



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución- NoComercial-CompartirIgual 2.5 Perú](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/).

Vea una copia de esta licencia en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



**“PROPAGACIÓN SEXUAL Y CLONAL DE SACHA INCHI (*Plukenetia
volubilis* L.) BAJO CONDICIONES *IN VITRO*”**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGRÓNOMO**

PRESENTADO POR EL BACHILLER:

OBDULIO BARRERA RENGIFO

**TARAPOTO - PERÚ
2007**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL



TESIS

“PROPAGACIÓN SEXUAL Y CLONAL DE SACHA INCHI (*Plukenetia
volubilis* L.) BAJO CONDICIONES *IN VITRO*”

PRESENTADO POR:

BACH. OBDULIO BARRERA RENGIFO

TARAPOTO

2007

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL

AREA DE BIOLOGÍA



“PROPAGACIÓN SEXUAL Y CLONAL DE SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis* L.) BAJO CONDICIONES *IN VITRO*”



Blgo. M. Sc. Winston F. Ríos Ruiz

PRESIDENTE



Ing. Eybis José Flores García

MIEMBRO



Ing. Luis Alberto Lanza Guerra

MIEMBRO



Ing. Elías Torres Flores

PATROCINADOR



Bach. Obdulio Barrera Rengifo

TESISTA

TARAPOTO – PERÚ

2007

DEDICATORIA

En memoria a mi señor Padre, que desde lo alto me sigue guiando con sus consejos y ejemplo que en vida me dio a él. Y a mi querida Madre, quien me trajo a este mundo y que su sola existencia, me da la fuerza para seguir adelante. A ellos mi eterna gratitud y dedicación.

Mis padres: Robinsón y Rosita.

A mis hermanos:

Robinsón, Zalatiel, Henry, Elvira, Bruno, Fidelina y Rosita, quienes con sus consejos, ejemplos de superación y apoyo constante en el que hacer de la vida me han ayudado siempre a salir adelante. A ellos mi dedicación y gratitud.

AGRADECIMIENTO

Al Ing. Agr. Elías Torres Flores, por su apoyo y dedicada colaboración como patrocinador en la ejecución del presente trabajo de tesis.

De manera especial al Biólogo Marco León Martínez, como coasesor y conocedor del tema de biotecnología aplicada al cultivo de tejidos vegetales, por su apoyo y valiosas sugerencias brindadas durante la ejecución de mi trabajo de tesis.

A la Universidad Nacional de San Martín, por brindarme la oportunidad de realizarme como profesional, a todos los docentes que contribuyeron de alguna u otra forma a este fin, a la Facultad de Ciencias Agrarias que me brindo las facilidades y la infraestructura del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales para realizar el presente trabajo de tesis.

Al Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria – INIEA “El Porvenir”, por haberme facilitado la obtención del material vegetal utilizado en el presente trabajo de tesis.

Y también, muy en especial a mis amigos y colegas Segundo Amasifuén Vásquez, Francisco Arévalo Armas, Roger A. Gálvez Panduro, Tito Rojas Reategui, Henry Delgado Haya y Jim Dickerson Vásquez Pinedo; gracias, por sus valiosas sugerencias y amistad.

INDICE

	Pag.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. REVISION BIBLIOGRAFICA	4
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	18
V. RESULTADOS	32
VI. DISCUSIONES	45
VII. CONCLUSIONES	58
VIII. RECOMENDACIONES	59
IX. RESUMEN	60
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	62
XI. ANEXO	64

I. INTRODUCCIÓN

El Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.), es una Euphorbiacea conocida también como sachá maní o maní del monte, se encuentra distribuida en las zonas rurales de la Región Amazónica del Perú: Iquitos, Madre de Dios, Huanuco, San Martín, Rodríguez de Mendoza, Ucayali, Junín y Cuzco.

En los últimos años este cultivo ha adquirido una gran importancia por su alto valor agroindustrial, siendo requerido en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica por su alto contenido de proteínas y grasas, al mismo tiempo concentraciones altas de ácidos grasos insaturados esenciales para la vida humana como el omega 3, 6 y 9; superando ampliamente a las demás oleaginosas (Soya, algodón palma, girasol y otras), incrementando las áreas de siembra de este cultivo y poniéndose en la mira de países desarrollados (mercados europeos) deseosos de adquirir este producto; de tal manera que constituye un potencial para la industrialización y una alternativa de desarrollo y de sustitución al cultivo de la hoja de coca, en la Región San Martín.

Dado a la importancia de este cultivo es necesario realizar trabajos de investigaciones que contribuyan al manejo agronómico y su mejoramiento genético, a fin de seleccionar variedades con buenos rendimientos y altos contenidos de aceite, resistentes a plagas y enfermedades, de manera que se pueda competir en la industria de aceites en el mercado nacional e internacional.

En la actualidad el INIEA, viene trabajando e investigando 75 Accesiones (ecotipos) de Sacha Inchi procedentes de trabajos de colecta realizado en distintas partes de la Región y del País, el cual demanda bastante esfuerzo, dedicación e inversión; debido a la polinización cruzada (alogamia) y a la susceptibilidad que presentan alguna de éstas, a patógenos como *Meloidogyne* sp y *Fusarium* sp., corremos el riesgo de perder parte de este material colectado (por efecto de cruzamiento perdiendo la pureza varietal y por causa de enfermedades).

Presentándose el cultivo *In Vitro* de tejidos vegetales, como una alternativa de reproducción y conservación en condiciones totalmente asépticas a partir de un pequeño segmento inicial de tejido es posible regenerar en poco tiempo grandes volúmenes de plantas genéticamente iguales a la planta madre (homocigotos), en espacios reducidos, libres de patógenos, por medio de variables físicas y químicas controladas en un medio de cultivo.

El presente trabajo se realizó con la colaboración del INIEA en el marco de un convenio suscrito con la UNSM - T, teniendo como objetivo principal validar un protocolo de introducción a condiciones *In Vitro* del Sacha Inchi a partir de embriones para su conservación y de segmentos nodales para su propagación clonal.

II. OBJETIVOS



2.1. Objetivo general

- Determinar un protocolo para la propagación sexual y clonal de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) bajo condiciones *In Vitro*.

2.2. Objetivo específicos

- Evaluar la respuesta agronómica de nueve accesiones de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en condiciones *In Vitro*, introducidos a partir de embriones, sometidos a un medio de cultivo.
- Evaluar la eficiencia de diferentes niveles de concentración hormonal para la micropropagación *In Vitro* de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) a partir de segmentos nodales tomados de vitroplántulas.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO

3.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

ARÉVALO 1996, clasifica al cultivo de Sacha Inchi de la siguiente manera:

ORDEN: Euphorbiales

FAMILIA: Euphorbiaceae

GENERO: Plukenetia

ESPECIE: volubilis Linneo.

A su vez manifiesta que la especie *Plukenetia volubilis* L. es conocida de acuerdo al idioma o al lugar con los siguientes nombres: Sacha Inchi, Sacha Inchi, Sacha maní, Maní del Inca, Maní del monte, Inca peanut.

3.1.2. Morfología general

ARÉVALO 1996, describe al cultivo de Sacha Inchi como una planta voluble semileñosa y perenne que alcanza una altura de 2 m aproximadamente. Sus hojas son alternas, acorazonadas, puntiagudas de 10 a 12 cm de largo y de 8 a 10 cm de ancho, con peciolo de 2 a 6 cm de largo. Las nervaduras nacen en la base de la hoja, orientándose la nervadura central hacia el ápice. Por lo general

los brotes son dentados. En la base de las hojas, mayormente justo al inicio del pedúnculo, muchas presentan una estípula. Los frutos son cápsulas 3 a 5 cm de diámetro, dehiscentes, de color verde que cuando maduran se ponen de un color marrón negruzco. Usualmente están formados por cuatro cápsulas, algunos frutos presentan de cinco a siete cápsulas. Dentro de las cápsulas se encuentran las semillas de color marrón oscuro, con nervaduras notorias. Ovais de 1.5 a 2 cm de diámetro y de 48 a 100 g de peso, ligeramente abultadas en el centro y aplastadas hacia los bordes, con un hileum bien diferenciado. Al abrirlas encontramos los cotiledones a manera de almendras y cubiertas de una película blanquecina.

3.1.3. ECOLOGÍA

En cuanto a la ecología de este cultivo **ARÉVALO 1996**, manifiesta que experimentalmente la evaluación de ecotipos de "Sacha Inchi" en la Estación Experimental El Porvenir, ubicada en el Distrito de Juan Guerra, Tarapoto, se ha realizado a T° máxima de 32,2°C, una T° mínima de 20,4°C y una T° media de 26,6°C, observándose un buen desarrollo en general. El mismo autor a su vez manifiesta que el Sacha Inchi crece desde los 100 m.s.n.m. en la selva baja y 1 500 m.s.n.m. en la Selva Alta; alcanzando un comportamiento óptimo, donde fue realizado el presente trabajo, en Juan Guerra (Tarapoto), a una altitud de 232 m.s.n.m.

AGUA.- Es una planta de rápido crecimiento, requiere de disponibilidad permanente de agua (850 – 1000 mm/año), para tener un crecimiento sostenido; siendo mejor si las lluvias se distribuyen en forma uniforme durante los 12 meses.

LUZ.- Requiere de abundante luz para el proceso de fotosíntesis. A bajas intensidades de luz, la planta necesita de mayor número de días para completar su ciclo de vegetativo; asimismo, cuando la sombra es muy intensa la floración disminuye y por lo tanto la producción se reduce. Con el sistema de tutores vivos, manejándose la sombra con podas, el "Sacha Inchi" tiene un buen comportamiento.

HUMEDAD RELATIVA.- Una humedad relativa con fuertes precipitaciones pluviales condiciona un desarrollo vigoroso de la planta, aunque pueda resultar propicio para la proliferación de enfermedades. En una humedad relativa de 18% y una temperatura media de 26°C, se observan plantas de "Sacha Inchi" prácticamente libres de enfermedades.

SUELO.- De acuerdo a su distribución el cultivo del "Sacha Inchi", tiene un amplio margen de adaptación a diferentes tipos de suelo. Es una planta agronómicamente rústica de poca exigencia nutricional, crece en suelos ácidos y con alta concentración de aluminio. Ensayos realizados en la Estación Experimental El Porvenir (Arévalo, 1990-1995), demuestran que este cultivo prospera en suelos arcillosos (más

de 50% de arcilla), franco arenosos (más de 60% de arena), indicando esto que es una planta versátil, que muy fácilmente se adapta a diferentes tipos de suelos, pudiendo establecerse hasta en colinas.

Sin embargo, es necesario resaltar que se debe distinguir los suelos que posibiliten el mejor desarrollo y productividad del "Sacha Inchi", de aquellos donde la planta apenas sobrevive.

Por las referencias de los agricultores y observaciones realizadas en el campo, se puede afirmar que crece mejor en los suelos francos y/o aluviales planos con buen drenaje, localizados en orillas de los ríos; siendo su producción menor en otro tipo de suelo.

3.2. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES IN VITRO

ROCA y MROGINSKI 1991, hacen referencia que, el cultivo de tejidos como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínscico o inducido.

Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener el cultivo libre de contaminación microbiana.

