

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA FORESTAL



T E S I S

**EFECTO DE TRES DOSIS Y CUATRO REGULADORES DE CRECIMIENTO EN LA
MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Cedrela angustifolia* DC. (Meliaceae) –
CAJAMARCA**

Para obtener el Título Profesional de:

INGENIERO FORESTAL

Presentado por el Bachiller:

HENRY YOEL NÚÑEZ IDROGO

Asesor:

Ing. Mg. Sc. LUIS DÁVILA ESTELA

CAJAMARCA-PERÚ

2025

CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

1. Investigador:
Henry Yoel Núñez Idrogo
DNI: N° 73472500
Escuela Profesional/Unidad UNC:
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA FORESTAL
2. Asesor:
Ing. Mg. Sc. Luis Dávila Estela
Facultad/Unidad UNC:
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
3. Grado académico o título profesional
 Bachiller Título profesional Segunda especialidad
 Maestro Doctor
4. Tipo de Investigación:
 Tesis Trabajo de investigación Trabajo de suficiencia profesional
 Trabajo académico
5. Título de Trabajo de Investigación:
EFFECTO DE TRES DOSIS Y CUATRO REGULADORES DE CRECIMIENTO EN LA MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Cedrela angustifolia* DC. (Meliaceae) – CAJAMARCA
6. Fecha de evaluación: 15/06/2025
7. Software antiplagio: TURNITIN URKUND (ORIGINAL) (*)
8. Porcentaje de Informe de Similitud: 14%
9. Código Documento: oid: 3117:467019465
10. Resultado de la Evaluación de Similitud:
 APROBADO PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O DESAPROBADO

Fecha Emisión: 16/06/2025

<i>Firma y/o Sello Emisor Constancia</i>


Ing. Mg. Sc. Luis Dávila Estela DNI: 26684487

* En caso se realizó la evaluación hasta setiembre de 2023



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
"NORTE DE LA UNIVERSIDAD PERUANA"
Fundada por Ley N° 14015, del 13 de febrero de 1962
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
Secretaría Académica



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Cajamarca, a los diecinueve días del mes de mayo del año dos mil veinticinco, se reunieron en el ambiente 2C - 202 de la Facultad de Ciencias Agrarias, los miembros del Jurado, designados según **Resolución de Consejo de Facultad N° 700-2024-FCA-UNC, de fecha 17 de diciembre del 2024**, con la finalidad de evaluar la sustentación de la **TESIS** titulada: **"EFECTO DE TRES DOSIS Y CUATRO REGULADORES DE CRECIMIENTO EN LA MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Cedrela angustifolia* DC. (Meliaceae) - CAJAMARCA"**, realizada por el Bachiller **HENRRY YOEL NÚÑEZ IDROGO** para optar el Título Profesional de **INGENIERO FORESTAL**.

A las diecisiete horas y quince minutos, de acuerdo a lo establecido en el **Reglamento Interno para la Obtención de Título Profesional de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca**, el Presidente del Jurado dio por iniciado el Acto de Sustentación, luego de concluida la exposición, los miembros del Jurado procedieron a la formulación de preguntas y posterior deliberación. Acto seguido, el Presidente del Jurado anunció la aprobación por unanimidad, con el calificativo de quince (15); por tanto, el Bachiller queda expedito para proceder con los trámites que conlleven a la obtención del Título Profesional de **INGENIERO FORESTAL**.

A las dieciocho horas y cuarenta minutos del mismo día, el Presidente del Jurado dio por concluido el Acto de Sustentación.



Ing. M. Sc. **Walter Ricardo Roncal Briones**
PRESIDENTE



Ing. **Nehemías Honorio Sangay Martos**
SECRETARIO



Ing. **Oscar Rogelio Sáenz Narro**
VOCAL



Ing. Mg. Sc. **Luis Dávila Estela**
ASESOR

DEDICATORIA

Dedico esta tesis con mucho cariño a mi padre Norvil Núñez Ruiz, cuya paciencia y valiosas recomendaciones me han guiado en mi crecimiento académico. A mi madre Olga Idrogo Tirado, y a mi hermana Lucy Núñez Idrogo, quienes siempre han estado presentes en mi vida, apoyándome desde el inicio de mi carrera profesional en los buenos y malos momentos.

AGRADECIMIENTO

Mi sincero y especial agradecimiento al Ing. M. Sc. Luis Dávila Estela y al Ing. M. Sc. Alex Wilfredo Huatay Saldaña asesores de la presente tesis, por sus enseñanzas y la orientación para lograr concretizar este trabajo de investigación.

Al Ing. Manuel Malpica Rojas y a la Ing. Teresita Moreno Huamán quienes de manera servicial me brindaron su apoyo durante las actividades experimentales en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

ÍNDICE

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
RESUMEN	x
ABSTRACT.....	xi
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Antecedentes.....	4
2.2. Bases teóricas	6
2.2.1. Reguladores de crecimiento de las plantas.....	6
2.2.2. Cultivo de tejidos	8
2.2.3. La micropropagación	12
2.2.4. Descripción de la Cedrela angustifolia.....	21
2.3. Definición de términos	24
CAPÍTULO III.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1. Ubicación geográfica del laboratorio	26
3.2. Materiales	26
3.2.1 Materiales experimentales.....	26

3.2.2	Materiales y equipos de laboratorio	27
3.3.	Metodología.....	27
3.3.1.	VARIABLES DE ESTUDIO	27
3.3.2.	Diseño experimental.....	27
3.3.3.	Procedimiento	28
CAPÍTULO IV.....		35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		35
4.1.	Efecto de los reguladores de crecimiento en la fase de multiplicación	35
4.1.1.	Fase previa: Desinfección y establecimiento de explantes <i>in vitro</i> de <i>C. angustifolia</i>	35
4.1.2.	Multiplicación de explantes <i>in vitro</i> de <i>C. angustifolia</i>	36
4.2.	Efecto de los reguladores de crecimiento en la fase de enraizamiento.....	43
CAPÍTULO V.....		44
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		44
CAPÍTULO VI.....		45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		45
ANEXOS		54

ÍNDICES DE FIGURAS

Figura 1. Etapas y fase de la investigación en <i>C. angustifolia</i>	28
Figura 2. Plantones de <i>C. angustifolia</i> usadas como donantes de explantes.....	29
Figura 3. Establecimiento de explantes in vitro de <i>C. angustifolia</i>	31
Figura 4. Distribución de medias de los indicadores evaluados	38
Figura 5. Desarrollo de explantes en la fase de multiplicación.....	39
Figura 6. Distribución de medias de la supervivencia de explantes	41

ÍNDICES DE TABLAS

Tabla 1. Variables independientes y dependientes.....	27
Tabla 2. Dosis de citoquininas de BAP y 2iP, para la fase de multiplicación	32
Tabla 3. Tratamientos para determinar la mejor respuesta de citoquininas en la multiplicación	32
Tabla 4. Dosis de auxinas ANA y AIA, para la fase de enraizamiento	33
Tabla 5. Tratamientos para determinar la mejor respuesta de auxina en el enraizamiento.....	33
Tabla 6. Supervivencia de los explantes durante el establecimiento in vitro.....	35
Tabla 7. Descriptivos de los indicadores evaluados.....	38
Tabla 8. Análisis de varianza de la supervivencia de explantes.....	41
Tabla 9. Descriptivos de la supervivencia de explantes y la prueba de comparación múltiple de Tukey	41

RESUMEN

En esta investigación se realizó la micropropagación *in vitro* de *Cedrela angustifolia* a partir de explantes obtenidos de plantones cultivados en invernadero. El objetivo fue determinar el efecto de tres dosis de los reguladores de crecimiento bencilaminopurina (BAP) y 2-isopenteniladenina (2iP) sobre la multiplicación, y tres dosis de ácido indolacético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA) en el enraizamiento de explantes de *C. angustifolia*. La experimentación se llevó a cabo utilizando un diseño completamente al azar para los tratamientos, y los resultados cuantitativos se analizaron mediante un análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. En la fase de multiplicación se evaluaron siete tratamientos logrando obtener el mejor resultado en el T3 (1 mg/l BAP) con una longitud de brote de 1,20 cm, número promedio de brotes de 1,33, número de nudos 2.66 y un promedio de 3 hojas por explante. La fase de enraizamiento no se logró concretar debido al reducido número de explantes obtenidos en la multiplicación; además, la presencia de explantes con problemas de hiperhidratación, necrosis en la base del tallo, amarillamiento, caída de hojas y el crecimiento reducido de los explantes, fueron condiciones que limitaban llevar a cabo la fase de enraizamiento.

Palabras clave: *Cedrela angustifolia*, reguladores de crecimiento, auxinas, citoquininas, explantes, micropropagación.

ABSTRACT

In this study, *in vitro* micropropagation of *Cedrela angustifolia* was carried out using explants obtained from seedlings grown in a greenhouse. The objective was to determine the effect of three doses of the growth regulators benzylaminopurine (BAP) and 2-isopentenyladenine (2iP) on multiplication, and three doses of indoleacetic acid (IAA) and naphthaleneacetic acid (NAA) on the rooting of *C. angustifolia* explants. The experiment was carried out using a completely randomized design for the treatments, and the quantitative results were analyzed using analysis of variance and Tukey's multiple comparison test. Seven treatments were evaluated in the multiplication phase with the best result obtained in T3 (1 mg/l BAP) with a shoot length of 1,20 cm, an average number of shoots of 1,33, a number of nodes of 2.66, and an average of 3 leaves per explant. The rooting phase was not completed due to the small number of explants obtained in the multiplication phase. In addition, the presence of explants with problems of hyperhydration, necrosis at the base of the stem, yellowing, leaf fall, and reduced growth of the explants were conditions that limited the rooting phase.

Keywords: *Cedrela angustifolia*, growth regulators, auxins, cytokinins, explants, micropropagation.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La *C. angustifolia* es un árbol maderable conocido como “cedro andino”, se encuentra distribuida en la sierra y en ceja de selva, en bosques premontanos y montanos, subhúmedos y húmedos, entre 500 y 3 500 m s.n.m con poblaciones de pocos individuos (Toledo et al., 2008; Reynel y Marcelo, 2009). Esta especie se reporta en los departamentos Amazonas, Ancash, Apurímac, Cajamarca, Cusco, Junín, Pasco y Piura. En el departamento de Cajamarca se reportan en la provincia de San Ignacio y Contumazá (Trópicos, 2024).

La disminución de sus poblaciones se debe a su alto valor económico de la calidad de su madera, la cual ha incrementado su extracción de manera ilegal o autorizada a través de títulos habilitantes (SERFOR, 2020). La deforestación por actividades de ampliación de fronteras agrícolas también ha conllevado a una disminución significativa en su abundancia, ocasionando que *C. angustifolia* se encuentre en situación de peligro (Decreto Supremo N° 043- 2006-AG) y otras especies en situación de vulnerables como *C. fissilis*, *C. montana* y *C. odorata* (SERFOR, 2020).

La propagación de esta especie se realiza por semillas y posee un porcentaje de germinación entre el 50 % y 90 %, en condiciones de almacenamiento las semillas presentan pérdida de viabilidad. Con respecto a su propagación asexual por estacas o esquejes no se reporta información; sin embargo, la propagación asexual *in vitro* en *C. odorata* ha demostrado ser exitosa (Santos Junior et al., 2021).

Ante la situación de disminución de sus poblaciones y con el fin de contribuir a su supervivencia y sostenibilidad de la especie se propone a la micropropagación *in vitro* como una alternativa para propagar *C. angustifolia*, mediante esta técnica se puede lograr la producción masiva de plantas con alta calidad genética y con características uniformes para realizar plantaciones con fines comerciales y así reducir la sobre explotación del cedro en los bosques naturales. Además, ayuda a superar los problemas o dificultades de la propagación sexual y asexual con métodos tradicionales, hacer frente a la pérdida de viabilidad y reducir la variabilidad genética en plantaciones donde se desea uniformidad (Briones, 2015).

Las ventajas de propagación *in vitro* son atribuibles al principio de totipotencia, el cual se basa en la capacidad de las células vegetales para regenerar todo un organismo a partir de una sola célula o una pequeña porción de tejido vegetal llamado explante (Ferl y Paul, 2000). Al agregar reguladores de crecimiento como auxinas y citoquininas al medio de cultivo, estos actúan regulando la división, el crecimiento y desarrollo de los explantes (Suárez, 2020).

Esta investigación se realizó considerando la problemática de la disminución de sus poblaciones por la tala ilegal en Cajamarca, su valor económico e importancia ecológica para el Perú (Lombardi, 2014), así como, por la falta de investigaciones en las técnicas de propagación *in vitro*; además se tiene como propósito contribuir al conocimiento científico con la finalidad de que este estudio sirva como referencia para posteriores investigaciones.

