UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL

ESCUELA ACADÉMICO - PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

TESIS

PROPAGACIÓN *In vitro* DE CEDRO (*Cedrela odorata* L.) VÍA ORGANOGENÉSIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADO POR LA BACHILLER:

GUADALUPE XIMENA HUAMÁN CACHIQUE

TARAPOTO - PERÚ

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL

ESCUELA ACADÉMICO – PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

TESIS

PROPAGACIÓN *in vitro* DE CEDRO (*Cedrela odorata* L.) VÍA ORGANOGÉNESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADO POR LA BACHILLER:

GUADALUPE XIMENA HUAMÁN CACHIQUE

TARAPOTO – PERÚ
2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL

ESCUELA ACADÉMICO – PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

ÁREA DE MEJORAMIENTO Y PROTECCIÓN DE CULTIVOS

TESIS

PROPAGACIÓN *in vitro* DE CEDRO (*Cedrela odorata* L.) VÍA ORGANOGÉNESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE:
INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADO POR LA BACHILLER:
GUADALUPE XIMENA HUAMÁN CACHIQUE

COMITE DE TESIS

Ing. M. Sc. César Enrique Chappa Santa María
PRESIDENTE

Ing. María Emilia Ruíz Sánchez
SECRETARIO

Ing. Roaldo López Fulca
MIEMBRO

Blgo. M. Sc. Dr. Winston Franz Ríos Ruiz
ASESOR

ÍNDICE

		Pág.
DEDICATORIA		
AGRADECIMIENTO		
I.	**INTRODUCCIÓN**	**01**
II.	**OBJETIVOS**	**03**
III.	**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**	**04**
	3.1. Características del Cultivo de Cedro	**04**
	3.1.1. Distribución y Densidad de Poblaciones en el Perú	04
	3.1.2. Clasificación botánica del Cedro	07
	3.1.3. Morfología General del Cedro	07
	3.1.4. Propagación Forestal del Cedro	09
	3.1.5. Plagas y Enfermedades del Cedro	10
	3.1.6. Usos del Cedro	10
	3.2. Micropropagación de Especies Forestales	**11**
	3.2.1. Propagación Vegetativa *in vitro*	11
	3.2.1.1. Generalidades	11
	3.2.1.2. Reguladores de crecimiento	13
	Auxina	14
	Citoquinina	14
	Interacción auxina-citoquinina	15
	3.2.2. Técnicas de cultivo *in vitro*	16

3.2.2.1. Organogénesis 16

3.2.2.1.1. Generalidades 16

3.2.2.1.2. Factores que afectan la organogénesis 17

Explante 17

Asepsia 18

Medios de Cultivo 18

3.3. Cultivo *in vitro* de cedro 20

3.4. Ventajas de la propagación *in vitro* de forestales 23

IV. MATERIALES Y MÉTODOS 24

4.1. Ubicación del experimento 24

4.2. Descripción del experimento 24

4.3. Componentes en estudio 24

Factor A: Concentración de BAP 25

Factor B: Concentración de ANA 25

4.4. Obtención de plántulas de Cedrela odorata L. a condiciones de cultivo *in vitro* 26

4.4.1. Selección de la semilla 26

4.4.2. Desinfección 26

4.4.2.1. Germinación de semillas 28

4.4.3. Inducción a la organogénesis directa-Fase experimental 29

Medio de cultivo 29

Material vegetal 31

Establecimiento de explantes a condiciones *in vitro* 32

Incubación de explantes 33

4.6. Variables evaluadas 34

Altura de Planta 34

Número de Nudos 35

Número de Hojas 36

Número de Raíz 37

Longitud de Raíz 38

V. RESULTADOS 39

5.1. Establecimiento de semillas a condiciones *in vitro* 39

5.2. Altura de Planta 40

5.3. Número de Nudos 42

5.4. Número de Hojas 44

5.5. Número de Raíz 46

5.6. Longitud de Raíz 48

VI. DISCUSIONES 50

6.1. Porcentaje de contaminación de semillas 50

6.2. Altura de planta 52

6.3. Número de nudos 55

6.4. Número de hojas 58

6.5. Número de raíz 60

6.6. Longitud de raíz 63

VII. CONCLUSIONES 67

VIII. RECOMENDACIONES 69

IX. BIBLIOGRAFÍA 70

X. RESUMEN 75

XI. SUMARY 77

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

N° de Figuras	Descripción	Pág.
Figura N° 01	Mapa de distribución y densidad del género Cedrela	06
Figura N° 02	Semilla de Cedro	26
Figura N° 03	Desinfección	27
Figura N° 04	Germinación de semillas	28
Figura N° 05	Medio de Cultivo	30
Figura N° 06	Material Vegetal	31
Figura N° 07	Establecimiento de explantes a condiciones *in vitro*	32
Figura N° 08	Incubación de explantes	33
Figura N° 09	Evaluación altura de planta	34
Figura N° 10	Evaluación número de nudos	35
Figura N° 11	Evaluación número de hojas	36
Figura N° 12	Evaluación número de raíz	37
Figura N° 13	Evaluación longitud de raíz	38

ÍNDICE DE CUADROS

N° de cuadros	Descripción	Pág.
Cuadro N° 01	Tamaño y Distribución de las poblaciones de *Cedrela spp.* por regiones.	05
Cuadro N° 02	Tratamientos en estudio	25
Cuadro N° 03	Análisis de varianza para altura de planta	40
Cuadro N° 04	Prueba de Duncan Factor A (BAP), para altura de planta	40
Cuadro N° 05	Prueba de Duncan Factor B (ANA), para altura de planta	40
Cuadro N° 06	Análisis de varianza para el número de nudos	42
Cuadro N° 07	Prueba de Duncan Factor A (BAP), para número de nudos	42
Cuadro N° 08	Prueba de Duncan Factor B (ANA), para número de nudos	42
Cuadro N° 09	Análisis de varianza para el número de hojas	44
Cuadro N° 10	Prueba de Duncan Factor A (BAP), para el número de hojas	44
Cuadro N° 11	Prueba de Duncan Factor B (ANA), para el número de hojas	44
Cuadro N° 12	Análisis de varianza para el número de raíz	46
Cuadro N° 13	Prueba de Duncan Factor A (BAP), para el número de raíz	46
Cuadro N° 14	Prueba de Duncan Factor B (ANA), para el número de raíz	46
Cuadro N° 15	Análisis de varianza para longitud de raíz	48
Cuadro N° 16	Prueba de Duncan Factor A (BAP), para longitud de raíz	48
Cuadro N° 17	Prueba de Duncan Factor B (ANA), para longitud de raíz	48

ÍNDICE DE GRÁFICOS

N° de gráficos	Descripción	Pág.
Gráfico N° 01	Porcentaje de contaminación y germinación	39
Gráfico N° 02	Efecto de la interacción ANA **(B)** para altura de planta	41
Gráfico N° 03	Efecto de la interacción BAP **(A)** para altura de planta	41
Gráfico N° 04	Efecto de la interacción ANA **(B)** para el número de nudos	43
Gráfico N° 05	Efecto de la interacción BAP **(A)** para el número de nudos	43
Gráfico N° 06	Efecto de la interacción ANA **(B)** para el número de hojas	45
Gráfico N° 07	Efecto de la interacción BAP **(A)** para el número de hojas	45
Gráfico N° 08	Efecto de la interacción BAP **(A)** para el número de raíz	47
Gráfico N° 09	Efecto de la interacción ANA **(B)** para el número de raíz	47
Gráfico N° 10	Efecto de la interacción BAP **(A)** para longitud de raíz	49
Gráfico N° 11	Efecto de la interacción ANA **(B)** para longitud de raíz	49

DEDICATORIA

A Dios por darme sueños y esperanzas.
A mis queridos padres Hugo Huamán y
Nancy Cachique, por el apoyo diario e incondicional en mi vida.

Especialmente a:
Benilda Ramírez Ramírez, por ser mi recuerdo de ternura y felicidad, y
A mi bella Amazonía por darme la motivación de soñar.

A mis hermanos:
Rosalinn, Hugo Alberto y Hugo Hernán.

AGRADECIMIENTO

A la Ing. María Emilia Ruiz, Jefe del Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional de San Martín por haberme dado la oportunidad de trabajar en éste laboratorio.

Mi especial y profunda gratitud y reconocimiento a Juan Carlos Guerrero Abad porque aparte de los consejos, orientación y excelente asesoría, fue capaz de brindarme la fuerza y motivación emocional en el desarrollo de la tesis.

Al Blgo. Winston Franz Ríos Ruiz por el apoyo, sugerencias, paciencia y asesoramiento en la tesis.

A Reynaldo Solis, con quien iniciamos las primeras introducciones de germinación de semillas, con quien se inició la idea de tesis y quien tolero muchos de mis errores.

A Guinaldo Huamán Ampüero, a quien considero un grandioso amigo y quien constantemente me motivo a seguir con el trabajo en momentos difíciles.

A mis compañeros de trabajo y amigos del PEHCBM, especialmente al Ing. Javier Hidalgo Lecca, Ing. Jorge Rengifo, Blgo. Mario Ríos, Ing. Crosby Tello y a todos los amigos del DMA, que apoyaron de manera indirecta en la construcción y presentación de la tesis.

A Wilmar Murrieta, por acompañarme día a día, enseñarme y brindarme apoyo durante el proceso y desarrollo de la tesis en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales.

Y a todos aquellos que brindaron un poquito para la construcción y culminación de este proyecto.

Gracias a todos.

I. INTRODUCCIÓN

La propagación vegetativa es utilizada para auxiliar la réplica de características deseables en plantas de importancia económica, desempeña hoy en día un papel importante en procesos de producción. Técnicas simples y complejas acompañan su desarrollo en el área forestal, agrícola, ornamental, etc. El cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro* es una técnica considerado de gran importancia desde la década de los años 80, consiguiéndose por medio de la cual propagar asexualmente plantas con características deseables y libres de microorganismos a escala comercial.

El cedro (*Cedrela odorata* L.), especie forestal de la familia Meliaceae, es considerada como una de las más valiosas del mundo dentro de la industria maderera, muy utilizada en la ebanistería fina para la confección de muebles, instrumentos musicales, decoración de interiores, esculturas, torneados, construcción, etc. **(Riveros 1998).** Su sobre-explotación en ambientes naturales ha generado una fuerte presión sobre la especie, debido a la tala indiscriminada y selectiva **(Albert et al., 1995),** provocando tanto en nuestro país como en el mundo la disminución y pérdida de individuos parentales genéticamente valiosos.

Su inclusión en la lista de especies con prioridad para su conservación iniciado en 1981 durante la Quinta Reunión del Panel de Expertos en Recursos Genéticos Forestales **(Lahera, 1995),** puso énfasis que es necesario la implementación de tecnologías que permita su conservación y sostenibilidad de este recurso forestal.

Del mismo modo **Reynel, (1988)** afirmó que poblaciones de cedro y otras especies maderables estaban siendo impactadas negativamente, siendo cada vez más difícil localizar árboles con diámetros de valor comercial **(Álvarez, 1999).**

Como alternativa al abastecimiento de material vegetal selecto, el cultivo *in vitro,* considerada como una técnica de micropropagación, ofrece numerosas ventajas para la propagación masiva de árboles catalogados "élite", a fin de generar disponibilidad de material durante todo el año. Sin embargo, existe una escasa disponibilidad de metodologías adecuados para la propagación *in vitro* de cedro; en tal sentido, se planteó desarrollar una metodología adecuada para la micropropagación *in vitro* de cedro vía organogénesis, empleándose diferentes concentraciones de 6-Bencilamino purina (BAP) y Ácido naftaleno acético (ANA) en segmentos nodales.

II. OBJETIVOS

2.1. General

- Establecer una metodología procedimental para el enraizamiento y multiplicación lateral de segmentos nodales de Cedro (*Cedrela odorata* L.).

2.2. Específicos

- Establecer un procedimiento para el establecimiento de embriones a condiciones *in vitro*.

- Determinar efectos fisiológicos de 6-bencil amino purina (BAP) y ácido naftaleno acético (ANA) en el enraizamiento y multiplicación de cedro a partir de segmentos nodales.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Características del cultivo de cedro

3.1.1. Distribución y Densidad de Poblaciones en el Perú

El Estudio de las Poblaciones del Género *Cedrela* en el Perú (UNALM-FCF 2010), reporta según la fuente de varios autores las siguientes cinco especies: *Cedrela fissilis* Vell, conocida como "cedro" y "cedro del bajo"; *Cedrela lilloi* C.DC, conocida como "cedro" y "cedro de altura"; *Cedrela montana* Moritz ex Turczaninov, conocida como "cedro de altura", *Cedrela odorata* L.; y *Cedrela weberbaueri* Harás in Macbr., conocida como "cedro".

De estas especies la más abundante y de mayor importancia económica es, sin duda, *Cedrela odorata*, que tiene una amplia distribución tanto en el hemisferio norte como en el hemisferio sur. Se extiende desde el norte de México (26°N), en las vertientes del Pacífico y del Atlántico, continua por América Central y América del Sur hasta Argentina en las provincias de Misiones y Tucumán (28°S), encontrándose también en las islas de El Caribe.

El mencionado estudio estimó, a nivel nacional, el tamaño total de las poblaciones del género *Cedrela* en 1.1 millones de árboles; de los cuales el 50% se localiza en la región de Loreto que limita con el estado de Amazonas del Brasil y las zonas tropicales de Ecuador y Colombia. Complementariamente, la región de Ucayali que limita con el estado Acre del Brasil participa con el 16%, y la región de Madre de Dios limítrofe con las

regiones Pando y Bení de Bolivia y Acre del Brasil participa con el 8% la población total de cedro (Cuadro Nº 01).

Cuadro 1: Perú: Tamaño y Distribución de las poblaciones de *Cedrela* spp. por regiones.