MEJIA 1998, menciona que el termino de "cultivos de tejidos" vegetales o de plantas se refiere al "cultivo *In Vitro*" de cualquier estructura viva de una planta sean estas células, tejidos u órganos, bajo condiciones asépticas.

La técnica "*In Vitro*" significa literalmente "en vidrio", debido a que el cultivo se encuentra dentro de un frasco de vidrio o de plástico transparente, la propagación "*In Vitro*", también se le conoce como MICROPROPAGACIÓN debido a la obtención de manejo de plantas en miniatura llamada "plántula".

También señala que la tasa de multiplicación es mucha más rápida que por métodos tradicionales, el conjunto de estas técnicas forman parte de la biotecnología.

LUCAS 2001, menciona que el cultivo *In Vitro* tiene las siguientes ventajas y desventajas:

VENTAJAS:

1. La multiplicación *In Vitro* es masiva y más rápida.
2. A veces es posible propagar especies *In Vitro*, que no pueden ser propagadas sexualmente.
3. El crecimiento de las plantas propagadas *In Vitro* es frecuentemente rejuvenecimiento y/o al hecho de que las plantas *In Vitro* se encuentran libres de enfermedades.
4. Utilizando el cultivo *In Vitro* es posible, conseguir una multiplicación libre de enfermedades, bien por una rigurosa selección del material inicial, o bien liberando el material inicial de enfermedades.
5. Homogeneidad del material.
6. Multiplicación todo el año. Porque se trabaja en condiciones ambientales controladas.

7. Ya que se necesita una cantidad de material relativamente pequeña para iniciar un cultivo *In Vitro*, se puede realizar una cuidadosa selección del mismo.
8. Ahorro de espacio con respecto de los sistemas tradicionales.
9. Conservación del material genético.
10. Fácil transporte e intercambio de material vegetal.

DESVENTAJAS:

1. Las plantas producidas *In Vitro* pueden mostrar características poco convenientes in vivo: Excesiva producción de ramas laterales y paso total a la fase juvenil.
2. La aclimatación de las plántulas es un proceso difícil y puede que muchas veces, los mayores porcentajes de la pérdida se presenten en esa etapa.
3. Difícil respuesta inicial de algunas especies y genotipos.
4. Variación de respuesta entre los genotipos.
5. Alto costo de establecimiento de un laboratorio, lo que incide indirectamente en el precio final de la planta producido de esta manera.
6. Necesidad de una mano de obra especializada.

3.3. FASES DE LA PROPAGACIÓN IN VITRO

Según CIRGEBV 1994, menciona que la propagación in Vitro comprende las siguientes fases:

FASE 0: SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA PLANTA MADRE

En esta fase se debe tener en cuenta que la planta a propagar deberá representar a la especie, no debe presentar signos de enfermedad y se debe seleccionar una modalidad de pre-tratamiento para volver funcional la estrategia que se adopte.

FASE I: CULTIVO ASÉPTICO Y ESTABLECIMIENTO

Fase muy importante ya que de ella dependerá que los cultivos que se estén manejando no se contaminen, con lo cual se disminuye los costos de producción.

FASE II: PRODUCCIÓN DE PROPÁGULOS ADECUADOS.

En este estadio las semillas, callos, raíces, meristemos, etc. Entran en desarrollo acelerado ya sea en su desarrollo en sí o en su producción de protocormos o embrioides, después de las cuales se inicia la diferenciación de estos en nuevas plántulas.

FASE III: PREPARACIÓN PARA EL CRECIMIENTO EN EL MEDIO AMBIENTE

Lo que se busca en esta etapa, es lograr que las plántulas ya diferenciadas inicien su enraizamiento y desarrollo con la cual estas plántulas estarán aptas para ser sometidas a la etapa de aclimatación.

FASE IV: ACLIMATACIÓN Y TRANSFERENCIA AL MEDIO AMBIENTE NATURAL

Referido a plántulas que van a iniciar un proceso en el cual serán introducidas progresivamente a condiciones de cultivo y/o campo definitivo, es una etapa donde los porcentajes de pérdidas pueden ser elevados, pero que con un manejo adecuado estas plántulas podrán ser acondicionadas para crecer en el medio ambiente natural.

FASE V: CRECIMIENTO EN EL CAMPO DEFINITIVO

Las plántulas en esta etapa, ya pueden desarrollar hoja y demás órganos, soportando con facilidad los cambios bruscos del ambiente.

3.4. GERMINACIÓN *IN VITRO*

Cuando la germinación de semillas se realiza en condiciones *In Vitro*, en algunos casos los requerimientos y factores implicados aumentan considerablemente, así, factores como pH, hidratos de carbono, sales minerales, vitaminas y gelificantes del medio de cultivo son importantes, siendo los reguladores de crecimiento, los que permiten controlar (inhibir/inducir) la germinación de las semillas.

La germinación *In Vitro* tiene ventajas respecto a la producida en condiciones naturales: puede solucionar casos de inhibición total de la germinación, permitir la germinación de semillas con intermediario obligado, aumentar la tasa de germinación, evitar el aborto embrionario, reducir el tiempo necesario y sincronizar la germinación.

La semilla viable culmina su función cuando tiene lugar la germinación, que se produce normalmente cuando hay agua suficiente, bastante oxígeno y la temperatura ronda límites fisiológicos. Si no se produce la germinación con todas las condiciones favorables, esto implica un estado de dormancia, un mecanismo de protección que se caracteriza por una disminución de la actividad metabólica. Tomado de **LÓPEZ y GONZALES 2005**.

MATOS 2002, presidente del Grupo Cubano de Restauración Ecológica, explicó que cada nueva plántula mantiene su individualidad genética, al provenir de semillas silvestres acopiadas en su lugar de origen. Mencionado por **LÓPEZ y GONZALES 2005**.

3.5. MEDIO DE CULTIVO

HURTADO y MERINO 1988, hacen mención que usando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes, así como su forma química adecuada, ha sido posible establecer cultivos para casi todas las partes de la planta en diversas especies vegetales. Mencionado por **RUIZ 2003**,

Según **HURTADO 1994**, menciona el éxito que se obtenga de un cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio nutritivo adecuado, como también del empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivo, etc. Usando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes, así como su forma química adecuada, ha sido posible establecer cultivos para casi todas las partes de una planta de diversas especies vegetales.

Por su parte **MEJIA 1994**, indica que probablemente las fórmulas estándares mejores conocidas son aquellas desarrolladas por **Murashige y Skoog 1962**. Este medio fue formulado inicialmente para desarrollar brotes de plantas herbáceas en las tres fases de cultivo.

3.6. PREPARACIÓN DEL EXPLANTE

Generalmente se considera que los tejidos intactos y sanos son asépticos internamente y que la principal tarea de limpieza del material para explante esta limitada a la esterilización superficial.

La solución de hipoclorito de sodio (NaOCl), en concentraciones de 1% a 3%, es una de las preparaciones más útiles como germicida y agente oxidante. Sirve para la esterilización superficial de materiales de todo tipo, siempre y cuando no se produzca lesiones debido a su acción blanqueadora, **ROCA y MROGINSKI 1991**.

MERINO 1994, a su vez manifiesta que la diferencia entre un laboratorio de tejidos vegetales y otro, son las condiciones de esterilidad que son de fundamental importancia por que todos los medios empleados contienen nutrientes, los cuales facilitan el desarrollo de muchas bacterias y hongos. Por estas y muchas razones el material vegetativo se desinfecta con Hipoclorito de Sodio superficialmente antes de iniciar un cultivo *in vitro*.

3.7. CULTIVO DE MERISTEMOS AXILARES

LUCAS 2001, menciona que el método por esquejes de segmentos nodales, consiste en el aislamiento de una yema, junto con una porción de tallo, para obtener un vástago a partir de la yema. Este es el método más natural de propagación vegetativa de las plantas *In Vitro*, ya que también puede aplicarse *In Vitro*. Cada una de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas, idénticas a la del ápice del tallo, pueden ser aislados sobre un medio nutritivo, intentándose así su desarrollo *In Vitro*, realizándose los repicados cuando son necesarios. Cuando se obtiene un número suficientemente grande de vástagos, estos son enraizados y finalmente se realiza la transferencia al suelo.

3.8. HORMONAS DE LAS PLANTAS

GONZALES y RACIMAN 2003, manifiestan que el desarrollo normal de una planta depende de la interacción de actores externos (luz, nutrientes, agua, temperatura) e internos (hormonas). Una definición abarcativa del término hormona es considerar bajo este nombre a cualquier producto químico de naturaleza orgánica que sirve de mensajero químico, ya que producido en una parte de la planta tiene como blanco otra parte de ella. Las fitohormonas pertenecen a cinco grupos conocidos de compuestos que ocurren en forma natural, se incluyen al etileno, auxina, giberlina, citoquininas y el ácido abscísico, cada uno con una estructura particular y activos a muy bajas concentraciones dentro de la planta, cada una de las cuales exhiben propiedades fuertes de regulación del crecimiento en plantas. Mientras que cada fitohormona ha sido implicada en un arreglo relativamente diverso de papeles fisiológicos dentro de las plantas y secciones cortadas de estas, el mecanismo preciso del cual funcionan no es aún conocido.

a. AUXINAS.

GONZALES y RACIMAN 2003, también manifiesta que el nombre auxina en griego significa crecer, y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación. El ácido indolacético (IAA) es la forma predominante, sin embargo, evidencias recientes sugieren que existen otras auxinas indólicas naturales.

Aunque las auxinas se encuentran en toda la planta, las más altas concentraciones se localizan en las regiones meristemáticas en

crecimiento activo. Se le encuentra tanto como molécula libre o en formas conjugadas inactiva. Cuando se encuentran conjugadas, la auxina se encuentra metabólicamente unida a otros compuestos de bajo peso molecular. Este proceso parece ser reversible. La concentración de auxina libre en la planta varía de 1 a 100 mg/kg peso fresco. En contraste, la concentración de auxina conjugada ha sido demostrada que en ocasiones es sustancialmente más elevada.

La auxina a sido implicada en la regulación de un número de procesos fisiológicos Promueve el crecimiento y diferenciación celular, y por lo tanto en el crecimiento en longitud de la planta.

Estimula el crecimiento y maduración de los frutos, floración, senectud, geotropismo, retardan la caída de las hojas, flores y frutos.

b. CITOQUININAS.

Son hormonas vegetales naturales que estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos. Inicialmente fueron llamadas quininas, sin embargo, debido al uso anterior de un grupo de compuestos de la fisiología animal, se adaptó el término citoquinina. Son producidos en las zonas de crecimiento, como los meristemas en las puntas de las raíces. La zeatina es una hormona de esta clase y se encuentra en el maíz, tomado de **GONZALES y RACIMAN 2003**. A su vez el mismo autor manifiesta que las mayores concentraciones de citoquininas se encuentran en embriones y frutas jóvenes en desarrollo, ambos sufriendo

una rápida división celular. La presencia de altos niveles de citoquininas puede facilitar su habilidad de actuar como una fuente demandante de nutrientes. Las citoquininas también se forman en las raíces y son translocadas a través del xilema hasta el brote. Sin embargo, cuando los compuestos se encuentran en las hojas son relativamente inmóviles.