En relación a la problemática y las innovaciones de la propagación del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, se planteó el siguiente problema de investigación: ¿Cuál es el efecto de tres dosis y cuatro reguladores de crecimiento en la micropropagación *in vitro* de *C. angustifolia* en Cajamarca? Ante los vacíos en investigación y como alternativa para la preservación de la

especie se planteó como objetivo: Determinar el efecto de tres dosis y cuatro reguladores de crecimiento en la micropropagación *in vitro* de *C. angustifolia* (Meliaceae) en Cajamarca.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes

Jiménez et al. (2017) evaluaron tres protocolos de desinfección de explantes de *Cedrela odorata*. El protocolo T2, utilizó Etanol al 50 % (C₂H₆O) e Hipoclorito de Sodio (NaClO) al 25% con un tiempo de inmersión de 60 segundos para cada uno, logrando un 95,64 % éxito en el establecimiento de explantes. Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los otros dos protocolos evaluados.

Vergara (2018) investigó la micropropagación de *Cedrela lilloi* C. DC. (cedro de altura) utilizando yemas apicales provenientes de embriones. Para la fase de desinfección de semillas se utilizó alcohol al 70 % por un minuto, también se remojo las semillas en una solución de 100 ml de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0,9 %, agregándole dos gotas de Tween20 (para romper la tensión superficial) durante un tiempo de 20 min. La siembra de embriones cigóticos *in vitro* se realizó en tubos de ensayo que contenían 10 ml de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962). Para la fase multiplicación se empleó diferentes medios de cultivo MS y WPM (Lloyd & McCown, 1981), a ambos medios de cultivo se adiciono citoquininas (BAP Y ZEA) en diferentes concentraciones. Para la fase de enraizamiento se utilizó el medio de cultivo MS, adicionando auxinas en diferentes concentraciones como ANA, AIB y AIA. Los resultados obtenidos indicaron un porcentaje de germinación del 72,5 % en la fase de establecimiento a las cuatro semanas, utilizando el medio MS. En la fase de multiplicación, se observó que el tratamiento de MS con 0,5 mg/l de Zeatina condujo a una tasa de multiplicación de 3,13 en la quinta semana. En cuanto a la fase de enraizamiento, no se encontraron diferencias significativas entre el medio de

cultivo sin tratamiento y el tratamiento con 0,5 mg/l de ácido indolacético (AIA). Para la fase de aclimatación, no hubo diferencias significativas al 95 % de confianza de los sustratos empleados Jiffy F50 y Premix #8.

Dos Santos et al. (2021) llevaron a cabo una investigación sobre el rescate de árboles adultos de *Cedrela odorata* L., a través de organogénesis directa. El experimento se diseñó mediante un enfoque factorial, acompañado de un ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se emplearon segmentos nodales provenientes de brotes de esquejes tomados del dosel, los cuales fueron desinfectados con etanol al 70 % y NaClO al 2 % más Tween 20; posteriormente fueron sembrados en un medio MS con y sin PPM® (Plant Preservative Mixture). En la multiplicación se incorporó al medio MS diferentes concentraciones de AG₃ (0,28 y 1,12 μM) y BAP (2,2; 3,3; 4,4; 6,6 y 8,8 μM), obteniéndose 4,16 brotes por explante en el medio MS con 8,8 μM de BAP y 0,28 μM de GA₃ en 30 días de cultivo. En el enraizamiento se aplicaron 3 auxinas (4,9 μM AIB, 5,7 μM AIA y 5,37 μM ANA), logrando un 60 % de enraizamiento en el medio MS suplementado 4,9 μM de AIB. Las plántulas enraizadas se aclimataron exitosamente y mostraron un desarrollo normal con una alta tasa de supervivencia.

Afolabi et al. (2022) desarrollaron un estudio para mejorar la producción de plantas de *C. odorata* utilizando BAP y ANA en el cultivo *in vitro*. El experimento lo realizaron mediante un tratamiento factoriales con un diseño completamente aleatorio donde los datos cuantitativos obtenidos se sometieron a un ANOVA y a una prueba de rangos múltiples de Duncan. En la fase de establecimiento se emplearon cuatro medios de cultivo a concentración del 100 % y 50 %, siendo el medio MS y el Woody Plant Medium (WPM) al 100 % los que mejor favorecieron el desarrollo de los explantes; en la multiplicación se empleó MS y WPM con cuatro concentraciones de BAP (0,0; 1,0; 2,0 y 3,0 mg/l), logrando obtener el mejor resultado de 2

brotos axilares y 3,14 cm de longitud en el medio MS con 1 mg/l de BAP; en la inducción de raíces, el medio MS al 100 % suplementado con 1,0 mg/l de BAP con o sin 0,5 mg/l de ANA se obtuvieron resultados de 3,92 raíces y una longitud de 2,93 cm después de 8 semanas esto indica que la alta concentración de sales favoreció la inducción de raíces de la especie por encima de los medios concentrados al 25 y 50 %.

Santa Cruz (2022) investigó el efecto de los medios de cultivo (MS y WPM) y las fitohormonas (Kinetina y ANA) en la micropropagación de segmentos de tallo de *C. odorata*. Los resultados obtenidos durante la desinfección indicaron que la desinfección con alcohol al 70 % e hipoclorito de sodio 1 % durante 15 min, redujo la contaminación al 40 %; En la multiplicación y el enraizamiento de los explantes se observó que niveles hormonales superiores a 0,35 mg/l de kinetina y 0 mg/l de ANA tuvieron un efecto negativo en el número de brotes y raíces. En conclusión, el tratamiento con medio de cultivo (MS) y sin fitohormonas fue el medio más efectivo para promover el crecimiento vegetativo en este experimento.

2.2.Bases teóricas

2.2.1. Reguladores de crecimiento de las plantas

En el cultivo *in vitro* es crucial el uso de los reguladores de crecimiento. El tipo y la concentración dependerá de la especie y el tipo de explante, ambos determinan si se debe añadir una auxina o una citoquinina al medio de cultivo para conseguir la repuesta organogénica. Las plantas que generan más auxina y/o citoquinina no requieren de la aplicación exógena; a partir de aquí se puede hacer la siguiente clasificación: cultivos que no necesitan auxinas ni citoquininas, cultivos que necesitan solo auxinas o cultivos que necesitan solo citoquininas (Gisbert y Picó, 2015). En este contexto se describen los siguientes:

a) Auxinas

Las auxinas tienen la capacidad de inducir la división y elongación celular, la elongación de tallos y promover la formación y el crecimiento de raíces laterales y adventicias, intervienen en el tropismo (gravedad y luz), dominancia apical, crecimiento de las partes florales y la diferenciación del tejido vascular; se transporta a través del floema desde el ápice (caulinales y radicales). Proviene de dos fuentes: la auxina natural ácido indolacético (AIA) y las auxinas sintéticas como el ácido indolbutírico (AIB), el ácido naftalenoacético (ANA) y el ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) (Ramos, 2012; Boeri, 2015).

- El ácido indolacético: La única auxina presente en la naturaleza es el AIA que se encuentra en las zonas de crecimiento y migra por debajo del floema al resto de la planta, ya que de forma natural desaparece del tejido muy rápidamente (Jácome, 2011)
- El ácido indolbutírico (AIB) Es más estable en la luz que el AIA, se prefiere para la inducción de raíces. Punto óptimo de concentración es de 1 mg/l a 5 mg/l (Jácome, 2011).
- El ácido naftalenacético (ANA) se usa para la inducción de raíces, pero también para promover el crecimiento de tejido calloso, punto óptimo de concentración es alrededor de 2 mg/l (Jácome, 2011).
- El 2,4-dichlorophenoxyacetic ácido (2,4-D) tiene propiedades herbicidas en altas concentraciones. Es muy utilizado en cultivo de tejidos para inducir la formación de callos (Jácome, 2011).

b) Citoquininas

Las citoquininas estimulan la generación de brotes axilares e inducen brotes adventicios en callos (Campos, 2018); producen efectos fisiológicos como división celular, regulación de la

morfogénesis, rompimiento de la dominancia apical, retraso de la senescencia foliar y la promoción de la maduración de los cloroplastos. Entre las más utilizadas están: Bencil Adenina (BAP), 6-furfuril aminopurina (KIN), Zeatina (Zea), 2-isopenteniladenina (2-iP) siendo las dos últimas de origen natural y las otras sintéticas (Azcón y Talón, 2013).

c) Giberelinas

Las giberelinas estimulan y aceleran la tasa de división celular (mitosis) y promueven la elongación de los entrenudos e interrumpen el período de latencia de las semillas; se sintetizan en los primordios apicales de las hojas, en las puntas de las raíces y en las semillas en desarrollo. Su estructura química se deriva del ent-gibberellano, este es un grupo muy heterogéneo de hormonas, se presentan de muchas formas, aunque muy pocas tienen efecto (Paredes, 2009).

La más empleada en cultivo *in vitro* es el ácido giberélico (GA3), el cual es adicionado al medio de cultivo para promover la elongación de tallos micropropagados y conversión de embriones somáticos en plantas (Rojas et al., 2004).

2.2.2. Cultivo de tejidos

Con los avances logrados en la ciencia biológica, es posible realizar investigaciones exhaustivas sobre plantas a nivel celular y molecular en condiciones *in vitro* dentro de un laboratorio, donde las plantas se propagan en un ambiente controlado replicando todos los factores que inducen el crecimiento y desarrollo de plantas libres de enfermedades (Sharry y Abedini, 1998).

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se ha convertido en un eje de nuevas técnicas para el mejoramiento genético vegetal y una mejor comprensión de los procesos genéticos y

fisiológicos de las plantas. Una de las ventajas en el cultivo de tejidos *in vitro* es la facilidad para manipular las condiciones ambientales (luz, temperatura, hormonas, nutrientes) y así ayudan a conocer los procesos biológicos involucrados en el desarrollo de las plantas (Mroginski y Roca, 1991).

Para Gisbert et al. (2010) el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* requiere un ambiente de trabajo aséptico utilizando la parte de una planta que se le denomina explante, en un medio que proporcione los requerimientos de nutrientes necesarios, utilizando técnicas que permitan aprovechar el potencial genético de las células. Desde el punto de vista de Calva y Pérez (2005), esta técnica se basa en el principio de totipotencia celular, es decir, cualquier célula contiene una copia completa de un gen, independientemente de su función o ubicación, por lo que puede regenerarse bajo ciertas condiciones hasta convertirse en una planta completa.

Es un sistema de reproducción asexual a partir de una parte de la planta madre, obteniendo como resultado plantas genéticamente idénticas debido al principio de totipotencia celular. A través de este sistema se han criado más de 140 especies de madera en todo el mundo (Ramos, 2012).

- Planta madre.

La planta madre es la donadora de explante y de ella depende en gran medida la calidad fenotípica del clon, por lo que se seleccionan individuos élite, con las mejores características fenotípicas, además deben tener buenas condiciones fisiológicas y sanitarias. (Indacochea et al., 2019).

Si hay más de una planta donante, se debe tener en cuenta que sean de la misma edad y que todas presenten un crecimiento activo, vigoroso y sano, es decir, lo más homogéneo posible en todos los aspectos para que en el establecimiento de los explantes exista uniformidad, de lo contrario, es necesario tratar las plantas donantes sometiéndolas a tratamientos como: cultivarlas en ambientes controlados (de luz, temperatura y humedad relativa), aplicarle tratamientos de nutrición y desinfección (Indacochea et al., 2019). Si la planta donante es adulta, debe ser sometida a tratamientos para rejuvenecerse para un cultivo *in vitro* exitoso (Paniego et al., 2010).

- **Explante.**

Un explante es una parte o fragmento de un órgano o tejido vegetal aislado de una planta a partir del cual se puede obtener una progenie constante mediante cultivo de tejido *in vitro*. Se pueden usar como tejidos las hojas, tallos, raíces, pétalos y más. Y como órgano las semillas, ovarios, anteras o botones florales. La selección de explantes se basa en los objetivos que se persiguen y las especies vegetales a utilizar (Mroginski y Roca, 1991).

La sobrevivencia y la rápida respuesta del explante en el cultivo *in vitro* depende mucho de la planta madre de la cual se obtienen. Lo recomendable es obtener de plantas que se encuentran lo más sanas posibles, que presenten un crecimiento vigoroso y que sean jóvenes, porque, mientras más joven e indiferenciado se encuentre el explante, mejor será su respuesta; por otra parte, las plantas adultas pueden haber acumulado mayor cantidad de microorganismos en sus tejidos (Paniego et al., 2010).

Para Rojas et al. (2004) un explante es un tejido, órgano o embrión que se va a cultivar para obtener una planta igual a la donante. Dependerá de la especie y del sitio de la planta que se extrae, puede provenir de raíces, hojas, meristemos vegetativos o reproductivos, semillas, tallos,

ápices o yemas, inflorescencias jóvenes, embriones, anteras, pero lo más usados como material vegetal son los meristemas y yemas apicales.

- Problemas asociados al cultivo de tejidos.