Región /Territorio	Población (N°)	Limites/Ubicación
Loreto	550,000	Amazonas-Brasil, Ecuador y Colombia
Ucayali	180,000	Acre-Brasil
Madre de Dios	80,000	Pando y Beni – Bolivia. Acre – Brasil
San Martin	30,000	Ucayali y Loreto
Amazonas	10,000	Ecuador. Loreto y San Martin
Otras regiones	50,000	Interior del país
SINANPE	200,000	Interior del país
Total – Perú	**1'100,000**	

Fuente: UNALM-FCF (2010).

Se estima que un tercio de las poblaciones de cedro, alrededor de 370 mil ejemplares, representa el stock apto para el aprovechamiento de la especie y 730 mil ejemplares, actualmente en crecimiento, estarían alcanzado el diámetro mínimo de corta en los próximos quinquenios. Si descotamos la población localizada en las áreas naturales protegidas y regiones con menos de 10 mil ejemplares se tiene una población total de 260 mil ejemplares apta para su aprovechamiento comercial en el primer quinquenio. El estudio UNALM-FCF encuentra densidades de hasta 1.15 ejemplares por hectárea, concentrándose la mayor densidad en los sectores limítrofes de la selva peruana con Brasil y Bolivia (Figura Nº 01).

Figura 1. Perú: Mapa de Distribución y Densidad del género *Cedrela*.

Fuente: UNALM-FCF (2010).

3.1.2. Clasificación Botánica del Cedro

El género **Cedrela** fue establecido por Browne en 1756, Linneaus en 1759 describe a la especie **odorata**. **(Patiño *et al.*, 1997).**

De acuerdo a Cronquist **(Marzocca, 1985/cit. por Tullume, 2000)**, el Cedro se clasifica de la siguiente manera:

División : Magnoliophyta

Clase : Magnoliopsidae

Sub clase : Rosidae

Orden : Sapindales

Familia : Meliáceas

Género : Cedrela

Especie : odorata

3.1.3. Morfología General del Cedro

El cedro es un árbol generalmente recto, de 20m a más de altura, 0.8 a 1.00m de diámetro de tronco **(Riveros, 1998).** Follaje tupido, color verde intenso, copa esférica de gran desarrollo, de forma irregular con un diámetro promedio mayor a 10m. Árbol caducifolio **(Urbina, 2000).**

Corteza externa

El Cedro presenta una corteza externa regularmente surcada y fisurada, "agrietada" **(Tullume, 2000)**, color marrón-grisáceo, gris-negro o pardo-rojizo, con ritidomas en tiras largas leñosas **(Larco, 2000; Riveros, 1998)**, desprendible en placas grandes.

Corteza interna

Es laminar de color rosado a "rojo pardo" **(Tullume, 2000),** desprende un olor agradable, típico de cedro cuando está cortado, a diferencia de *C. fissilis*, que desprende un olor fuerte a ajos.

Hojas

Hojas compuestas dispuestas en espiral **(Riveros, 1998),** de 25 a 50 cm de largo **(Urbina, 2000),** "paripinnadas o imparipinada con un foliolo terminal abortivo" **(Larco, 2000),** sin estipulas, agrupadas al final de la rama **(Tullume, 2000).** "El haz de color verde oscuro y el envés más claro o verde amarillento" **(Urbina, 2000).**

Foliolos

5 – 11 pares opuestos, sobrepuestos o alternos mayormente falcados, ápice corto acuminado, sin pelos. Haz de color verde brillante **(Larco, 2000; Riveros, 1998).**

Flores

Flores pequeñas **(Urbina, 2000),** agrupados en racimos florales o panículas "terminales o subterminales" **(Riveros, 1998)** de 15 a 30 cm de longitud **(Urbina, 2000).** Pétalos de color verde amarillo a blanco verdoso y de olor agradable **(Larco, 2000),** con cáliz irregularmente dentado. Son monoicos y presentan cinco pétalos pubescentes con color crema verduzco, en las flores femeninas las anteras son delgadas y el estigma es verde, globoso y capitado **(Tullume 2000).** Las flores masculinas y femeninas se encuentran en la misma inflorescencia, aunque las flores femeninas abren primero **(Patiño, 1997).**

Frutos

Cápsula leñosa blanquecina ovoide **(Urbina, 2000)**, de 5 valvas delgadamente leñosas, color marrón-castaño o marrón-grisáceo, de 3 – 5 cm de largo **(Larco, 2000)**. Con dehiscencia longitudinal septicida, de superficie externa lenticelada y lisa, el fruto se desprende una vez liberada la semilla. **(Tullume, 2000)** y puede contener entre 25 a 40 semillas haladas **(Riveros, 1998)**.

Semillas

Las semillas son de tamaño pequeño, de forma alargada y aplanada que se prolongan por una expansión membranosa semejante a un ala fina (Fig. 04). Están envueltas por un tegumento delgado de color pardo. El embrión recto está bien diferenciado por un eje constituido por la radícula y la gémula, provisto de dos cotiledones aplanados y poco carnosos **(Corbineau *et al*, 1985)**.

Raíces

Extendidas y superficiales y la base del fuste con aletones muy bien desarrollados en suelos poco profundos y raíces profundas de base acanalada en suelos fértiles **(Tullume, 2000)**.

3.1.4. Propagación Forestal del Cedro

La propagación por semillas es exitosa en esta especie. Los frutos se cosechan directamente del árbol cuando comienzan a abrir. Se dejan en un lugar seco para que las cápsulas se abran completamente y se extrae la semilla **(Reynel *et al*, 2003)**. La germinación se inicia entre 7-13 días y finaliza a los 21 días **(Flinta, 1960; CTFS-STRI, 2000)**. Según **Flinta (1960)**,

el poder germinativo es de 60-70. Con respecto a la propagación vegetativa por estacas **Gómez (1974)** propagó con mucha dificultad estacas de Cedro y Caoba usando Ácido Indol Acético (AIA).

En 1979 la FAO realizó varios ensayos con estacas de Cedro, resultando en la formación de brotes y raíces que, fueron atacados por Hypsipyla sp. **(Guevara, 1988).** Este mismo autor indicó que debido a las dificultades que presenta el Cedro para el establecimiento en plantaciones puras, el manejo de la regeneración natural puede ser una alternativa para su cultivo extensivo.

3.1.5. Plagas y Enfermedades del Cedro

***Hypsipyla grandella* Zeller**

La plaga más seria para el cedro es el "barrenador de las meliáceas", el Lepidóptero *Hypsipyla grandella* Zeller, que es un insecto perteneciente a la familia *Pyralidae*. El ataque de este insecto al Cedro y Caoba, que además de causar una ramificación excesiva y un crecimiento atrofiado, ocurre tanto en la etapa de vivero (etapa en el cual descorteza la base del tronco, lo que puede causar la muerte de los plantones) como durante su adaptación y crecimiento en el campo. Las dos especies principales que ocasionan daño a las meliáceas son la *H. grandella* y la *H. robusta* **(Patiño, 1997).**

3.1.6. Usos del Cedro

Cedrela odorata recibe considerable atención debido al alto valor de su madera **(Flores, 1990),** a su apariencia atractiva, sus adecuadas propiedades físico mecánicas, y a su resistencia al ataque de termitas **(Riveros, 1998),** teniéndola como una madera muy fina y preciosa.

Puede usarse en acabados y divisiones interiores, muebles de lujo, chapa plano decorativas, artículos torneados, gabinetes de primera clase, ebanistería, puertas y ventanas, puertas talladas, contrachapados, botes (partes internas), molduras y paneles, palillos y cajas de fósforos, regular para la producción de pulpa para papel y carpintería.

Otros usos: como árbol de ornato en parques y área verdes, sombra en potreros. Puede utilizarse como cortina rompevientos, cercas vivas, protección de cultivos, en la conservación y disminución a la erosión de suelos (CONIF 1996). Tiene uso medicinal ya que la corteza es astringente y también sirve como febrífugo (contra la fiebre), y en cocimiento de hojas y corteza son usadas contra el paludismo. Y se considera melífera porque en época de floración es visitada por las abejas **(Morales, 2009 y Herrera, 2009).**

3.2. Micropropagación de Especies Forestales

3.2.1. Propagación vegetativa *in vitro*

3.2.1.1. Generalidades

El cultivo *in vitro* definido como un grupo de técnicas desarrolladas en laboratorio sobre diferentes condiciones físicas y químicas intensamente controladas, utilizada en el auxilio de estudios básicos sobre fisiología vegetal, genética molecular, ingeniería genética; así como fines comerciales destinados a la propagación masiva de plantas libres de virus, producción de semilla sintética, mejora genética de plantas (haploides y poliploides),

germinación de semilla dependiente de condiciones nutritivas necesarias (orquídeas), etc; utiliza explantes de acuerdo a la afinidad por especie.

Explante, definido como cualquier porción vegetal con capacidad regenerativa son utilizados para la propagación de plantas que pasan por fases consecutivas entre ellas: ***fase de desdiferenciación***, donde las células se tornan competentes para responder ante cualquier estímulo organogénico o embriogénico; ***fase de inducción***, donde las células se determinan para formar un órgano o embrión, y la ***fase de realización,*** donde ocurre la formación y estructuración del órgano o embrión somático propiamente dicho.

La máxima ganancia genética puede ser obtenida mediante el empleo conjunto de propagación sexual y agámica. La reproducción sexual es importante para la introducción de genes nuevos, prevenir los efectos de la endogamia y el mejoramiento de características controladas por efectos aditivos de genes. La reproducción asexual, por otro lado, permite la multiplicación de individuos o grupos de individuos seleccionados de una población élite.

Tradicionalmente, las especies forestales fueron propagadas vegetativamente mediante el enraizamiento de estacas, así como también por injertos. La propagación por estacas de varias especies ha sido llevada a cabo durante siglos en Asia y Europa. Sin embargo, para la mayoría de los árboles propagados por estacas destacan una incapacidad para la formación de nuevas raíces (rizogénesis). Siendo que el cultivo *in vitro* pueda corregir

problemas de enraizamiento futuro, correlacionada al rejuvenecimiento del tejido que pasa por laboratorio.

3.2.1.2. Reguladores de crecimiento

El desarrollo normal de una planta depende de la interacción de factores externos (luz, nutrientes, temperatura) e internos (fitohormonas). Los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas concentraciones estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en plantas, los cuales son producidos en una parte de ella y transferidos a otras regiones influenciadas por mecanismos fisiológicos.

Se conocen cinco grupos principales de hormonas vegetales o fitohormonas: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico; sin embargo durante estos últimos años se han reportado grupos de reguladores de crecimiento con precursores distintos a los anteriores entre ellos brasinosteroides de naturaleza esteroidal; ácido jasmónico, y ácido salicílico participes en respuesta inmune en plantas elicitados por patógenos (biotróficos, hemibiotróficos, necrotréoficos) y herviboría; estrigolactonas, que desempeña funciones de brotación lateral; péptidos hormonales, de origen proteico con función biológica en aspectos básicos (divisón y alongamiento celular) y defensa **(Matsubayashi & Sakagami, 2006).** Se reporta la existencia de moléculas de origen amino que desarrollan una función reguladora "Poliaminas".

El efecto de la aplicación exógena de los reguladores de crecimiento sobre el crecimiento y desarrollo de células, tejidos y órganos está fuertemente influenciado por otros factores como las condiciones ambientales de cultivo, el tipo de explante y el genotipo, **(Delgado & Rojas, 1999).**

Auxinas

Se sintetiza principalmente en el ápice del tallo y las ramas jóvenes, en las yemas y hojas jóvenes, y en general en los meristemos. **(Taiz & Zeiger 2004).** Tienen la capacidad de producir alargamiento celular, sin embargo se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en tejidos vegetales. Frecuentemente fomentan el desarrollo de callos y generalmente ejercen el control primario en el crecimiento de tallos y raíces, **(Hurtado & Merino 1994).**

Las auxinas son los únicos reguladores de crecimiento que aumentan consistentemente la formación de primordios radiculares, pero menos en tejidos que naturalmente presentan cierta predisposición al enraizamiento. **(Haissig 1974).** Además, las auxinas intervienen en el crecimiento del tallo, inhibición de yemas laterales, abscisión de hojas y de frutos, activación de las células del cambium y otras, **(Salisbury, 2000).**

Citoquininas

Las citoquininas han presentado otros efectos en los procesos fisiológicos de crecimiento, incluyendo la disminución por senescencia foliar, movilización de nutrientes, dominancia apical, formación y actividad de meristemos apicales,

desarrollo floral, germinación de semillas, también parecen mediar muchos aspectos de desarrollo regulado para la luz, incluyendo la diferenciación de cloroplastos, o desarrollo de metabolismo autotrófico y la expansión de hojas y cotiledones. **(Taiz & Zeiger 2004).**

La citoquinina se encuentra presente como moléculas libres (ligadas covalentemente a cualquier macromolécula) en plantas con ciertas bacterias, han sido encontradas en grandes variedades de angiospermas, probablemente sean de un grupo diversificado de plantas, estas fueron encontradas también en algas, musgos y coníferas, **(Taiz & Zeiger 2004).** Según **Delgado & Rojas (1999)** concentraciones de citoquininas utilizadas en el cultivo de tejidos se encuentran en un rango de 0,1-3,0 mg/l, según **(Delgado y Rojas, 1999).**

Interacción auxina-citoquinina

El proceso de crecimiento y diferenciación en cultivo de tejidos es dramáticamente afectado por la interacción auxina-citoquinina, habiendo sido ampliamente aceptado que las plantas regulan los niveles de auxinas y citoquininas por el proceso de síntesis y conjugación. Así, el incremento del nivel de citoquinina, biológicamente activa, es por desconjugación de N-glucósidos inactivo. En general, las concentraciones altas de auxinas y bajas de citoquininas estimulan la división celular, en tanto que las concentraciones bajas de auxinas y altas de citoquininas estimulan el crecimiento celular **(Skoog & Miller, 1957).**

3.2.2. Técnicas de cultivo *in vitro*

La embriogénesis somática y la organogénesis son dos procesos morfogénicos muy frecuentes en el cultivo *in vitro* de especies vegetales. La embriogénesis somática es el proceso por el cual se obtiene una estructura similar al embrión zigótico sin que medie la fertilización de las gametas, mientras que por organogénesis pueden obtenerse tallos, raíces o flores. Estos órganos son inducidos a partir de una célula o de un grupo de células que, según las condiciones de cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división.