3.9. NIVELES DE VARIACIÓN: AUXINAS & CITOQUININAS

MEJIA 1998, sugiere a continuación algunas variaciones:



Cuadro N° 01. Niveles de variación

HORMONAS	CONCENTRACIONES(mg/l)
AUXINA	
IBA	0 – 10
AIA	0 – 10
ANA	0 – 10
CITOQUININAS	
ZiP	0 – 30
Kinetina	0 – 10
BAP	0 – 10

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

La instalación del experimento se realizó en los ambientes del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto.

4.1.1. UBICACIÓN POLÍTICA

- Distrito : Morales
- Provincia : San Martín
- Departamento : San Martín

4.1.2. UBICACIÓN GEOGRÁFICA

- Longitud Oeste : 76° 22' 48,4"
- Latitud sur : 06° 29' 13,2"
- Altitud : 278 m.s.n.m.

4.2. CARACTERÍSTICAS DEL EXPERIMENTO

El trabajo de investigación estuvo dividido en dos **PRUEBAS (I y II)** correlacionadas, consistiendo el primero en la introducción a condición *In Vitro* de nueve accesiones de Sacha Inchi a partir de embriones, y el segundo en la micropropagación vegetativa, utilizando segmentos nodales tomados de vitroplántulas de Sacha Inchi de aquella accesión más sobresaliente introducida.

A. PRUEBA I: INTRODUCCIÓN DE EMBRIONES

a). Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar o randomizado (DCA), el cual consistió de nueve tratamientos con diez repeticiones respectivamente.

b). Tratamientos en estudio

Los tratamientos en estudio, estuvieron dados por nueve accesiones, a las cuales, estuvo dirigido la investigación, con diez repeticiones por cada accesión (ver Cuadro N° 02).

Cuadro N° 02. Tratamientos en estudio

TTOS	ACCESIONES*	DESCRIPCIÓN
T1	B2	Barranquita
T2	C2	Cumbaza
T3	CH	Chazuta
T4	MU2	Muyuy
T5	PR2	Pinto Recodo
T6	RPA	Rumizapa
T7	SH2	Shilcayo
T8	TB	Tabatinga
T9	TY	Tioyacu

* Cave mencionar que estas accesiones se tomaron a sugerencia de los investigadores de la estación experimental (INIEA), Ing. Emma Manco Céspedes y Blgo. Marco León Martínez; quienes consideraron la resistencia a plagas y enfermedades, el contenido de aceite y la vigorosidad de las plantas madres.

C). Distribución de los tratamientos

Cuadro N° 03. Distribución de los tratamientos

REPET. \ TTOS.	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
R1	X ₁								
R2	X ₂								
R3	X ₃								
R4	X ₄								
R5	X ₅								
R6	X ₆								
R7	X ₇								
R8	X ₈								
R9	X ₉								
R10	X ₁₀								

d). Análisis de varianza del experimento

Cuadro N° 04. Análisis de varianza del experimento

F. DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
Tratamientos	$t - 1 = 8$
Error	$t (r - 1) = 81$
Total	$r * t - 1 = 89$

B. PRUEBA II: INTRODUCCIÓN DE SEGMENTOS NODALES TOMADOS DE VITROPLANTULAS

a). Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar o randomizado (DCA), el cual consistió de cuatro tratamientos y cinco repeticiones respectivamente.

b). Tratamientos en estudio

Los tratamientos en estudio, estuvieron dados por tres niveles de concentración hormonal de BAP (bencil amino purina) y ANA (ácido naftaleno acético), mas un tratamiento testigo que no se aplicó hormona, con cinco repeticiones por cada tratamiento.

c). Niveles de concentración hormonal

Cuadro N° 05. Niveles de concentración hormonal/tratamiento

HORMONAS \ TRATAMIENTOS	Volumen de Aplicación (ml)			
	T1	T2	T3	T4
BAP 100 ppm de Concentración	0.00	0.10	0.20	0.30
ANA 100 ppm de Concentración	0.00	0.05	0.10	0.20

d). Distribución de los tratamientos

Cuadro N° 06. Distribución de los tratamientos

REP \ TTOS	T1	T2	T3	T4
R1	X ₁	X ₁	X ₁	X ₁
R2	X ₂	X ₂	X ₂	X ₂
R3	X ₃	X ₃	X ₃	X ₃
R4	X ₄	X ₄	X ₄	X ₄
R5	X ₅	X ₅	X ₅	X ₅

e). Análisis de varianza del experimento

Cuadro N° 07. Análisis de varianza del experimento

F. DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
Tratamientos	$t - 1 = 3$
Error	$t (r - 1) = 16$
Total	$r * t - 1 = 19$

4.3. CONDUCCIÓN DEL EXPERIMENTO

4.3.1. MEDIO DE CULTIVO EMPLEADO

Los medios de cultivos empleados se componen de sales minerales M&S (Murashige & Skoog 1962) a concentración total como base, a los cuales se los suplementó diferentes niveles de concentración de vitaminas y hormonas los cuales se muestran a continuación:

A. PRUEBA I: INTRODUCCIÓN DE EMBRIONES

Fórmula de medio de cultivo utilizado/litro:

M&S (Total) + Sucrosa (20 g) + Carbón activado (2 g) + Agente gelificante (Gel rite 2,5 g) + pH = 5.8

B. PRUEBA II: INTRODUCCIÓN DE SEGMENTOS NODALES TOMADOS DE VITROPLANTULAS

Fórmula de medio de cultivo utilizado/litro:

M&S (Total) + Concentraciones hormanales/TTO (ver Cuadro N° 05)
+ vitaminas Inositol (100ml) y tiamina (1ml) + Sucrosa (20 g) +
Carbón activado (2 g) + Agente gelificante (Gel rite 2,5 g) + pH = 5.8

4.3.2. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Se preparó 1,500 ml de medio de cultivo M&S Basal a concentración total, para la Prueba I y para la prueba II 500 ml suplementado con sucrosa (10 g), carbón activado (1 g) y gel rite (1.25 g) para ambos casos; solo para la segunda prueba se suministro al medio de cultivo bencil amino purina (BAP) y ácido naftaleno acético (ANA) a 100 ppm,

de acuerdo a las concentraciones puestos en estudio, se calibro el pH a 5.8; luego se procedió a dispensar 15 ml de medio de cultivo en cada tubo de ensayo de 150 mm x 250 mm para ambas pruebas, los cuales fueron tapados, rotulados y autoclavados a una presión de 15 lb por 20 minutos a una temperatura de 121 °C, siendo posteriormente enfriados a temperatura ambiente y almacenados en refrigeración a una temperatura de 25 °C.

4.3.3. RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL

El material vegetal se colectó del banco de germoplasma de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) de la Estación Experimental "El Porvenir" INIEA, ubicado en el km 14,5 carretera "Fernando Belaunde Terri" Marginal Sur.

Se colectó aquellos frutos que aun no han alcanzado la totalidad de su madurez fisiológica para facilitar el trabajo de escarificación e incisión del almendro y la semilla al momento de la siembra. Los frutos se colectaron en forma manual de 5 a 7 por accesión teniendo en cuenta las características agronómicas y fitosanitarias de la planta madre colocando en bolsas de papel separadas por accesión con sus respectivas etiquetas.

4.3.4. PREPARADO Y DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

A. PARA LA INTRODUCCIÓN DE EMBRIONES

Se lava los frutos con abundante agua corriente y jabón líquido a razón de 10 ml/l (ó 5gr/l de detergente comercial) durante 10 minutos, con la ayuda de una escobilla y una esponja se procederá a retirar las impurezas de la superficie del fruto, para posteriormente seccionar el fruto, de manera que se obtengan 4 cápsulas. Con la ayuda de la tijera podadora previamente lavado se procedió a abrir la cápsula, sin lastimar al almendro hasta exponerlo, colocando en una placa petrí para ser lavado nuevamente, tal como se observa en la **Foto N° 01 y 02**; luego con la ayuda de un alicate de mano previamente lavado se procedió a partir el almendro en dos tratando de no lastimar al endospermo realizar todo esté proceso de manera individual por cada accesión, y en los ambientes del lavatorio muy alejado de la área de siembra.



Foto N° 01. Escarificado de cápsulas **Foto N° 02.** Almendros expuestos

Una vez obtenido los endospermos se procedió a sumergir 10 de estos por accesión en cada frasco de vidrio estéril con solución desinfectante de Hipoclorito de Sodio a 1% de concentración durante

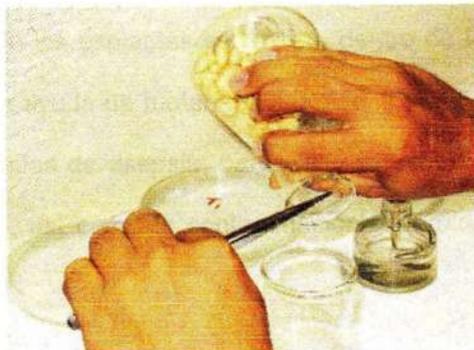


Foto N° 03. Desinfección

10 minutos se enjuago en agua destilada estéril en constante agitación por 2 minutos durante dos veces, como se muestra en la **Foto N° 03**. Realizando similar proceso para las nueve accesiones a ser introducidas.

B. PARA LA INTRODUCCIÓN DE SEGMENTOS NODALES

Los segmentos nodales se tomaron de la parte media del tallo de la accesión más sobresaliente introducida a partir de embriones, en este caso el tratamiento T_2 (C2); no fue necesaria su desinfección debido a que la procedencia del segmento nodal es estéril (libre de agente contaminante). Simplemente nos remitimos a trabajar tomando todas las precauciones y medias de asepsia para evitar contaminación en las unidades experimentales a evaluar.

4.3.5. SIEMBRA Y ESTABLECIMIENTO *IN VITRO*

Todo el proceso de siembra de los explantes se realizó, dentro de la cámara de flujo laminar, con la ayuda de material quirúrgico, tomando todas las precauciones y medidas de asepsia, para evitar el estrés y deshidratamiento del explante, así como la contaminación y pérdida de unidades experimentales.

Para la obtención de los embriones se procedió a realizar un corte muy superficial a poca profundidad por toda la circunferencia de la semilla, como se muestra en la **Foto N° 04**, luego tratar de palanquear de manera muy suave y delicada para no lastimar el embrión hasta partir en dos el endospermo. El lado que contiene el embrión se trató de levantar con el bisturí con mucho cuidado de no lastimar el embrión y los cotiledón, como se muestra en la **Foto N° 05**. Y poner en una placa petrí estéril con agua destilada estéril, para evitar su deshidratamiento hasta el momento de la siembra.

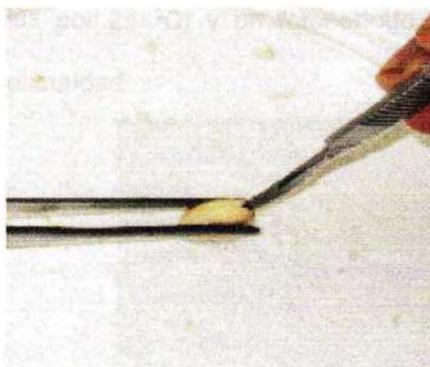


Foto N° 04. Corte del endospermo

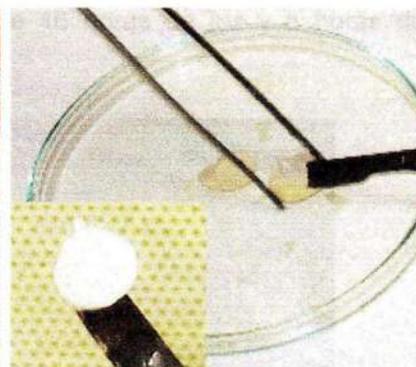


Foto N° 05. Obtención del embrión

Y para los segmentos nodales se procedió a extraer las vitroplántulas de los tubos de ensayo, con la ayuda de una pinza previamente flameado y enfriado para evitar posibles quemaduras, como se muestra en la



Foto N° 06, para ser colocados sobre una placa petri estéril. Luego con la pinza y el bisturí se realizó cortes en bisel a unos 1cm. aproximadamente tratando de que el entrenudo conteniendo la yema axilar quede en el centro.