Contaminación: Los patógenos contaminantes que con mayor frecuencia se presentan suelen ser hongos, bacterias y levaduras. Estos organismos son perjudiciales para el cultivo *in vitro*, porque compiten con los explantes por los nutrientes del medio e incluso pueden colonizar tejidos vegetales o expulsar metabolitos tóxicos al medio, en algunos casos provocando la muerte de los explantes (Sharry et al., 2015) y, en ocasiones, causa pérdidas de hasta el 90 % en varias etapas del cultivo *in vitro* (Hernández y González, 2010)

Estos patógenos se encuentran colonizando la parte externa del tejido vegetal así como en el interior de los tejidos, en algunos casos la contaminación también suele producirse por fallas en los procedimientos en el laboratorio (Paniego et al., 2010).

Oxidación: Es un problema de varias especies leñosas que se observa como oscurecimiento del tejido vegetal que se relaciona con el estrés oxidativo que sufren las células, esto se observa en los explantes cuando se realiza una mala praxis en la desinfección, corte, exposición a volumen inadecuado del frasco, pH inapropiado y mala composición del medio del cultivo (Azofeifa, 2009). Para mitigar este problema es necesario utilizar explantes tiernos, reducir la intensidad de la luz, disminuir la temperatura, realizar subcultivos frecuentes, agregar al medio antioxidantes, carbón activado, reducir el pH, acortar el tiempo de desinfección del explante, aumentar las sales de calcio y reducir el contenido de nitrato D'Silva y D'Souza (1993).

Vitrificación o hiperhidricidad: Este fenómeno hace que los brotes se vean transparentes, vidriosos y que las hojas, los tallos se vean hinchados y quebradizos (Sharry et al., 2015). Se caracteriza por cambios fisiológicos (aumento del consumo de agua, disminución del contenido de clorofila, disminución de la capacidad fotosintética, baja lignificación), cambios anatómicos (epidermis y cutícula delgadas, grandes espacios intercelulares, disminución del desarrollo vascular, estomas anormales) y cambios morfológicos (entrenudos más cortos, coloración anormal, formación de rosetas, hojas más gruesas, largas y rugosas, tallos de mayor diámetro). Este fenómeno está regulado por factores como son la fotosíntesis y transpiración (Olmos et al., 2010).

2.2.3. La micropropagación

Consiste en la propagación de un genotipo a gran escala utilizando técnicas del cultivo de tejidos, las cuales son muy útiles en los programas de mejoramiento genético, ya que tienen el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial. Por medio de esta técnica es posible obtener un sinnúmero de planta generalmente homogéneas a partir de ejemplares seleccionados (plantas élite) (Olmos et al., 2010).

La micropropagación es una técnica que ofrece numerosos beneficios en comparación con los métodos tradicionales de propagación en botánica. Uno de los beneficios más destacados es la capacidad de producir una gran cantidad de plantas homogéneas y de alta calidad fitosanitaria en un corto período de tiempo y en espacios reducidos. Sin embargo, hay inconvenientes significativos asociados con esta técnica, como los costos muy elevados en comparación con los métodos tradicionales, tanto para el montaje de un laboratorio como para el proceso de producción en sí mismo. Para Villalobos y Thorpe (1993) la micropropagación presenta

numerosas ventajas, entre las que podemos mencionar: Propagación vegetativa rápida y a gran escala, uniformidad seleccionada del material clonado, multiplicación de plantas recalcitrantes, reducción en el tiempo de multiplicación y el espacio requerido para tal fin, mayor control sobre la sanidad del material propagado, introducción rápida de nuevos cultivares, conservación de germoplasma y facilidades para el intercambio internacional del material vegetal.

a) Fases de la micropropagación.

- Preparación del material vegetal

Se necesita explantes con un alto nivel nutricional y desarrollo adecuado, para ello, tenemos que mantener a la planta madre (donante de explantes) en un invernadero bajo condiciones controladas entre una semana a varios meses. Garantizando condiciones sanitarias óptimas, con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Castillo, 2004).

La selección y crecimiento de la planta madre bajo condiciones asépticas reduce notablemente los contaminantes, principalmente fúngicos. La mayor fuente de contaminación primaria en los cultivos *in vitro* proviene de la planta madre. Si se logra establecer un explante axénico, la contaminación posterior será debida a fallas en la técnica o procedimiento (Sharry et al., 2015).

- Establecimiento del cultivo

El éxito de la propagación *in vitro* dependerá en gran porcentaje de esta fase. Los explantes deben obtenerse de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas porque tienen un mejor desarrollo que aquellos que proceden de plantas adultas o yemas en reposo. A medida que

es más joven y menos diferenciado el tejido que se va a implantar, mejor será la respuesta in vitro (Suárez, 2020).

Luego de seleccionar los explantes, es necesario la desinfección para evitar el crecimiento de bacterias y hongos que pueden ocasionar pérdidas significativas (Sánchez et al., 2015). Para esta desinfección se utilizan diferentes compuestos como el hipoclorito sódico, hipoclorito de cálcico, peróxido de hidrógeno, nitrato de plata, cloro comercial y alcohol (Jiménez y Agramonte, 2013).

El empleo de jabón, alcohol y NaClO son ampliamente utilizados como desinfectantes, por su bajo costo y por ser eficaz en la eliminación o reducción de la población de microorganismo presentes en la superficie de los explantes. El jabón carbólico compuesto de ácido carbólico(fenoles) es un desinfectante efectivo contra bacterias, algunos hongos y otros microorganismos, tiene la capacidad de desnaturalizar proteínas y causar daño a la membrana celular. El alcohol actúa destruyendo la membrana celular y también desnaturalizando proteínas con la consiguiente interferencia con el metabolismo y lisis celular, su eficacia se basa en la presencia de agua (70%) que facilita una mejor penetración en las células y bacterias; el NaClO libera cloro y oxígeno actuando como agente oxidante contra bacterias, virus, hongos y esporas, inhibe las reacciones enzimáticas y desnaturaliza proteínas (Sánchez y Sáenz, 2005).

Después de la desinfección superficial de los explantes con cada uno de los productos, se debe realiza tres enjuagues con agua estéril (Mroginski y Roca, 1991); posterior a ello los brotes son colocados en un medio de cultivo que contiene macronutrientes, micronutrientes, sales, agente gelificante, reguladores de crecimientos y otros compuestos (Roca y Mroginski, 1993). En

el transcurso de una semana o 15 días se inicia el proceso de germinación o regeneración de nuevo tejido vegetal, iniciándose el ciclo de cultivo in vitro (Castillo, 2004).

- Multiplicación

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento, bulbificación, etc.). Es importante señalar que, en esta etapa, cualquiera sea la vía de regeneración, es conveniente evitar la formación de callo para disminuir el riesgo de variación soma clonal. En esta etapa, los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantes (Olmos et al., 2010).

El objetivo de esta etapa es aumentar el número de brotes para obtener nuevos subcultivos. La inducción y respuesta organogénica están influenciadas principalmente por el tipo de explante (su edad fisiológica, tamaño, tejido u órgano del que se extrae) y la dosis de reguladores del crecimiento como auxinas y citoquinas (Gisbert et al., 2010). La incubación y posterior multiplicación de plántulas de plantas élite se debe realizar en condiciones controladas, siendo estas, temperatura, calidad e intensidad de luz, humedad relativa, fotoperiodo e higiene (Roca y Mroginski, 1993).

- Enraizamiento

Esta etapa da como resultado la formación de raíces. Esta fase depende del tipo de especie que se estudie, esto debido a que las especies herbáceas tienen facilidad para la formación de

raíces, mientras que para las especies forestales representa un desafío mayor por su limitada capacidad rizogénica (Gisbert y Picó, 2015).

Algunos factores que pueden ser determinantes en el éxito del enraizamiento de los explantes, son el tipo y cantidad de auxinas aplicadas para favorecer la formación de raíces adventicias porque modifican la extensibilidad celular, al producir factores que ablandan la pared (Ramos, 2012). El ácido indolbutírico (AIB) es un fitorregulador auxínico sintético comúnmente utilizado por su estabilidad, ya que es muy resistente a la oxidación por la luz, enzimas u otros agentes. La concentración de AIB varía con la especie que se esté utilizando (Azcón, 2000).

Para esta fase, se utiliza principalmente una plántula de unos dos cm de tamaño. Los brotes obtenidos en la etapa reproductiva (Multiplicación) se transfieren a un medio sin reguladores de crecimiento o que contienen solo hormonas de tipo auxina. Algunas plantas no necesitan pasar por esta fase porque ya están enraizadas en el mismo medio. Entonces los procesos de reproducción y enraizamiento ocurren simultáneamente (Castillo, 2004).

Gran parte del éxito de enraizamiento depende de la adición al medio de cultivo de auxinas, para favorecer la formación de raíces adventicias, donde el crecimiento y alargamiento de las raíces es estimulado por la presencia de una o dos tipos auxina dependiendo de la especie o clon; las más comúnmente usadas son el AIB, el ANA y el AIA. En algunas ocasiones para algunas especies principalmente las herbáceas, enraízan en medio básico o con niveles muy reducidos de auxina. Para lograr que las plantas micropropagadas sobrevivan al proceso de aclimatación y trasplante a campo definitivo es necesario que estas tengan un buen número y tamaño de raíces (Villarreal y Cadima, 2016).

- **Aclimatación**

Se transfiere a los explantes que mejor han enraizados de los frascos a un invernadero, donde se podrá reducir paulatinamente la humedad relativa y se aumenta la intensidad de lumínica, debido a que en el medio de cultivo donde se encontraban existe una humedad relativamente elevada, además que las estomas de sus hojas no están bien adaptadas para responder a la pérdida de humedad, ocurriendo así una desecación del explante. Los explantes se mantendrán en el invernadero hasta lograr que la planta deje de ser heterótrofa y pasen hacer autótrofas logrando crecer normalmente en el medio natural (Castillo, 2004).

b) Medios de cultivo

Los medios de cultivo, son un elemento fundamental porque permiten el desarrollo de plantas *in vitro*, contienen una porción balanceada de nutrientes, vitaminas, reguladores de crecimiento, sacarosa, agua y un agente gelificante para darle una consistencia sólida, incluso se suelen agregar otros compuestos de uso específico dependiendo de lo que se quiera alcanzar. Estos compuestos suelen utilizarse en cantidades muy pequeñas en mg/l (Gisbert et al., 2010).

El proceso de preparación del medio de cultivo, se lleva a cabo a través de una serie de pasos que se realizan para obtener un medio con la formulación correcta para la especie (Suárez, 2020). En la actualidad existen una gran variedad de medios de cultivo comerciales, pero su elección dependerá del objetivo a lograr y la especie a cultivar, en un gran porcentaje serán responsable del éxito o del fracaso del cultivo, pues el medio debe aportar de manera similares de lo que aporta el suelo a las plantas en su estado natural, más aún porque las plantas *in vitro* presentan una nutrición heterótrofa (Boeri, 2015).

Según Ramos (2012) los medios de cultivo son una combinación de nutrientes que, al estar presentes en las concentraciones adecuadas y en las condiciones físicas correctas, permiten el crecimiento de explantes vegetativos en el laboratorio de cultivo *in vitro*. Estos medios son esenciales en la propagación *in vitro* de plantas. Existen varios tipos de medios de cultivo, con variaciones en la cantidad y tipo de sales utilizadas. Algunos de los medios más comúnmente utilizados incluyen Murashige y Skoog (MS) (1962), White (1963), Linsmaier y Skoog (LS) (1965), Borgin y Nitsch (1967), Miller y Oyima (1968) y Gamborg (B5) (1970)

c) Sales minerales.

Los Macronutrientes incluyen seis elementos esenciales: nitrógeno (N; afecta el crecimiento de las plantas, cuya deficiencia se manifiesta por hojas cloróticas y crecimiento reducido), fósforo (P, se requiere para la conversión de energía y activación enzimática), potasio (K, promueve el crecimiento del tejido meristemático, síntesis de carbohidratos y proteínas, reducción de nitratos y regulación del agua en el sistema) calcio (Ca, forma parte de la pared celular y favorece en la formación de raíces, cuya deficiencia puede causar muerte de meristemas), magnesio (Mg; es un componente de la molécula de clorofila y actúa como activador enzimático, su deficiencia se observa clorosis en hojas maduras) y azufre (S, necesario para la síntesis de algunos aminoácidos) (Suárez, 2020; Boeri, 2015).

