planta.

Para cultivar células, tejidos u órganos in vitro se siguen una serie de principios básicos. Primeramente es necesario seleccionar y separar de la planta el material que se desea cultivar. El siguiente paso consiste en eliminar los microorganismos que se encuentran contaminando el material vegetal. Por último se debe proporcionar a las células, tejidos u órganos un medio ambiente apropiado a través de medios de cultivo sintéticos y condiciones de incubación adecuadas. Tanto la asepsia como la inoculación del material vegetal se llevan a cabo en ambiente estéril. (Archibald, 1954).

Pierik (1991), define cultivo in vitro de plantas superiores como: El cultivo en medio nutritivo, bajo condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores. Asimismo el autor menciona que, los cultivos in vitro pueden iniciarse prácticamente a partir de cualquier parte de la planta. Sin embargo, la fuente inicial de material vegetal puede ser determinante para el éxito en el establecimiento de los cultivos.

Generalmente se aconseja utilizar plantas sanas y vigorosas como fuente del explante; comúnmente se seleccionan aquellas partes de la planta que se encuentran en división activa, como las regiones meristemáticas. El éxito en el cultivo de órganos, tejidos o células disminuye con el aumento de la edad de la planta, por lo que es recomendable utilizar plantas jóvenes como fuente de explantes (Rosell, 1990).

2.2.6. Micropropagación

Rosell (1990), La formación de órganos nuevos se puede inducir reproduciblemente a través de la manipulación química de los medios de cultivo. Cuando las células son cultivadas en condiciones apropiadas, son capaces de desarrollar individuos completos como lo hace el cigoto. El desarrollo de los primordios en los órganos respectivos es esencialmente el mismo tanto en cultivo de tejidos como en plantas intactas, por lo tanto, el uso de cultivos in vitro tienen grandes ventajas para estudios tanto básicos como aplicados. Thorpe (1980) considera que para el éxito en el establecimiento de un sistema de cultivo de tejidos, existen 3 condiciones importantes:

- La selección del explante adecuado
- La elección apropiada del medio
- El control de las condiciones físicas.

Los explantes in vitro seguirán en proceso morfológico por cualquiera de las rutas generales; esto es por medio de meristemoides, subsecuentemente primordios, brotes y finalmente la formación de raíces adventicias o bien a través de embriogenesis somática. (Winton, 1977). En cualquiera de los 2 procesos, la naturaleza que controla el mecanismo de diferenciación sigue siendo, a la fecha, una de las más importantes incógnitas de la biología moderna.

2.3. Reguladores de crecimiento

Roca, (1991), actualmente se reconoce cinco tipos de sistemas químicos de reguladores del crecimiento vegetal, dividido en tres grupos principales:

- Promotores del crecimiento: auxinas, citocininas y giberelinas
- Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico
- Etileno

De los cinco sistemas químicos incluidos en este grupo, las auxinas y giberelinas estimulan principalmente la elongación celular; las citoquininas estimulan la división celular. (Hurtado, 1988)

Las hormonas son, por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo; actúan generalmente en lugar diferente a donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades. A parte de este producto natural, se han desarrollado también otros de tipo sintético, junto con las hormonas, se les denomina "reguladores", y son los responsables, en primer lugar, de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza. También determina el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta. (Hartman, 1995).

En el cultivo in vitro de las plantas superiores, los reguladores, especialmente las auxina y citocininas, juegan un papel muy importante. Se puede decir que el cultivo in vitro es generalmente imposible sin

reguladores. Si a un medio nutritivo se le debe añadir una auxina o una citocinina, para conseguir la extensión y/o la división celular, es algo que depende del tipo de explante y de la especie vegetal. Por ejemplo explantes que producen suficiente cantidad de citocininas, no precisan de ninguna adición exógena. Otros explantes que producen suficiente cantidad de auxinas, no necesitan una cantidad adicional para conseguir la extensión y/o división. (Hall *et al.,* 1974). Se puede hacer la siguiente división, en relación con el crecimiento de células, tejidos, órganos, entre otros:

- Cultivos que no necesita ni auxinas ni citocininas
- Cultivos que necesitan sólo auxinas
- Cultivos que necesitan sólo citocininas
- Cultivos que necesitan auxinas y citocininas

En el caso de especies con las que no se hayan trabajado previamente, se debe plantear si sus tejidos u órganos necesitarán reguladores exógenos, para su crecimiento y desarrollo in vitro. Se deberán, por tanto, determinar las cantidades absolutas y relativas, de auxinas y/o citocininas que deben añadirse. Otros reguladores como giberelinas y etileno, pueden también ser necesarios, (Pierik, 1991).

2.3.1. Citocininas

Hurtado (1994) indica que la KIN (6-furfuril-amino purina) ha recibido mucha atención como una sustancia estimuladora de la división celular; no se ha demostrado que esté presente como un compuesto natural y generalmente se reconoce como un artefacto. Actualmente comprenden la sustancia más conocida de división celular, sustancias promotoras, y las adenilcitocininas.

Las citoquininas naturales de mayor importancia son la cinetina, zeatina y ribozeatina. Por otro lado, dentro de las citoquininas

sintéticas se encuentra la BA o BAP (6- Bencilaminopurina) y el PBA (6- bencilamino-9 (2 tetrahidropiranil) –9H-purina) (SEILER, 2002).

La ZEA (6-[4-hidroxi-E-metil but-trans-2-enilamino] purina) se considera generalmente como el prototipo de las adenilcitocininas que ocurren naturalmente; es unas 10 veces más potente que la KIN.

Otra citosina sintética, el BAP, se utiliza actualmente tal vez más que la KIN o la ZEA. Es un compuesto muy activo.

Modo de acción:

Como derivan de una purina:

- Se unen a la cromatina del núcleo.
- Efecto promotor sobre el ARN y las enzimas.
- Estimulan el estado de transición del estado G2 en la mitosis.
- Actúan en la traducción del ARN.
- Incrementa la rapidez de síntesis de proteínas.

Efectos fisiológicos:

- División celular y formación de órganos.
- Retardo de la senescencia (debido a su propiedad de generar alta división celular son fuentes, por lo que realizan su efecto de retardo de la senescencia).
- Desarrollo de yemas laterales.
- Inducen partenocarpia.
- Floración de plantas de días cortos.
- Reemplazo de luz roja en germinación de semillas fotoblasticas.

2.3.2. Bencil amino purina (BAP)

Sus principales funciones dentro de la planta son: estimular la división celular y el crecimiento romper la latencia de las yemas axilares promover la organogénesis en los callos celulares, retrasar la senescencia o envejecimiento de los órganos vegetales promover la

expansión celular en cotiledones y hojas y el desarrollo de los cloroplastos (SEILER, 2002)

2.3.3. Kinetina

Miller y Skoog descubrieron la kinetina, una citocinina artificial.
En 1955, tras experiencias previas realizadas con ADN de esperma de arenque, Folke Skoog y Carlos Miller consiguieron preparar por tratamiento térmico de ADN un compuesto, el 6-furfurilamino purina, que promovía la división celular. Denominaron a esta sustancia kinetina y llamaron a los reguladores que se incluían dentro de este grupo citocininas, debido, como dijimos anteriormente, a su aparente implicación en los procesos de citocinesis, o división celular.
Actualmente se han aislado citocininas de muchas especies diferentes de plantas, donde se encuentran, fundamentalmente, en órganos cuyos tejidos se están dividiendo de forma activa, es decir, en semillas, frutos, y raíces. Recientemente, las citocininas se han identificado en dos plantas vasculares sin semilla, un equiseto (*Equisetum arvense*) y el helecho *Dryopteris crassirhizoma*. (AZCON. 1993).

2.4. Fenolizacion u oxidación

La oxidación es el proceso a través del cual un átomo, o grupo de átomos, pierde uno o más electrones (se oxida) y los cede a otro (el cual se considera reducido). En sustratos orgánicos, la oxidación y reducción involucra la participación de átomos de carbono enlazados en forma covalente a otros átomos (Karp1998, citado por Azofeifa, 2009).

La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados in vitro, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación decompuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando

daño e incluso la muerte celular (Amiot et al. 1996, Bray *et al.* 2000, citados por Azofeifa, 2009).

2.4.1. Origen y factores desencadenantes

La mayoría de radicales libres se producen a partir del metabolismo del oxígeno y se les llama especies de oxígeno reactivo o intermediarios de oxígeno reactivo (ROS). Estas son formas parcialmente reducidas del oxígeno atmosférico y típicamente resultan de la excitación del O_2 para formar el oxígeno singulete ($1O_2$) o también mediante la transferencia de uno, dos o tres electrones al O_2 para formar el radical súper óxido (O_2-•), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el radical hidroxilo (HO•) respectivamente. En las células vegetales, éstos se forman constantemente durante las reacciones redox de varias vías metabólicas; la incompleta reducción del oxígeno o de la oxidación del agua en el cloroplasto o la mitocondria, en la cadena de transferencia de electrones tanto de la fotosíntesis como de la respiración, en la β-oxidación de los ácidos grasos, oxidación del glicolato, del NADPH, oxalato y de las xantinas (Bray *et al.* 2000, Mittler 2002, Turrens 2003, Apel eHirt 2004, citados por Azofeifa, 2009). Los ROS también se pueden generar en otras organelas celulares, como los peroxisomas y los lisosomas, a consecuencia de los cortes realizados en los explantes (Karp1998, citado por Azofeifa, 2009). Adicionalmente, el O_2-• puede reaccionar con el óxido nítrico para formar su radical (NO•). Este y otras formas oxidantes del óxido nítrico; dióxido de nitrógeno (NO_2•), peróxido nítrico (ONOO-), nitrosil catión (NO+), etc., reciben en conjunto el nombre de especies reactivas denitrógeno (RNS). El estrés ocasionado por ROS se le conoce como estrés oxidativo y el originado por RNS como estrés nitrosativo (Turrens 2003, Valderrama *et al.* 2007, citados por Azofeifa 2009).