Foto N° 06. Extracción

Obtenidos los explantes, se procedió a la siembra sumergiendo ligeramente en la superficie del medio de cultivo, como se muestra en la **Foto N° 07**, sembrando un explante (embrión y/o segmento nodal) por tubo de ensayo. Los tubos posteriormente fueron rotulados y sellados para ser llevados a la cámara de incubación donde se mantuvo a condición de iluminación y temperatura controlada (3000 lux por 25 °C) y un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.



Foto N° 07. Siembra y establecimiento *In Vitro*



4.4. PARAMETROS A EVALUAR

A. DESARROLLO EMBRIONARIO

La evaluación se realizó a los 3 días después de la siembra *In Vitro*, de los embriones, considerando los parámetros de:

a). Contaminación

El porcentaje de contaminación de los explantes se evaluó a partir del tercer día de la siembra hasta el séptimo día en todos los tratamientos establecidos, realizando en total 5 evaluaciones.

b). Germinación

El porcentaje de germinación de los embriones se evaluó a partir del tercer día de la siembra hasta el séptimo día en todos los tratamientos establecidos, realizando en total 5 evaluaciones.

c). Longitud de raíces

La longitud de raíces se evaluó semanalmente desde los 15 días hasta 50 días después de la siembra *In Vitro*, realizando 6 evaluaciones, midiendo la longitud del cuello de la raíz hasta la parte terminal de la raíz principal (cofia).

d). Número de raíces

Se evaluó semanalmente desde los 15 días hasta 50 días después de la siembra *In Vitro*, contemplando la evaluación todas las raíces tanto la principal, secundarias y demás, realizando 6 evaluaciones.

e). Longitud de tallo

Se evaluó semanalmente desde los 15 días hasta 50 días después de la siembra *In Vitro*, realizando 6 evaluaciones, midiendo la longitud del cuello de la raíz hasta la parte terminal del tallo (ápice).

f). Número de hojas

Se evaluó el número de hojas considerando el primer par de cotiledones ya diferenciados y los siguientes que fue emitiendo las plántulas, iniciando esta evaluación a los 15 días, hasta los 50 días después de la siembra *In Vitro*, realizando 6 evaluaciones.

g). Número de segmentos nodales

El número de segmentos nodales se evaluó semanalmente, iniciando esta evaluación a los 15 días, hasta los 50 días después de la siembra *In Vitro*, realizando 6 evaluaciones.

h). Porcentaje de supervivencia

Se realizó a los 50 días después de la siembra *In Vitro* evaluando y descartando aquellas unidades experimentales que por efecto de contaminación u otros motivos fisiológicos hayan muerto.

i). Velocidad de crecimiento

Este parámetro está estrechamente relacionado con el incremento en tamaño del tallo, se evaluó semanalmente desde los 15 días hasta 50 días después de la siembra *In Vitro*, realizando 6 evaluaciones,

midiendo la longitud del cuello de la raíz hasta la parte terminal del tallo (ápice).

B. DIFERENCIACIÓN DE SEGMENTOS NODALES

La evaluación de la diferenciación de las yemas axilares de los segmentos nodales se realizó a los 3 días de la siembra *In Vitro* considerando los siguientes parámetros a evaluar:

a). Contaminación

El porcentaje de contaminación de los explantes se evaluó a partir del tercer día de la siembra hasta el séptimo día en todos los tratamientos establecidos, realizando 5 evaluaciones.

b). Fenolización

El porcentaje de fenolización de los explantes se evaluó semanalmente hasta los 28 días después de la siembra *In Vitro* en todos los tratamientos establecido (ver cuadro N° 19 Grado de fenolización).

c). Número de brotes

El número de brotes se evaluó a partir de la segunda semana hasta 28 días después de la siembra *In Vitro*, en todos los tratamientos establecidos.

d). Longitud de brotes

Se evaluó semanalmente desde los 14 días hasta 28 días después de la siembra *In Vitro*, realizando 3 evaluaciones, midiendo la longitud, del segmento nodal hasta la parte terminal del brote (ápice).

e). Número de hojas

Se evaluó el número de hojas considerando folíolos primarios diferenciados o no, iniciando esta evaluación a los 14 días, hasta los 28 días después de la siembra *In Vitro*, realizando 3 evaluaciones.

f). Supervivencia

Se realizó hasta los 28 días después de la siembra *In Vitro* evaluando y descartando aquellas unidades experimentales que por efecto de contaminación u otros motivos fisiológicos hayan muerto.

V. RESULTADOS

5.1. DESARROLLO EMBRIONARIO

5.1.1. CONTAMINACIÓN

Cuadro N° 08: Consolidado de contaminación por tratamiento expresado en porcentaje y proporción a los 7 días después de la siembra *In Vitro*.

N° DE EVAL.	D.D.S*	T1		T2		T3		T4		T5		T6		T7		T8		T9	
		C	N/C																
1°	3	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
2°	4	0	100	10	90	30	70	10	90	10	90	10	90	10	90	0	100	0	100
3°	5	0	100	10	90	30	70	10	90	10	90	10	90	10	90	0	100	0	100
4°	6	0	100	10	90	30	70	10	90	10	90	10	90	10	90	0	100	0	100
5°	7	0	100	10	90	30	70	10	90	10	90	10	90	10	90	0	100	0	100
TOTAL (%)		0%		10%		30%		10%		10%		10%		10%		0%		0%	
PROPORCIONAL		0/10		1/10		3/10		1/10		1/10		1/10		1/10		0/10		0/10	

Leyenda: C = Contaminado.
N/C = No contaminado.
* = Días después de la siembra.

5.1.2. GERMINACIÓN

Cuadro N° 09: Consolidado de germinación por tratamiento expresado en porcentaje y proporción a los 7 días después de la siembra *In Vitro*.

N° DE EVAL.	D.D.S.	T1		T2		T3		T4		T5		T6		T7		T8		T9	
		SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
1°	3	80	20	70	100	30	70	70	30	30	70	90	10	60	40	60	40	100	0
2°	4	100	0	100	90	60	40	100	0	100	0	100	0	60	40	60	40	100	0
3°	5	100	0	100	90	60	40	100	0	100	0	100	0	80	20	70	30	100	0
4°	6	100	0	100	90	60	40	100	0	100	0	100	0	80	20	90	10	100	0
5°	7	100	0	100	90	60	40	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
TOTAL (%)		100%		100%		60%		100%		100%		100%		100%		100%		100%	
PROPORCIONAL		10/10		10/10		06/10		10/10		10/10		10/10		10/10		10/10		10/10	

5.1.3. LONGITUD DE RAÍZ

Cuadro N° 10: Diferencia de longitud promedio de raíz entre tratamientos a los 50 días después de la siembra *In Vitro*.

F. de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F. Cal	Signifi.
Tratamientos	8	26,2001	3,275	62,6392	**
Error	81	4,2350	0,0523		
Total	89	30,4351	0,3273		

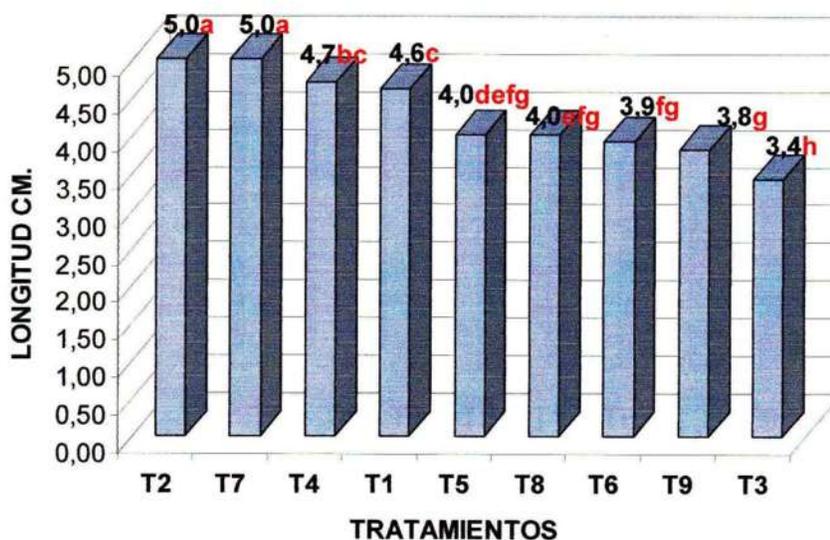
** : Altamente significativo.

CV= 5,24 %

R = 86,09 %

X = 4,27

Gráfico N° 01: Prueba de Duncan para medir la diferencia de longitud promedio de raíz entre tratamientos a los 50 días después de la siembra *In Vitro*.



5.1.4. NÚMERO DE RAÍCES

Cuadro N° 11: Diferencia de número de raíces promedio entre tratamientos a los 50 días después de la siembra *In Vitro*.

F. de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F. Cal	Signifi.
Tratamientos	8	85,3554	10,6694	183,4789	**
Error	81	4,7102	0,0582		
Total	89	90,0656	10,7276		

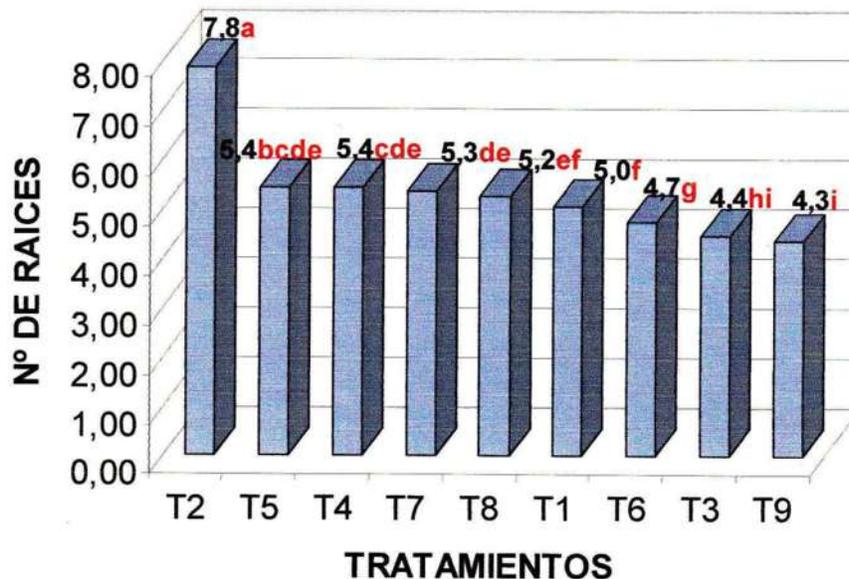
** : Altamente significativo.