Los micronutrientes se necesitan en pequeñas cantidades de mg/l: Boro (B, implicado en el movimiento de azúcares, agua y hormonas, así como en el metabolismo del nitrógeno y la división celular), Cloro (Cl, necesario para estimular la fotosíntesis y el crecimiento de las plantas), Cobalto (Co, componente de la vitamina B12, síntesis de ácidos nucleicos), Cobre (Cu, conversión de energía, síntesis de clorofila y es un componente de algunas enzimas), Manganeso

(Mn, la membrana que recubre el cloroplasto) y Zinc (Zn, que es un componente de clorofila) (Perea, 2009).

d) Vitaminas

Son necesarios para una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo celular y su ausencia en cultivo *in vitro* es un factor limitante para el crecimiento. En el cultivo *in vitro*, las vitaminas suelen ser añadidas al medio porque los explantes no las sintetizan; las concentraciones y el tipo de vitaminas dependerá de la especie (Boeri, 2015). Según Aguirre et al. (2016) las vitaminas más empleadas son:

- Tiamina (Vitamina B1): Componente esencial de las coenzimas que catalizan la oxidación del ácido pirúvico en el ciclo respiratorio. Su presencia es esencial para que las células puedan realizar sus funciones vitales, y necesaria para el crecimiento celular de los vegetales.
- Ácido nicotínico (Niacina o Vitamina B3): Estimula el crecimiento de la planta a través de su participación como componente de coenzimas que actúan en las reacciones de energía.
- Mio- inositol: los cultivos *in vitro* reaccionan mejor si agregamos dicha vitamina, estimulando el crecimiento y división celular.
- Ácido ascórbico (Vitamina C): Usado frecuentemente como antioxidante en el cultivo de tejidos, su deficiencia suele manifestarse por un oscurecimiento del tejido generado por la inhibición del crecimiento, y en los casos más graves provocando la necrosis o muerte del tejido

e) Fuente de carbono

Los cultivos de tejidos vegetales en su mayoría tienen un comportamiento heterótrofo, por ello, se les suministra una fuente de carbono a través de la sacarosa o azúcar común a concentraciones de dos a cinco % para satisfacer su demanda y garantizar su desarrollo; en algunos casos se la puede remplazar por glucosa, maltosa o galactosa (Paniego et al., 2010).

f) Agente gelificante

El Agar: Es un polisacárido derivado de los extractos de varias algas rojas del género *Lily*. Hay diferentes tipos de agar y diferentes empresas comerciales lo venden con diferentes nombres (Cruz, 2012). Es el agente gelificante más utilizado porque su rigidez le permite sostener los cultivos y permitir que los nutrientes fluyan del medio al tejido (Suárez, 2020). La gelificación del agar depende del pH del medio, para tejidos vegetales el pH óptimo es 5,7 antes de agregar agar. Se debe tener en cuenta que un pH por debajo de cuatro afecta su dureza (Jácome, 2011).

g) Agua

Se utiliza agua destilada. El agua del grifo no se utiliza porque es impura, heterogénea y además contiene varios elementos disueltos: Sales minerales, aceites, productos de corrosión de tuberías, compuestos orgánicos, microorganismos, gases disueltos, etc. Las células cultivadas son incluso muy sensibles a las sustancias nocivas presentes en el medio ambiente. Por lo que es importante utilizar agua purificada (agua destilada), esta constituye alrededor del 90% al 95% de cualquier medio de cultivo (Boeri, 2015).

2.2.4. Descripción de la *Cedrela angustifolia*

- Taxonomía de la especie.

Según Catalogue of Life (2023) la sistemática de la especie es:

- Reino: Plantae
- Filo: Tracheophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Sapindales
- Familia: Meliaceae
- Género: *Cedrela*
- Especie: *Cedrela angustifolia*
- Nombre científico: *Cedrela angustifolia* DC.
- Nombre común: cedro andino, cedro de altura, atoc cedro

- Descripción botánica.

SERFOR (2020) lo describe en los siguientes términos:

Árbol que mide entre 18 m a 40 m de altura, que puede llegar a tener un diámetro de 40 cm a 200 cm, posee una corteza externa agrietada de color gris oscuro y con ritidoma leñoso, su ramificación es monopodial en el último tercio, sus hojas son compuestas paripinnadas, dispuestas en espiral, de 30 cm a 40 cm de longitud, con 7 a 9 pares de folíolos, de forma lanceolada, de 12 cm a 15 cm de longitud y 3 cm a 4,5 cm de ancho, ápice acuminado, margen

entero, base asimétrica, nervadura eucamptódroma, glabros y de consistencia ligeramente coriácea.

Las flores son actinomorfas y hermafroditas morfológicamente, pero unisexuales funcionalmente. Tienen de 10 mm de longitud con un pedicelo de 2 mm de longitud y el cáliz cupuliforme, con 3 mm de longitud, los sépalos 5 son glabrados, los pétalos 5 elípticos y el gineceo con ovario globoso tiene de 2 mm a 3 mm de diámetro y sostenido por un androginóforo.

Los frutos son de tipo cápsulas elipsoidales con 3 cm a 5 cm de longitud y 2 cm de diámetro, posee una superficie glabra y lenticelada; una columna central la cual lleva prendida numerosas semillas de 2 cm a 2,5 cm de longitud, aladas y membranosas, con el embrión en un extremo; su germinación es de tipo epigea y posee una viabilidad baja.

- Usos de la *Cedrela angustifolia*

El principal uso de esta especie es la madera, debido a que posee un alto valor económico por sus características de grano recto, densidad media y textura, es durable, trabajable, sirve para ebanistería, su madera también es empleada como leña. En cuanto a los usos no maderables, sus hojas se utilizan como tintes para teñir lana y algodón, por su porte, se emplea como árbol ornamental, en cercos vivos como cortinas rompe vientos, en sistemas agroforestales y en la protección de cárcavas (SERFOR, 2020).

- Distribución geográfica de la especie.

La *Cedrela angustifolia* está restringida en algunos países de América del Sur, como Perú, Bolivia, Argentina y Brasil. Se ha reportado entre los 1000 y 3400 m s.n.m, pero también se encuentran en altitudes de 800 m s.n.m (Lombardi, 2014). Según SERFOR (2020) en el Perú la

especie tiene una la superficie elegible en nuestro país de 123 630,3 km², lo que corresponde al 9,53 %, estas superficies están ubicadas en el lado oriental de los Andes, aproximadamente entre los 14° y 6° de latitud sur.

Teniendo en cuenta a Reynel y Marcelo (2009) la *C. angustifolia* en nuestro país se distribuye mayormente en el centro, sur, sierra y ceja de selva, en los bosques montanos y premontanos, húmedos y subhúmedos, en elevaciones entre los 500 m a 3500 m s.n.m, con una temperatura de 10 °C a 18 °C, precipitaciones anuales entre 1 000 mm y 2 000 mm. En Perú han sido reportada para los departamentos de Cajamarca, Amazonas, Ancash, Apurímac, Pasco, Piura y Junín (Pennington & Muellner, 2010).

- **Situación de la especie.**

La Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres, está incluido en el Apéndice II *C. odorata*, pero también se pidió la inclusión de las otras 16 especies del género *Cedrela* para contribuir a su sostenibilidad y no constituya una amenaza el comercio internacional para la supervivencia de estas especies (CITES, 2021). En Perú, algunas especies de este género están clasificadas en diferentes categorías de amenaza, *Cedrela angustifolia* Sessé & Moc. ex DC. (*C. lilloi*) se encuentra en peligro (EN), mientras que *Cedrela fissilis* Vell., *Cedrela montana* Moritz ex Turcz. y *Cedrela odorata* L. se encuentran en la categoría de vulnerables (VU) (MINAGRI, 2006).

La especie de *C. angustifolia* ha sido sobreexplotada hasta la fecha, asimismo el conocimiento limitado del valor de la especie, los escasos esfuerzos y los métodos de replantación limitados también han obstaculizado la reforestación. Asimismo, los programas de reforestación de los últimos años han incluido especies exóticas con buen potencial de desarrollo,

relegando los esfuerzos de reforestación del cedro de altura (Cardoso y Cuellar, 2016). Pese a que el rango de distribución en el Perú es amplio, las poblaciones de esta especie son usualmente de pocos individuos debido a la tala por su madera de excelente calidad (Reynel y Marcelo, 2009).

En los años 2009 y 2010 se registró la mayor producción de madera de *Cedrela* con 90 872,58 y 111 144,07 m³ respectivamente, disminuyendo gradualmente en el 2016 a 34 209,18 m³ (SERFOR, 2020).

2.3. Definición de términos

- a) **Organogénesis directa:** Capacidad que tiene un tejido preexistente, como una hoja, raíz, o estructura reproductiva, de generar un nuevo órgano directamente (brotes o raíces) mediante factores nutricionales y hormonales del medio de cultivo *in vitro*. (Mroginski y Roca, 1991).
- b) **Multiplificación:** Proceso el cual busca la proliferación rápida y masiva de las plantas a partir de explantes vegetales. Durante esta fase, los explantes se colocan en un medio de cultivo específico que contiene nutrientes, hormonas y condiciones óptimas para estimular la división celular y el desarrollo de nuevos brotes (Sharry et al., 2015).
- c) **Enraizamiento:** Proceso mediante el cual se induce la formación de raíces de los explantes micropropagados mediante el uso de medios de cultivo específicos que contienen auxinas (Aguirre et al., 2016).
- d) **Explante:** Puede ser un órgano o un tejido escindido de una planta donante utilizado para un cultivo *in vitro* (Aguirre et al., 2016).

- e) ***Contaminación de explantes:*** Es la presencia no deseada de microorganismos, como bacterias, hongos u otros agentes patógenos, en el cultivo de tejidos vegetales (Aguirre et al., 2016).
- f) ***Fenolización de explantes:*** Es la oxidación de compuestos fenólicos liberados por las células dañadas con el corte, esto causa que las extremidades cortadas se oscurezcan rápidamente y que los productos de oxidación sean tóxicos para el resto del explante y oscurezcan el medio de cultivo (Aguirre et al., 2016).
- g) ***Brote:*** Es una parte aérea nueva que se origina a partir de una yema axilar estimulada a crecer en la inserción de las hojas, mediante la aplicación de citoquinina exógena o la simple subdivisión del tallo en segmentos nodales que contienen una yema axilar (Aguirre et al., 2016).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación geográfica del laboratorio

La ejecución del proyecto de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca, ubicado en el distrito, provincia y departamento de Cajamarca, con dirección en la Av. Atahualpa N° 1050, km 3,5 de la carretera Cajamarca – Los Baños del Inca.

3.2. Materiales

3.2.1 *Materiales experimentales*

- Explantes (yemas apicales y segmentos nodales) de plantas de *C. angustifolia*
- Desinfectante: jabón carbólico, alcohol metanol e hipoclorito de sodio.
- Reguladores de crecimiento: Bencilaminopurina (BAP) y 2-isopenteniladenina (2iP), ácido indolacético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA)
- Medio de cultivo: Murashige y Skoog de 1962 (Anexo 1)

3.2.2 *Materiales y equipos de laboratorio*

- Probeta
- Matraz
- Frascos de siembra
- Bisturí
- Pinzas
- Parafilm
- Papel Aluminio
- Agitador magnético
- Balanza analítica
- Autoclave
- pH metro
- Destilador de agua
- Cabina de flujo laminar
- Cámara de incubación

3.3. Metodología

3.3.1. *Variables de estudio*

Este trabajo de investigación abarcó principalmente dos fases de la micropropagación las cuales son: fase de multiplicación y fase de enraizamiento.

Tabla 1.

Variables independientes y dependientes

Fase	Variables independientes	Variables dependientes
Multiplicación	- Dosis de citoquininas: BAP y 2iP	- Número de brotes - Longitud de brotes - Número de nudos - Número hojas - Supervivencia de explantes
Enraizamiento	- Dosis de auxinas: ANA y AIA	- Longitud de raíz - Número de raíces - Porcentaje de enraizamiento

3.3.2. *Diseño experimental*

Para el desarrollo del experimento se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con siete tratamientos (Tablas 3 y 5) y tres repeticiones. Los datos obtenidos del efecto de las tres concentraciones de citoquininas sobre la multiplicación de explantes y las tres concentraciones de auxinas sobre el enraizamiento fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA),

seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey para poder determinar diferencias significativas entre tratamientos utilizando un nivel de significancia del 5%.

Modelo estadístico lineal

$$Y = u + \tau_i + \epsilon_{ij} \quad \left\{ \begin{array}{l} - i=1, 2, \dots, t \\ - j=1, 2, \dots, n \end{array} \right.$$

Donde:

- t: Número de tratamiento
- n: Número de replicaciones por tratamiento

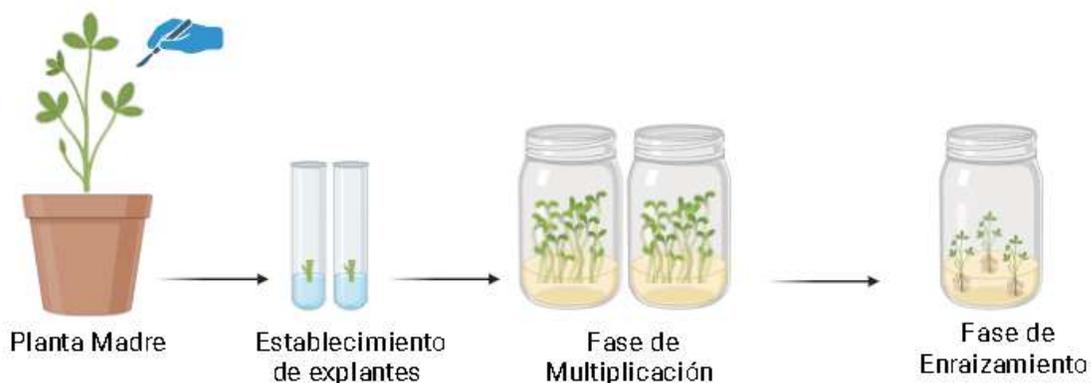
En esta forma del modelo:

- U: es el medio
- τ_i : es el efecto i - ésimo tratamiento
- ϵ_{ij} = es el efecto verdadero de la j - ésima unidad experimental, sujeta i - ésimo tratamiento (error experimental)

3.3.3. Procedimiento

Figura 1.