3.2.2.1. Organogénesis

3.2.2.1.1. Generalidades

La organogénesis puede darse por inducción de yemas axilares o adventicias. La inducción de yemas axilares comprende la multiplicación de yemas preformadas, usualmente sin formación de callo. La inducción de yemas adventicias comprende la inducción de tejido meristemático localizado mediante un tratamiento con reguladores de crecimiento, conduciendo a la diferenciación del primordio y desarrollo del vástago, esto último generalmente en ausencia del regulador de crecimiento que indujo la organogénesis.

La principal desventaja del primer método es que el número de yemas axilares por explante limita la cantidad de vástagos. Esto se ve compensado, sin embargo, por un aumento en la tasa de multiplicación con los sucesivos sub cultivos. La formación de yemas adventicias ofrece mayor potencial para

la producción de vástagos, ya que la inducción de vástagos ocurre en sitios distintos al de los meristemas.

3.2.2.1.2. Factores que afectan la organogénesis

Murashige (1974) y Narayanaswamy (1977) han descrito ciertos factores que deben ser considerados para la manipulación exitosa de la organogénesis. Se incluyen factores relacionados con el explante (su edad fisiológica y ontogénica, su tamaño, el tejido u órgano del que es extraído) así como el estado fisiológico de la planta madre y la época del año en que se realiza el cultivo.

Cualquiera de estos factores, o su combinación, puede afectar profundamente la respuesta morfogenética, y es necesario realizar una evaluación sistemática de tales efectos con el fin de establecer un sistema característico de experimentación.

Explante

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada **(Roca y Mroginski, 1991).** Virtualmente todas las partes de la planta se han utilizado como explantes **(Flick *et al.*, 1983; Murashige, 1974; Evans *et al.*, 1981);** no obstante, los tejidos juveniles poseen un alto grado de actividad meristemática y tienden a tener más plasticidad *in vitro*.

Asepsia

El ambiente generado por explante medio de cultivo-condiciones físicas de incubación es altamente propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos que pueden provocar la destrucción de los cultivos. Es difícil cuantificar el impacto de estas pérdidas, pero en promedio, en laboratorios dedicados a la micropropagación se lo puede estimar en alrededor del 10%. En el mejor de los casos, estos microorganismos no destruyen los cultivos pero compiten con el explante por los nutrientes del medio de cultivo o bien lo modifican **(Mroginski et al., 2006).**

Medios de cultivo

Krikorian (1991), Menciona que el crecimiento de las células y tejidos cultivadas a nivel *In Vitro,* requieren de compuestos orgánicos e inorgánicos dispuestos en diversas concentraciones de macro y microsales, compuestos carbonados, vitaminas, hormonas, aminoácidos, etc. participando en una forma responsable y activa en el crecimiento de los explantes introducidos a nivel *In Vitro.*

Fuente de carbono: Prácticamente todos los cultivos son heterótrofos (comparativamente unos pocos son autótrofos) y por ende necesitan del suministro de una fuente de carbono. La sacarosa, en concentraciones de 2 al 5%, es el azúcar más utilizado. En algunos medios se la reemplaza por glucosa. En casos particulares se cita el empleo de maltosa o galactosa.

Nutrientes minerales: Los medios de cultivo deben suministrar los macro y micronutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas enteras. En general se destacan las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio. El nitrógeno es suministrado en forma de amonio y/o nitrato. Es fundamental que el hierro sea incorporado conjuntamente con un agente quelante (Na2EDTA), lo que lo hace disponible en un amplio rango de pH.

Sustancias vitamínicas: De todas las que comúnmente se incorporan a los medios, pareciera que la tiamina es la única realmente imprescindible para el buen crecimiento de los cultivos.

Sustancias reguladoras del crecimiento: En la mayoría de los casos los medios utilizados para el establecimiento de los cultivos contienen auxinas (ANA, 2,4-D, AIA, IBA) y/o citocininas (BA, BAP, ZEA, 2iP, Thidiazurón). Las giberelinas (especialmente GA3) son requeridas en algunas ocasiones para el cultivo de meristemas o para la elongación de brotes.

Agente gelificante (en el caso de medios semisólidos): El agar (entre 0,6 y 1%) es el compuesto más utilizado. También pueden emplearse «Phytagel» (0,25 - 0,40%), «Gelrite» (0,10 - 0,20%).

3.3. Cultivo *in vitro* de cedro

A fin de obtener información sobre la formación de callos en inflorescencias inmaduras de Caoba híbrida y Cedro **(Daquinta *et al.*, 2003)** realizaron un estudio donde se utilizaron árboles adultos de 40 años de edad aproximadamente. A partir de estas plantas se tomaron segmentos de inflorescencias jóvenes, se siguió la misma metodología de desinfección referido para otras Meliáceas que comprendió el empleo de 0.25% de Bicloruro de Mercurio durante 10 minutos. Posteriormente se colocaron segmentos de inflorescencias en el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS) al que se le adicionaron diferentes concentraciones de Tidiazuron (0.1, 0.25, 0.5 y 1 mg.l-1).

Obteniendo la formación de callos como mejor resultado a partir de segmentos de inflorescencias jóvenes en el medio de cultivo MS (1962) suplementado con 0.25 mg.l-1 de Tidiazuron.

Fue realizado también **(Pérez *et al.*, 2001)** un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L. donde se utilizaron explantes de nudo cotiledonar, obtenidos de semilla germinada *in vitro*, se establecieron en medio MS al 50% suplementado con 2,2 mM de 2-iP para iniciación de brotes axilares y evaluaron el efecto de citocininas en la multiplicación, los brotes obtenidos se subcultivaron en el mismo medio, suplementado con 2,2, 6,5, 13,3 o 20 mM de BAP, kinetina o 2-iP.

Estos explantes sobrevivieron en todos los tratamientos de citocinina y el número máximo de brotes se obtuvo con BAP a 2,2 y 6,5 mM. Estos tratamientos también fueron estadísticamente superiores en cuanto a días a brotación, porcentaje de brotación y altura de brotes obtenidos. Las altas concentraciones de todas las citocininas produjeron callo en la base de los explantes y la bencilaminopurina (BAP) a niveles de 2,2 y 6,5 mM fue la mejor citocinina para favorecer la brotación de explantes nodales de *C. odorata*. Sin embargo, el tamaño de los brotes obtenidos no garantiza el éxito para pasar a la fase posterior del cultivo *in vitro* (desarrollo), por su difícil manejo y la mayor susceptibilidad a la manipulación, por lo que fue recomendado realizar un subcultivo en un medio con carbón activado para remover residuos de citocinina utilizada en multiplicación **(Biondi *et al.* 1984)**, para favorecer el alargamiento de los brotes obtenidos.

El efecto de la revigorización en el establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de *Cedrela odorata* L. también fue evaluado **(Jiménez *et al.*, 2007)**. Los autores realizaron este trabajo con el objetivo de disminuir la contaminación microbiana e incrementar la supervivencia *in vitro* de ápices y segmentos nodales de Cedro. Para ello se efectuó la revigorización de las plantas madres colectando en diferentes periodos de tiempo estaquillas de 1-2 cm de diámetro y 25 cm de longitud las cuales se plantaron en una casa de cultivo.

También se aplicaron soluciones con reguladores de crecimiento para evaluar su efecto sobre la brotación, crecimiento de los brotes y el enraizamiento. Se

tomaron los brotes jóvenes emitidos por las estaquillas que recibieron tratamiento con fungicidas para disminuir la contaminación *in vitro* y se compararon con los ápices y segmentos nodales colectados directamente de las plantas de campo y de la casa de cultivo, que no recibieron tratamiento con fungicidas. La desinfección de los explantes se realizó con hipoclorito de sodio (NaClO) y posteriormente fueron colocados en un medio de cultivo con 6-BAP 0.25 mg.l-1 y AIA 0.125 mg.l-1.

La aplicación de sustancias estimuladoras incrementó la brotación y el crecimiento de las yemas axilares y la emisión de raíces de las estaquillas. Se logró un 84% de supervivencia y 10% de contaminación de los explantes con la desinfección durante 10 minutos por inmersión en NaClO al 1.5%. Se demostró la necesidad de realizar la revigorización del material vegetal para lograr el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de cedro, el que demostró mejores resultados en todas las variables evaluadas y se obtuvo el mayor porcentaje de estaquillas brotadas (32.4%) con diferencias significativas en comparación con los restantes periodos. Estos resultados demostraron la influencia de la época de colecta en la revigorización del material vegetal.

Los mejores resultados en estimulación del crecimiento de las estaquillas en la casa de cultivo se obtuvieron con el tratamiento 3 en el cual se combina la aplicación de dos soluciones estimuladoras que contienen auxina (ANA), citoquinina (6-BAP), giberelina (AG3) y brasinosteroide (Biobras-6). Con estos resultados se observa que la aplicación de estas soluciones no determinó la

supervivencia de las estaquillas pero si tuvo un efecto estimulador de la brotación, emisión de raíces y crecimiento de los brotes.

3.4. Ventajas de la propagación *in vitro* de forestales

Dentro de las especies leñosas, las más extensivamente estudiadas en los últimos años han sido las forestales, especialmente los maderables por su gran valor comercial **(Roca y Mroginski, 1991; Muñoz, 2003; Pérez *et al.*, 2004)**.Los programas de mejoramiento genético tradicionales en especies forestales no han tenido repercusiones trascendentales en la urgente necesidad de reforestación o de acortar el tiempo de obtener rentabilidad en las producciones comerciales, debido principalmente al largo ciclo de estas especies desde la siembra de la semilla hasta la floración, esto hace necesario tomar acciones inmediatas en la búsqueda de alternativas que mejoren sus sistemas de producción y la calidad del material de siembra **(INISEFOR, 1998).**

Las ventajas que ofrecen las técnicas de micropropagación contribuyen enormemente demostrado ser una importante alternativa para la solución de algunos de los problemas anteriormente referidos, tiene muchas ventajas si se cuenta con metodologías repetibles y puede ser una herramienta muy valiosa en las diferentes etapas del mejoramiento genético forestal implicando una ganancia en tiempo, incrementos en sus tasas de reproducción, material clonado y una selección del material de siembra **(Esquivel *et al.*, 2000).**

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1. Ubicación del experimento

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto; perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias. Se encuentra ubicado políticamente en el Departamento de San Martín, Provincia de San Martín, Distrito de Morales, y geográficamente con Latitud sur de 06° 29' 13,2"; con Longitud oeste de 76° 22' 48,4" y una Altitud de 350 m.s.n.m.

4.2. Descripción del experimento

El experimento abordó el desarrollo de organogénesis directa en cedro a partir de segmentos nodales provenientes de plántulas germinadas *in vitro,* fueron acondicionadas a diferentes concentraciones de 6-bencil amino purina (0,5; 1,00; 2,00 mg/l) y ácido 1-naftalenacetico (0,00; 0,1; 0,25 mg/l). Nueve (09) tratamientos hormonales con cinco (05) repeticiones constituidas por 03 unidades experimentales por repetición fueron sometidos a un DCA con arreglo factorial 3x3 (Cuadro 2). Análisis de comparación de medias (Duncan, $p<0,01$) para efectos principales e interacción fueron realizados para altura de planta, número de nudos, número de hojas, número de raíz, longitud de raíz.

4.3. Componentes en estudio

Estuvieron referidos a diferentes concentraciones de BAP (Factor A) y ANA (Factor B). Nueve Tratamientos hormonales con cinco repeticiones, constituidas por tres unidades experimentales/repetición (Cuadro N°02).

a. **Concentraciones de BAP – Factor (A)**

a_1 = 0,5 mg/l = 2,21 uM

a_2 = 1,00 mg/l = 4,43 uM

a_3 = 2,00 mg/l = 8,87 uM

b. **Concentraciones de ANA – Factor (B)**

b_1 = 0, 00 mg/l = 0,0 uM

b_2 = 0, 1 mg/l = 0,53uM

b_3 = 0, 25 mg/l = 1,34uM

Cuadro 2: Tratamientos en estudio

Trats	Combinaciones	BAP (mg/L)	ANA (mg/L)	Explantes/ Frasco	Repeticiones (Frasco)
T1	a1b1	0,5	0,0	3	5
T2	a1b2	0,5	0,1	3	5
T3	a1b3	0,5	0,25	3	5
T4	a2b1	1	0,0	3	5
T5	a2b2	1	0,1	3	5
T6	a2b3	1	0,25	3	5
T7	a3b1	2	0,0	3	5
T8	a3b2	2	0,1	3	5
T9	a3b3	2	0,25	3	5

4.4. Obtención de plántulas de *Cedrela odorata* L. a condiciones de cultivo in vitro.

4.4.1. Selección de la semilla

Fueron seleccionadas semillas que presentaron características óptimas en sanidad, maduración, apariencia física y disponiéndolas sin estructura alar (retiradas mediante cortes transversales). (Figura N°02).

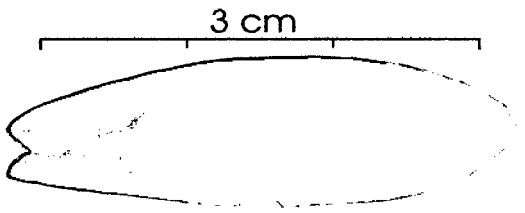


Figura 2: Semilla de *Cedro*

4.4.2. Desinfección

Las semillas sin estructura alar fueron inicialmente lavadas por 10 minutos con detergente comercial (5g/L), enseguida fueron sometidas a una solución fungicida (Benomil, 1g/L) durante un periodo de 10 minutos. Realizándose enjuagues y lavados continuos fueron llevadas a flujo laminar donde fueron sumergidas sobre una solución de alcohol etílico 70% durante 60 segundos continuados por una desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) 1,5% durante dos tiempos: i) 10 minutos y ii) 15 minutos, como se indica en la figura 3. Enseguida fueron realizados tres enjuagues con agua destilada estéril a fin de retirar fracciones de hipoclorito de sodio. Seis (06) semillas desinfectadas superficialmente fueron acondicionadas sobre frascos con MS (basal) de 15 onz., colocados en la sala de incubación sobre un fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad) a 24°C±2, 46% HR.