CV = 4,64 %

R² = 94,77 %

X = 5,28

Gráfico N° 02: Prueba de Duncan para medir la diferencia del número de raíces promedio entre tratamientos a los 50 días después de la siembra *In Vitro*.



5.1.5. LONGITUD DE TALLO

Cuadro Nº 12: Diferencia de longitud de raíces promedio entre tratamientos a los 50 días después de la siembra *In Vitro*.

F. de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F. Cal	Signifi.
Tratamientos	8	52,0345	6,5043	261,446	**
Error	81	2,0151	0,0249		
Total	89	54,0497	6,5292		

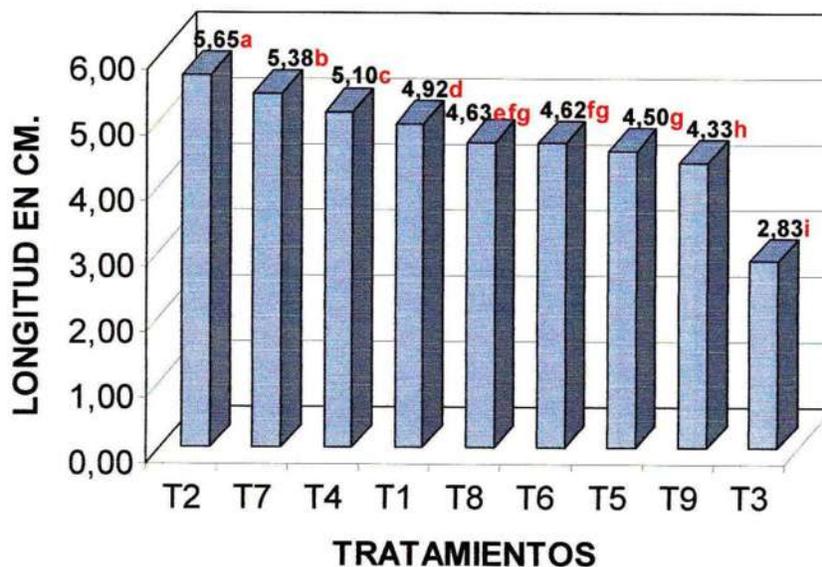
** : Altamente significativo.

CV = 3,72 %

R² = 96,27 %

X = 4,66

Gráfico Nº 03: Prueba de Duncan para medir la diferencia de longitud de raíces promedio entre tratamientos a los 50 días después de la siembra *In Vitro*.



5.1.6. NÚMERO DE HOJAS

Cuadro N° 13: Diferencia de número de hojas promedio por tratamientos a los 50 días después de la siembra *In Vitro*.

F. de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F. Cal	Signifi.
Tratamientos	8	12,6223	1,5778	99,8323	**
Error	81	1,2802	0,0158		
Total	89	13,9024	1,5936		

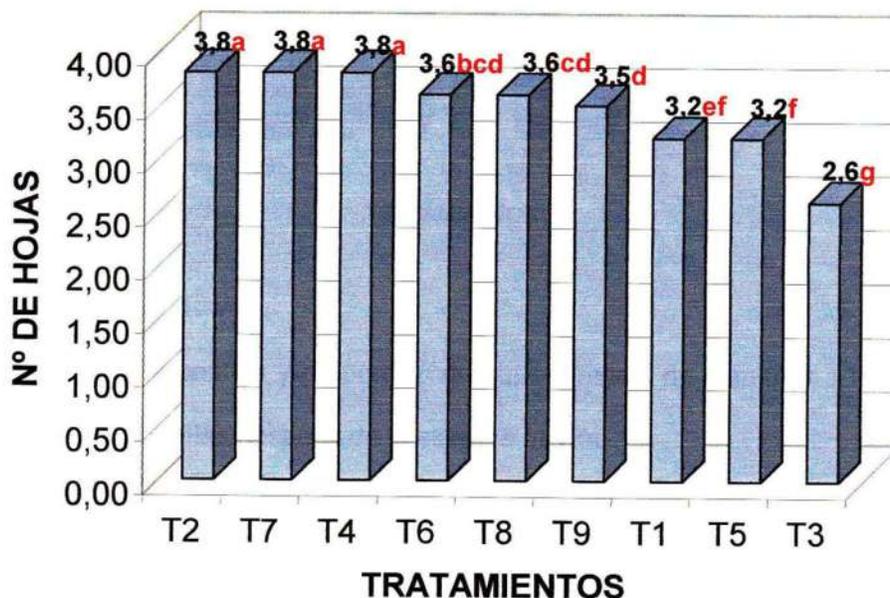
** : Altamente significativo.

CV = 4,09 %

R² = 90,79 %

X = 3,46

Gráfico N° 04: Prueba de Duncan para medir la diferencia del número de hojas promedio por tratamientos a los 50 días después de la siembra *In Vitro*.





5.1.7. NÚMERO DE SEGMENTOS NODALES

Cuadro N° 14: Diferencia de número de segmentos nodales promedio por tratamiento a los 50 días después de la siembra *In Vitro*.

F. de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F. Cal	Signifi.
Tratamientos	8	2,2627	0,2828	44,3324	**
Error	81	0,5168	0,0064		
Total	89	2,7795	0,2892		

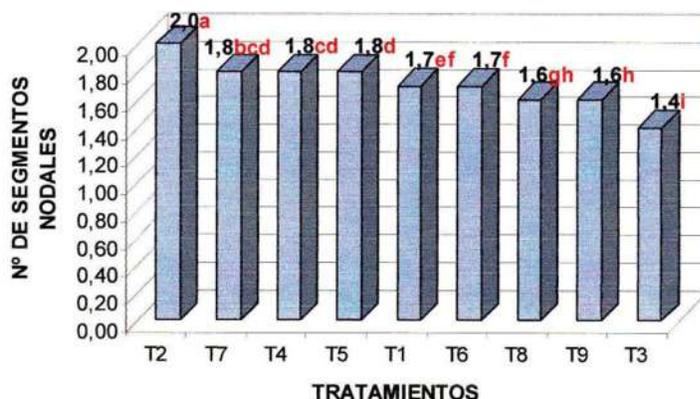
** : Altamente significativo.

CV = 5,85 %

R² = 81,41 %

X = 1,71

Gráfico N° 05: Prueba de Duncan para medir la diferencia de número de segmentos nodales promedio por tratamiento a los 50 días después de la siembra *In Vitro*.



5.1.8. SUPERVIVENCIA

Cuadro N° 15: Porcentaje y proporción de supervivencia de plántulas a los 50 días después de la siembra *In Vitro*.

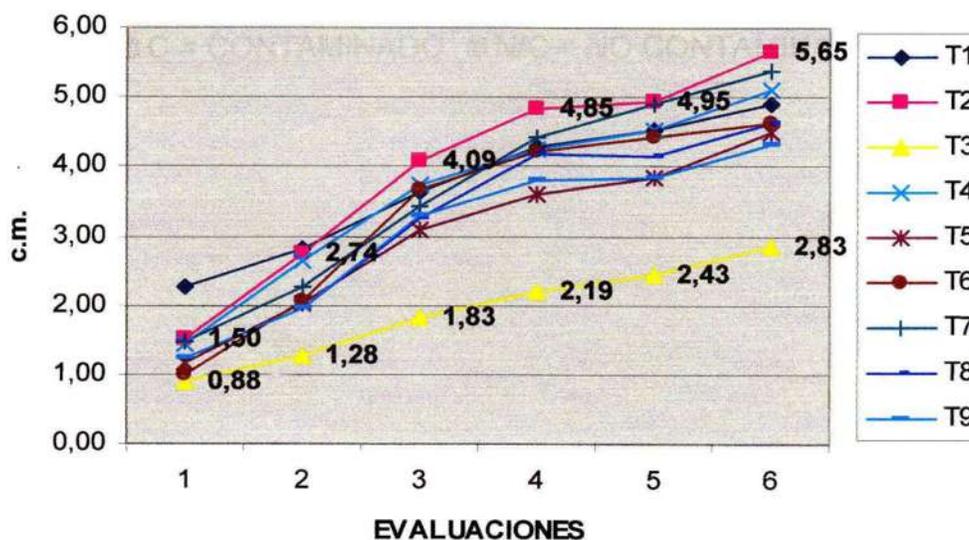
TTOS	SUPERVIVENCIA A LOS 50 DIAS DESP. DE LA SIEMBRA								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
PORCENTAJE	100%	90%	70%	90%	90%	90%	90%	100%	100%
PROPORCIÓN	10/10	9/10	7/10	9/10	9/10	9/10	9/10	10/10	10/10

5.1.9. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

Cuadro Nº 16: Diferencia de velocidad de crecimiento promedio por tratamiento a los 50 días después de la siembra *In Vitro*.

Nº DE EVALUACIÓN	DIAS DESP. DE LA SIEMBRA	TRATAMIENTOS								
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
1º	15	2,25	1,50	0,88	1,44	1,15	1,01	1,49	1,24	1,24
2º	22	2,82	2,74	1,28	2,63	2,03	2,05	2,26	1,95	1,95
3º	29	3,63	4,09	1,83	3,74	3,09	3,66	3,42	3,25	3,28
4º	36	4,27	4,85	2,19	4,26	3,61	4,23	4,43	4,19	3,82
5º	43	4,54	4,95	2,43	4,51	3,85	4,41	4,89	4,15	3,85
6º	50	4,92	5,65	2,83	5,10	4,50	4,62	5,38	4,63	4,33

Gráfico Nº 06: Curva de velocidad de crecimiento promedio por tratamiento a los 50 días después de la siembra *In Vitro*.



5.2. DIFERENCIACIÓN DE SEGMENTOS NODALES

5.2.1. CONTAMINACIÓN

Gráfico N° 07: Consolidado de contaminación por tratamiento expresado en porcentaje a los 28 días después de la siembra *In Vitro*.



5.2.2. Fenolización

Cuadro N° 18: Número total de explantes fenolizados en 4 evaluaciones a los 28 días después de la siembra *In Vitro*.

Tratamientos	Grados de fenolización a los 28 días después de la siembra				
	F0	F1	F2	F3	F4
T ₁	4	—	1	—	—
T ₂	4	1	—	—	—
T ₃	1	3	1	—	—
T ₄	—	—	1	1	3

Cuadro N° 19: Grados de fenolización

Grado	% fenolización	Interpretación
F0	0	No fenolizado
F1	Hasta 10	Leve
F2	Hasta 35	Medio
F3	Hasta 80	Alto
F4	Hasta 100	Muerte

Fuente: León (1995).

5.2.3. Número de brotes

Cuadro N° 20: Influencia de los tratamientos sobre el número de brotes promedio por segmento nodal inducido a los 28 días después de la siembra *In Vitro*.