Etapas y fase de la investigación en C. angustifolia



a) Selección de la planta madre

Los explantes de *C. angustifolia* se obtuvieron de plántones vigorosos de 20 cm de altura (Figura 1) que fueron cultivadas en el invernadero de silvicultura de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Forestal, Facultad de Ciencias Agrarias y donadas para este presente estudio.

Figura 2.

Plántones de C. angustifolia usados como donantes de explantes



b) Preparación del cultivo (MS)

Para la preparación de los medios de cultivo se realizó según la formulación Murashige y Skoog de 1962 (Anexo 10), siguiendo este procedimiento:

- Primero se agregó agua destilada en un matraz y se colocó en agitación para asegurar que cada elemento a incorporar se disuelva y se consiga una mezcla homogénea.
- Se agregaron las sales minerales de Murashige y Skoog (4,33 g/l).

- Vitaminas: Tiamina HCL (1,00 mg/l), Ácido Nicotínico (0,50 mg/l), Piridoxina HCL (0,50 mg/l), Glicina (2,00 mg/l) y Mio-inositol (100 mg/l).
- Sacarosa (30 g/l) como fuente de carbono.
- Reguladores de crecimiento.
- El pH de la solución se ajustó a 5,70 utilizando hidróxido de sodio (NaOH) a 1 N para subir el pH y ácido clorhídrico (HCl) a 1 N para bajar el pH.
- Finalmente se procedió a colocar y disolver el agar.

Preparado el medio de cultivo se depositó en los tubos de ensayo, luego fueron tapados con papel aluminio, y colocados en autoclave para ser esterilizados a 121 °C por 20 min, pasado este tiempo, se sacaba del autoclave y se dejaba enfriar a temperatura ambiente hasta que el medio adquiriera una consistencia sólida.

c) Establecimiento de explantes

- Desinfección de explantes

Después de extraer los explantes de la planta madre se procedió a desinfectarlos con jabón carbólico (4000 ppm) por 10 min, alcohol (70 %) por 3 min e hipoclorito de sodio (2 %) durante 5 min, seguido de tres enjuagues utilizando agua esterilizada después de la aplicación de cada desinfectante.

- Establecimiento in vitro de los explantes

Este proceso se realizó en la cabina de flujo laminar la cual proporcionó condiciones asépticas. Los explantes desinfectados se acondicionaron eliminando las partes afectadas por los desinfectantes, luego con la ayuda de la pinza el explante fue sembrado en el medio de cultivo

MS sin reguladores de crecimiento contenido en los tubos de ensayo, finalmente fueron sellados y rotulados para su identificación.

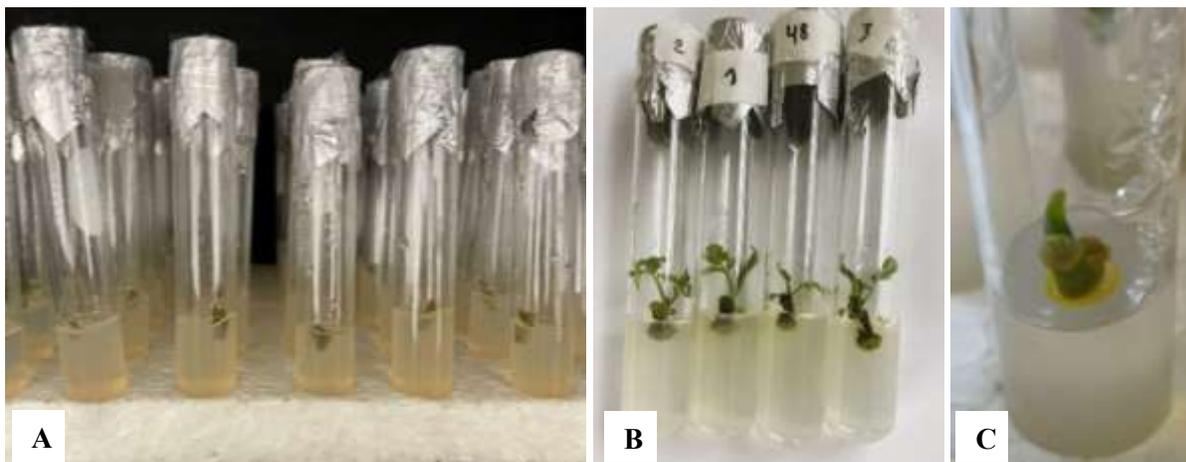
Después de la siembra *in vitro*, los explantes fueron llevados a la cámara oscura durante siete días a una temperatura de 16 a 20 °C para reducir el estrés oxidativo de los tejidos y mejorar la viabilidad. Posteriormente, se trasladaron al área de crecimiento donde se mantuvo a una intensidad lumínica de 9 500 lux, durante 12 h de luz al día, a una temperatura de 26 °C hasta la diferenciación de tallos y hojas.

- *Evaluación*

La evaluación de los explantes se realizó a través del método de observación directa, donde se registraron los datos cuantitativos de supervivencia de explantes, tamaño de brotes, contaminación por microorganismos (hongos y bacterias) y fenolización (Anexos 1). Las evaluaciones se realizaron cada 15 días durante un periodo de 60 días.

Figura 3.

Establecimiento de explantes in vitro de C. angustifolia



Nota. Explantes desinfectados y sembrados *in vitro* (A); Explante a los 30 días de siembra (B); explante contaminado con bacteria (C).

d) Multiplicación

Los brotes que se desarrollaron en la etapa de establecimiento fueron seccionados y sembrados en el medio de cultivo MS suplementado con BAP y 2ip a diferentes concentraciones para estimular la proliferación de brotes (Tabla 3). El proceso de siembra se llevó a cabo en condiciones asépticas dentro de la cabina de flujo laminar. Los frascos con explantes fueron rotulados y colocados en el área de incubación durante 60 días.

El efecto de las hormonas sobre los explantes se evaluó cada 15 días (Anexo 2) después de la siembra. Los indicadores evaluados (Tabla 1) fueron: longitud de brote, número de brotes, número nudos, número de hojas y porcentaje de fenolización.

Tabla 2.

Dosis de citoquininas de BAP y 2iP, para la fase de multiplicación

Reguladores de crecimiento	Concentración
Bencil Aminopurina (BAP)	0,5 mg/l
	1,0 mg/l
	1,5 mg/l
2- isopenteniladenina (2iP)	0,5 mg/l
	1,0 mg/l
	1,5 mg/l

Tabla 3.

Tratamientos para determinar la mejor respuesta de citoquininas en la multiplicación

Tratamientos	Concentración de citoquininas
T1	0,0 mg/l
T2	0,5 mg/l BAP
T3	1,0 mg/l BAP
T4	1,5 mg/l BAP
T5	0,5 mg/l 2iP
T6	1,0 mg/l 2iP
T7	1,5 mg/l 2iP

e) Enraizamiento

Para ejecutarse esta fase se esperó que los explantes desarrollen tallos y hojas en la fase de multiplicación y alcancen una altura de 2 cm a más para ser cultivados en un nuevo medio de cultivo suplementado con ANA y AIA a diferentes concentraciones para promover la formación de raíces (Tabla 5). La evaluación de la respuesta de las auxinas sobre los explantes se debió realizar cada 15 días después de la siembra en un espacio de tiempo de 60 días; los indicadores a evaluar fueron longitud de raíz y número de raíces (Anexo 3).

Tabla 4.

Dosis de auxinas ANA y AIA, para la fase de enraizamiento

Reguladores de crecimiento	Concentración
Ácido 1-naftalenoacetico (ANA)	0,5 mg/l
	1,0 mg/l
	1,5 mg/l
Ácido 3 indolacético (AIA)	0,5 mg/l
	1,0 mg/l
	1,5 mg/l

Tabla 5.

Tratamientos para determinar la mejor respuesta de auxina en el enraizamiento

Tratamientos	Concentración de auxinas
T1	0,0 mg/l
T2	0,5 mg/l ANA
T3	1,0 mg/l ANA
T4	1,5 mg/l ANA
T5	0,5 mg/l AIA
T6	1,0 mg/l AIA
T7	1,5 mg/l AIA

f) Análisis estadístico

El registro de datos de los indicadores evaluados en el proceso experimental, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos; posterior a ello, se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, el cual, permite compara la media de los tratamientos para determinar que tratamientos son diferentes entre sí y así poder hallar el más óptimo en la multiplicación y enraizamiento de explantes *in vitro* de *C. angustifolia*. El software empleado para realizar este análisis fue JASP 0.19.1.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de los reguladores de crecimiento en la fase de multiplicación

4.1.1. Fase previa: Desinfección y establecimiento de explantes *in vitro* de *C. angustifolia*

La desinfección realizada con jabón carbólico (4000 ppm), alcohol (70 %) e hipoclorito de sodio (2 %) favorecieron la obtención del 74,6 % de explantes *in vitro* sanos y libre de patógenos; sin embargo, el 22,24 % de pérdida de explantes se debió a la presencia de hongos y bacterias que sobrevivieron o no fueron eliminados por completo durante la desinfección. Estos microorganismos al entrar en contacto con el medio de cultivo rico en nutrientes, comienzan a multiplicarse masivamente y compiten con los explantes por los nutrientes e incluso colonizan los tejidos y les ocasionan la muerte (Villalobos y Thorpe, 1993). El problema de fenolización del 3,08 % que se evidenció en la primera semana, fue ocasionada por la acción oxidante de NaClO el cual provocó la muerte de explantes (Sánchez y Sáenz, 2005). (Tabla 6). A las 6 semanas los explantes que brotaron fueron sometidos a los tratamientos de la fase de multiplicación.

Tabla 6.

Supervivencia de los explantes durante el establecimiento in vitro

Estado del explante	Nº de explantes	Porcentaje
Sano	97	74,6
Con bacteria	17	13,1
Con hongo	12	9,23
Fenolizado	4	3,08
Suma	130	100

Los resultados de desinfección con alcohol (70 %) y NaClO (2 %) son semejantes a los obtenidos en *C. odorata*, Dos Santos et al. (2021) alcanzaron una supervivencia del 80 % con explantes libre de microorganismos; por el contrario, Santa Cruz (2022) y Huamán et al. (2012) empleando el NaClO (1 %) a menor concentración obtuvieron menores resultados con 60 %, sin embargo, García (2011) al utilizar una solución del 5 % de NaClO ocasionó la muerte de sus explantes por fitotoxicidad y por despigmentación tisular con decoloración progresiva del cual no se recuperaron.

Se utilizó jabón carbólico porque está compuesto de ácido carbólico (fenoles) el cual es un desinfectante efectivo contra bacterias, algunos hongos y otros microorganismos, tiene la capacidad de desnaturalizar proteínas y causar daño a la membrana celular. El alcohol actúa destruyendo la membrana celular y también desnaturalizando proteínas con la consiguiente interferencia con el metabolismo y lisis celular, su eficacia se basa en la presencia de agua (70 %) que facilita una mejor penetración en las células y bacterias; el NaClO libera cloro y oxígeno actuando como agente oxidante contra bacterias, virus, hongos y esporas, inhibe las reacciones enzimáticas y desnaturaliza proteínas (Sánchez y Sáenz, 2005).

Para lograr resultados eficaces de desinfección fue necesario obtener explantes de plantas sanas (Hernández y González, 2010) y en la aplicación de los desinfectantes se debe tener en cuenta la concentración, el tipo de explantes y la especie a utilizar porque hay tejidos y órganos que son más sensibles a ser dañados (Villalobos y Thorpe, 1993).

4.1.2. Multiplicación de explantes *in vitro* de *C. angustifolia*

Los datos obtenidos en las evaluaciones de esta fase fueron sometidos a un ANOVA (Anexos 6, 7, 8 y 9) y se obtuvo un valor de $p < 0,001$ el cual indica que existe una diferencia

estadística significativa entre las dosis de reguladores de crecimiento para determinar esa diferencia estadística entre los tratamientos se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Anexos 6, 7, 8 y 9). El tratamiento T3 (1 mg/l BAP) presentó la mejor respuesta en longitud de brote (1.20 cm), número promedio de brotes (1,33), número de nudos (2,66) y hojas (3,0). El segundo tratamiento que presentó una respuesta similar fue T2 (0,5 mg/l BAP).