En condiciones normales decrecimiento la producción de ROS en la célula es baja: 240 µM/s O_2- y 0,5 µM/s de H_2 O_2 en los cloroplastos. En situación de estrés, el nivel de O_2- en la célula se incrementa entre los

240 - 720 µM/s y entre los 5 - 15 µM/s de $H_2 O_2$ en los cloroplastos (Mittler, 2002, citados por Azofeifa, 2009). La producción de especies reactivas puede ser activada por inductores específicos (como parte del metabolismo normal de la planta) o también por mecanismos no específicos, por ejemplo en respuesta a un tipo de estrés. Minutos después de la estimulación inicial ocurre, en respuesta, una producción elevada de especies reactivas de oxígeno (Arauz 1998, citado por Azofeifa, 2009).

La célula vegetal sometida a un estrés reacciona produciendo mayores niveles de ROS y, o RNS; los cuales generan una reacción en cascada, cuando el electrón libre se transfiere de una molécula a otra. Una de las consecuencias que trae consigo es la acción de enzimas oxidasas, frecuentemente nombradas como polifenol oxidasas (PPOs), fenolasas y tirosinasas, así como de las peroxidasas (POX). Las cuales son liberadas, sintetizadas o están presentes en ciertos sustratos y en condiciones oxidativas cuando los tejidos son lesionados o se encuentran senescentes. En muchos casos, la oxidación se ha relacionado directamente con el acúmulo de PPO y decrecimiento de putrescina, espermidina, y espermita de los tejidos. Los sustratos para estas enzimas, que pueden variar entre los diferentes tejidos, son comúnmente la tirosina o los fenoles. La enzima y el sustrato entran en contacto cuando la célula sufre algún daño, estrés o se encuentra senescente y, generalmente, da como resultado la muerte del explante (Bhat y Chandel 1991, George, 1996, Vatanpour-Azghandiet al. 2002, Tang y Newton, 2004, Gratão et al. 2005, Pompeu et al. 2008, citados por Azofeifa, 2009).

Factores ambientales como: intensidad de luz, cortes, herbicidas, senescencia, patógenos, metales pesados, lesiones, sustancias abrasivas pueden desencadenar el estrés oxidativo y nitrosativo (Bray *et al.* 2000, Pompeu et al. 2008, citados por Azofeifa, 2009). En el caso particular del cultivo de tejidos in vitro, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante

aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo (George1993, Tabiyeh *et al.,* 2006, Van Staden *et al.,* 2006, Abdelwahd *et al.*, 2008, citados por Azofeifa, 2009).

2.4.2. Problemática y su desarrollo in Vitro

El establecimiento in vitro de tejidos vegetales de algunas especies de plantas, especialmente leñosas, está, en gran medida, limitado por la ocurrencia de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo. Esto constituye uno de los problemas más serio y frecuente, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado in vitro (George, 1996, citados por Azofeifa, 2009). El establecimiento in vitro de tejidos vegetales de algunas especies de plantas, especialmente leñosas, está, en gran medida, limitado por la ocurrencia de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo. Esto constituye uno de los problemas más serio y frecuente, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado in vitro (George, 1996, citado por Azofeifa, 2009). Además, se puede deber a la oxidación de proteínas, aquefenoles se unan con proteínas mediante puentes de hidrógeno (Harms *et al.*, 1983, citado por Azofeifa, 2009), a la acción de enzimas peroxidasas, las cuales pueden catalizar su oxidación en presencia de peróxido. Este y otros radicales libres son liberados o generados durante el proceso de escisión, limpieza, desinfección y cultivo del explante (George, 1996, Uddin y Titov 2007, citados por Azofeifa, 2009). La presencia de algunas sustancias fenólicas dañinas puede tener un efecto autocatalítico en su síntesis.

El daño que resulta de la producción de exudados es usualmente más severo durante los estados iniciales de cultivo. El problema tiende a cesar cuando el explante inicia su crecimiento. A parte del oscurecimiento de explantes, al estrés oxidativo se le ha relacionado con el desencadenamiento de otros desordenes fisiológicos, morfológicos, epigenéticos y genéticos que ocurren en los explantes cultivados, tales

como recalcitrancia, hiperhidricidad, variación somaclonal y habituación (Cassells y Curry 2001, van Staden *et al.,* 2006, citados por Azofeifa, 2009).

2.4.3. Factores Externos Del Cultivo

A. La temperatura.

Según Closas *et al.* (1999), Determinar la temperatura óptima de crecimiento para cada cultivo *In Vitro* puede ser un proceso muy laborioso que, además, exige gran cantidad de cámaras de cultivo reguladas de forma diferente. Afortunadamente, y para la mayoría de situaciones, se pueden obtener resultados satisfactorios con temperaturas de incubación que oscilan entre los 20 y 28^{0}C.

En lo mencionado por Barcelo *et al.* (2001), la temperatura actúa estimulando, hasta un cierto límite, tanto la respiración como el crecimiento y luego actúa como inhibidor. El papel del regulador del la temperatura sobre el crecimiento. Se realiza a través de la regulación de reacciones enzimáticas que, directa o indirectamente intervienen en el proceso. El óptimo de temperatura la mayoría de las veces está entre 28 y 32°C y por encima de los 35°C empieza a causar daño, ya que las diferentes reacciones poseen coeficientes de temperatura ligeramente distintos, un cambio de temperatura puede fomentar una reacción y por el contrario perjudicial a otra. (Dieter, 1980)

B. El fotoperíodo.

Algunos fenómenos propios del desarrollo de las plantas (germinación, floración, tuberización, etc.) pueden ser activados por el número de horas diarias de luz que recibe la planta. De forma análoga, el número de horas de luz que recibe el explante cultivado *In Vitro* puede afectar a su desarrollo. En general, el mejor fotoperíodo ex Vitro será también el mejor fotoperíodo *In Vitro*. (Barcelo, *et al.,* 2001).

C. La intensidad de luz.

La luz artificial puede emplearse para prolongar el fotoperiodo natural, se ha visto que el efecto estimulador no depende de la intensidad de luz, si no de la luz como tal, es decir basta con la luz de una linterna para estimular a una planta a la producción de flores. Para algunas especies la luz de la luna llena basta para generar estimulación a la producción de brotes. (Erston, 1967).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Ubicación y duración del experimento

El experimento se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos y Meristemas de la Universidad Nacional de Ucayali, situado en el km 6 de la Carretera Federico Basadre al sureste de Pucallpa, margen izquierdo, distrito de Manantay, provincia de Coronel Portillo, región de Ucayali. El estudio se llevó a cabo en los meses de agosto a diciembre del 2012.

Geográficamente el área esta situado a 08° 23' 39.6'' de latitud sur y 74° 34' 39.8''de longitud oeste, a 154 msnm.

3.2. Ecología y clima

Según el Sistema Holdrige, Ucayali se clasifica como "bosque húmedo tropical" y según la clasificación de los bosques amazónicos pertenece al ecosistema "bosques tropicales semi-siempre verde estacional", cuyas condiciones climáticas promedio para la zona de Pucallpa son:

- Temperatura máxima anual 36. 5°C
- Temperatura media anual 26. 9°C
- Temperatura mínima anual 17. 4°C
- Precipitación promedio anual 1773 mm, (Cochrane, 1982).

Dentro del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Meristemas, las medidas registradas fueron la de temperatura mínima y máxima, los cuales se indican en el cuadro 03.

Cuadro 03. Datos climatológicos observados en la cámara de incubación del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la U.N.U., agosto – noviembre del 2012. Pucallpa, Perú, 2012.

Meses	Semanas	T° max.	T° min.	T° media
Agosto	1	28	24	26
	2	27	25	26
	3	28	24	26
	4	29	24	26,5
Setiembre	1	27	25	26
	2	29	25	27
	3	27	25	26
	4	28	24	26
Octubre	1	29	24	26,5
	2	28	23	25,5
	3	28	23	25,5
	4	29	24	26,5
Noviembre	1	28	25	26,5
	2	27	25	26
	3	29	24	26,5
	4	28	24	26

El cuadro 03, nos muestra que, en el interior de la cámara de incubación del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Meristemas, la temperatura máxima, oscilo entre 29 a 27 °C, la temperatura mínima oscilo entre 23 y 25 °C y la temperatura media se encuentra entre 25,5 y 27 °C, los cuales en encuentra entre el promedio requerido para un proceso de incubación para cultivo de tejidos vegetales, el cual es 25°C, como se muestra en la figura 01.

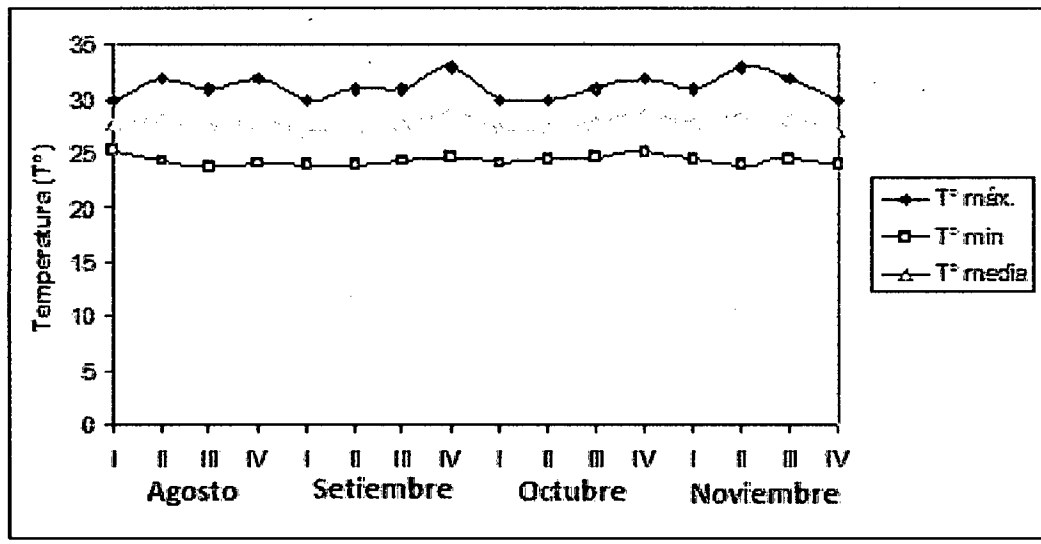


Figura 01. Datos de temperatura registrados dentro de la cámara de incubación del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Meristemas – UNU, agosto – noviembre, 2012. Pucallpa, Perú, 2012.