F. de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F. Cal	Signifi.
Tratamientos	3	6,9104	2,3035	887,5519	**
Error	16	0,0420	0,0026		
Total	19	6,9524	2,3061		

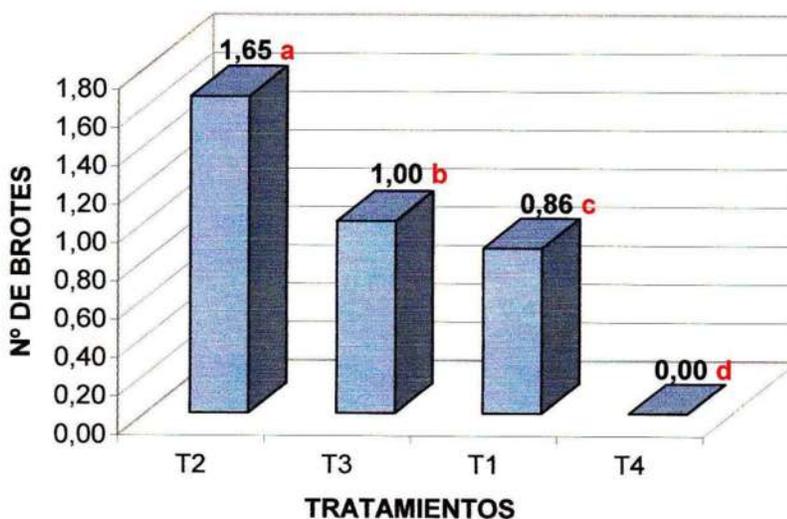
** : Altamente significativo.

CV = 8,3 %

R² = 99,40 %

X = 0.66

Gráfico N° 08: Prueba de Duncan para la influencia de los tratamientos en el número de brotes promedio por segmento nodal a los 28 días después de la siembra *In Vitro*.



5.2.4. Longitud de brotes

Cuadro N° 21: Influencia de los tratamientos sobre la longitud de brotes promedio por segmento nodal inducido a los 28 días después de la siembra *In Vitro*.

F. de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F. Cal	Signifi.
Tratamientos	3	5,9084	1,9695	2129,4082	**
Error	16	0,0148	0,0009		
Total	19	5,9232	1,9704		

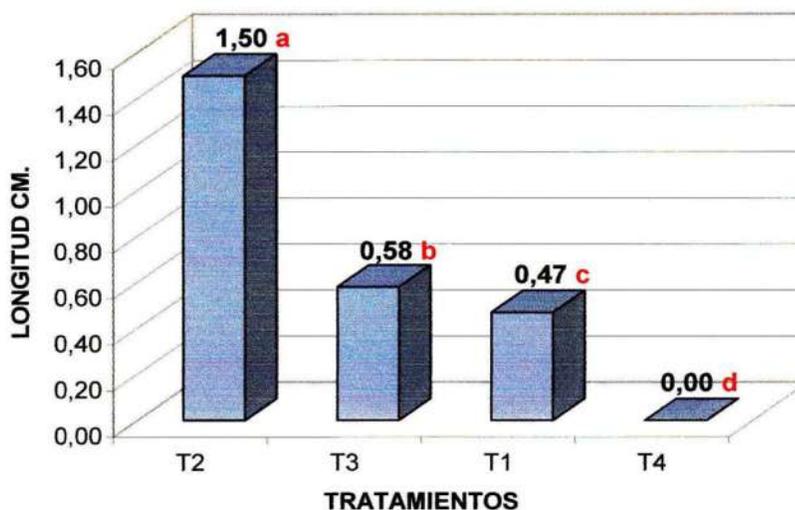
** : Altamente significativo.

CV = 4,94 %

R² = 99,75%

X = 0,64

Gráfico N° 09: Prueba de Duncan para la influencia de los tratamientos en la longitud promedio de raíces por meristemo inducido a los 28 días después de la siembra *In Vitro*.



5.2.5. Número de hojas

Cuadro N° 22: Influencia de los tratamientos sobre el número de hojas promedio en los brotes obtenidos a los 28 días después de la siembra *In Vitro*.

F. de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F. Cal	Signifi.
Tratamientos	3	6,0375	2,0125	2146,4810	**
Error	16	0,0150	0,0009		
Total	19	6,0525	2,0134		

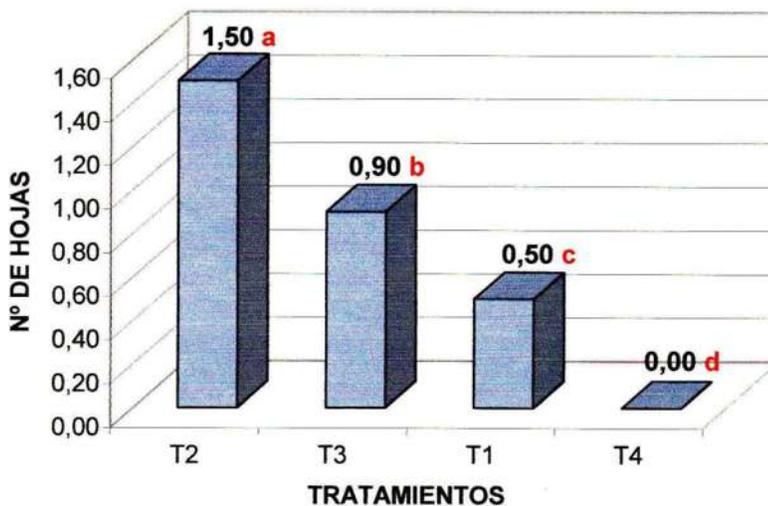
** : Altamente significativo.

CV. = 4,33 %

R² = 99,75 %

X = 0.73

Gráfico N° 10: Prueba de Duncan para la influencia de los tratamientos en el número de hojas promedio por meristemo inducido a los 28 días después de la siembra *In Vitro*.



5.2.6. Porcentaje de supervivencia

Cuadro N° 23: Porcentaje y proporción de supervivencia de plántulas a los 28 días después de la siembra *In Vitro*.

TRATAMIENTOS	SUPERVIVENCIA A LOS 50 DIAS DESP. DE LA SIEMBRA			
	T1	T2	T3	T4
PORCENTAJE	100%	100%	80%	60%
PROPORCIÓN	5/5	5/5	1/5	2/5

VI. DISCUSIONES

6.1. DESARROLLO EMBRIONARIO

6.1.1. CONTAMINACIÓN

La contaminación obtenida durante la introducción *In Vitro* de los embriones de cada accesión puesta en estudio, fue bajo si consideramos, que el material proveniente fue de campo y el número de unidades experimentales trabajados por un solo operador, siendo estos posibles factores influyentes en la contaminación obtenida, el cual se observa en el cuadro N° 08.

6.1.2. GERMINACIÓN

En la mayoría de tratamientos trabajados se obtuvo una respuesta heterogénea en cuanto a la germinación a los 7 primeros días de la introducción a condiciones *In Vitro*, esto posiblemente a una mejor respuesta por absorción osmótica, de los nutrientes presentes en el medio por algunos embriones. Pero durante las posteriores evaluaciones se fueron homogenizando hasta un 100% de germinación excepto el tratamiento T3 (CH) que obtuvo un 60% de germinación, el cual se puede observar en el cuadro N° 09.

CABELLO 2005, menciona que los ensayos con embriones extirpados cultivados *In Vitro* demuestran que los embriones absorben agua, se activan, y germinan rápidamente, por lo que la(s) barrera(s) a la germinación se ubicaría en otros tejidos (testa y/o endospermo).

6.1.3. LONGITUD DE RAÍCES

En el cuadro N° 10 y gráfico N° 01 se presenta el análisis de varianza y la prueba de Duncan respectivamente para los promedios de los tratamientos puestos en estudio respecto a la longitud de raíces.

La prueba de f , nos demuestra una alta significancia estadística para los promedios obtenidos; esta alta significancia estadística se corrobora con la prueba de Duncan, gráfico N° 01.

Los valores obtenidos para el C.V. con 5,24 % y R^2 con 86,09 % demuestran la confiabilidad de la información obtenida durante la investigación y la alta determinación entre la variable evaluada y los tratamientos en estudio.

El análisis de Duncan para el respectivo parámetro evaluado (gráfico N° 01) nos muestra el nivel de diferencia estadística, donde los tratamientos T_2 (C2) y T_7 (SH2) con 5,0 cm en promedio de longitud son los más elevados, superando estadísticamente al resto de tratamientos. Seguido por el T_4 (MU2) y el T_1 (B2) con promedios de 4,7 y 4,6 cm respectivamente, siendo el tratamiento T_3 (CH) quien obtuvo el resultado más bajo en cuanto al parámetro evaluado con un promedio de 3,4 cm de longitud de raíz.

6.1.4. NÚMERO DE RAÍCES

En el cuadro N° 11 y gráfico N° 02 se presenta el análisis de varianza y la prueba de Duncan respectivamente para los promedios de los tratamientos puestos en estudio respecto al número de raíces.

La prueba de f , nos demuestra una alta significancia estadística para los promedios; esta alta significancia estadística se corrobora con la prueba de Duncan, gráfico N° 02.

Los valores obtenidos para el C.V. con 4,64 % y R^2 con 94,77 % demuestran la confiabilidad de la información obtenida durante la investigación.

El análisis de Duncan para el parámetro evaluado (gráfico N° 02) nos muestra el nivel de diferencia estadística, donde el T_2 (C2) con 7,8 obtuvo el promedio más elevado superando al resto de tratamientos. Seguido por el T_5 (PR2) y T_4 (MU2) con promedios de 5,4 respectivamente y a su vez mantiene una relación estadística no significativa, con el T_7 (SH2) y T_8 (TB) con promedios de 5,3 y 5,2. Siendo el tratamiento T_3 (CH) quien obtuvo el resultado más bajo en cuanto al parámetro evaluado con un promedio de 4,3 raíces. **ARDITTI 1977**, menciona que las plántulas responden a los cambios de medio y la composición que contengan, como el caso de auxinas que actúa directamente en la formación de raíces, así como las condiciones



ambientales controladas (Temperatura, luz, humedad relativa, fotoperíodo 16/8).

6.1.5. LONGITUD DE TALLO

En el cuadro N° 12 y gráfico N° 03 se presenta el análisis de varianza y la prueba de Duncan respectivamente para los promedios de los tratamientos puestos en estudio respecto a la longitud de tallo.

La prueba de f , nos demuestra una alta significancia estadística para los promedios; esta alta significancia estadística se corrobora con la prueba de Duncan, gráfico N° 03.

Los valores obtenidos para el C.V. con 3,72 % y R^2 con 96,27 % demuestran la confiabilidad de la información obtenida durante la investigación.

El análisis de Duncan para el parámetro evaluado (gráfico N° 03) nos muestra el nivel de diferencia estadística, donde el T_2 (C2) con 5,65 cm. obtuvo el promedio más elevado superando al resto de tratamientos, seguido del T_7 (SH2) y T_4 (MU2) con 5,38 y 5,10 cm. respectivamente, manteniéndose el resto en el mismo rango a excepción del único tratamiento, el T_3 (CH) que obtuvo una longitud baja de 2,83 cm.; esto posiblemente debido a un proceso de vitrificación presente en este tratamiento.

6.1.6. NÚMERO DE HOJAS

En el cuadro N° 13 y gráfico N° 04 se presenta el análisis de varianza y la prueba de Duncan respectivamente para los tratamientos puestos en estudio respecto al número de hojas promedios presentes.

La prueba de f , muestra una alta significancia estadística para los promedios obtenidos, esta alta significancia estadística se corrobora con la prueba de Duncan, gráfico N° 04.

Los valores obtenidos para el C.V. con 4,09 % y R^2 con 90,79 % Corroboran la confiabilidad de la información obtenida durante la investigación.