A una dosis de 1,5 mg/l de BAP el efecto fue negativo, la respuesta de longitud y número de brotes tendió a disminuir como consecuencia de la alta división celular y la formación de callo en la parte media e inferior del explante. De acuerdo con Suárez (2020) afirma que a concentraciones elevadas de BAP de la que requiere la especie causan efectos en la reducción de la dominancia apical y la disminución en el número de brotes. Resultados semejantes se reportaron en la propagación de *C. odorata* donde el BAP presentó un efecto reductor sobre la longitud, número brotes y número de hojas en dosis mayores a 1mg/l (Afolabi et al., 2022; Pérez et al., 2002) y mayor a 2 mg/l para *C. lilloi* (Vergara, 2018).

Los tratamientos con 2iP en la multiplicación de *C. angustifolia*, presentaron menor respuesta que el BAP, como se puede apreciar en la Tabla 7 y Figura 3. Las concentraciones de 0,5; 1,0 y 1,5 mg/l 2iP empleadas de este regulador de crecimiento, no favoreció el desarrollo de la longitud del brote, número de brotes y el número de hojas de los explantes. Del mismo modo, Pérez et al. (2002) obtuvieron una respuesta similar en *C. odorata* empleando 2iP (0,5 brotes por explante de 0,5 cm de longitud); sin embargo, este regulador de crecimiento presenta una mejor respuesta en el brotamiento, longitud de brote y número de hojas en otras especies forestales como *Loxopterygium huasango* (Conde et al., 2017) .

Tabla 7.

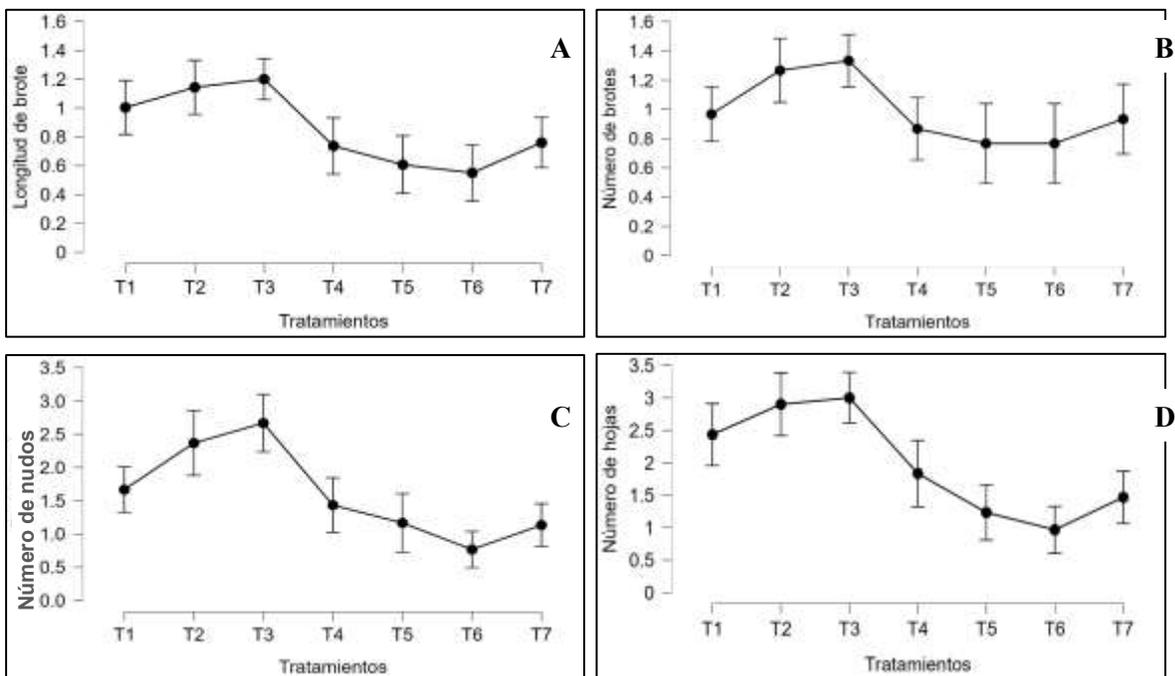
Descriptivos de los indicadores evaluados

Tratamientos	N	Longitud de brote *	Promedio de brotes *	Número promedio de nudos *	Número promedio de hojas *				
T1	30	1,003	bc	0,967	ab	1,667	bc	2,433	bc
T2	30	1,143	c	1,267	b	2,367	cd	2,900	c
T3	30	1,200	c	1,333	b	2,667	d	3,000	c
T4	30	0,737	ab	0,867	ab	1,433	ab	1,833	ab
T5	30	0,607	a	0,767	a	1,167	ab	1,233	a
T6	30	0,550	a	0,767	a	0,767	a	0,967	a
T7	30	0,760	ab	0,933	ab	1,133	ab	1,467	a

Nota. Agrupación basada en letras del indicador de significancia (*). Si la media de dos o más tratamientos comparte el mismo símbolo de agrupación no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 4.

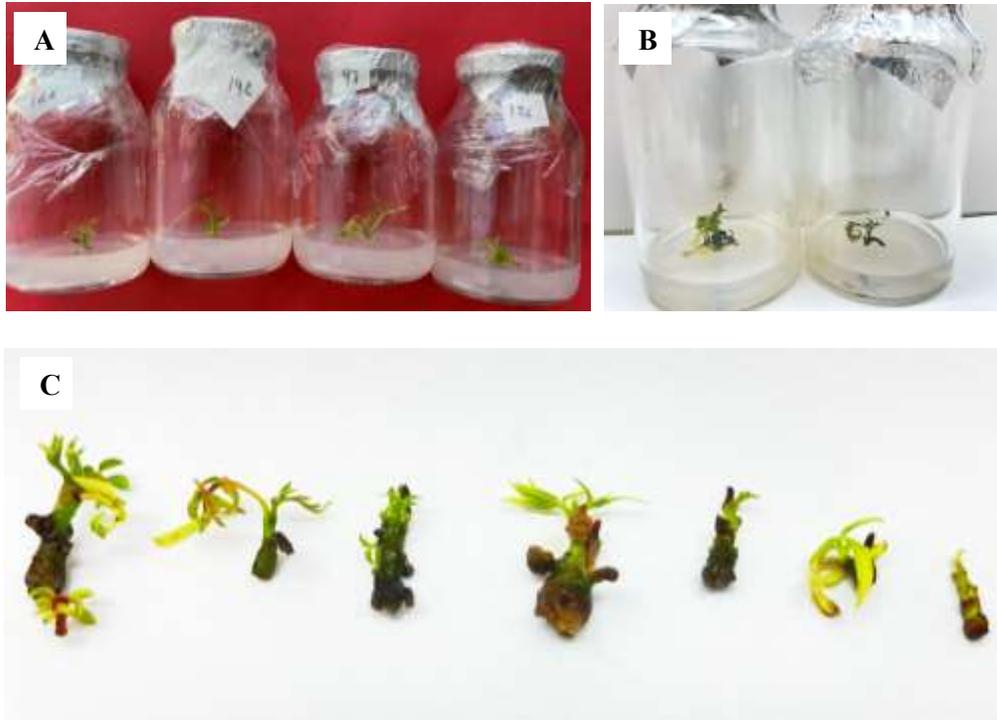
Distribución de medias de los indicadores evaluados



Nota. Las gráficas contrastan la influencia y el efecto de la dosis de BAP y 2iP en la respuesta de los explantes con respecto a la longitud de brotes (a) número de brotes (b) número de entrenudos (c) y número de hojas (c).

Figura 5.

Desarrollo de explantes en la fase de multiplicación.



A: Explantes cultivamos en MS + BAP con crecimiento normal B: Explantes cultivamos en MS + 2iP con crecimiento reducido y C: Explantes con problemas fisiológicos de hiperhidratación, necrosis, amarillamiento, caídas de hojas y de corta longitud.

Los resultados obtenidos en la fase de multiplicación empleando medio de cultivo MS más BAP difieren a los alcanzado en otras investigaciones, donde lograron obtener mejores respuestas en la multiplicación de *C. odorata* empleando BAP en combinación con otros reguladores de crecimiento. Dos Santos et al. (2021) empleando 8,8 μM de BAP y 0,28 μM AG_3 obtuvo 4,16 brotes por explante; igualmente García et al. (2011) adicionando al medio de cultivo 2 mg/l BAP más 3 mg/l ANA obtuvo brotes de 3,93 cm de altura y Huamán et al. (2012) con 0,5 mg/l de BAP y 0,1 mg/l de ANA indujo la mejor respuesta morfogénica de los segmentos nodales con un coeficiente de multiplicación de 2,87 brotes de 4,82 cm de longitud y 3,25 nudos.

Empleando otros reguladores de crecimiento como la Kinetina (0,35 mg/l), Santa Cruz (2022) sostiene que obtuvo un promedio de 1,55 brotes de 1,33 cm de longitud, pero a medida que aumentó la dosis se presentó un efecto negativo en la longitud y el número de brotes en la fase de multiplicación de *C. odorata*.

Las diferencias de respuestas morfogénicas discutidas anteriormente, están influenciadas por la especie, el genotipo, el tipo, la dosis y la interacción de los reguladores de crecimiento. De acuerdo con García et al. (2011) menciona que, la interacción y el balance adecuado entre el BAP y ANA benefician la diferenciación, la elongación celular y la dominancia apical, pero también un mayor número de nudos y hojas (Huamán et al., 2012); de igual modo, la incorporación de otros reguladores de crecimiento como el AG₃ también favorece el alargamiento de los entrenudos y una mayor altura (Dos Santos et al., 2021). Sin embargo, Villalobos y Thorpe (1993) mencionan que no todas las especies del mismo género presentan la misma respuesta a un medio de cultivo, siendo algunas muy difíciles de propagar.

- ***Porcentaje de supervivencia***

El análisis de varianza realizado para el porcentaje de supervivencia, presentó un valor de $P=0,108$ lo cual indica que no hay una diferencia significativa entre tratamientos. En el T3 (1 mg BAP) se alcanzó un valor del 60 % de supervivencia, sin embargo, los tratamientos con 2iP presentaron una menor respuesta a comparación del BAP (Figura 5). La mayoría de explante vivos obtenidos presentaron problemas de hiperhidratación, necrosis, amarillamiento, caídas de hojas y crecimiento reducido a partir de los 30 días después de la siembra *in vitro*.

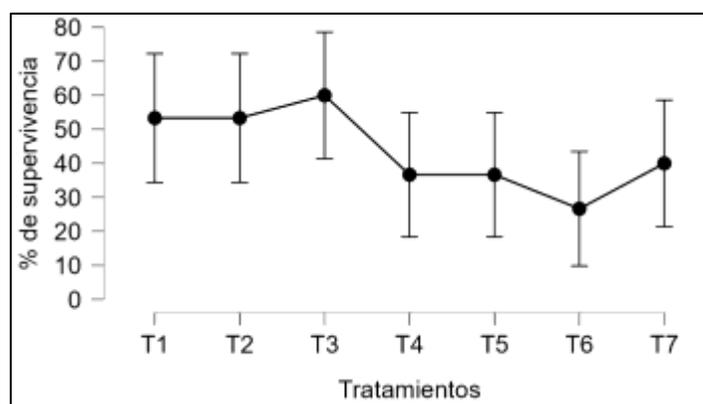
Tabla 8.*Análisis de varianza de la supervivencia de explantes*

Casos	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	F	p
Tratamientos	25619,048	6	4269,841	1,764	0,108
Residuals	491333,333	203	2420,361		

Tabla 9.*Descriptivos de la supervivencia de explantes y la prueba de comparación múltiple de Tukey*

Tratamientos	N	Media	DT	ET	Coefficiente de variación	*
T1	30	53,33	50,742	9,264	0,951	a
T2	30	53,33	50,742	9,264	0,951	a
T3	30	60,00	49,827	9,097	0,830	a
T4	30	36,67	49,013	8,949	1,337	a
T5	30	36,67	49,013	8,949	1,337	a
T6	30	26,67	44,978	8,212	1,687	a
T7	30	40,00	49,827	9,097	1,246	a

Nota. Agrupación basada en letras del indicador de significancia (*). Si la media de dos o más tratamientos comparte el mismo símbolo de agrupación no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 6.*Distribución de medias de la supervivencia de explantes*

Nota: La gráfica muestra la supervivencia de explantes para los tratamientos con BAP y 2ip.