Figura 3: Desinfección (A-F): A. Semillas de Cedro antes de ser seleccionadas; **B.** Semillas seleccionadas y desaladas; **C.** Semillas en una solución de detergente comercial; **D.** Semillas en una solución Fungicida (Benomil 1g/L). **E.** Semillas sometidas a NaOCl al 1.5%. **F.** Semillas sembradas en el medio basal MS.

4.4.2.1. Germinación de semillas

La germinación de las semillas (Figura N° 04) se apreció a partir del tercer día, obteniendo un mejor resultado con el tiempo de inducción 2 (menor porcentaje de contaminación).

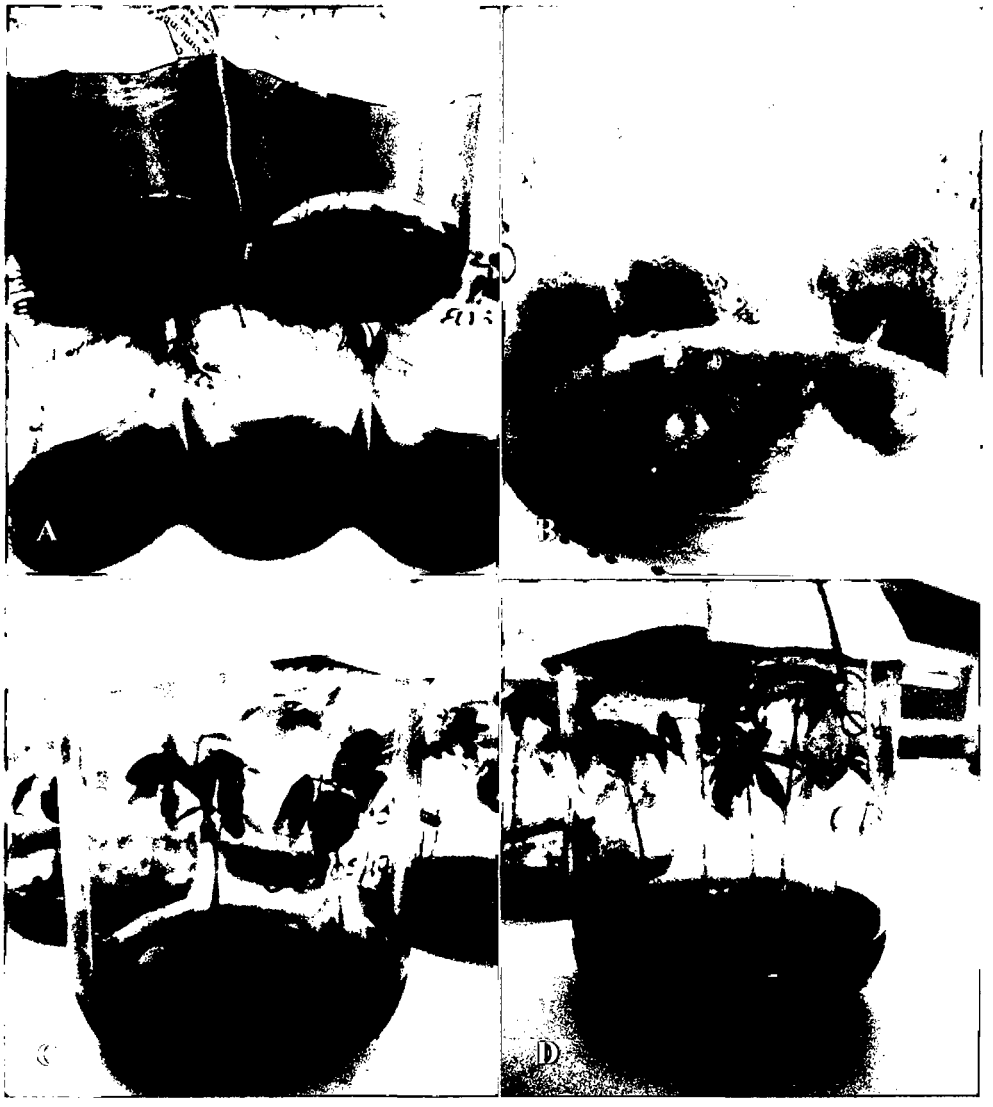


Figura 4. A-D: A. Semillas recién sembradas; **B.** Semillas al cuarto día; **C.** Plántulas de *Cedrela odorata* L. a los 12 días de germinación T1 (1); **D.** Plántulas de *Cedrela odorata* L. a los 12 días de germinación T1 (2).

4.4.3. Inducción a la Organogénesis Directa – Fase experimental

Medio de cultivo

Constituido por sales macro y micro minerales **(Murashige & Skoog, 1962)** a concentración total, suplementado con 10,00 mL/L Myo-inositol (10 000 ppm); 0,5 mL/L Piridoxina; 0,1 mL/L tiamina; 2,0 mL/L glicina; 0,5 mL/L ácido nicotínico; 30,00 g/L de sacarosa; 10,00 g/L de agar ; 2 g/L de carbón activado, al cual se les agregó diferentes concentraciones de 6-bencil aminopurina (BAP) (0,5; 1,0; 2,0 mg/L) y ácido 1-naftalenacetico (0,00; 0,1; 0,25 mg/L) con sus respectivas combinaciones (cuadro 03); pH 5,65 ± 0.05 volúmenes de tratamientos fueron dispensados en frascos de vidrio autoclavables (15 onzas) con un volumen de 60 ml por frasco, los cuales fueron cerrados con papel aluminio y papel reciclado, enseguida autoclavados a 15 psi sobre 121 °C por intermedio de 20 minutos, como se muestra en la figura N° 05.

Posteriormente fueron enfriados a temperatura ambiente. Para la preparación de este medio se utilizó el procedimiento sugerido por **George (1992),** tomado de **Guerrero (2007).**

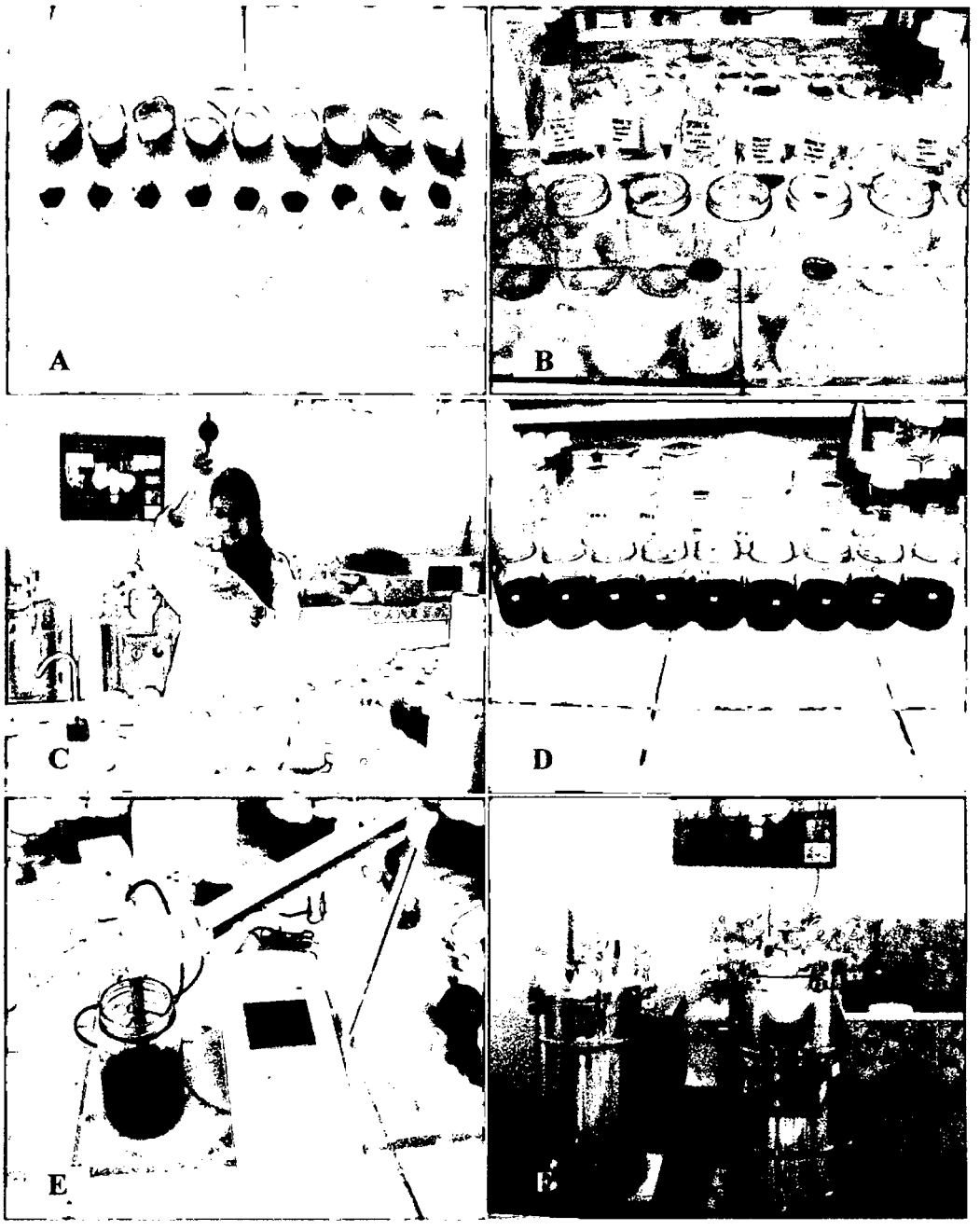


Figura N° 05. A-F: A. Sucrosa, Carbón activado y Agar agar; **B.** Stock y Hormonas preparadas; **C.** Inicio de la preparación del medio de cultivo; **D.** Medio de cultivo listo para su calibración. **E.** Medio de cultivo en proceso de calibración. **F.** Medio de cultivo autoclavandose.

Material Vegetal

Fueron empleadas para la extracción de segmentos nodales de 1-1,5 cm de longitud, plántulas de cedro germinadas *in vitro* con 60 días de edad. Explantes cortados transversalmente fueron transferidos a placas petri conteniendo agua destilada estéril a fin de evitar estrés por deshidratación. La extracción de explantes fueron realizados en cámara de flujo laminar manteniendo procedimientos y cuidados de asepsia (Figura N° 06).

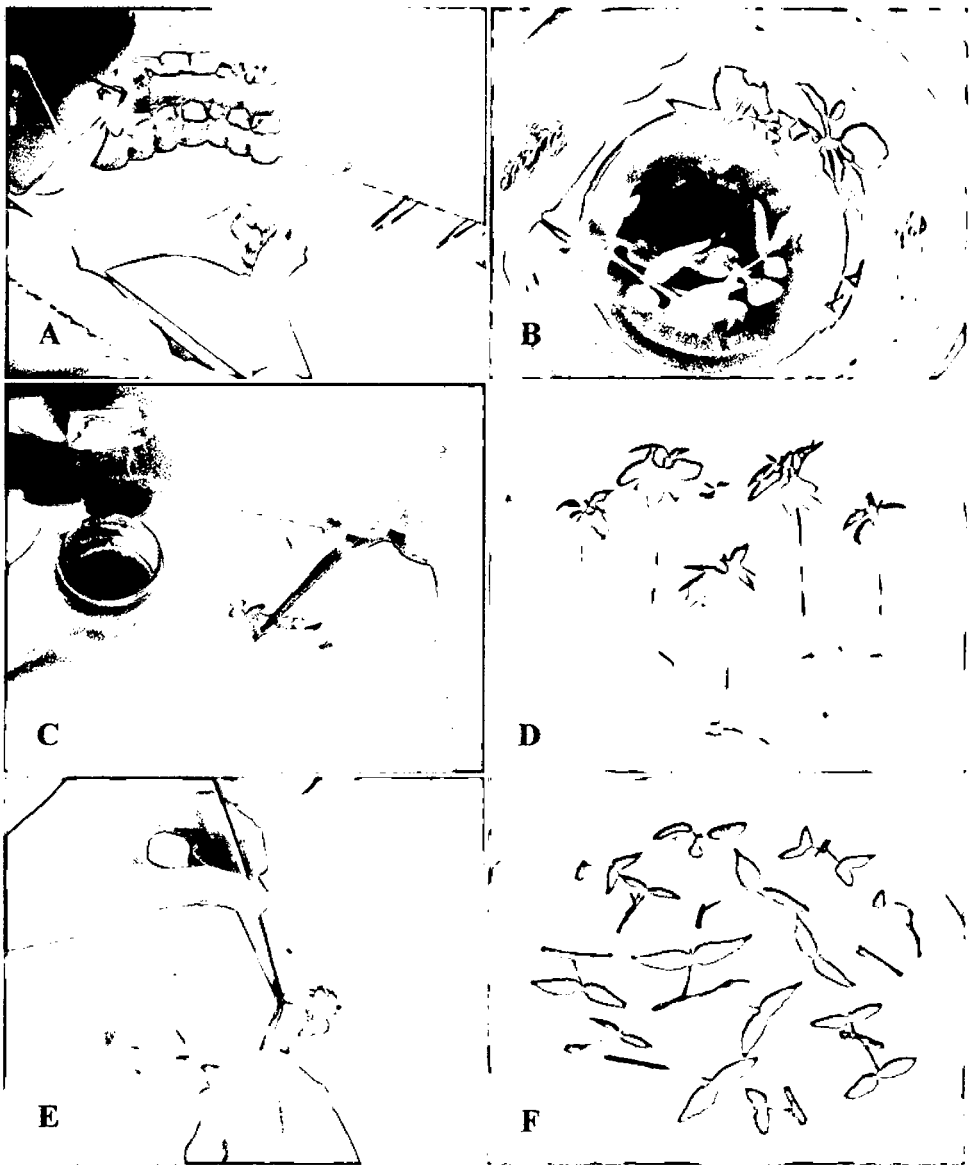


Figura N° 06. A-F: A. Proceso de destapado de frascos con plántulas de Cedro; **B.** Plántulas procedentes de semillas; **C.** Extracción de las plántulas de Cedro; **D.** Plántulas en agua destilada estéril. **E.** Proceso de corte para la extracción del explante. **F.** Explantes de segmentos nodales.