3.3. Materiales

3.3.1. De laboratorio

- Matraces Erlenmeyers de 250 y 500 ml
- Vasos de precipitado de 500 ml
- Placas petri
- Pipetas de 1 y 10 ml
- Probetas de 100 ml
- Mechero de alcohol
- Pinzas
- Tubos de ensayo autoclavable
- Varillas de vidrio
- Frascos ámbar
- Papel aluminio
- Cintas selladoras
- Mangos de bisturí
- Hoja de bisturí

- Cuchillas

3.3.2. Equipos de laboratorio

- Autoclave
- Estufa
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Aire acondicionado
- Refrigeradora
- Cocina eléctrica
- Horno Pasteur

3.3.3. Instrumentos

- Termómetro de máxima y mínima

3.3.4. Reactivos

- Sales de Murashige & Skoog (1962)
- Regulador de crecimiento: 6-Bencil aminopurina y Kinetina a 1000 ppm
- Phyto Agar
- Sacarosa
- Hipoclorito de sodio a 5 y 3 % de concentración
- Alcohol de 96 °
- Alcohol de 70°
- Tween 80
- Tetraciclina
- Estreptomicina
- Formate (Benomyl)
- Acido Cítrico
- Acido Ascórbico

3.4. Tratamientos en estudio

El regulador de crecimiento estudiado, corresponde a las citocininas: 6-Bencil aminopurina y Kinetina, del los cuales se probó las siguientes concentraciones:

6-Bencil aminopurina

T_1: MS + 30 g/L Sacarosa + 8 g/L phytoagar + 0 ppm de BAP
T_2: MS + 30 g/L Sacarosa + 8 g/L phytoagar + 1 ppm de BAP
T_3: MS + 30 g/L Sacarosa + 8 g/L phytoagar + 3 ppm de BAP
T_4: MS + 30 g/L Sacarosa + 8 g/L phytoagar + 6 ppm de BAP

Kinetina

T_1: MS + 30 g/L Sacarosa + 8 g/L phytoagar + 0 ppm de KIN
T_2: MS + 30 g/L Sacarosa + 8 g/L phytoagar + 1 ppm de KIN
T_3: MS + 30 g/L Sacarosa + 8 g/L phytoagar + 3 ppm de KIN
T_4: MS + 30 g/L Sacarosa + 8 g/L phytoagar + 6 ppm de KIN

3.5. Variables a medir

3.5.1. Porcentaje de plántulas contaminadas: Se realizó, contando el número de plántulas contaminadas con bacterias y con hongos, este conteo se realizó a partir de los 3 días de sembrados en condiciones de in Vitro.

3.5.2. Porcentaje de plántulas fenolizadas: Se realizó, contando el número de plántulas que presentaban procesos progresivos de ennegrecimiento de los tejidos de los explantes.

3.5.3. Porcentaje de supervivencia: Se determinó en unidades de explantes vivos en relación del total de explantes que se sembraron inicialmente, esto se midió en porcentaje.

3.5.4. Elongamiento de tallo: La longitud se determinó en centimetros, con la ayuda de un vernier, y este se evaluó al final del experimento.

3.5.5. Número de hojas: Se evaluó al final de la trabajo de investigación y se determinó en unidades de hojas presentes por explante.

3.5.6. Número de raíces. Se determinó contando el número de raíces por explante, y esta variable se evaluó al final de la evaluación.

3.5.7. Porcentaje de explantes con callos. Se determinó mediante el conteo de explantes que cuenten con tejido calloso y este se midió en porcentaje en relación del 100% de explantes sembrados.

3.6. Del trabajo experimental

3.6.1. Introducción de plántulas de dale dale a condiciones de in Vitro

1. Selección de plántulas de dale dale

Las plántulas fueron obtenidas de un pequeño campo de cultivo ubicado en el Campus Universitario, en el cual, fue instalado en octubre del 2010.

Las plántulas seleccionadas tuvieron una altura de 15 - 30 cm.

2. Pruebas de desinfección

Las plántulas fueron expuestas con alcohol al 70°, por un espacio de 30 segundos, e inmediatamente se agregó los tratamientos de hipoclorito de sodio al 5% y 3% en diferentes tiempos de exposición, de acuerdo a los tratamientos estudiados que se muestran en el cuadro 04, en el cual, además se utilizó diferentes tratamientos de antibióticos, antifungicos y antioxidantes, realizando este proceso en la cámara de flujo laminar.

Cuadro 04. Tratamiento de desinfección con hipoclorito de sodio

Tratamientos	Concentración de Hipoclorito de Sodio	Tiempo de Exposición al desinfectante	Medio de cultivo
T_1	5 % + 3 gotas de Tween 80	40 minutos	Aplicación de tetraciclina + Formate en el medio de cultivo, después del proceso de esterilización y antes de que se solidifique (45°C), las plántulas se mantuvieron por un espacio de 7 días en el medio con tetraciclina y luego se realizó el transplante a un medio sin antibióticos ni antifúngicos.
T_2	5 % + 3 gotas de Tween 80	30 minutos	Aplicación de tetraciclina + Formate en el medio de cultivo, después del proceso de esterilización y antes de que se solidifique (45°C), además se agregó medió líquido conteniendo tetraciclina a las plántulas, los cuales, se mantuvieron por un espacio de 7 días en el medio con tetraciclina y luego se realizó el transplante a un medio sin antibióticos ni antifúngicos.
T_3	3 % + 3 gotas de Tween 80	30 minutos	Aplicación de tetraciclina + Formate en el medio de cultivo, después del proceso de esterilización y antes de que se solidifique (45°C), además se agregó medió líquido conteniendo tetraciclina mas estreptomicina a las plántulas, los cuales, se mantuvieron por un espacio de 7 días en el medio con tetraciclina y estreptomicina y luego se

			realizó el transplante a un medio sin antibióticos ni antifúngicos. Adicionalmente, se utilizó Acido Ascórbico y Acido Cítrico para el enjuague de los explantes antes del tratamiento de desinfección y en el medio líquido que contenía además, los antibióticos para los primeros 7 días.

Culminado el tiempo de exposición por cada tratamiento expuesto a hipoclorito de sodio, estas fueron enjuagadas con agua destilada estéril cuatro veces, agitando de manera constante, para luego ser sembradas en el medio de cultivo preparado.

3. Preparación del medio de cultivo

Para la etapa de introducción, el medio de cultivo que se utilizó estuvo constituido por sales de Murashige & Skoog (ver anexo), al cual se le agregó phyto agar a razón de 8 g por litro y sacarosa a razón de 30 g por litro, no se le agregó reguladores de crecimiento (ver anexo).

Para la primera semana, al medio de cultivo se agregó una solución de tetraciclina (500 mg diluido en 200 ml de agua destilada) y antifúngico (600 mg diluido en 200 ml de agua destilada), el cual fue agregado antes de que el medio de cultivo se solidifique. Además se preparo medio líquido libre de reguladores de crecimiento al cual se le agregó 500 mg de tretaciclina en 200 ml de medio de cultivo, y también se le agregó 500 mg de estreptomicina en 200 ml de medio de cultivo líquido, el cual se utilizó de acuerdo a los tratamientos de desinfección estudiados.

Para la segunda semana, se preparó un medio de cultivo sin aplicación de tetraciclina al medio de cultivo, además, se adicionó, medio de cultivo líquido conteniendo Acido Cítrico y Acido Ascórbico.

Para la tercera semana, se preparó un medio de cultivo con la adición de las citocininas y sus respectivas concentraciones en estudio, además, se adicionó, medio de cultivo líquido conteniendo Acido Cítrico y Acido Ascórbico.

4. Preparación de plántulas de dale dale

Las plántulas de dale dale fueron lavadas para eliminar los restos de sustrato y suelo, para posteriormente, cortar las hojas y cortar el sistema radicular.

Se cuidó de eliminar tejido necrosado presente en el tejido radicular.

Se redujo el tallo hasta 1 cm de la zona de la base y se removió los 2 pecíolos más externos.

Los explantes fueron colocados en frascos conteniendo agua limpia.

5. Siembra

Para proceder a esta actividad previamente se limpió y desinfectó la cámara de flujo laminar donde se realizó la siembra, teniendo a la mano placas petri y pinzas estériles, mechero de alcohol.

Se procedió a extraer los explantes desinfectados con ayuda de una pinza y se colocó sobre una placa petri, para luego cortar los tejidos quemados por el desinfectante, para luego ser sembradas en frascos con medio de cultivo para introducción (ver anexo).

Seguidamente se selló y rotuló los frascos con cinta plástica y lapicero tinta indeleble.