Probablemente algunos de los problemas fisiológicos estuvieron influenciados por la concentración de los reguladores de crecimiento. Según Waldesse et al. (2018) indican que el uso del BAP a bajas concentraciones asegura una tasa de multiplicación con menor grado de trastornos del aparato fotosintético, no afectando la tasa fotosintética y el crecimiento de la planta; sin embargo, a altas concentraciones afecta la funcionalidad estomática, esto puede haber provocado la hiperhidratación en los explantes.

Por otra parte, Radice (2010) menciona que en el cultivo *in vitro* de algunas especies se requiere condiciones atmosféricas con porcentajes adecuados de oxígeno y dióxido de carbono para la respiración y la actividad fotosintética, en algunos casos, la presencia de otros compuestos como el etileno actúan primero como promotor de la morfogénesis, pero luego inhiben el crecimiento de los órganos diferenciados y ocasionan caída de hojas.

Otros autores como García y Abdelnour (2013) y Pérez et al. (2012) presentaron este mismo problema de caída de hojas, hiperhidratación y coloración amarillenta de los explantes empleando BAP a más de 1,0 mg/l; García y Abdelnour, afirmaron que tales alteraciones se debieron al exceso de BAP, sin embargo la aplicación de caseína hidrolizada al medio de cultivo mejoro la respuesta de los explantes; por su parte Pérez et al. (2012) señalan que este problema estuvo influenciado por la concentración de etileno, para lo cual, usó tapas porosas que favorecen la ventilación del cultivo *in vitro* mejorando considerablemente sus resultados en el crecimiento y los procesos morfogénicos de *Swietenia macrophylla* y *C. odorata* .

Mesa et al. (2002) sugieren en la fase de multiplicación el uso del BAP en combinación con auxinas para inducir el brotamiento y el crecimiento apropiado de los brotes, pues, es necesario dosis bajas y equilibradas para lograr un buen desarrollo, ya que las plantas superiores

poseen una mayor carga hormonal endógena comparada con plantas herbáceas (Schmülling, 2004). Otros autores mencionan que para algunas especies maderables no es necesario la incorporación de reguladores de crecimiento en la fase de multiplicación (Abdelnour et al., 2011) y enraizamiento (Flores et al., 2009) esto depende de la capacidad de síntesis de la planta para suplir sus necesidades (Indacochea et al., 2018).

4.2.Efecto de los reguladores de crecimiento en la fase de enraizamiento

El enraizamiento de explantes no se llevó a cabo debido a los problemas que presentaron los explantes en la multiplicación; pese a varios intentos por conseguir explantes con mejores características cultivándolos en el medio de cultivo (MS + 1 mg/l BAP) donde se obtuvo buenos resultado, no se logró conseguir y se volvió a experimentar el problema mencionado en la sección de la fase de multiplicación.

Del mismo modo, Vergara (2018) también experimentó una disminución en la tasa de multiplicación de *Cedrela lilloi* utilizando BAP (1,0 mg/l), el resultado de la multiplicación de explantes disminuyó del 2,47 a 0,27 brotes en promedio, esta misma respuesta se presentó en los tratamientos con Zeatina, y a una mayor concentración de estas citoquininas se obtuvo un mayor número de individuos necrosados.

Villalobos y Thorpe (1993) mencionan que no todas las especies vegetales responden en todas las fases del cultivo *in vitro*, porque esta influenciado por la respuesta organogénica de las especies, el medio de cultivo empleado, el tipo de reguladores de crecimiento y, por los problemas de oxidación que dificultan la inducción de brotes (Pineda et al., 2021). Cada fase del cultivo *in vitro* presenta desafíos y aspectos técnicos que resolver, por ello es importante seguir investigando para determinar los factores y lograr su cultivo en condiciones *in vitro*.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En la multiplicación de *C. angustifolia* los explantes estuvieron influenciados por la dosis de BAP y 2iP; el tratamiento T3 con un 1mg/l BAP presentó la mejor respuesta en longitud de brote (1,20 cm), número de brotes (1,33), número nudos (3,0), número de hojas (2,67).

El enraizamiento de explantes no se pudo realizar por la presencia de explantes que no reunían las características adecuadas para ser enraizados debido a los problemas fisiológicos como hiperhidratación, partes necrosadas, presencia de hojas amarillentas caída de hojas y explantes de corta longitud obtenidos en la fase de multiplicación.

Ante los desafíos presentados en este estudio se recomienda realizar pre tratamientos de desinfección de la planta madre para reducir la contaminación durante el establecimiento; en la fase de multiplicación se debe emplear otros reguladores de crecimiento combinando citoquininas con auxinas a fin de lograr resultados más óptimos en la propagación *in vitro* de *C. angustifolia*.

CAPÍTULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelnour Esquivel, A., Aguilar, Ma. E., & Valverde, L. (2011). Micropropagación de pilón (Hieronyma alchorneoides). *Agronomía Costarricense*, 35(2), 9–19. <https://doi.org/10.15517/rac.v35i2.6675>
- Afolabi, J. O., Asonibare, A. O., Onawumi, O. A., & Oyetunde, E. O. (2022). In Vitro Growth Enhancement of Cedrela odorata L. using Benzyl Amino Purine and A-Naphthalene Acetic Acid. *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences*, 29(1), 71–82. <https://doi.org/10.4314/njbas.v29i1.9>
- Aguirre Villarroel, G., Pierre Baudoin, J., & Leigue Arnéz. Lilibeth. (2016). *Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos* (G. Aguirre Villarroel, J. Pierre Baudoin, & Leigue Arnéz. Lilibeth, Eds.). Universidad Mayor de San Simón. <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/212904/1/Aguirre%2C>
- Azcón Bieto, J., & Talón Manuel. (2013). *Fundamentos de la fisiología vegetal* (J. Azcón Bieto & Talón Manuel, Eds.; 2nd ed.). Universidad de Barcelona.
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 2(1), 153–175. <https://www.redalyc.org/pdf/437/43711514016.pdf>

- Boeri, P. (2015). ¿Cómo se nutren las plantas de probeta? Medios de Cultivo- Reguladores de crecimiento. In *Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro* (pp. 46–72). edulp. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/46738>
- Briones, Valentina. (2015). Micropropagación: La técnica de “fotocopiado”de plantas. In *PLANTAS DE PROBETA. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro* (pp. 112–120). edulp. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/46738>
- Calva Calva, G., & Pérez Vargas, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6, 1–16. http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov_art104a.pdf
- Campos Torres, O. I. (2018). *Reguladores de crecimiento y medios de cultivo en la micropropagacion de Cinchona pubescens Valh “Cascaquilla”* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Jaén]. <http://repositorio.unj.edu.pe/handle/UNJ/114>
- Cardoso Villacorta, S., & Cuellar Bautista, J. E. (2016). Manejo de los bosques naturales y plantaciones forestales recuperación, ecología y silvicultura del cedro de altura (*Cedrela angustifolia*) en la región de Cusco. *Congreso Nacional Forestal*.
- Castillo, A. (2004). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: Una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria-Uruguay. <http://www.inia.uy/Publicaciones/Paginas/publicacion-1009.aspx>
- CITES. (2021, February 12). *La inclusión de especies valiosas de holoturias y cedros en el Apéndice II de CITES entra en vigor*. Convención Sobre El Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. <https://cites.org/esp/node/57207>

- Conde Solano, V. M., Eras Guamán, V. H., González Zaruma, D., Moreno Serrano, J., Minchala Patiño, J., Yaguana Arévalo, M., Poma Angamarca, R., & Valarezo Ortega, C. (2017). Procesos biotecnológicos para la proliferación y enraizamiento in vitro de hualtaco *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl. proveniente del bosque seco de la provincia de Loja. *Bosques Latitud Cero*, 7(1), 108–129. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/171/167>
- D’Silva, I., & D’Souza, L. (1993). Controlling contamination and browning of in vitro cultures of cashew. *Journal of Plantation Crops*, 21, 22–29.
- Ferl, R., & Paul, A. L. (2000). Genome organization and expression. In B. B. Buchanan, W. Gruissem, & R. L. Jones (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. (1st ed., pp. 312–357). American Society of Plant Physiologists.
- García Gonzáles, R., Delgado, M., González, Y., González, A., Garriga, M., Caligari, P. D. S., Carrasco, B., & Quiroz, K. (2011). In vitro Propagation of Cedar (*Cedrela odorata* L.) from Juvenile Shoots. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(3), 376–382. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392011000300005>
- García Rojas, T., & Abdelnour Esquivel, A. (2013). Crioconservación de ápices y semillas de cedro (*Cedrela odorata* L.) mediante las técnicas de vitrificación y deshidratación. *Agronomía Costarricense*, 37(3), 113–126. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/ac/v37n1/a09v37n1.pdf>
- Gisbert Doménech, C., & Picó Sirvent, M. B. (2015). *Micropropagación*. [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/51895/Gisbert and Pico_2015 micropropagación.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/51895/Gisbert_and_Pico_2015_micropropagación.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- Hernández, Y., & González, M. E. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4), 01–19. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Huamán, X., Ruiz Sánchez, M. E., Guerrero Abad, J. C., Pichis García, R., García, L., & Solís, R. (2012). Propagación in vitro de segmentos nodales de cedro (*Cedrela odorata* L.) obtenidos a partir de semillas botánicas. *FOLIA Amazónica*, 21(2), 109–111. <http://revistas.iiap.org.pe/index.php/foviaamazonica/article/view/39/73>
- Jácome Tabango, A. (2011). *Micropropagación in vitro de la especie endémica: Jiguerón (Aegiphila ferruginea), para la producción masiva y conservación de esta especie en peligro de extinción*. [Tesis de pregrado, Escuela Politécnica del Ejército]. Ingeniería en Biotecnología.
- Jiménez González, A., Zhindón Ganchozo, B. A., Indacochea Ganchozo, B. S., & Ramos Rodríguez, M. P. (2017). Protocolos de desinfección de explantes durante la micropropagación de *Cedrela odorata* L. *UNESUM-Ciencias. Revista Científica Multidisciplinaria*, 1(2), 01–06. <https://doi.org/10.47230/unesum-ciencias.v1.n2.2017.14>
- Lombardi Indacochea, I. (2014). *Las poblaciones del género cedrela en el Perú* (1st ed.). Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Mesa, C., Romero, A., & Cruz, A. M. (2002). Estudio de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en la micropropagación in vitro de la *Leucaena leucocephala* vc

Perú. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 36, 271–274.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193018103012>

MINAGRI. (2006, June 13). *Decreto Supremo N.º 043-2006-AG - Aprueban Categorización de Especies Amenazadas de Flora Silvestre*. Diario Oficial El Peruano.

Mroginski, L., & Roca, W. M. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. In *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones* (pp. 20–40).

Olmos, S., Luciani, G., & Galdeano, E. (2010). Micropropagación. In G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, H. Esteban, & L. Mroginski (Eds.), *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II* (2.^a ed., pp. 353–362). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
<https://intainforma.inta.gob.ar/“biotecnologia-y-mejoramiento-vegetal-ii”-un-libro-a-ciencia-cierta/>

Paniego, N., Heinz, R., Fernández, P., Lia, V., & Fusari, C. (2010). Bioinformática aplicada a la biotecnología vegetal. In G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, & L. Mroginski (Eds.), *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II* (1st ed., p. 17'). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
<https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/BiotecnologiyMejoramientovegetalII.pdf>

Paredes, I. (2009). *Utilización de Giberelinas en explantes vegetales*. Seminario de crecimiento y desarrollo. <https://www.es.scribd.com/doc/35592184/Giberelinas>

Pennington, T. D., & Muellner, A. N. (2010). *A Monograph of Cedrela (Meliaceae)* (1st ed.). dh books.