Establecimiento de explantes a condiciones *in vitro*

Explantes extraídos (segmentos nodales) fueron establecidos en medios de cultivo que mantenían los diferentes tratamientos en estudio. Consistió en la inoculación de tres (03) explantes por frasco, considerando que cada frasco es una repetición que mantiene 3 unidades experimentales, la respuesta promedio de los tres explantes fue considerado a futuro como un dato para análisis estadístico, siendo que cada tratamiento obtuvo cinco (05) repeticiones. Frascos inoculados sellados con *parafilm* fueron llevados a incubación sobre un fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad), 24°C±2, 46% HR externa.

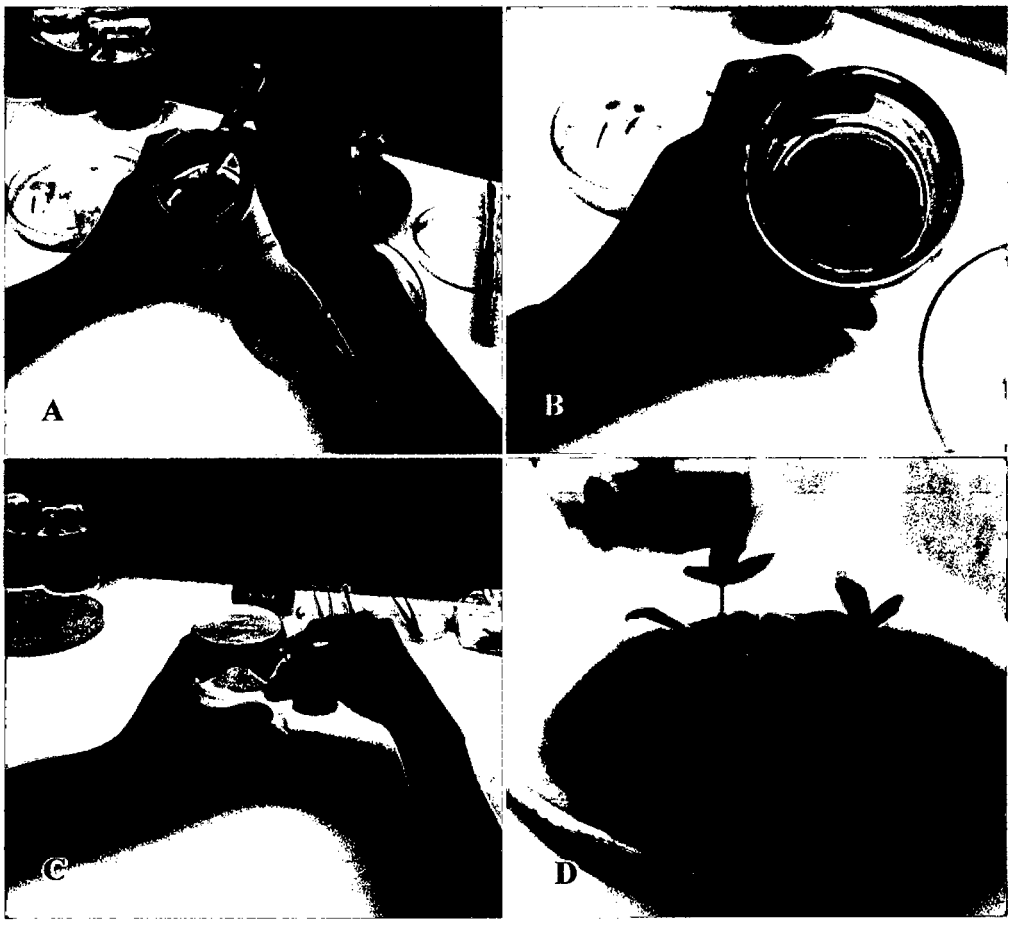


Figura N° 07. A-D: A. Proceso de siembra; **B.** Proceso de siembra; **C.** Sellando los frascos para asegurar su esterilidad; **D.** Explantes sembrados.

Incubación de Explantes

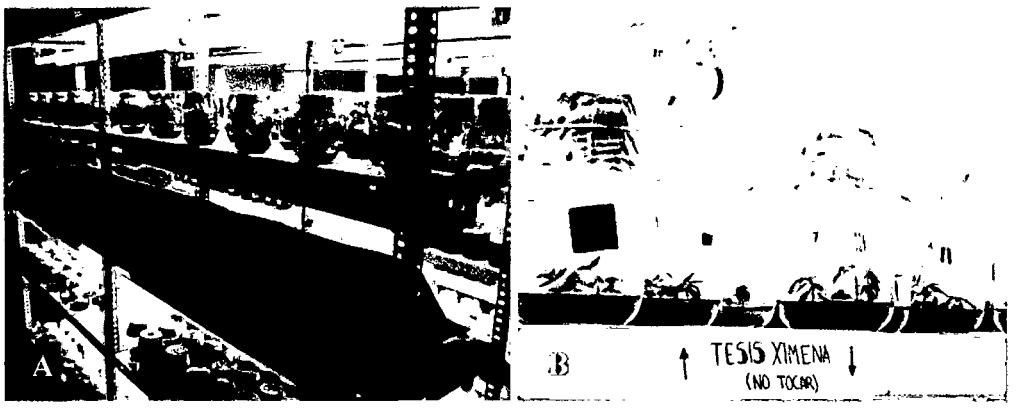


Figura N° 08. A-B: A. Incubación de Explantes; **B.** Frascos con los Explantes ubicados por tratamientos.

4.5. Variables evaluadas

La medición de parámetros biométricos fue efectuada en cámara de flujo laminar, acondicionándose las unidades experimentales en placas petri de 14 cm conteniendo agua destilada estéril a fin de evitar deshidratación y facilitar la evaluación, mediciones de longitudes fueron auxiliadas por pinzas y papel milimetrado (Figura N° 09). Fueron registrados los siguientes parámetros a los 35 días después de haberse establecido el experimento.

- **Altura de Planta:** Evaluación realizada mediante la extensión longitudinal de plantas.

Figura N° 09. A-D: Evaluando Altura de Plántulas a los 35 días. Plántulas de diferentes tamaños.

- **Número de Nudos:** Fueron realizados conteos de nudos presentes en cada planta, como se muestra en la figura N° 10.

Figura N° 10. A-D. Evaluando número de nudos a los 35 días. Plántulas de diferente número de nudos.

- **Número de Hojas:** De igual manera fue realizado el conteo de hojas compuestas (Figura N° 11).

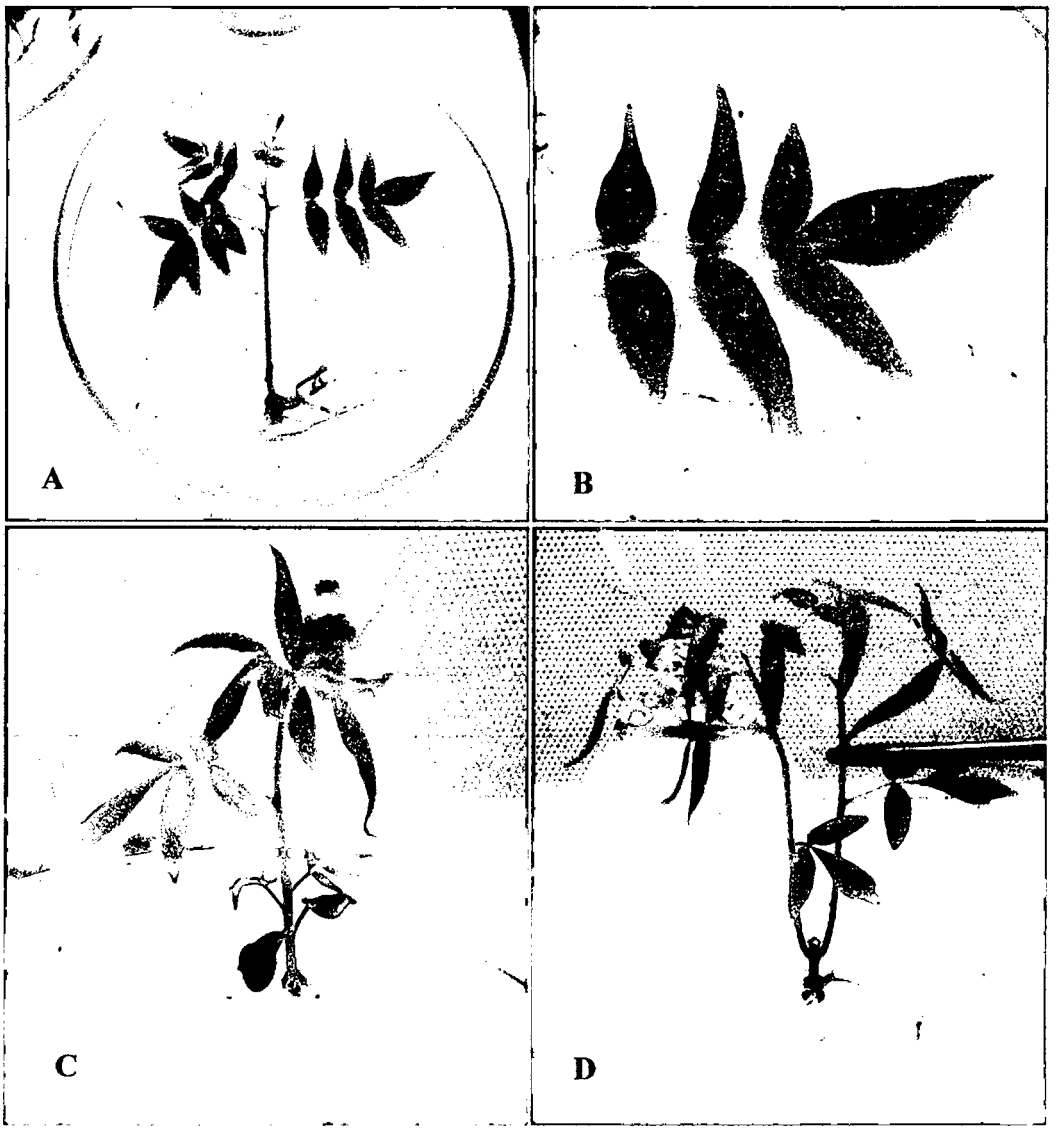


Figura N° 11. A-D: A. Evaluando número de hojas a los 35 días. **B.** Hoja compuesta de siete (7) foliolos. **C.** Plántula con cuatro (4) hojas compuestas. **D.** Plántula con estructura diferente. Ocho (8) hojas compuestas.

- **Número de Raíz:** Fue realizado el conteo de raíces por cada planta en los diferentes tratamientos puestos en estudio (Figura N° 12).

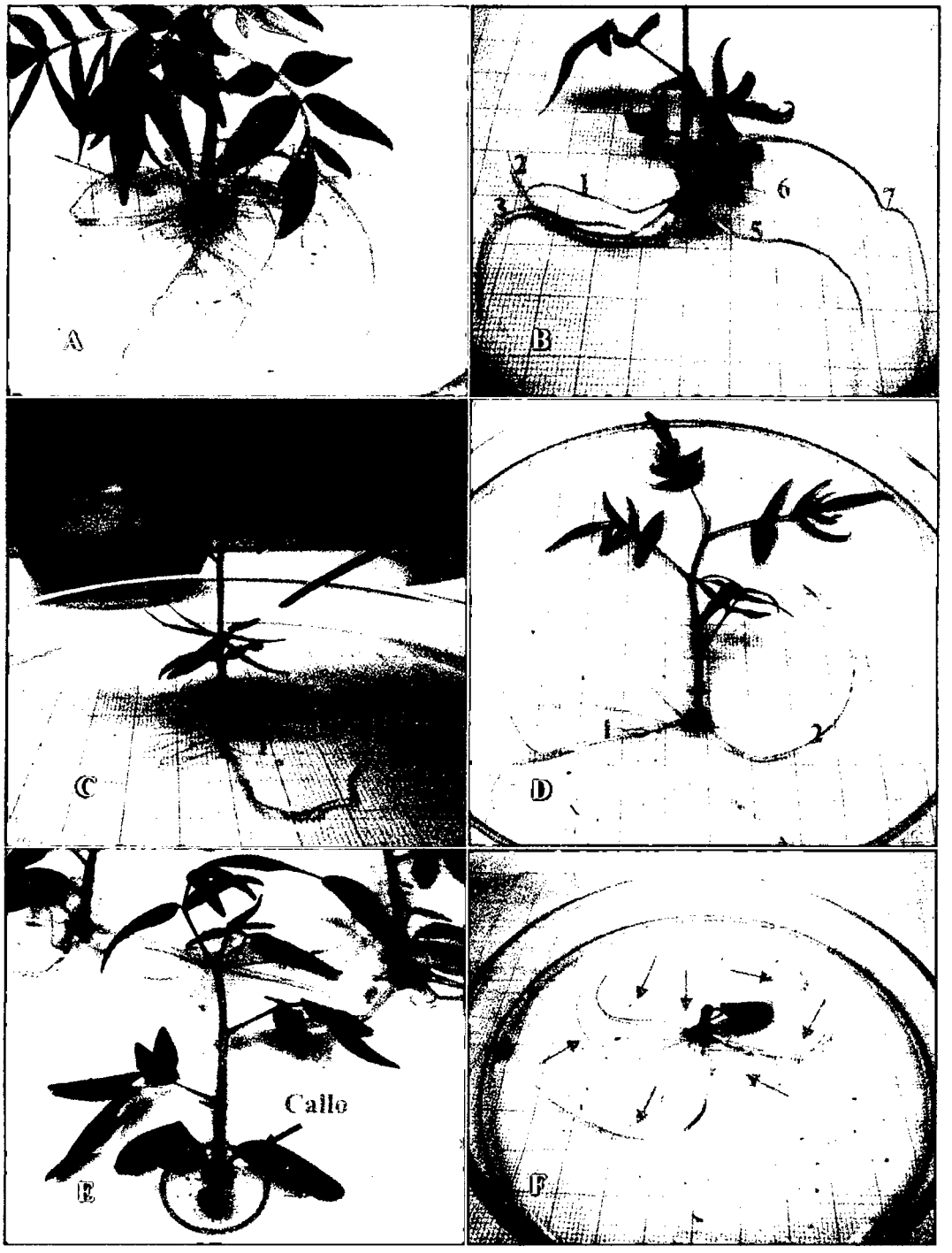


Figura N° 12. A-F: A. Evaluando número de raíz a los 35 días. **B-D.** Conteo de raíces. **E.** Formación de callo en la parte radicular. **F.** Sistema radicular.