6. Evaluación de contaminación

La evaluación de contaminación se realizó a partir de los tres días de sembradas la plantas en los tratamientos, examinando cada frasco. Esto se realizó con la finalidad de determinar la presencia de estructuras fungosas o crecimiento bacteriano, y poder determinar el porcentaje de contaminación de cada uno de los tratamientos, así mismo se contó el número de explantes fenolizados

3.6.2. Efecto de concentraciones de las citocininas (Bencil aminopurina y Kinetina) en explantes de dale dale

1. Preparación del medio de cultivo

Para la etapa de micropropagación, el medio de cultivo que se utilizó estuvo constituido por sales de Murashige & Skoog (ver anexo), al cual se le agregó Phyto agar a razón de 8 g por litro y sacarosa a razón de 30 g por litro, agregándose las concentraciones de Bencil aminopurina y Kinetina en estudio (ver anexo).

2. Repique o transplante.

Se procedió a extraer los explantes y se repicó en los medios de cultivo conteniendo los tratamientos en estudio, los frascos fueron rotulados de acuerdo al tratamiento correspondiente.

3. Incubación.

Luego del repique y la identificación de los frascos con la fecha de repique y el tratamiento correspondiente, se trasladó a la cámara de incubación, y se depositó los

frascos sobre los estantes, en los cuales se esperó el proceso de morfogénesis, bajo condiciones ambientales de 25°C de temperatura promedio y una intensidad lumínica de 2000 lux.

4. Evaluación de parámetros.

Los parámetros fueron evaluados mediante observaciones directas a los frascos. Estas evaluaciones fueron cada 15 días.

3.7. Diseño experimental

Se utilizó el diseño completo al azar (DCA) con 4 tratamientos y 6 repeticiones para cada tipo de citocinina, se usó la prueba de promedio de Duncan a 0.05 de probabilidad.

$$Y_{ij} = U + T_j + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Una observación cualquiera, $_j$ – ésima observación en el $_i$ –ésimo tratamiento en estudio.
U = Media general
T_i = Efecto del $_i$-ésimo tratamiento en estudio
E_{ij} = Error residual.

Esquema del ANVA.

F.V.	G.L.
Tratamiento	3
Error	20
Total	23

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Porcentaje de contaminación

El cuadro 05, nos muestra los resultados del porcentaje de contaminación, así mismo, el porcentaje de plantas fenolizadas observado en los distintos tratamientos de desinfección estudiados para la introducción de explantes de dale dale a condiciones de in Vitro.

Cuadro 05. Porcentaje de contaminación, explantes sanos y porcentaje de fenolización de dale dale en condiciones in Vitro. Pucallpa, Perú, 2012.

Tratamiento de desinfección	% Contaminación por hongos	% Contaminación por bacterias	% Plantas sanas	%Plantas fenolizadas
T1	30	70	0	0
T2	10	90	0	0
T3	34	0	66	6

Observando el cuadro 05, podemos notar que, para el tratamiento 01, constituido por 5% de hipoclorito de sodio por espacio de 40 minutos, con una solución de tetraciclina y formate (Benomyl) en medio de cultivo, se observó un 300% de contaminación por hongos y 70% de contaminación por bacterias, no obteniéndose plantas sanas. Para el tratamiento 02, constituido por 5% de hipoclorito de sodio por espacio de 30 minutos, con una solución de tetraciclina y formate (Benomyl) en el medio de cultivo, y adicionando tetraciclina en medio de cultivo líquido, se observó 10% de contaminación por hongos y 90% de contaminación por bacterias, no obteniendose plantas sanas. Para el tratamiento 03, constituido por 3% de hipoclorito de sodio por un espacio de 30 minutos, con una solución de tetraciclina, formate (Benomyl), ácido ascórbico y ácido cítrico en el medio de cultivo y adicionando tetraciclina y estreptomicina en el medio líquido,, se observó un 34% de contaminación por hongos, 0% de contaminación por bacterias y 66% de explantes sanos, libres de contaminación por

microorganismos, además se observo un 6% de explantes fenolizados, como se muestra en la figura 03.

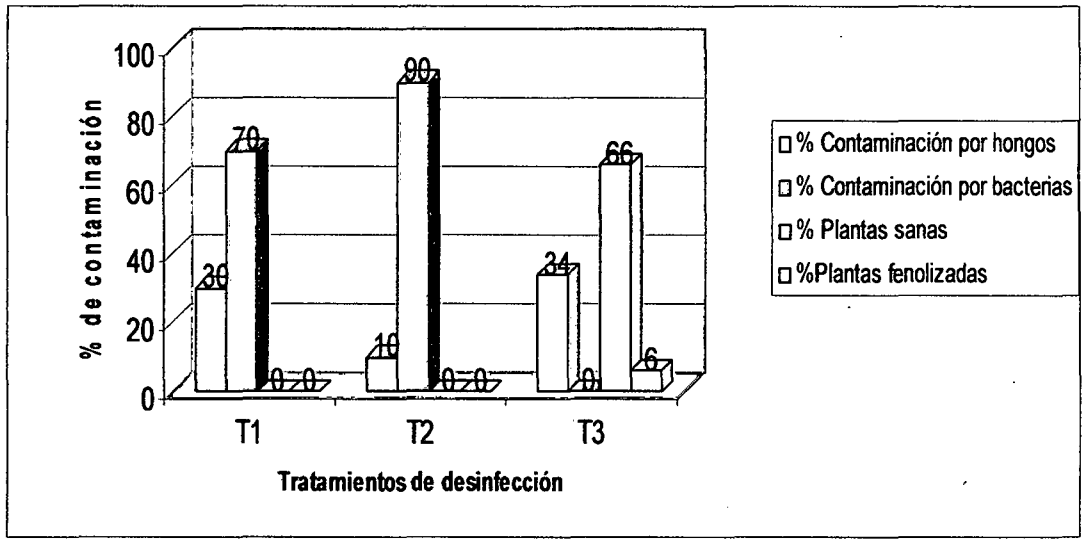


Figura 03. Porcentaje de contaminación, explantes sanos y fenolizados, observado en los explantes de dale dale en condiciones de in vitro.

Observando la figura 03, podemos notar que para los tratamientos T1 y T2, presentaron un 100% de contaminación por hongos y bacterias, a diferencia del tratamiento T3 en el cual, al sembrar los explantes de dale dale en un medio de cultivo conteniendo una solución de Tetraciclina, Formate (Benomyl), ácido ascórbico y ácido cítrico, y además, agregar tetraciclina y estreptomicina en medio líquido, sometidos a 7 días de exposición, nos permitió reducir la contaminación por hongos en 34% y la contaminación por bacterias en 0%, permitiendo obtener un 66% de explantes libres de contaminantes y 6% de explantes fenolizados.

Hartman (1995), indica que el control de organismos patógenos en las plantas madres se facilita con el sistema in vitro pero se debe incluir como parte del procedimiento las pruebas para determinar organismos patógenos. Por otro lado el mismo autor, menciona que en el establecimiento de un explante estéril en un medio de cultivo, los factores que afectan el éxito de ésta etapa incluyen la selección del explante, la eliminación de contaminantes del mismo y las condiciones de cultivo.

Hurtado (1994), indica que en cuanto al material vegetativo, éste contiene en la superficie una abundante microflora, que debe ser eliminado por medio de una desinfección antes del corte del tejido y órgano que será empleado como inóculo. El agente desinfectante mas adecuado, así como su concentración y el tiempo de desinfección, debe ser determinado empíricamente para el material vegetativo con el que se trabaja. El mismo autor afirma que esto probablemente se deban que en cualquier medio de cultivo pueden crecer microorganismos principalmente hongos y bacterias las cuales compiten ventajosamente en el explante, ya sea por mala desinfección o simplemente sea debido a la presencia de fitopatógenos que se encuentran dentro del explante y al momento de ser introducido a condiciones in vitro estas afloran.

4.2. Elongamiento de tallo

En el cuadro 06, se presentan los resultados del análisis de promedios de Duncan para el elongamiento de tallo de explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in Vitro, para las diferentes concentraciones de Bencil aminopurina (BAP).

Cuadro 06. Análisis de promedios de Duncan para las variables elongamiento de tallo de explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in vitro. Pucallpa, Perú, 2012.

Tratamientos	Descripción	Elongamiento de tallo a los 60 días (cm)	Elongamiento de tallo a los 68 días (cm)
T1	0 ppm de BAP	2,55 c	2,61 c
T2	1 ppm de BAP	3,31 b	3,55 b
T3	3 ppm de BAP	3,45 a	3,83 a
T4	6 ppm de BAP	3,26 b	3,30 b

*Letras iguales no presentan diferencias significativas. Duncan $p \leq 0,05$

Después de 60 días de incubación, para la variable elongamiento de tallo, se realizó el análisis de varianza (ver anexo), encontrándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos, al realizar la prueba de promedios de Duncan, que se muestra en el cuadro 06, podemos observar diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos en estudio, notándose mayor elongación de tallo, en el tratamiento con 3 ppm de BAP, seguido de los tratamientos con 6 y 1 ppm de BAP, los cuales no mostraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre ellos, pero si mostraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al tratamiento con 0 ppm de BAP, el cual mostró el menor promedio de elongación de tallo. Luego de 68 días de incubación, para la variable elongamiento de tallo, se realizó el análisis de varianza (ver anexo), encontrándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos, al realizar la prueba de promedios de Duncan, que se muestra en el cuadro 06, podemos observar diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos en estudio, notándose mayor elongación de tallo, en el tratamiento con 3 ppm de BAP, seguido de los tratamientos con 6 y 1 ppm de BAP, los cuales no mostraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre ellos, pero si mostraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al tratamiento con 0 ppm de BAP, el cual mostró el menor promedio de elongación de tallo, como se muestra en la siguiente figura.