- Perea, M. (2009). Cultivo de tejidos vegetales in vitro. In *Universidad Nacional de Colombia* (Vol. 9, Issue 19). Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Biología. http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad_de_Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas_Libros/Biologia/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro.pdf?fbclid=IwAR2xLhdtU-7yKztpAvuWQjdZYh-ltzpcYT6PnzpAErkw__Zozfqc
- Pérez Flores, J., Aguilar Vega, M. E., & Roca Tripepi, R. (2012). Assays for the in vitro establishment of *Swietenia macrophylla* and *Cedrela odorata* Ensayos para el establecimiento in vitro de *Swietenia macrophylla* y *Cedrela odorata* Establishment of Mahogany and Spanish cedar nodal explants. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 1–11. <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v14n1/v14n1a03.pdf>
- Pineda Lázaro, A. J., Argüelles Curaca, A., Rojas Chávez, J. A., & Díaz Pillasca, H. B. (2021). Respuesta en el establecimiento y regeneración in vitro de rocoto (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.). *Aporte Santiaguino*, 14(1). <https://doi.org/10.32911/as.2021.v14.n1.745>
- Radice, S. (2010). Morfogénesis. In *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II* (1st ed., pp. 26–33). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Ramos Amaya, J. E. (2012). *Avances de la micropropagación in vitro de plantas leñosas* [Tesis de grado, Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Universidad Nacional Abierta y a Distancia]. <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/2515/17127974.pdf;jsessionid=F97626C9C2C4CAFCECE88528DAD83801?sequence=1>

- Reynel, C., & Marcelo, J. (2009). *Árboles de los ecosistemas forestales andinos. Manual de identificación de especies. Serie de Identificación y Sistematización N°9* (1st ed.). INTERCOOPERATION. <https://sinia.minam.gob.pe/sites/default/files/siar-puno/archivos/public/docs/1526.pdf>
- Rojas Gonzales, S., García Lozano, J., & Alarcón Rojas, M. (2004). *Propagación asexual de plantas. Conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas.*
- Sánchez Saldaña, L., & Sáenz Anduaga, E. (2005). Antisépticos y desinfectantes. *Dermatología Peruana*, 15(2), 82–103. https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v15_n2/pdf/a02.pdf
- Santa Cruz Carrasco, R. M. (2022). *Efecto de dos medios de cultivos y dos fitohormonas en la micropropagación de Cedrela odorata L. “cedro colorado”* [Universidad Nacional Agraria de La Selva]. <https://repositorio.unas.edu.pe/server/api/core/bitstreams/4985e255-1e43-49d1-9b99-5abae9583ffb/content>
- Santos Junior, C. F., Costa, M. D., Rech, T. D., Boff, P., & Boff, M. I. C. (2021). Use of micropropagation in the vegetative rescue of adult trees of *Cedrela odorata* L. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences*, 16(4), 1–7. <https://doi.org/10.5039/agraria.v16i4a8944>
- Schmülling, T. (2004). Cytokinin. In *In Encyclopedia of Biological Chemistry* (pp. 1–7). Academic Press/Elsevier Science.

SERFOR. (2020). *Estado situacional del género Cedrela en el Perú*.
[https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/1252008/Estado situacional del género Cedrela spp. en el Perú.pdf](https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/1252008/Estado_situacional_del_g%C3%A9nero_Cedrela_spp._en_el_Per%C3%BA.pdf)

Sharry, S., & Abedini, W. (1998). Micropropagación de *Pelargonium graveolens* L'Herit "malva rosa". *Revista Horticultura Argentina*, 17, 51–59.

Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). *Plantas de proveta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. edulp.

Suárez Padrón, I. E. (2020). *Cultivo de tejidos vegetales*. Fondo Editorial Universidad de Córdoba.
<https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/2553>

Toledo, M., Chevallier, B., Villarroel, D., & Mostacedo, B. (2008). *Ecología y silvicultura de especies menos conocidas: Cedro, Cedrela spp.* (F. Clavijo, Ed.; 1a. edición).
https://www.researchgate.net/publication/310748785_Ecologia_y_silvicultura_de_especies_menos_conocidas_Cedro_Cedrela_spp

Tropicos. (2024, October 24). *Cedrela angustifolia* DC. Jardín Botánico de Misuri.

Vergara Arellano, R. C. (2018). *Micropropagación de Cedrela lilloi C. DC. (cedro de altura) a partir de yemas apicales provenientes de embriones cigóticos germinados in vitro* [Universidad Nacional Agraria La Molina].
<https://repositorio.lamolina.edu.pe/items/17e0b1fd-8b56-4c9b-a4dd-c3ba59331dbf>

- Villalobos, V. M., & Thorpe, T. A. (1993). Micropropagación: Conceptos, metodología y resultados. In W. M. Roca & L. A. Mroginski (Eds.), *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones prácticas* (pp. 127–142). Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Villarreal, C. L., & Cadima, X. (2016). MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS. In G. Aguirre Villarreal, J. Pierre Baudoin, & L. Leigue Arnéz (Eds.), *La aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos* (pp. 89–104). Universidad Mayor de San Simón.
- Waldesse Stoch, R., Paulo Rodrigues, M. J., Santos Rodrigues, E., De Almeida Rodrigues, L. C., Lima Gontijo, A. B. P., & Ralph Falqueto, A. (2018). Photosynthetic apparatus performance in function of the cytokinins used during the in vitro multiplication of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 133(3), 339–350. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1385-x>

ANEXOS

Anexo 1. Hoja de registro para evaluar la contaminación y sanidad de los explantes

Hoja de registro en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> de la <i>C. angustifolia</i>				
Fecha de siembra:	Contaminación		Fenolización	Tamaño (cm)
Fecha de evaluación:				
Número de tubos de ensayo	Hongo	Bacteria		
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
...				

Anexo 2. Hoja de registro para evaluar la fase de multiplicación

Hoja de registro en la fase de multiplicación de explantes							
Fecha de siembra:		Total, de explantos:	Brotos		Observaciones		Fenolización
Fecha de evaluación:							
Tratamientos	Repeticiones	Tubos de ensayo	Longitud	Número	Nudos	Hojas	
			Tn	R	1		
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							

Nota. Tratamientos (Tn), Repeticiones (R).

Anexo 3. Hoja de registro para evaluar la fase de enraizamiento

Hoja de registro en la fase de enraizamiento de explantes				
Fecha de siembra:		Total, de explantes:	Raíces	
Fecha de evaluación:				
Tratamientos	Repeticiones	Tubos de ensayo	Tamaño	Cantidad
Tn	Rn	1		
		2		
		3		
		4		
		5		
		6		
		7		
		8		
		9		
		10		
Tn	Rn			

Nota. Tratamientos (Tn), Repeticiones (R).

Anexo 5. Resumen promedio de los datos cuantitativo de la desinfección y establecimiento

Tratamientos	Repeticiones	Longitud de brote	Nº de brotes	Nº de Nudos	Nº de hojas	Supervivencia
T1	R1	1.17	1.1	2	3.2	60
T1	R2	0.93	0.9	1.5	2.2	60
T1	R3	1.12	1.1	1.9	2.5	40
T2	R1	1.2	1.2	2.4	3	50
T2	R2	1.14	1.4	2.5	3	40
T2	R3	1.37	1.4	2.8	3.4	70
T3	R1	1.3	1.4	2.6	3.3	60
T3	R2	1.29	1.4	2.7	3	60
T3	R3	1.23	1.2	2.7	3	60
T4	R1	1.13	1	2.5	2.8	80
T4	R2	0.61	0.8	1.1	1.5	30
T4	R3	0.64	0.8	0.9	1.2	0
T5	R1	0.56	0.8	1.2	1.3	30
T5	R2	0.7	1	1.2	1.5	40
T5	R3	0.56	0.5	1.1	1.1	40
T6	R1	0.49	0.7	0.8	1	10
T6	R2	0.76	1	1.1	1.6	40
T6	R3	0.41	0.6	0.6	0.9	30
T7	R1	0.69	0.9	1.1	1.6	30
T7	R2	0.99	1	1.4	1.8	60
T7	R3	0.73	0.9	1	1.2	40

Anexo 6. ANOVA y prueba de comparación múltiple de Tukey de la longitud de brotes

ANOVA - Longitud de brote

Casos	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	F	p
Tratamientos	12.056	6	2.009	8.314	< .001
Residuals	49.059	203	0.242		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo III

Prueba de comparación múltiple de Tukey - Longitud de brote

Descriptivos - Longitud de brote

Tratamientos	N	Media	DT	ET	Coeficiente de variación *	
T1	30	1.003	0.501	0.091	0.499	bc
T2	30	1.143	0.502	0.092	0.439	c
T3	30	1.200	0.380	0.069	0.316	c
T4	30	0.737	0.522	0.095	0.708	ab
T5	30	0.607	0.536	0.098	0.883	a
T6	30	0.550	0.520	0.095	0.945	a
T7	30	0.760	0.464	0.085	0.611	ab

Nota. Agrupación basada en letras del indicador de significancia (*). Si dos o más medias comparten el mismo símbolo de agrupación, entonces no podemos demostrar que sean diferentes, pero tampoco demostramos que sean iguales ($p > 0,05$).

Anexo 7. Prueba de comparación múltiple de Tukey del número de brotes

ANOVA - Número de brotes

Casos	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	F	p
Tratamientos	9.390	6	1.565	4.204	< .001
Residuals	75.567	203	0.372		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo III

Prueba de comparación múltiple de Tukey - Número de brotes

Tratamientos	N	Media	DT	ET	Coeficiente de variación *	
T1	30	0.967	0.490	0.089	0.507	ab
T2	30	1.267	0.583	0.106	0.460	b
T3	30	1.333	0.479	0.088	0.360	b
T4	30	0.867	0.571	0.104	0.659	ab
T5	30	0.767	0.728	0.133	0.949	a
T6	30	0.767	0.728	0.133	0.949	a
T7	30	0.933	0.640	0.117	0.685	ab

Nota. Agrupación basada en letras del indicador de significancia (*). Si dos o más medias comparten el mismo símbolo de agrupación, entonces no podemos demostrar que sean diferentes, pero tampoco demostramos que sean iguales ($p > 0,05$).

Anexo 8. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de nudos

ANOVA - Número de nudos

Casos	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	F	p
Tratamientos	85.733	6	14.289	12.911	< .001
Residuals	224.667	203	1.107		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo III

Prueba de comparación múltiple de Tukey - Número de nudos

Descriptivos - Número de nudos

Tratamientos	N	Media	DT	ET	Coefficiente de variación *	
T1	30	1.667	0.922	0.168	0.553	bc
T2	30	2.367	1.299	0.237	0.549	cd
T3	30	2.667	1.155	0.211	0.433	d
T4	30	1.433	1.104	0.202	0.770	ab
T5	30	1.167	1.177	0.215	1.009	ab
T6	30	0.767	0.728	0.133	0.949	a
T7	30	1.133	0.860	0.157	0.759	ab

Nota. Agrupación basada en letras del indicador de significancia (*). Si dos o más medias comparten el mismo símbolo de agrupación, entonces no podemos demostrar que sean diferentes, pero tampoco demostramos que sean iguales ($p > 0,05$).

Anexo 9. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del número de hojas

ANOVA - Número de hojas

Casos	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	F	p
Tratamientos	118.848	6	19.808	14.359	< .001
Residuals	280.033	203	1.379		

Nota. Suma de Cuadrados Tipo III

Prueba de comparación múltiple de Tukey - Número de hojas

Descriptivos - Número de hojas

Tratamientos	N	Media	DT	ET	Coefficiente de variación *	
T1	30	2.433	1.278	0.233	0.525	bc
T2	30	2.900	1.296	0.237	0.447	c
T3	30	3.000	1.050	0.192	0.350	c
T4	30	1.833	1.367	0.250	0.745	ab
T5	30	1.233	1.135	0.207	0.920	a
T6	30	0.967	0.964	0.176	0.998	a
T7	30	1.467	1.074	0.196	0.732	a

Nota. Agrupación basada en letras del indicador de significancia (*). Si dos o más medias comparten el mismo símbolo de agrupación, entonces no podemos demostrar que sean diferentes, pero tampoco demostramos que sean iguales ($p > 0,05$).

Anexo 10. Medio de cultivo Murashige y Skoog de 1962

N°	COMPUESTO	FORMULA	CANTIDAD
Macroelementos			g/l
1	Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	1,65
2	Nitrato de Potasio	KNO ₃	1,9
3	Cloruro de Calcio	CaCl ₂ 2H ₂ O	0,44
4	Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ 7H ₂ O	0,37
5	Fosfato de Potasio	KH ₂ PO ₄	0,17
Microelementos			mg/l
6	Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	6,2
7	Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ H ₂ O	16,9
8	Sulfato de Zing	ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,6
9	Ioduro de Potasio	KI	0,83
10	Molibdato de Sodio	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25
11	Sulfato de Cobre	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025
12	Cloruro de Cobalto	CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025
Hierro			mg/l
13	Sulfato de Fierro	FeSO ₄ 7H ₂ O	27,84
14	EDTA de Sodio	Na ₂ EDTA	37,24
Vitaminas			
	Tiamina HCL		1,00
	Mio - Inositol		100,00
	Ac. Nicotínico		0,50
	Piridoxina HCL		0,50
	Glicina		2,00

Anexo 11. Panel fotográfico de las actividades realizadas en el laboratorio



A: Preparación de medio de cultivo



B: Explantes acondicionados para desinfectar



C: Siembra de explantes en medio de cultivo



D: Evaluación de explantes de la fase de establecimiento



E: Explantes en la cámara de crecimiento



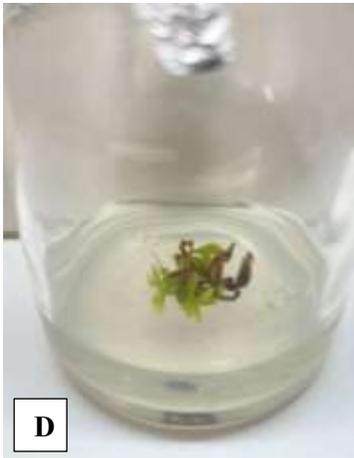
F

F: Siembra de explantes en la fase de multiplicación



G

G: Explantes en el área de crecimiento



D

D: Explante con inicio de



E

E: Explantes con tamaño reducido