- **Longitud de Raíz:** Las mediciones fueron efectuadas mediante el estiramiento de raíces sobre papel milimetrado, como se observa en la figura N° 13.

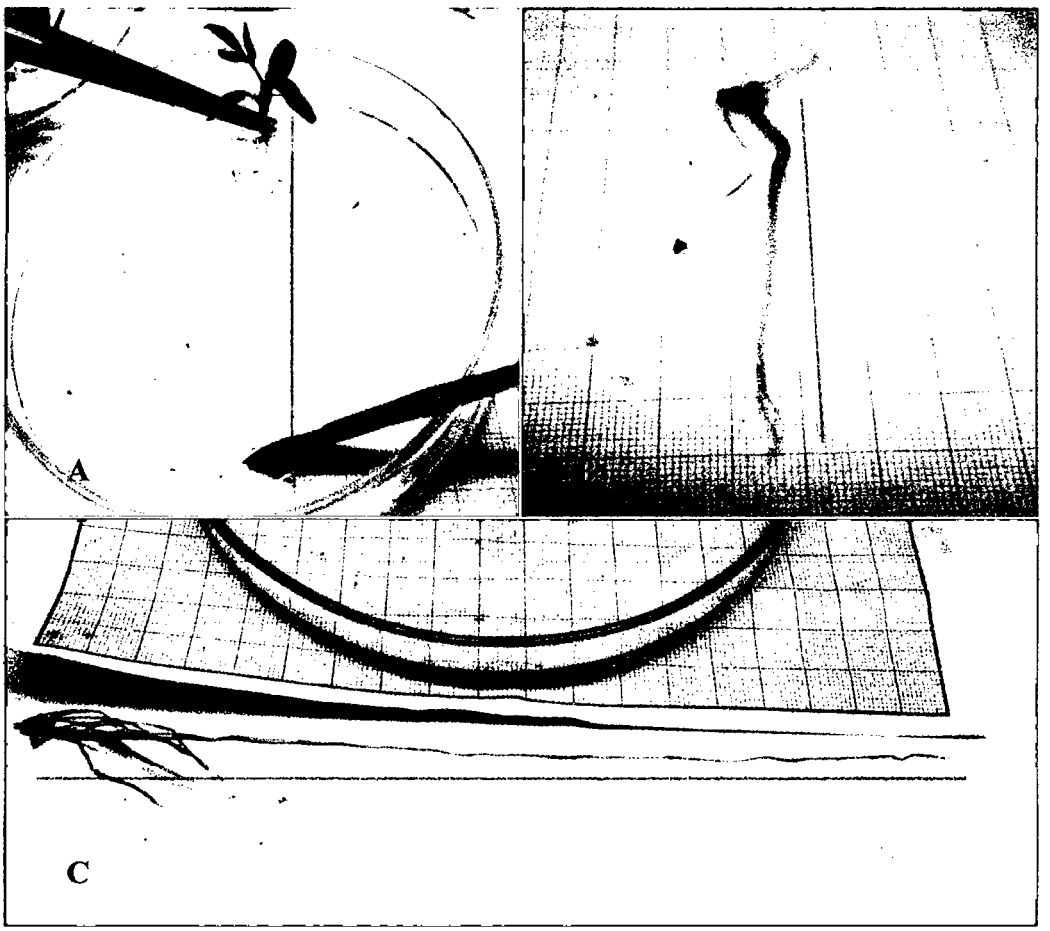


Figura N° 13. A-C: A. Evaluando longitud de raíz a los 35 días. **B-C.** Midiendo longitud de raíces con ayuda del papel milimetrado.

V. RESULTADOS

5.1. Establecimiento de semillas a condiciones *In Vitro:*

El gráfico 01 muestra los porcentajes de contaminación (ocasionados principalmente por hongos) y germinación de las semillas (apreciable a partir del tercer día) que fueron introducidas a condiciones *in vitro*, obteniendo como mejor resultado al tiempo de inducción 2 (15 minutos en NaOHCl) para ambos casos.

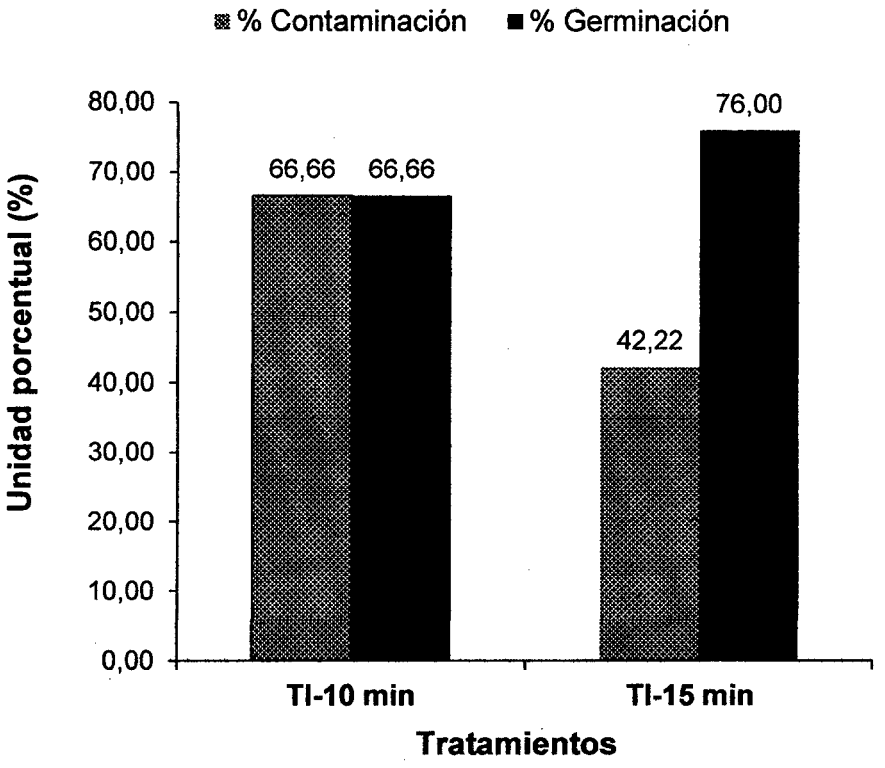


Gráfico 1: Porcentaje de contaminación y germinación

5.2. Altura de Planta

Cuadro 3: Análisis de varianza para la altura de planta, evaluado a los 35 días después de haberse establecido el experimento.

F.V.	G.L	SC	CM	F	P-valor
Factor A (BAP)	2	1,573	0,787	7,434	0.002 **
Factor B (ANA)	2	0,172	0,086	0,813	0.451 **N.S.**
Inter. Factor A*Factor B	4	5,971	1,493	14,107	0.000 **
Error	36	3,809	0,106		
Total	**44**	**11,525**			

n.s = no significativo, * = significativo, **= Altamente significativo

R^2=66.9% **C. V.= 7.94%** **X=4.10%**

Cuadro 4: Prueba de Duncan para los promedios de los niveles del factor A: BAP, respecto a la altura de la planta evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento.

Concentraciones de BAP	Descripción	Duncan (α 0.05)	
		a	b
A3	2.00 mg/L = 8.87 µm	3.88	
A2	1.00 mg/L = 4.43 µm	4.09	
A1	0.5 mg/L = 2.21 µm		4.34

Cuadro 5: Prueba de Duncan para los promedios de los niveles del factor B: ANA, respecto a la altura de la planta evaluada a los 35 días de haberse establecido el experimento.

Concentraciones de ANA	Descripción	Duncan (α 0.05)
		a
B3	0.25 mg/L = 1.34 µm	4.01
B1	0.00 mg/L = 0.00 µm	4.13
B2	0.1 mg/L = 0.53 µm	4.16

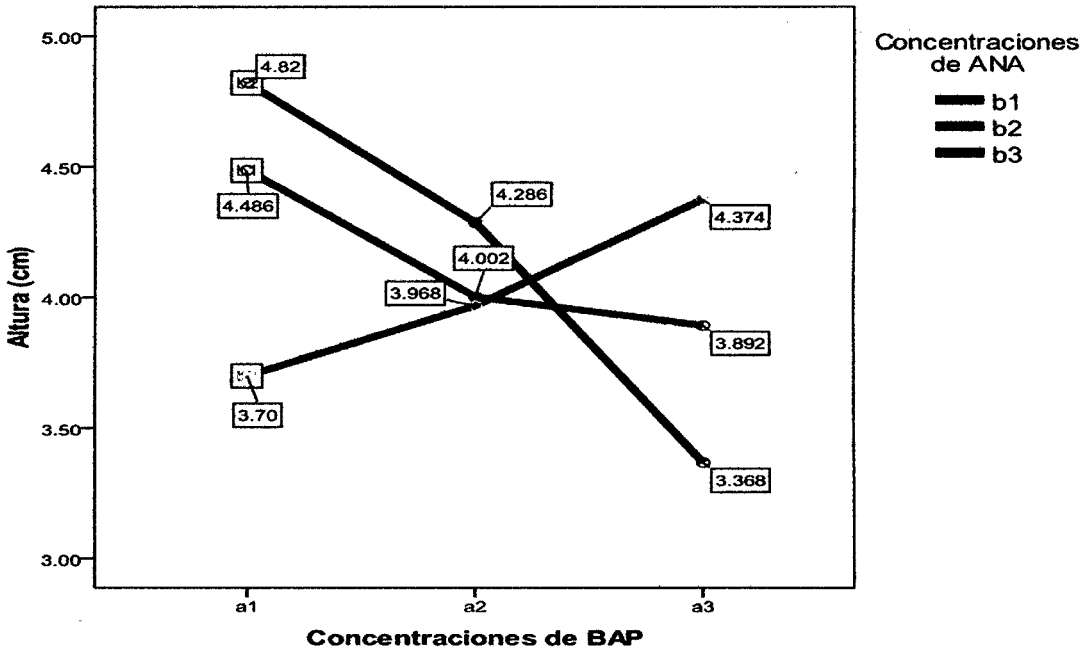


Gráfico 2: Efecto de la interacción del factor B (ANA) dentro de los promedios de los niveles del factor A (BAP) respecto a la altura de planta evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento.

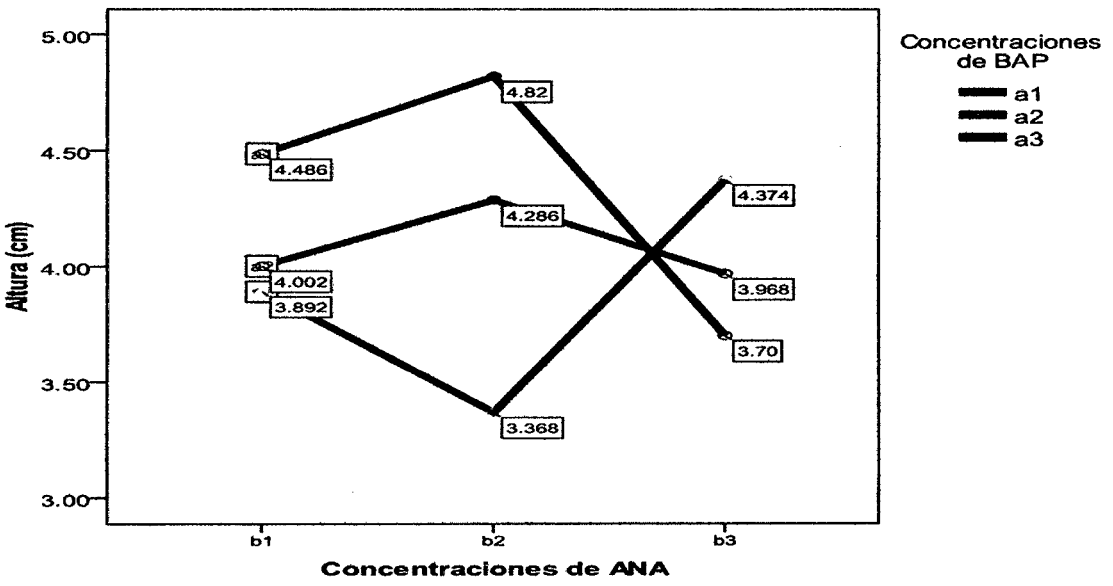


Gráfico 3: Efecto de la interacción del factor A (BAP) dentro de los promedios de los niveles del factor B (ANA) respecto a la altura de planta evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento.

5.3. Número de Nudos

Cuadro 6: Análisis de varianza para el número de nudos (datos transformados por √x) evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento.

F.V.	G.L	SC	CM	F	P-valor
Factor A (BAP)	2	0,031	0,015	3.064	0.059 **
Factor B (ANA)	2	0,035	0.017	3.459	0.042 *
Inter. Factor A*Factor B	4	0.137	0;034	6.860	0.000 **
Error	36	0,180	0,005		
Total	**44**	**0.383**			

n.s = no significativo, * = significativo, **= Altamente significativo

R^2=52.9% **C. V.= 4.26%** **X=1.66%**

Cuadro 7: Prueba de Duncan para los promedios de los niveles del factor A: BAP, respecto al número de nudos evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento.