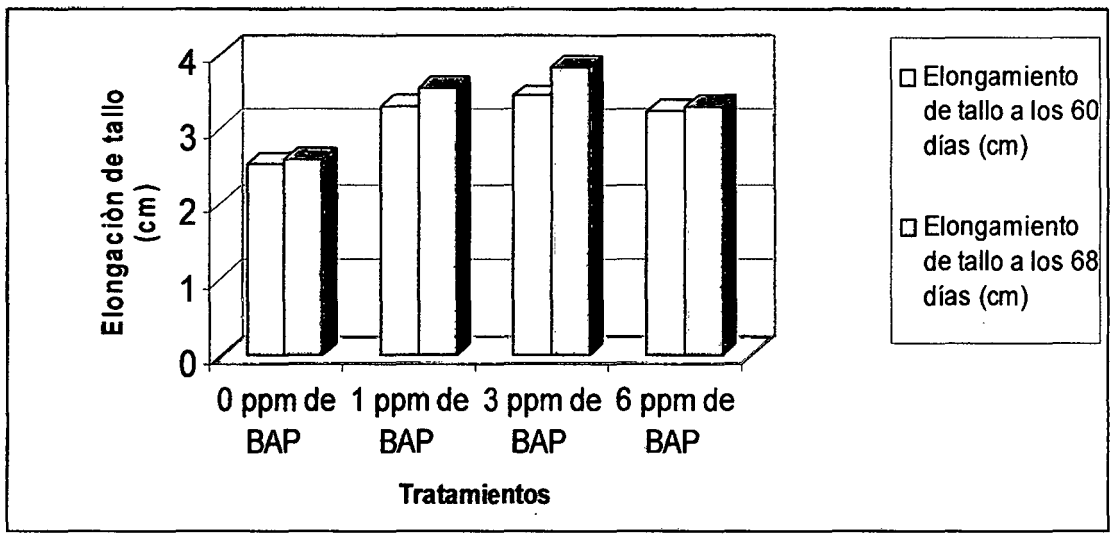


Figura 04. Elongamiento de tallos de dale dale a los 60 y 68 días de incubación, con Bencil aminopurina.

En el cuadro 07, se presentan los resultados del análisis de promedios de Duncan para el elongamiento de tallo de explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in Vitro, para las diferentes concentraciones de Kinetina (KIN).

Cuadro 07. Análisis de promedios de Duncan para las variables elongamiento de tallo de explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in Vitro, para las diferentes concentraciones de Kinetina (KIN). Pucallpa, Perú, 2012.

Tratamientos	Descripción	Elongamiento de tallo a los 60 días (cm)	Elongamiento de tallo a los 68 días (cm)
T1	0 ppm de KIN	2,48 c	2,63 c
T2	1 ppm de KIN	1,78 d	2,33 c
T3	3 ppm de KIN	5,51 a	6,50 a
T4	6 ppm de KIN	4,43 b	5,43 b

*Letras iguales no presentan diferencias significativas. Duncan $p \leq 0,05$

Después de 60 días de incubación, para la variable elongamiento de tallo, se realizó el análisis de varianza (ver anexo), encontrándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos, al realizar la prueba de promedios de Duncan, que se muestra en el cuadro 07, podemos observar diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos en estudio, notándose mayor elongación de tallo, en el tratamiento con 3 ppm de KIN, el cual mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al tratamiento con 6 ppm de KIN, el cual, a su vez, mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al tratamiento con 0 ppm de KIN, el mismo que, mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al tratamiento con 1 ppm de KIN, siendo este, el que mostró menor elongación de tallo. Luego de 68 días de incubación, para la variable elongamiento de tallo, se realizó el análisis de varianza (ver anexo), encontrándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos, al realizar la prueba de promedios de Duncan, que se muestra en el cuadro

07, podemos observar diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos en estudio, notándose mayor elongación de tallo, en el tratamiento con 3 ppm de KIN, el cual mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al tratamiento con 6 ppm de KIN, el cual, a su vez, mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al tratamiento con 1 y 0 ppm de KIN, los que no mostraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre ellos, siendo estos, los que mostraron menor elongación de tallo, como se muestra en la siguiente figura.

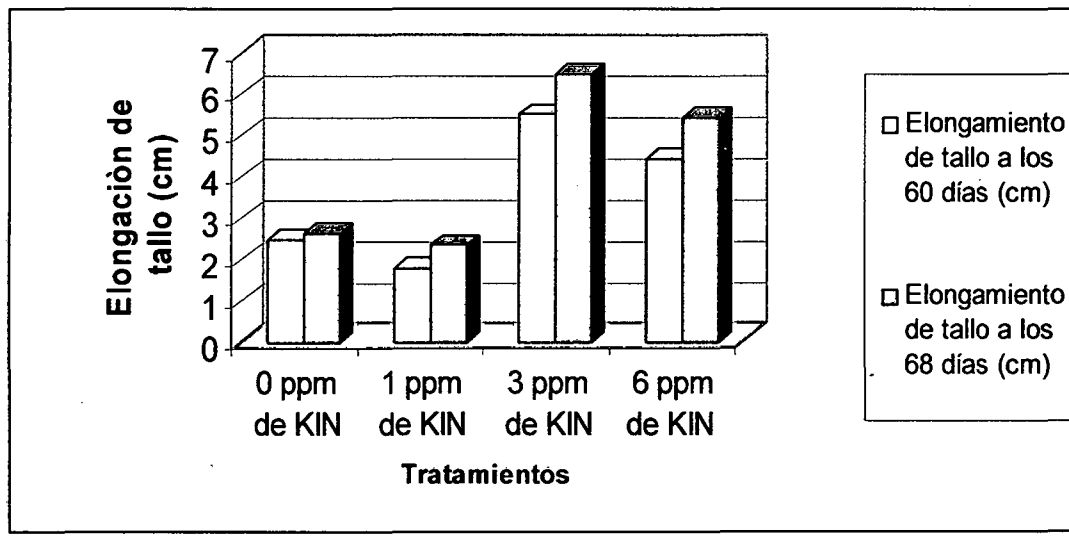


Figura 05. Elongamiento de tallos de dale dale a los 60 y 68 días de incubación, con Kinetina.

Al respecto, Pierik (1990), menciona que las citocininas se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y el desarrollo, generalmente estimulan la diisión celular, sobre todo si van en compañía de una auxina. Además, Pierik (1990), indica que en concentraciones elevadas (1-10 mg/l) pueden indicar la formación de vástagos adventicios, sin embargo, generalmente se inhibe la formación de raíces.

Pierik (1990), indica que las citocininas promueven la formación de vástagos axilares, porque disminuye la dominancia apical; también retarda el envejecimiento.

4.3. Número de hojas

En el cuadro 08, se presentan los resultados del análisis de promedios de Duncan para el número de hojas de explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in Vitro, para las diferentes concentraciones de Bencil aminopurina (BAP).

Cuadro 08. Análisis de promedios de Duncan para las variables número de hojas de explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in Vitro, para las diferentes concentraciones de Bencil aminopurina. Pucallpa, Perú, 2012.

Tratamientos	Descripción	Número de hojas a los 60 días	Número de hojas a los 68 días
T1	0 ppm de BAP	0,16 c	0 c
T2	1 ppm de BAP	1,16 b	1,16 b
T3	3 ppm de BAP	1,33 b	0 c
T4	6 ppm de BAP	2,00 a	1,83 a

*Letras iguales no presentan diferencias significativas. Duncan $p \leq 0,05$

Después de 60 días de incubación, para la variable número de hojas, se realizó el análisis de varianza (ver anexo), encontrándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos, al realizar la prueba de promedios de Duncan, que se muestra en el cuadro 08, podemos observar diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos en estudio, notándose mayor número de hojas, en el tratamiento con 6 ppm de BAP, seguido de los tratamientos con 1 y 3 ppm de BAP, los cuales no mostraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre ellos, pero si mostraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al tratamiento con 0 ppm de BAP, el cual mostró el menor promedio de número de hojas. Luego de 68 días de incubación, para la variable número de hojas, se realizó el análisis de varianza (ver anexo), encontrándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos, al realizar la prueba de promedios de Duncan, que se muestra en el cuadro 08, podemos observar diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos en estudio, notándose mayor

número de hojas, en el tratamiento con 6 ppm de BAP, el cual, muestra diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al tratamiento con 1 ppm de BAP, el mismo, que muestra diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto a los tratamientos con 3 y 0 ppm de BAP, los cuales no mostraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre ellos, los cuales mostraron los menor promedio de número de hojas, como se muestra en la siguiente figura.

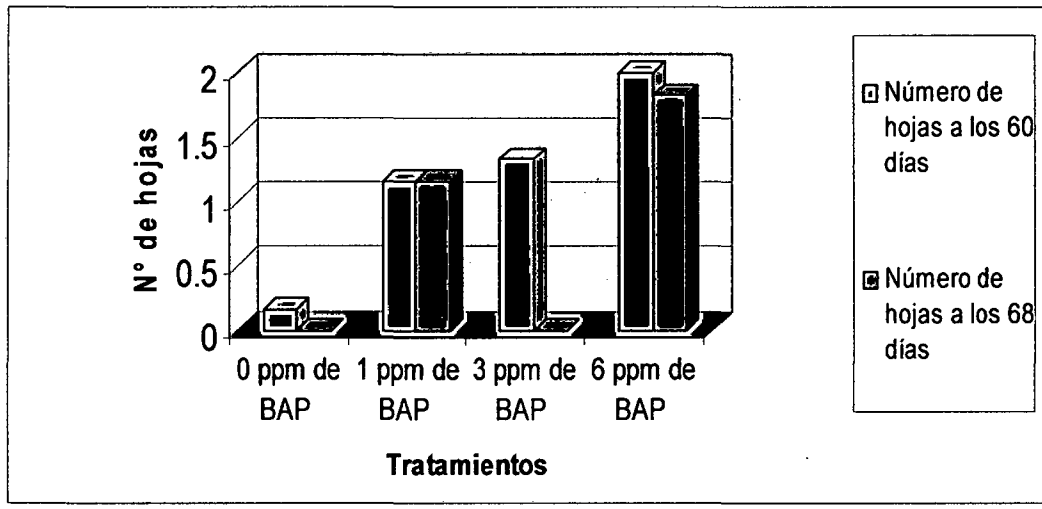


Figura 06. Número de hojas dale dale a los 60 y 68 días de incubación, con Bencil aminopurina.