El análisis de Duncan para el parámetro evaluado (gráfico N° 04) nos muestra el nivel de diferencia estadística, donde los tratamiento que mejor resultado obtuvieron fueron el T_2 (C2), T_7 (SH2) y T_4 (MU2) con 3,83 hojas en promedio respectivamente, seguido de los tratamientos T_6 (RPA), T_8 (TB) con 3,60, del T_9 (TY) con 3,5 y del T_1 (B2) y T_5 (PR2) con promedios de 3,2; siendo el único tratamiento el T_3 (CH) quien obtuvo el número de hojas en promedio más bajo de 2,6 hojas.

6.1.7. NÚMERO DE SEGMENTOS NODALES

En el cuadro N° 14 y gráfico N° 05 se presenta el análisis de varianza y la prueba de Duncan respectivamente para los promedios de los tratamientos puestos en estudio respecto al número de segmentos nodales presentes en cada tallo.

Los valores obtenidos para el C.V. con 5,85 % y R^2 con 81,41 % demuestran la confiabilidad de la información obtenida durante la investigación.

Donde se puede afirmar que a mayor longitud de raíz y tallo hay un mayor número de hojas y segmentos nodales, por tal razón el tratamiento T_2 (C2) obtuvo 2 segmentos nodales en promedio por plántula siendo este el promedio más alto, seguido del T_7 (SH2), T_4 (MU2) y T_5 (PR2) con 1,8 segmentos en promedio respectivamente, manteniéndose el resto en el rango de 1,7 a 1,6 segmentos, a excepción del único tratamiento T_3 (CH) que obtuvo 1,4 segmentos en promedio por plántula obtenida. Estando relacionado muy estrechamente la longitud del tallo con el número de segmentos.

6.1.8. SUPERVIVENCIA

El número de embriones muertos no afectó el normal establecimiento y desarrollo de las evaluaciones en los parámetros puestos en estudio, pues el porcentaje de mortalidad total fue muy bajo 8,89 % y la gran mayoría de los embriones sembrados presentaron un normal desarrollo hasta el final del período evaluado, tal como se puede observar en el cuadro N° 15

6.1.9. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

El tratamiento T₂ (C2) presentó mejor resultado en cuanto al crecimiento de tallo, con un promedio de 5,65 cm. de longitud, seguidos por el T₇ (SH2), con un promedio de 5,38 cm. de longitud, estos tratamientos presentaron los mejores resultados en cuanto a la velocidad de crecimiento debiéndose esto a la mejor asimilación de nutrientes por ósmosis de los embriones, el tratamiento que presentó un leve desarrollo fue el tratamiento T₃ (CH) con un promedio de 2,83 cm.; tal como lo demuestra el gráfico N° 06 manifestando la exigencia de sustancias hormonales por esta acesión, para un mejor desarrollo.

6.2. DIFERENCIACIÓN DE SEGMENTOS NODALES

6.2.1. Contaminación

HARTMAN y KESTER 1991, manifiestan que para la propagación de tallos y meristemas el procedimiento de desinfección debe iniciarse sumergiendo a los explantes en alcohol (70 al 95%) para darles una esterilización superficial preliminar. Pero para la presente investigación no fue necesario esto, debido a que el explante utilizado para la siembra (segmento nodal) ha sido proveniente de un ambiente estéril libre de contaminación. Por tal motivo la contaminación obtenida durante la introducción y el desarrollo *In Vitro* de los explantes fue nula, no hubo presencia de agentes contaminantes en ninguno de las unidades experimentales de los tratamientos en estudio tal como lo demuestra el cuadro N° 17 y el gráfico N° 07.

6.2.2. Fenolización

Durante el desarrollo *In Vitro* de los explantes introducidos se presentaron diferentes grados de fenolización tal como se observa en el cuadro N° 18 donde se expresa los segmentos fenolizados. El grado de fenolización F3 y F4 (ver cuadro N° 19), que corresponde a un porcentaje de fenolización crítico para el desarrollo del segmento en crecimiento y posteriormente provoca la muerte de este.

Los resultados de fenolización obtenidos de acuerdo a las evaluaciones dadas en el cuadro N° 18 muestran que el T4, presenta un mayor número de explantes fenolizados en la escala de F2, F3 y F4 (ver

cuadro N° 19). Esto debido a que todo tejido vegetal al ser sometido a corte libera fenoles al ponerse en contacto con el medio de cultivo. ROCA 2002, menciona que los meristemos apicales presentan menos problemas con la fenolización que los meristemos axilares utilizados de segmentos de tallo empleados para la propagación *In Vitro*.

HARTMAN y KESTER 1991, además menciona que las plantas de algunas especies contienen sustancias endógenas que exudan de las superficies cortadas al medio del cultivo, esos exudados se pueden lixiviar o lavar con cambios frecuentes de agua.

6.2.3. Número de brotes

En el cuadro N° 20 y gráfico N° 08 se presenta el análisis de varianza y la prueba de Duncan respectivamente para los promedios de los tratamientos puestos en estudio respecto al número de brotes.

La prueba de *f*, demuestra una alta significancia estadística para los promedios obtenidos en los tratamientos en estudio; esta alta significancia estadística se corrobora con la prueba de Duncan.

Los valores obtenidos para el C.V. con 8,3 % y R^2 con 99,40 % Corroboran la confiabilidad de la información obtenida durante la investigación.

El análisis de Duncan para el parámetro evaluado (gráfico N° 08) nos muestra el nivel de diferencia estadística, donde el tratamiento que mejor resultado obtuvo fue el T₂ con 1,65 brotes en promedio superando estadística y numéricamente al resto de los tratamientos, seguido T₃ con 1,0 y del T₁ con 0,86 brotes, siendo el tratamiento T₄ quien no obtuvo respuesta alguna a la concentración hormonal propuesta.

Estos resultados obtenidos tienen una relación con el contenido químico de cada medio de cultivo puesto en estudio referente a la emisión y crecimiento de los brotes, obteniendo la mayor cantidad de brotes en el T₂ que posee una concentración hormonal de 0.10 y 0.05 ppm. (auxina – citoquinina) afirmando de esta manera la proporción hormonal equilibrada que se aproxima a los requerimientos para la propagación clonal de Sacha Inchi a través de segmentos nodales; el cual ha influido en este resultado. Así mismo la no presencia de brotes en el T₄, posiblemente se deba al alto contenido hormonal propuesto en este tratamiento.

PETERSON y FLETCHER, en 1975, reportan que esta demostrado también que las yemas *In Vitro* no responden al tratamiento con 6-BAP pero si lo hacen cuando se trata un segmento de tallo con una yema, lo cual concuerda con nuestros resultados el T₂ más no en el T₄.

Además, es importante la adición de auxinas y citoquininas en los medios de cultivo desarrollados para la diferenciación de órganos, ya que las concentraciones de éstas a nivel de órganos sujetos a dominancia apical son bajas; por lo tanto su adición promueve la multiplicación y división celular, tal y como lo mencionan MATHEWS et al 1976 al reportar que los brotes pueden ser continuamente incubados en medio semisólido conteniendo, ANA y AIB.

6.2.4. Longitud de brote

En el cuadro N° 21 y gráfico N° 09 se presenta el análisis de varianza y la prueba de Duncan respectivamente para los promedios de los tratamientos puestos en estudio respecto a la longitud de tallo.

La prueba de f , nos demuestra una alta significancia estadística para los promedios; esta alta significancia estadística se corrobora con la prueba de Duncan, gráfico N° 09.

Los valores obtenidos para el C.V. con 4,94 % y R^2 con 99,75 % demuestran la confiabilidad de la información obtenida durante la investigación.

El análisis de Duncan para el parámetro evaluado (gráfico N° 09) nos muestra el nivel de diferencia estadística, donde el T_2 con 1,5 cm. obtuvo el promedio más elevado superando al resto de tratamientos, seguido del T_3 y T_1 con 0,58 y 0,47 cm. respectivamente, a excepción

del único tratamiento, el T₄ quien no obtuvo ninguna respuesta a la concentración hormonal propuesta en este tratamiento.

6.2.5. Número de hojas

En el cuadro N° 22 y gráfico N° 10 se presenta el análisis de varianza y la prueba de Duncan respectivamente para los promedios de los tratamientos puestos en estudio respecto al número de hojas presentes en el brote inducido.

La prueba de f , arrojó una alta significancia estadística para los promedios obtenidos en los tratamientos en estudio; esta alta significancia estadística se corrobora con la prueba de Duncan en gráfico N° 10.

Los valores obtenidos para el C.V. con 4,33 % y R^2 con 99,75 % confirman la confiabilidad de la información obtenida durante la investigación.

El análisis de Duncan nos muestra el nivel de diferencia estadística, donde se corrobora la significancia obtenida de los tratamientos en el que el T₂, con un promedio de 1,5 obtuvo el mayor promedio de hojas y manteniendo una relación significativa alta estadística y numéricamente con respecto al T₃ y T₁ con un promedio de 0,90 y 0,50. Así mismo el T₄ no obtuvo respuesta al medio tanto en la inducción de brotes como en la formación de hojas. Estos resultados

tiene que ver mucho con la con la composición de los medios propuestos.



6.2.6. Supervivencia

Este parámetro estuvo influenciado directamente por el porcentaje de fenolización obtenido durante el desarrollo del explante, presentando un índice de mortalidad de explantes en el tratamiento T3 y T4 de 20 y 40% respectivamente. Esto debido a la sudoración de fenoles producidos por los explantes al momento del corte durante la siembra.



VII. CONCLUSIONES

- 7.1. Se logró establecer un protocolo eficiente de introducción a condiciones *In Vitro* de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L) a través de embriones, demostrando que el medio de cultivo y la técnica empleada para tal fin es la más adecuada.
- 7.2. El tratamiento que mostró mejor comportamiento agronómico y precocidad en el desarrollo a nivel embrionario y como plántula fue el tratamiento T₂ (C2), seguido del T₇ (SH2) y demás tratamientos, a excepción del tratamiento T₃ (CH) que obtuvo resultados inferiores a los tratamientos antes mencionados.
- 7.3. La mayor eficiencia del medio de cultivo puesto en estudio como tratamiento para la propagación clonal fue el T₂ a una concentración hormonal de 0,10 ppm. de BAP y 0.05 ppm. de ANA, mostrando una mayor inducción hormonal de la yema axilar del segmento nodal y un desarrollo de brotes y hojas superior a los demás tratamientos.

VIII. RECOMENDACIONES

- 8.1. No realizar ningún otro proceso de manipulación y/o desinfección al embrión expuesto debido a lo susceptible y delicado que resulta ser el tejido embrionario, se recomienda si no se va a sembrar inmediatamente poner en agua destilada estéril para evitar el deshidratamiento y estrés del embrión, pues de lo contrario podríamos tener problemas en la germinación y desarrollo de las plántulas.

- 8.2. Realizar control fitosanitario a las plantaciones en campo para reducir los riesgos de contaminación, días antes de ser llevados al laboratorio para su introducción a condición *In Vitro*, además la carga de siembra por operario por día no debe pasar los 50 embriones, puesto que el nivel de precisión se ve influenciado por el cansancio y agotamiento físico pudiendo ser esto un factor que contribuya a la contaminación y al desarrollo de la plántula.

- 8.3. Realizar otros trabajos referentes a la prueba de medios de cultivos con otras combinaciones y concentraciones hormonales que permitan una buena inducción y diferenciación de tejidos meristemáticos en la propagación clonal, para obtener de esta manera plántulas diferenciadas y aptas para ser aclimatadas.