Concentraciones de BAP	Descripción	Duncan (α 0.05)	
		a	b
A3	2.00 mg/L = 8.87 µm	2.69	
A1	0.5 mg/L = 2.21 µm	2.71	
A2	1.00 mg/L = 4.43 µm		2.89

Cuadro 8: Prueba de Duncan para los promedios de los niveles del factor B: ANA, respecto al número de nudos evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento.

Concentraciones de ANA	Descripción	Duncan (α 0.05)	
		a	b
B3	0.25 mg/L = 1.34 µm	2.63	
B1	0.00 mg/L = 0.0 µm		2.82
B2	0.1 mg/L = 0.53 µm		2.84

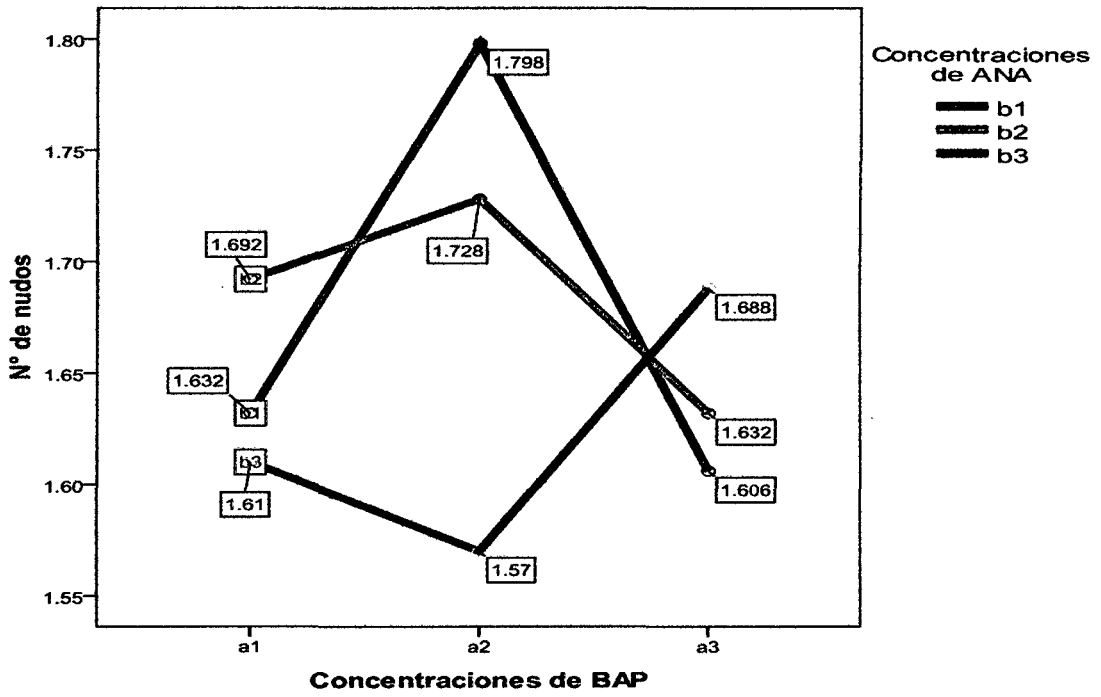


Gráfico 4: Efecto de la interacción del factor B (ANA) dentro de los promedios de los niveles del factor A (BAP) respecto al número de nudos evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento.

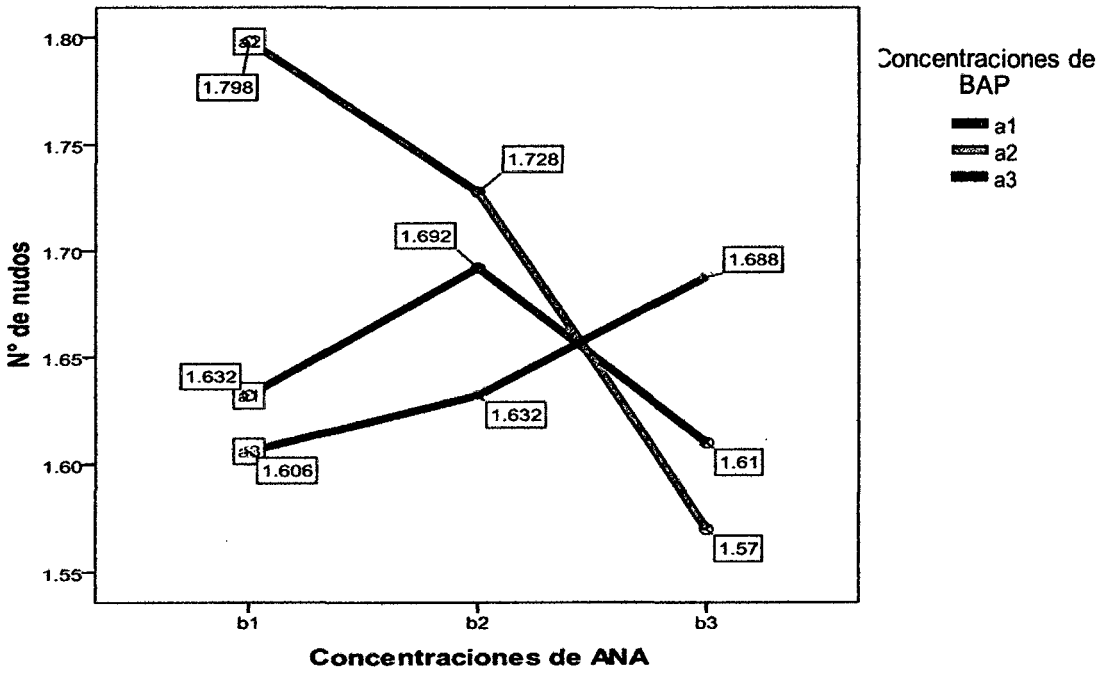


Gráfico 5: Efecto de la interacción del factor A (BAP) dentro de los promedios de los niveles del factor B (ANA) respecto al número de nudos evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento.

5.4. Número de Hojas

Cuadro 9: Análisis de varianza para el número de hojas (datos transformados por √x) evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento.

F.V.	G.L	SC	CM	F	P-valor
Factor A (BAP)	2	0,068	0,034	26.781	0.000 **
Factor B (ANA)	2	0,082	0.041	32.398	0.000 **
Inter. Factor A*Factor B	4	0.292	0;073	57.551	0.000 **
Error	36	0,046	0,001		
Total	**44**	**0.488**			

n.s = no significativo, * = significativo, **= Altamente significativo

R^2=90.6% **C. V.= 5.49%** **X=1.82%**

Cuadro 10: Prueba de Duncan para los promedios de los niveles del factor A: BAP, respecto al número de hojas evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento.

Concentraciones de BAP	Descripción	Duncan (α 0.05)		
		a	b	c
A3	2.00 mg/L = 8.87 µm	3.12		
A1	0.5 mg/L = 2.21 µm		3.32	
A2	1.00 mg/L = 4.43 µm			3.46

Cuadro 11: Prueba de Duncan para los promedios de los niveles del factor B: ANA, respecto al número de hojas evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento.

Concentraciones de ANA	Descripción	Duncan (α 0.05)		
		a	b	c
B3	0.25 mg/L = 1.34 µm	3.12		
B1	0.00 mg/L = 0.0 µm		3.30	
B2	0.1 mg/L = 0.53 µm			3.50

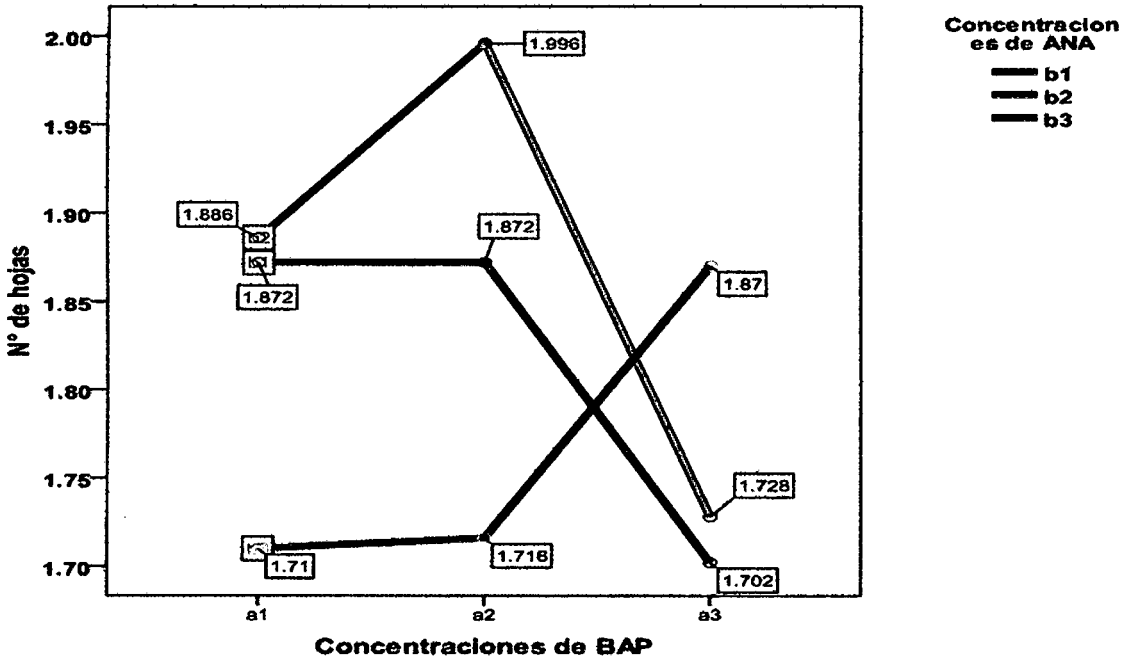


Gráfico 6: Efecto de la interacción del factor A (BAP) dentro de los promedios de los niveles del factor B (ANA) respecto al número de hojas a los 35 días de haberse establecido el experimento

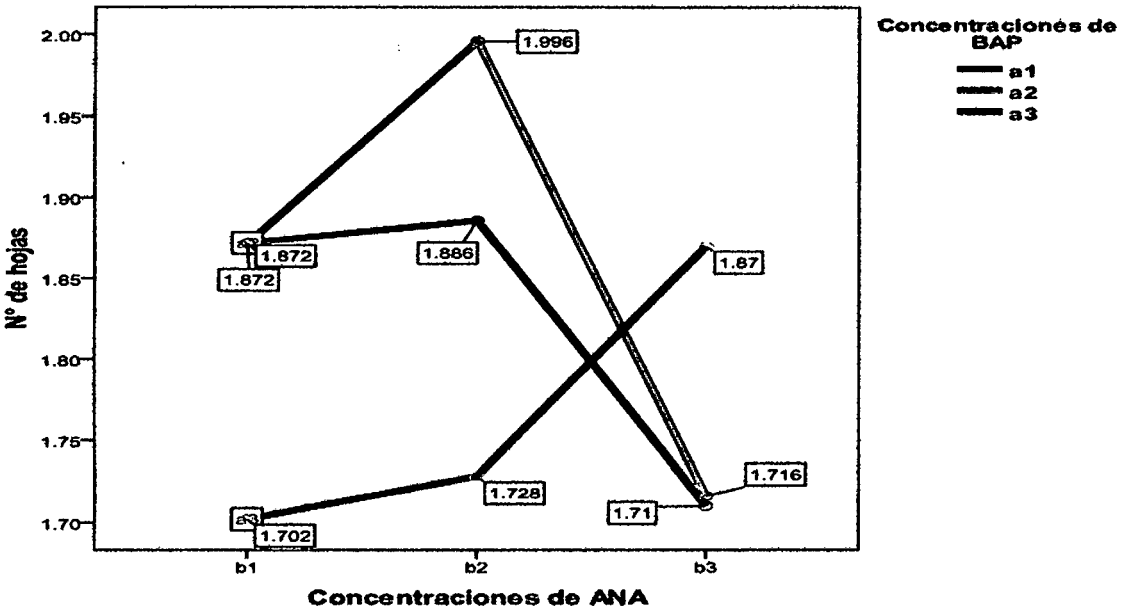


Gráfico 7: Efecto de la interacción del factor B (ANA) dentro de los promedios de los niveles del factor A (BAP) respecto al número de hojas a los 35 días de haberse establecido el experimento.

5.5. Número de Raíces

Cuadro 12: Análisis de varianza para número de raíces (datos transformados por √x) evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento.

F.V.	G.L	SC	CM	F	P-valor
Factor A (BAP)	2	0,477	0,238	29.210	0.000 **
Factor B (ANA)	2	0,417	0.209	25.585	0.000 **
Inter. Factor A*Factor B	4	1.946	0;487	59.629	0.000 **
Error	36	0.294	0,008		
Total	**44**	**3.134**			

n.s = no significativo, * = significativo, **= Altamente significativo

R^2=90.6% **C. V.= 3,73%** **X=2.40%**

Cuadro 13: Prueba de Duncan para los promedios de los niveles del factor A: BAP, respecto al número de raíces evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento.

Concentraciones de BAP	Descripción	Duncan (α 0.05)		
		a	b	c
A3	2.00 mg/L = 8.87 µm	5.16		
A2	1.00 mg/L = 4.43 µm		5.72	
A1	0.5 mg/L = 2.21 µm			6.37

Cuadro 14: Prueba de Duncan para los promedios de los niveles del factor B: ANA, respecto al número de raíces evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento.