En el cuadro 09, se presentan los resultados del análisis de promedios de Duncan para el número de hojas de explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in Vitro, para las diferentes concentraciones de Kinetina (KIN).

Cuadro 09. Análisis de promedios de Duncan para las variables número de hojas de explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in Vitro, para las diferentes concentraciones de Kinetina (KIN). Pucallpa, Perú, 2012.

Tratamientos	Descripción	Número de hojas a los 60 días	Número de hojas a los 68 días
T1	0 ppm de KIN	0 c	0 b
T2	1 ppm de KIN	0 c	0 b
T3	3 ppm de KIN	2.16 b	2.33 a
T4	6 ppm de KIN	2.66 a	2.66 a

*Letras iguales no presentan diferencias significativas. Duncan $p \leq 0,05$

Después de 60 días de incubación, para la variable número de hojas, se realizó el análisis de varianza (ver anexo), encontrándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos, al realizar la prueba de promedios de Duncan, que se muestra en el cuadro 09, podemos observar diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos en estudio, notándose mayor número de hojas, en el tratamiento con 6 ppm de KIN, el cual mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al tratamiento con 3 ppm de KIN, el cual, a su vez, mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto los tratamiento con 1 y 0 ppm de KIN, los mismos que, no mostró diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre ellos, notándose que no formaron hojas. Luego de 68 días de incubación, para la variable número de hojas, se realizó el análisis de varianza (ver anexo), encontrándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos, al realizar la prueba de promedios de Duncan, que se muestra en el cuadro 09, podemos observar diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos en estudio, notándose mayor número de hojas, en el tratamiento con 6 ppm de KIN, el cual mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al tratamiento con 3 ppm de KIN, el cual, a su vez, mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto los tratamiento con 1 y 0 ppm de KIN, los mismos que, no mostró diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre ellos, notándose que no formaron hojas, como se muestra en la siguiente figura.

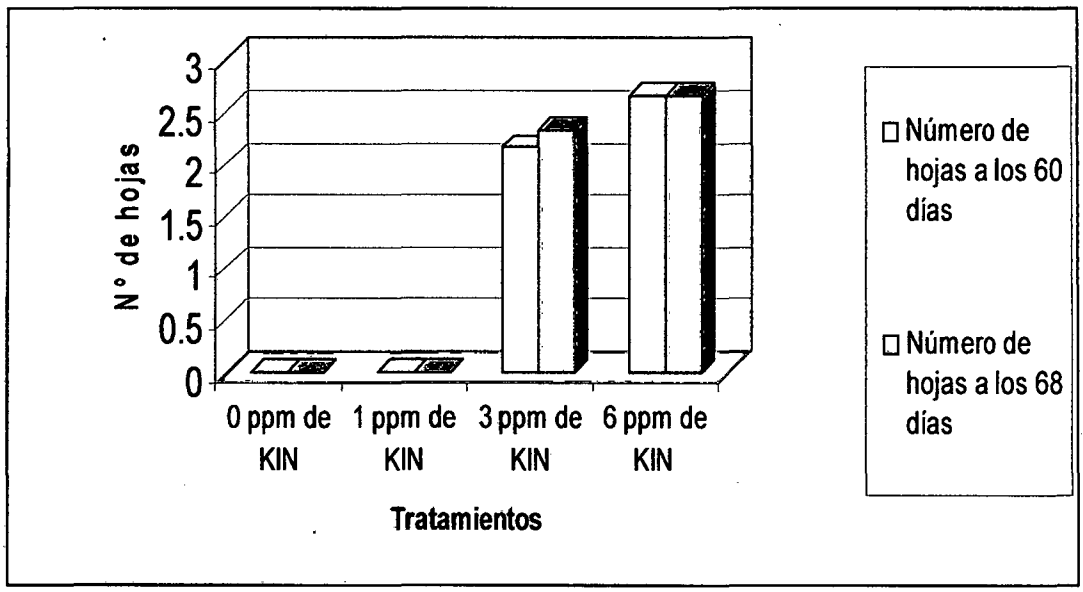


Figura 06. Número de hojas dale dale a los 60 y 68 días de incubación, con Kinetina.

Al respecto, Seiler (2002), indica que, las principales funciones de la Bencil aminopurina dentro de la planta son estimular la división celular y el crecimiento, rompe la latencia de las yemas axilares, promueve la organogénesis en los callos celulares, retrasa la senescencia o envejecimiento de los órganos vegetales, promueve la expansión celular en cotiledones y hojas y el desarrollo de los cloroplastos.

Azcon (1993) menciona que, la kinetina promueve la división celular y los procesos de citocinesis.

4.4. Número de yemas

En el cuadro 10, se presentan los resultados del análisis de promedios de Duncan para el número de yemas de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in Vitro, para las diferentes concentraciones de Bencil aminopurina (BAP).

Cuadro 10. Análisis de promedios de Duncan para las variables número de yemas de explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in Vitro, para las diferentes concentraciones de Bencil aminopurina. Pucallpa, Perú, 2012.

Tratamientos	Descripción	Número de yemas a los 60 días	Número de yemas a los 68 días
T1	0 ppm de BAP	0 b	0 c
T2	1 ppm de BAP	1.16 a	2.83 a
T3	3 ppm de BAP	0 b	1.16 b
T4	6 ppm de BAP	0 b	1.33 b

*Letras iguales no presentan diferencias significativas. Duncan $p \leq 0,05$

Después de 60 días de incubación, para la variable número de yemas, se realizó el análisis de varianza (ver anexo), encontrándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos, al realizar la prueba de promedios de Duncan, que se muestra en el cuadro 10, podemos observar diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos en estudio, notándose mayor número de yemas, en el tratamiento con 1 ppm de BAP, seguido de los tratamientos con 0, 3 y 6 ppm de BAP, los cuales no mostraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre ellos, ya que no formaron yemas. Luego de 68 días de incubación, para la variable número de yemas, se realizó el análisis de varianza (ver anexo), encontrándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos, al realizar la prueba de promedios de Duncan, que se muestra en el cuadro 10, podemos observar diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos en estudio, notándose mayor número de yemas, en el tratamiento con 1 ppm de BAP, el cual, muestra diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto a los tratamiento con 3 y 6 ppm de BAP, los mismos que no mostraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$)entre ellos, pero mostraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al tratamiento con 0 ppm de BAP, ya que este tratamiento no formo yemas, como se muestra en la siguiente figura.

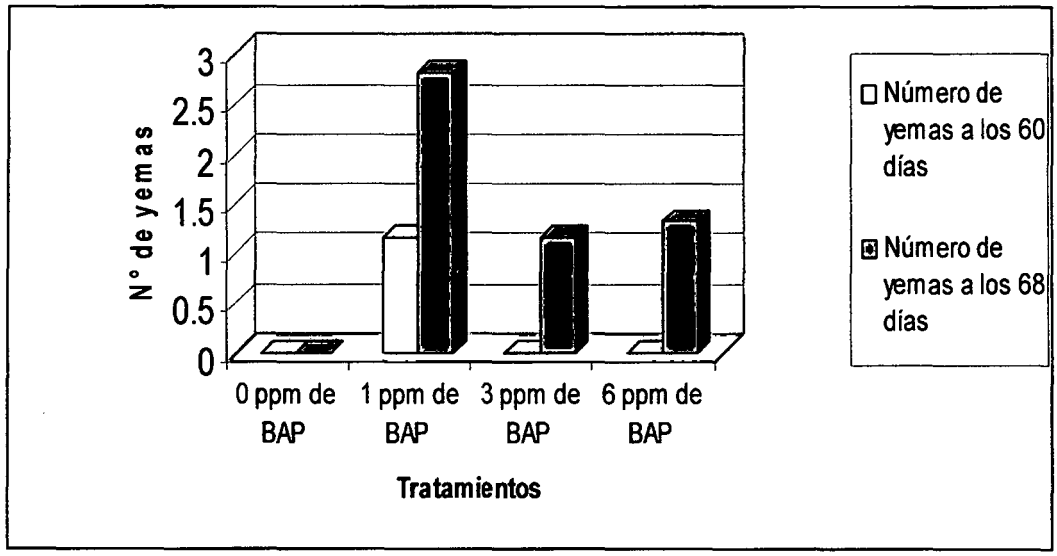


Figura 07. Número de yemas dale dale a los 60 y 68 días de incubación, con Bencil amiopurina.

En el cuadro 11, se presentan los resultados del análisis de promedios de Duncan para el número de yemas de explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in Vitro, para las diferentes concentraciones de Kinetina (KIN).

Cuadro 11. Análisis de promedios de Duncan para las variables número de yemas de explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in Vitro, para las diferentes concentraciones de Kinetina (KIN). Pucallpa, Perú, 2012.