IX. RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de Tejidos vegetales de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, titulado “Propagación sexual y clonal de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L) bajo condiciones *In Vitro*.”, así mismo tuvo como objetivos: Desarrollar un protocolo eficiente para la propagación sexual mediante embriones y clonal a través de segmentos nodales, evaluando el comportamiento de plántulas y la eficiencia de los medios puestos en estudio en la inducción y diferenciación de las yemas axilares ubicadas en los segmentos nodales bajo condiciones *In Vitro*.

Se utilizó un Diseño Experimental Completamente al Azar para ambas pruebas realizadas, en la prueba I (propagación sexual) se contó con 9 tratamientos y 10 observaciones, siendo los tratamientos semillas de nueve accesiones (ecotipos) procedentes del banco de germoplasma del Instituto Nacional de investigación y Extensión Agraria - INIEA “El Porvenir”. En la prueba II (propagación clonal) se contó con 4 tratamientos y 5 repeticiones, siendo los tratamientos medios de cultivo con diferentes concentraciones hormonales.

Los resultados demostraron que los embriones del tratamiento T₂ (C₂) a los 2 días de la siembra germinaron y a la semana se diferenciaron, obteniendo plántulas completas y vigorosas. En el caso de la propagación clonal el tratamiento T₂ a 0,10 y 0.05 ppm. de concentración hormonal de BAP y ANA en el medio de cultivo fue el que mejor resultado presentó en cuanto a la inducción hormonal mas no en la diferenciación.

SUMMARY

The present investigation work was carried out in the laboratory of cultivation of Fabrics vegetables of the National University of San Martín - Tarapoto, titled "Sexual propagation and clonal of sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L) | lower conditions In Vitro"., likewise it's had as objectives: To develop an efficient protocol for the sexual propagation by means of embryos and clonal through nodal segments, evaluating the seedling behavior and the efficiency of the on means in study in the induction and differentiation of the axillaries yolks located in the nodal segments under conditions In Vitro.

An Experimental Design was in use completely at random for both realized tests(proofs), in the test(proof) I (sexual spread) one possessed(relied on) nine treatments and 10 observations, being the treatments seeds of nine accessions (ecotypes) proceeding from the bank of germ plasma of the National Institute of investigation and Agrarian Extension - INIEA " The Future ". In the test (proof) (spread clonally) one counted (told) the lInd with 4 treatments and 5 repetitions, being the average treatments of culture (culturing) with different hormonal concentrations.

The results demonstrated that the embryos of the treatment T2 (C2) to 2 days of the sowing germinator and a week they differed, obtaining plantlets complete and vigorous. In case of the spread clonally the treatment T2 to 0,10 and 0.05 ppm. of hormonal concentration of BAP and ANA in the way of culture(culturing) went the fact that mass presented better result as for the hormonal induction not in the differentiation.

X. BIBLIOGRAFÍA.

1. **AREVALO, Gloria. 1996.** “El cultivo de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en la amazonia”. 1era. Edición. Lima – Perú. Pp. 8-24.
2. **ARDITTI, J. 1 1977.** Lewis Knudson: His Science, his times and his legacy. Lindleyana. 5 Pp 1- 79.
3. **CABELLO, L. 2005.** Departamento de Selvicultura, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Chile. Casilla 9206, Santiago. Pág. 50 – 61
4. **CIRGERV, 1994.** Resúmenes del primer curso de propagación in vitro de plantas ornamentales. Centro de investigación en Recursos genéticos y biotecnología Vegetal. Lima – Perú. Pág. 80 – 83
5. **GONZALES, A. M. y Raciman, J. S. 2003.** Fitoreguladores de crecimiento. Internet, http://perso.wanadoo.es/pedrogruen/hormonas_gegetales_y_reguladore.htm.
6. **HARTMANN y KESTER. 1991.** Propagación de plantas. Editorial Continental S.A. México. Pág. 550 – 618.
7. **HURTADO, M. y MERINA M. 1994.** “Cultivo de Tejidos Vegetales”. 3era Edición. México. Pp. 67.
8. **LEON, M. 1995.** “Conservación de especies peruanas de orquídeas utilizando técnicas de cultivo de tejidos In Vitro”, Facultad de ciencias, Universidad Nacional Agraria la Molina. Perú.
9. **LUCAS CARRILLO, E. A. 2001.** “BIOTEC” biotecnología vegetal, pagina electrónica gratuita, elucas@hotmail.com.

10. LÓPEZ, C. y GONZÁLEZ, I. 2005. "Apropósito de semillas". Colaborador Científico y Becaria de F.P.I., en la E.E. La Mayora (C.S.I.C.). España. Pp.129.
11. MATHEWS, V. H. 1976. "Micropropagation of *Ananas sativus in vitro*". Z. Pflanzenphysiol. Pp. 79. 450-454.
12. MATEO, J. M. y URBANO, T. P. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. Los meristemas y la organogenesis. Ed. Mundi-Prensa. Madrid – España. Pp. 22.
13. MEJIA, A. R. 1994. Agrobiotecnología: fundamentos y aplicaciones, Universidad Nacional Agraria de la Molina. Propagación comercial de 312 especies por cultivo in vitro. 18 – 27 pp.
14. MEJIA, A. R. 1998. Cultivo in vitro de plantas de papa. Manual Programa de investigación en papa. Año 1. N° 1. Lima – Perú.
15. MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473.
16. PETERSON, C. A. y R. A. FLETCHER. 1975. "Canadian Jour". *Bot.* 53: 243-248.
17. ROCA W. 2002. El cultivo de meristemas para la conservación de germoplasma de yuca *in vitro*. Guía de estudio. Serie 04SC-05.03. Cali, Col. Centro Internacional de Agricultura Tropical. 44 p.
18. ROCA, W. y L. MROGINSKI. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Pp. 499 - 553 –554.
19. RUÍZ, Astriht. 2003. "Micropropagación y determinación cromosómica del género *Crotón* productoras de látex". Tesis M. Sc. Pp. 28.

ANEXO

1. CUADROS

Cuadro N° 01. Constituyentes para el medio M & S

CONSTITUYENTES	
SALES MACRO Y MICRONUTRIENTES (mg / l)	
Nitrato de Amonio: NH_4NO_3	1650
Nitrato de Potasio: KNO_3	1900
Cloruro de Calcio: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
Sulfato de Magnesio: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
Fosfato de Potasio: KH_2PO_4	170
Sulfato de Manganeso: $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	16
Sulfato de Zinc: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
Ácido Bórico: H_3BO_3	6.2
Yoduro de Potasio: KI	0.83
Ac. Molibdico: $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
Cloruro de Cobalto: $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Hierro (mg / l) :	
Sulfato Ferroso: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
Agente quelante: Na_2 - EDTA	37.3

Medio Murashige – Skoog (Tomado de LEON 1995)

Cuadro N° 02. Materiales de campo utilizado en el presente trabajo.

- Tijera podadora	- Etiquetas
- Papel toalla	- Plumones
- Pisceta con agua destilada	- Libreta de apuntes
- Bolsa plástica	- Lapicero
- Acciones de Sacha Inchi (<i>Plukenetia volubilis</i> L.)	

Cuadro N° 03. Materiales de laboratorio utilizado en el presente trabajo.

-Probetas de 50,500 y 1000 ml.	-Mecheros
-Erlenmeyer de 150, 250 y 252 ml.	-Algodón
-Placas petri	-Hipoclorito de sodio
-Pinzas de acero quirúrgico	-Sistemas de iluminación
-Mangos de bisturí	-Agitador magnético
-Hojas de bisturí N° 10 y 11	-Cocinilla eléctrica
-Papel aluminio	-Potenciómetro
-Alcohol	-Agua destilada
-Reguladores de crecimiento	-Balanza analítica
-Medio de cultivo M&S* (1962)	-Refrigerador
-Vitaminas	-Autoclave
-Gel rite	-Cámara de flujo laminar
-Sucrosa	- Cámara Fotográfica digital

*Murashige – Skoog

Cuadro N° 04. Materiales de oficina utilizado en el presente trabajo.

- Papel bond A-4	- CD – RW.
- Papel bulki	- PERFORADORES
- Lapiceros	- ENGRAMPADOR
- Lápices	- GRAPAS
- Computadora	- Clips
- Impresora	- Fólder A4
- Disketes	- Regla de 30cm.

2. FOTOS
INTRODUCCIÓN DE EMBRIONES



Foto 01. Exposición de capsulas



Foto 02. Extracción del embrión

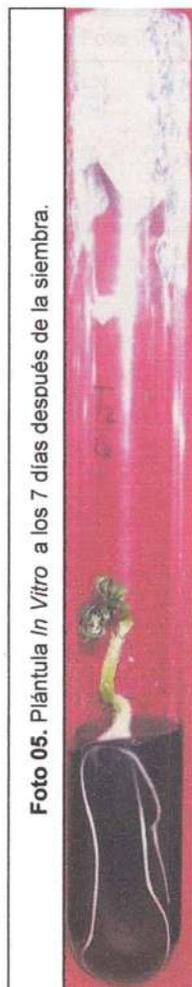


Foto 05. Plántula *In Vitro* a los 7 días después de la siembra.



Foto 03. Siembra del embrión



Foto 04. Establecimiento *In Vitro*

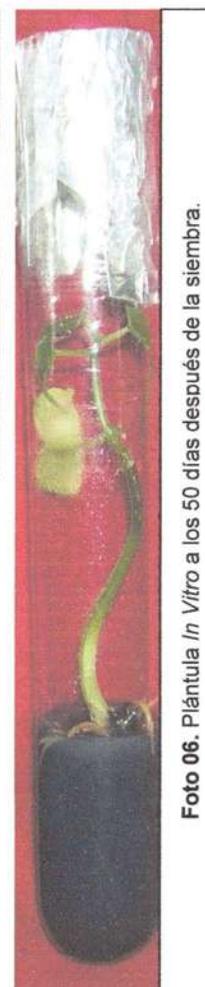


Foto 06. Plántula *In Vitro* a los 50 días después de la siembra.

INTRODUCCIÓN DE SEGMENTOS NODALES



Foto 07. Corte de segmentos nodales



Foto 08. Establecimiento de segmentos



Foto 09. Desarrollo de brotes y hojas

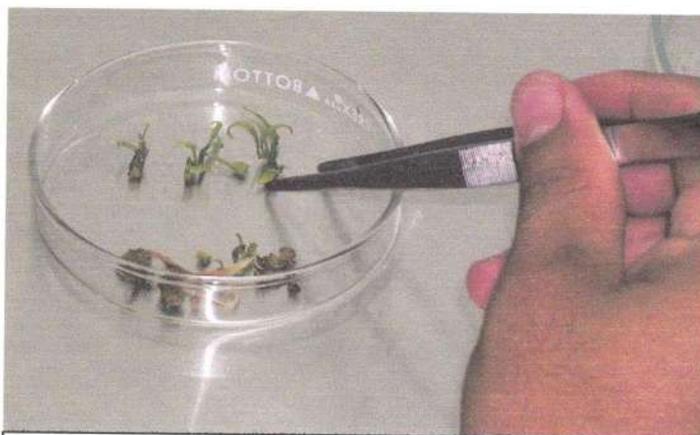


Foto 10. Brotes obtenidos a partir de segmentos nodales



Foto 10: Personal del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la FCA/UNSM.