Tratamientos	Descripción	Número de yemas a los 60 días	Número de yemas a los 68 días
T1	0 ppm de KIN	0 c	0 c
T2	1 ppm de KIN	0 c	0 c
T3	3 ppm de KIN	2.66 a	3.66 a
T4	6 ppm de KIN	1.16 b	3.00 b

*Letras iguales no presentan diferencias significativas. Duncan $p \leq 0,05$

Después de 60 días de incubación, para la variable número de yemas, se realizó el análisis de varianza (ver anexo), encontrándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos, al realizar la prueba de

promedios de Duncan, que se muestra en el cuadro 11, podemos observar diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos en estudio, notándose mayor número de yemas, en el tratamiento con 3 ppm de KIN, el cual mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al tratamiento con 6 ppm de KIN, el cual, a su vez, mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto los tratamiento con 1 y 0 ppm de KIN, los mismos que no formaron yemas. Luego de 68 días de incubación, para la variable número de hojas, se realizó el análisis de varianza (ver anexo), encontrándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos, al realizar la prueba de promedios de Duncan, que se muestra en el cuadro 11, podemos observar diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos en estudio, notándose mayor número de yemas, en el tratamiento con 3 ppm de KIN, el cual mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al tratamiento con 6 ppm de KIN, el cual, a su vez, mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto los tratamiento con 1 y 0 ppm de KIN, los mismos que no formaron yemas, como se muestra en la siguiente figura.

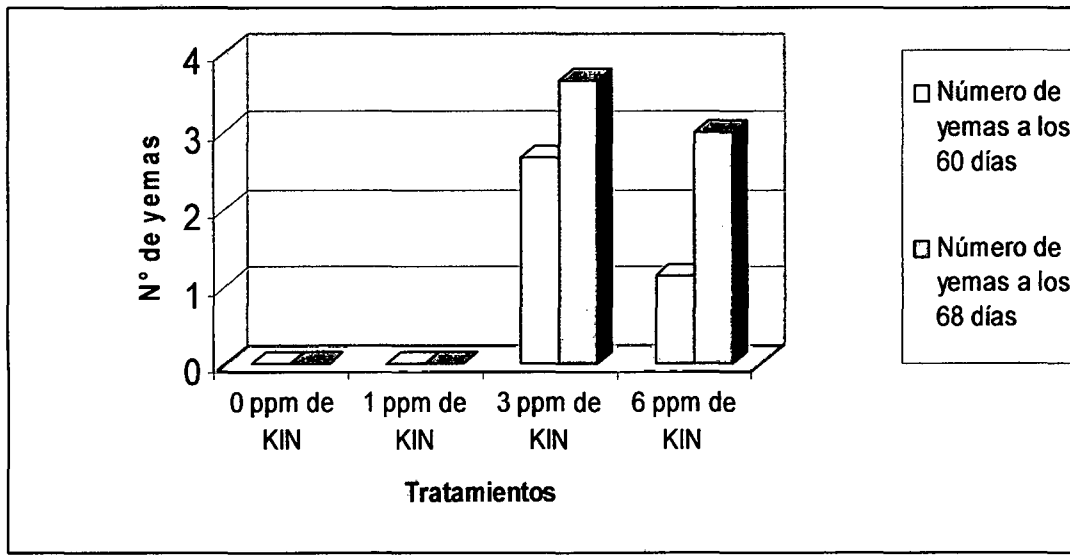


Figura 08. Número de yemas dale dale a los 60 y 68 días de incubación, con Kinetina.

4.5. Número de raíces y porcentaje de callos

En el cuadro 11, se presentan los resultados del análisis de promedios de Duncan para el número de raíces y porcentaje de callos en explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in Vitro, para las diferentes concentraciones de Bencil aminopurina (BAP).

Cuadro 11. Análisis de promedios de Duncan para las variables número de raíces y porcentaje de callos de explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in Vitro, para las diferentes concentraciones de Bencil aminopurina (BAP). Pucallpa, Perú, 2012.

Tratamientos	Descripción	Número de raíces a los 60 días	Número de raíces a los 68 días	% de callos a los 60 días	% de callos a los 68 días
T1	0 ppm de BAP	0	0	0	0
T2	1 ppm de BAP	0	0	0	0
T3	3 ppm de BAP	0	0	0	0
T4	6 ppm de BAP	0	0	0	0

El cuadro 11, nos muestra que, después de 60 y 68 días de incubación, no se observó formación de raíces ni tejido calloso en ninguna de las concentraciones de BAP en estudio.

En el cuadro 12, se presentan los resultados del análisis de promedios de Duncan para el número de raíces y porcentaje de callos en explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in Vitro, para las diferentes concentraciones de Kinetina (KIN).

Cuadro 12. Análisis de promedios de Duncan para las variables número de raíces y porcentaje de callos de explantes de dale dale a los 60 y 68 días de sembrado en condiciones de in Vitro, para las diferentes concentraciones de Kinetina (KIN). Pucallpa, Perú, 2012.

Tratamientos	Descripción	Número de raíces a los 60 días	Número de raíces a los 68 días	% de callos a los 60 días	% de callos a los 68 días
T1	0 ppm de KIN	0	0	0	0
T2	1 ppm de KIN	0	0	0	0
T3	3 ppm de KIN	0	0	0	0
T4	6 ppm de KIN	0	0	0	0

El cuadro 12, nos muestra que, después de 60 y 68 días de incubación, no se observó formación de raíces ni tejido calloso en ninguna de las concentraciones de BAP en estudio.

Al respecto, Pierik (1990), indica que en concentraciones elevadas (1-10 mg/l) pueden indicar la formación de vástagos adventicios, sin embargo, generalmente se inhibe la formación de raíces.

V. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la ejecución del trabajo de investigación, se concluye:

1. Que, la utilización de solución de tetraciclina y Estreptomicina en el medio de cultivo líquido y el uso de antioxidantes como el ácido ascórbico y el ácido cítrico incorporado al medio de cultivo aplicado a los explantes de dale dale en los primeros 7 días de introducción nos permitió obtener 66% de explantes libres de contaminantes.
2. Que, para la elongación de tallos, la concentración de 3 ppm de BAP y también, 3 ppm de KIN mostraron los mejores promedios, asi mismo, para el número de hojas, las concentraciones de 6 ppm de BAP y también, 6 ppm de KIN, mostraron los mejores promedios, para el número de yemas, 1 ppm de BAP, mostro los mejores promedios, asi mismo, para esta misma variable, 3 ppm de KIN, mostró los mejores promedios, siendo, además, las concentraciones de Kinetina, los que lograron los mejores valores absolutos para todas las variables.
3. Que, para el BAP y el KIN, en todas sus concentraciones estudiadas, no hubo formación de raíces y tejido calloso.

VI. RECOMENDACIONES

Luego de haber analizado los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, se recomienda lo siguiente:

1. Realizar estudios en la utilización de reguladores de crecimiento de tipo auxinas como el Ácido Indolacético, Ácido Napthalenacético, entre otros, en diferentes concentraciones.
2. Realizar estudios en la utilización de combinaciones de Kinetina, en sus mejores concentraciones, con auxinas, en explantes de dale dale para optimizar la metodología de micropropagación.
3. Evitar los problemas de fenolización de los tejidos en condiciones in Vitro, con la utilización de antioxidantes como el Ácido Ascórbico, Ácido Cítrico, en la etapa de introducción de los explantes de dale dale in Vitro.

VII. BIBLIOGRAFIA

AZOFEIFA, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in Vitro. Agronomía Mesoamericana 20(1): 153-175. 2009. ISSN: 1021-7444.

AZCON J.; TALON M. 1993. Fisiología y Bioquímica Vegetal. Madrid: McGraw Hill. 84-486-0033-9. En línea: http://es.wikipedia.org/wiki/Citoquinina

BARCELO J., G. N. RODRIGO.; B. SABATER GARCIA; R. SANCHEZ TAMÉS. 2001. Fisiología vegetal. Ediciones Pirámide. España.

BIONDI, S. & Thorpe, T. 1980. Clonal Propagation of Forest Tree Species. COSTER Symp. On Tissue Culture of Economically Importants Plants. Ed A.N. Rao. p 197-202. Singapore.

BUENO, C.R. 1981. Contribuição ao controle de Meloidogyne incognita (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 (Nematoda: Heteroderidae), raça fisiológica IV, com utilização de ariá (*Calathea allouia* (Aubl.) Lindl.). CNPq/INPA/Universidade do Amazonas. Manaus. Tesis de Licenciatura.

CALZADA, J. 1980. 143 frutales nativos. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. Perú. 320 p.

CLOSAS et al. 1999. Cultivo In Vitro. Universidad de Lleida-España. En línea: http://www.etsea2.udl.es/invitro/indice.htm

CRONQUIST, A. 1998. The Evolution and Classification of Flowering Plants. 2da Edition. The New York Botanical Garden. New York – USA.

DIETER H. 1980. Fisiología Vegetal. Ediciones Omega. Barcelona España. Pág. 240.

DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. 1990. Isolation of DNA from small amounts of plant tisúes. BRL Focus 12: 13 – 15.

ERSTON V. 1967. Fisiología Vegetal. Editorial Hispano Americano. Mexico. Pág. 240.

GAMBORG OL, MILLER RA AND OJIMA K. 1976. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res. 50:151-8.

HARTMAN, Hudson. 1995. Propagación de plantas. Compañía Editorial Continental S.A. Cuarta Reimpresión. México 8.5.

HURTADO, Daniel. 1994. Cultivo De Tejidos Vegetales. Editorial Trillas S.A. Tercera Reimpresión. México.

LEE, S. y RAO, A. 1998. Plantlet production of (*Calathea allouia* (Aubl.) Lindl.) L. King. Through tissue culture. Gard. Bull.(Singapore) 41:11-18

LEÓN, J. 1968. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, San José.

MEJIA R. 1992. Alternativas de equipamiento de laboratorio in Vitro y técnicas de micro propagación de plantas. Serie didáctica. Manual técnico 0.2/3.1-N°7-92. Lima-Perú.

MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant. Physiol.. 25:135-166.

MURASHIGE, T. AND F. SKOOG. 1974. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue culture. Phisiol. Plant. 15 p. 173 -197.

PASQUALETTO, P. L.; R.H. Zimmerman and I. Fordham. 1988. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars in vitro. Plat Cell, Tissue and Organ Culture. 14.p. 31-40.

PIERIK, R.L.M. 1991. Cultivo In Vitro De Las Plantas Superiores. Editorial Mundi – Prensa. Madrid – España.

ROCA, William. 1991. Cultivo De Tejidos En La Agricultura; Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional De Agricultura (CIAT).Cali – Colombia.

ROSELL, Cadmo y **VILLALOBOS**, V. 1991: Fundamento Teórico – Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales. FAO. Roma.

RAMÍREZ M; URDANETA A; LEÓN DE SIERRALTA S. 2002. Establecimiento in vitro de explantes adultos del guanábano (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2002; 19: 48-55.

REBOLLEDO R. 2007. Efecto del acido indolacetico sobre el desarrollo in vitro de los tejidos del fruto de naranjo dulce. http://business.highbeam.com/165603/article-1G1-178617461/efecto-del-acido-indolacetico-sobre-el-desarrollo-vitro

ROCA, W Y L. MROGINSKI. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. 499 - 553 –554 p.

SALISBURY F.B.; C.W. ROSS. 2000. Fisiología de las plantas. Paranifo Thomson Learning. Madrid.

SEILER, J. 2002. Forest Biology and Dendrology. Growth Regulators. (On line) Department of Forestry. Virginia Polytechnic Institute and State University. http://www.fw.vt.edu

SITTE, P. 2004. Strasburger. Tratado de Botánica. 35a Edición. Ediciones Omega S.A. Barcelona-España

THORPE, T.; Harry, I. S. & Kumar P. P. 1991. Aplication of micropropagation to forestry. , In: Micropropagation: Tecnology and Application. Debergh, P. C. & Zimmerman R. H. (eds). Kluiwer Academic Publisher. Netherlands. P 311 – 392.

VILLACHICA H. 1996. Cultivo de Frutales Nativos Promisorios. Tratado de Cooperación Amazónica. Lima – Perú.

WINTON, 1977/cit. por Rosell, Cadmo y Villalobos, V. 1991. Fundamento Teórico – Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales. FAO. Roma.

VIII. ANEXOS

Cuadro 13. ANVA para el elongamiento de tallo a los 60 días de incubación, con tratamiento de Bencil aminopurina.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F	Signif.
Tratamiento	3	2,94791667	0,98263889	84,83	0,0001	*
Error	20	0,23166667	0,01158333			
Total	23	3,17958333				

C.V. = 3,42

Cuadro 14. ANVA para el elongamiento de tallo a los 68 días de incubación, con tratamiento de Bencil aminopurina.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F	Signif.
Tratamiento	3	4,86833333	1,62277778	29,59	0,0001	*
Error	20	1,09666667	0,05483333			
Total	23	5,96500000				

C.V. = 7,04

Cuadro 15. ANVA para el elongamiento de tallo a los 60 días de incubación, con tratamiento de Kinetina.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F	Signif.
Tratamiento	3	53,44125000	17,81375000	941,70	0,0001	*
Error	20	0,37833333	0,01891667			
Total	23	53,81958333				

C.V. = 3,86

Cuadro 16. ANVA para el elongamiento de tallo a los 68 días de incubación, con tratamiento de Kinetina.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F	Signif.
Tratamiento	3	76,48500000	25,49500000	307,17	0,0001	*
Error	20	1,66000000	0,08300000			
Total	23	78,14500000				

C.V. = 6,81

Cuadro 17. ANVA para el número de hojas a los 60 días de incubación, con tratamiento de Bencil aminopurina.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F	Signif.
Tratamiento	3	10,333333333	3,444444444	13,78	0,0001	*
Error	20	5,0000000000	0,250000000			
Total	23	15,3333333333				

C.V. = 42,85

Cuadro 18. ANVA para el número de hojas a los 68 días de incubación, con tratamiento de Bencil aminopurina.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F	Signif.
Tratamiento	3	14,83333333	4,94444444	59,33	0,0001	*
Error	20	1,666666667	0,08333333			
Total	23	16,500000000				

C.V. = 38,49

Cuadro 19. ANVA para el número de hojas a los 60 días de incubación, con tratamiento de Kinetina.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F	Signif.
Tratamiento	3	35,79166667	11,93055556	110,13	0,0001	*
Error	20	2,166666667	0,10833333			
Total	23	37,95833333				

C.V. = 27,23

Cuadro 20. ANVA para el número de hojas a los 68 días de incubación, con tratamiento de Kinetina.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F	Signif.
Tratamiento	3	37,83333333	12,61111111	94,58	0,0001	*
Error	20	2,66666667	0,133333333			
Total	23	40,50000000				

C.V. = 29,21

Cuadro 21. ANVA para el número de yemas a los 60 días de incubación, con tratamiento de Bencil aminopurina.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F	Signif.
Tratamiento	3	5,45833333	1,81944444	16,79	0,0001	*
Error	20	2,16666667	0,10833333			
Total	23	7,62500000				

C.V. = 87,77

Cuadro 22. ANVA para el número de yemas a los 68 días de incubación, con tratamiento de Bencil aminopurina.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F	Signif.
Tratamiento	3	24,33333333	8,11111111	54,07	0,0001	*
Error	20	24,33333333	0,15000000			
Total	23	27,33333333				

C.V. = 29,04

Cuadro 23. ANVA para el número de yemas a los 60 días de incubación, con tratamiento de Kinetina.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F	Signif.
Tratamiento	3	28,79166667	9,59722222	88,59	0,0001	*
Error	20	2,16666667	0,10833333			
Total	23	30,9583333				

C.V. = 34,34

Cuadro 24. ANVA para el número de yemas a los 68 días de incubación, con tratamiento de Kinetina.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F	Signif.
Tratamiento	3	68,00000000	22,66666667	136,00	0,0001	*
Error	20	3,33333333	0,16666667			
Total	23	71,33333333				

C.V. = 24,49

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES MADRES

La solución salina madre de Murashige & Skoog, se prepara de la siguiente manera:

Cuadro 25. Composición química de la solución de Murashige & Skoog (1962)

Solución A	
KNO_3	19,00 g/L
NH_4NO_3	16,50 g/L
$CaCl_2$. $2H_2O$	3,30 g/L
$MgSO_4$. 7 H_2O	3,70 g/L
KH_2PO_4	1,70 g/L
Solución B	
H_3BO_3	620 mg/L
$MnSO_4$. $4H_2O$	2,23 g/L
$ZnSO_4$.4 H_2O	860 mg/L
Solución C	
KI	83 mg/L
Na_2MoO_4. 4 H_2O	25 mg/L
Solución D	
$CuSO_4$. $5H_2O$	2,5 mg/L
$CoCl_2$. $6H_2O$	2,5 mg/L
Solución E	
Na_2EDTA	3,72 g/L
$FeSO_4.7H_2O$	2,78 g/L
Solución V	
Ácido Nicotínico	50 mg/L
Piridoxina (B_6)	50 mg/L
Tiamina (B_1)	10 mg/L
Glicina	200 mg/L

Solución de Antibiótico

Oxitetraciclina.....	500 mg
H_2O c.s.p.....	200 ml

Solución de Fungicidas

Formate.....	600 mg
H_2O c.s.p.....	200 ml

Medio de cultivo líquido + antibiótico

Oxitetraciclina.....	500 mg
Estreptomicina.....	500 mg
Medio de cultivo líquido sin reguladores de crecimiento.....	200 ml

Cuadro 26. Preparación de medio de cultivo para el proceso de introducción de plántulas de dale dale.

Compuestos	Tratamiento 01	Tratamiento 02	Tratamiento 03
Solución A	100 ml	100 ml	100 ml
Solución B	10 ml	10 ml	10 ml
Solución C	10 ml	10 ml	10 ml
Solución D	10 ml	10 ml	10 ml
Solución E	10 ml	10 ml	10 ml
Solución V	10 ml	10 ml	10 ml
Sacarosa	30 g	30 g	30 g
Phyto Agar	8 g	8 g	8 g
Ácido Cítrico	---	---	1,5 g
Ácido Ascórbico	---	---	1,5 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml	1000 ml	1000 ml

Cuadro 27. Preparación de medio de cultivo para el ensayo de concentración con Bencil aminopurina en explantes de dale dale.

Compuestos	Tratamiento 01	Tratamiento 02	Tratamiento 03	Tratamiento 04
Solución A	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Solución B	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Solución C	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Solución D	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Solución E	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Solución V	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Sacarosa	30 g	30 g	30 g	30 g
Phyto Agar	8 g	8 g	8 g	8 g
BAP a 1000 ppm	---	1 ml	3 ml	6 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml

Cuadro 28. Preparación de medio de cultivo para el ensayo de concentración con Kientina en explantes de dale dale.

Compuestos	Tratamiento 01	Tratamiento 02	Tratamiento 03	Tratamiento 04
Solución A	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Solución B	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Solución C	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Solución D	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Solución E	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Solución V	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Sacarosa	30 g	30 g	30 g	30 g
Phyto Agar	8 g	8 g	8 g	8 g
KIN a 1000 ppm	---	1 ml	3 ml	6 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml

IX. ICONOGRAFÍA



Foto 01. Lavado de plántulas de dale dale.



Foto 02. Preparación del explante de dale dale.



Foto 03. Adición de antibióticos y fungicidas al medio de cultivo y desinfección de explantes.



Foto 04. Explantes de dale dale sembrados in vitro.



Foto 05. Explantes de dale dale en crecimiento in vitro.