Concentraciones de ANA	Descripción	Duncan (α 0.05)	
		a	b
B2	0.1 mg/L = 0.53 µm	5.39	
B3	0.25 mg/L = 1.34 µm	5.45	
B1	0.00 mg/L = 0.00 µm		6.41

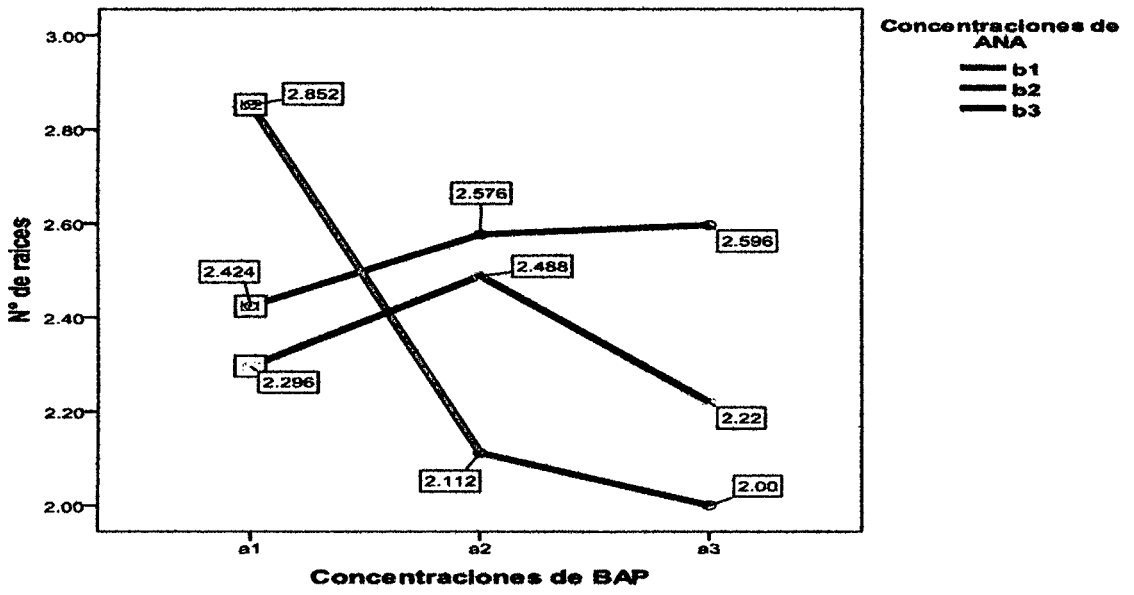


Gráfico 8: Efecto de la interacción del factor A (BAP) dentro de los promedios de los niveles del factor B (ANA) respecto al número de raíces a los 35 días de haberse establecido el experimento.

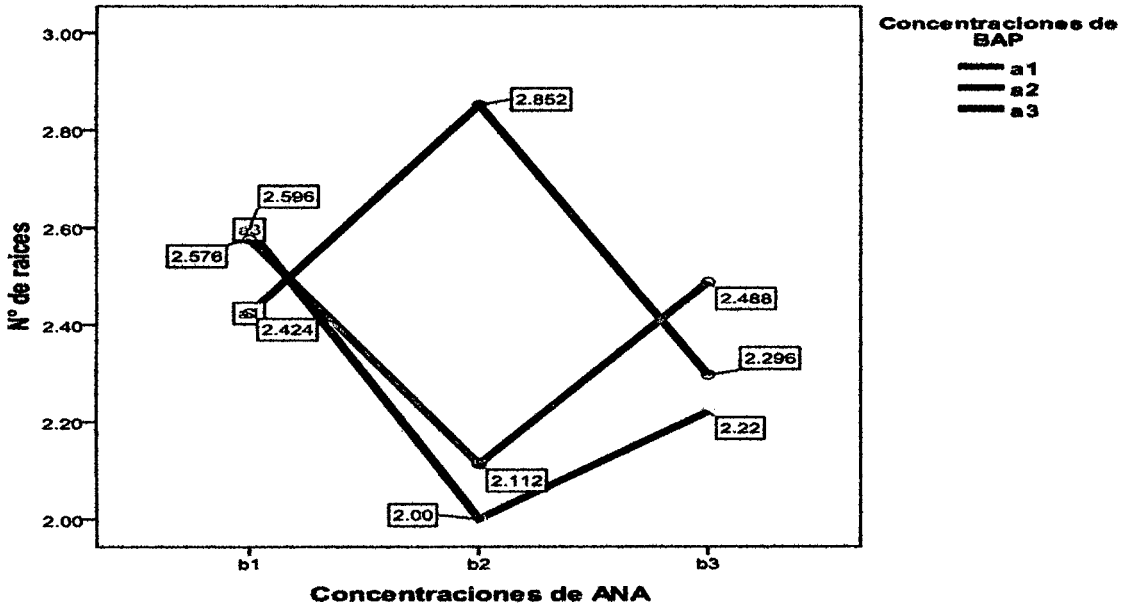


Gráfico 9: Efecto de la interacción del factor B (ANA) dentro de los promedios de los niveles del factor A (BAP) respecto al número de raíces a los 35 días de haberse establecido el experimento.

5.6. Longitud de Raíz

Cuadro 15: Análisis de varianza para longitud de raíz (datos transformados por √x) evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento.

F.V.	G.L	SC	CM	F	P-valor
Factor A (BAP)	2	19.098	9.549	21.128	0.000 **
Factor B (ANA)	2	31.190	15.595	34.505	0.000 **
Inter. Factor A*Factor B	4	16.412	4.103	9.078	0.000 **
Error	36	16.271	0,452		
Total	**44**	**82.971**			

n.s = no significativo, * = significativo, **= Altamente significativo

R^2=80.4% **C. V.= 7.52%** **X=8.94%**

Cuadro 16: Prueba de Duncan para los promedios de los niveles del factor A: BAP, respecto a la longitud de raíz evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento.

Concentraciones de BAP	Descripción	Duncan (α 0.05)		
		a	b	c
A2	1.00 mg/L = 4.43 µm	8.21		
A3	2.00 mg/L = 8.87 µm		8.82	
A1	0.5 mg/L = 2.21 µm			9.79

Cuadro 17: Prueba de Duncan para los promedios de los niveles del factor B: ANA, respecto a la longitud de raíz evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento.

Concentraciones de ANA	Descripción	Duncan (α 0.05)	
		a	b
B1	0.00 mg/L = 0.00 µm	8.34	
B3	0.25 mg/L = 1.34 µm	8.36	
B2	0.1 mg/L = 0.53 µm		10.11

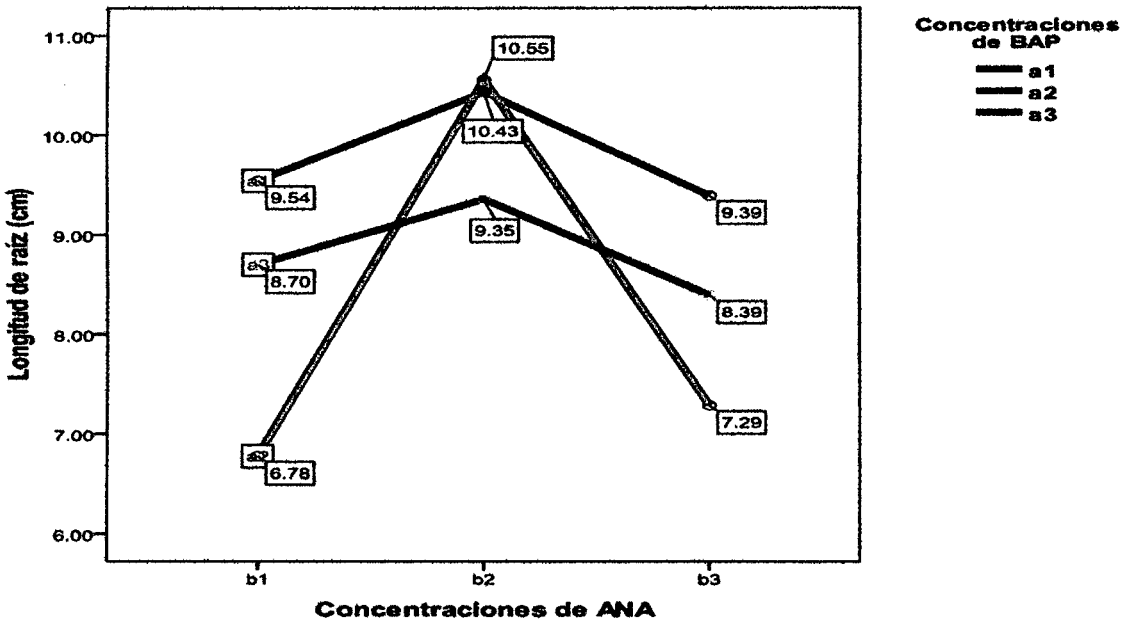


Gráfico 10: Efecto de la interacción del factor A (BAP) dentro de los promedios de los niveles del factor B (ANA) respecto a la longitud de raíz.

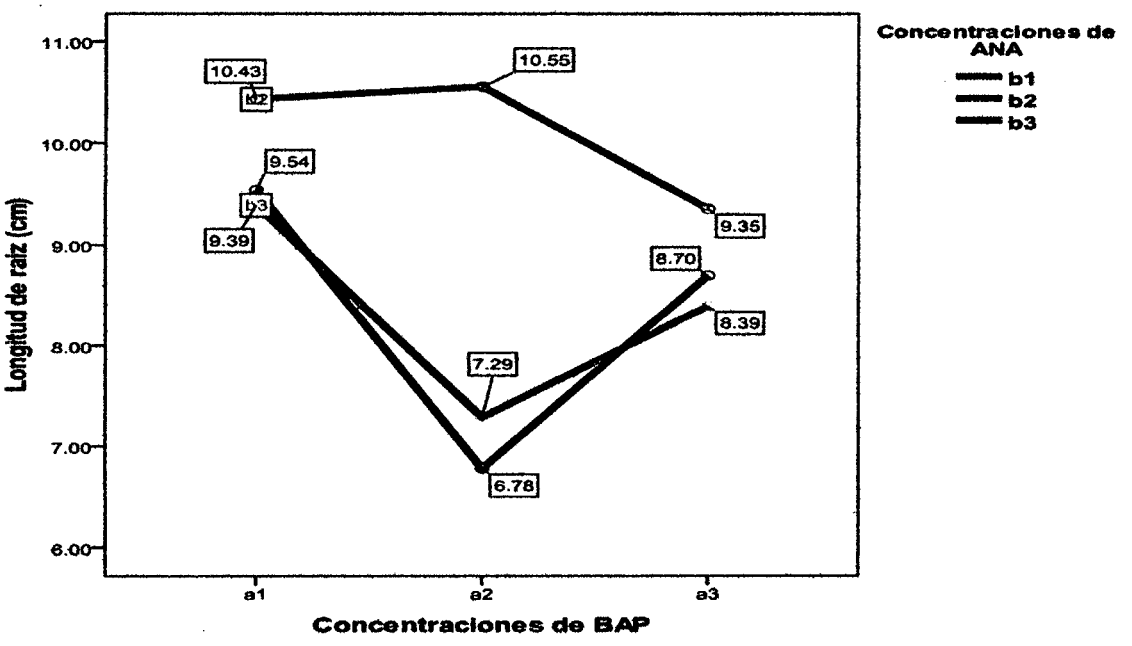


Gráfico 11: Efecto de la interacción del factor B (ANA) dentro de los promedios de los niveles del factor A (BAP) respecto a la longitud de raíz.

VI. DISCUSIONES

6.1. Porcentaje de Contaminación de Semillas

La contaminación *in vitro* provocada por microorganismos (hongos, bacterias, micoplasmas, etc.) uno de los principales problemas a resolver en la micropropagación, hasta ahora resulta ser la más trabajada cuando se pretende establecer explantes. Agentes contaminantes, pueden originarse mediante dos fuentes distintas: aquellos que están disponibles sobre la superficie o en los tejidos de plantas donantes y aquellos que surgen por manipulación durante procedimientos realizados en laboratorio. En plantas, tejidos superficiales constituyen hábitats esenciales para microorganismos.

Al evaluar el porcentaje de contaminación se observó que el tratamiento T1 presentó 66,66 % de contaminación mientras que el tratamiento T2 presentó 42,22 % (Gráfico 01). El empleo de alcohol (70 %) durante 60 segundos y NaOCl 1,5 % durante 15 minutos resultó ser más efectivo en la desinfección de semillas **Roca y Mroginski (1991)** señalan que agentes desinfectantes como hipoclorito de sodio (NaOCl) en concentraciones de 1 a 3 % resulta ser útil como germicida y agente oxidante, no produciendo lesiones debido a su acción blanqueadora.

García *et al.*, (2011) concluyeron que lavados en segmentos nodales de *Cedrela odorata* con propiconazol CE 25 al 5 % durante 3 minutos posibilita un 100 % de desinfección de los segmentos nodales. Sin embargo, su empleo podría ser limitado debido a su composición química para experimentos

donde se empleen pequeñas concentraciones hormonales, el mismo que probablemente genere acciones alteradas debido a la incorporación de un compuesto químico que podría interactuar directa o indirectamente con la composición química del medio de cultivo. Aquí, reportamos que concentraciones de 1.5% de hipoclorito de sodio (NaOCl) removido por enjuagues continuos después de la desinfección podrían ser adecuadas para el establecimiento *in vitro* de semillas de cedro.

Durante el análisis realizado (Gráfico 1) se observa que al incrementar tiempos de exposición con NaOCl, es consistente la disminución de agentes contaminantes, incrementando el porcentaje de germinación. La contaminación inicial por hongos y bacterias influyó negativamente en la germinación *in vitro* de las semillas de cedro, tal como fue observado por **Pérez et al., (2002)**. Esto puede estar asociado a semilla procedente de especies forestales tropicales, ambientes favorables por diversidad de microorganismos que, de manera natural ayudan a procesos de germinación pero que representa un factor limitante para los trabajos *in vitro* **(Castro, 2001).**

6.2. Altura de la Planta

El cuadro 3 presenta el análisis de varianza para la altura de planta evaluado a los 35 días después de haberse establecido el experimento y el cual detectó diferencias altamente significativas para la fuente de variabilidad BAP (6-bencil amino purina) y para interacción BAP x ANA (ácido 1-naftalenacetico), siendo que la significancia estadística para la interacción BAP x ANA anula literalmente la interpretación de los tratamientos en combinación. Así mismo el coeficiente de determinación (R^2) explica suficientemente el efecto que han tenido los tratamientos estudiados sobre la altura de planta, por otro lado, el coeficiente de variación (C.V.) con 7.94% ha determinado una ligera variabilidad de la información obtenida en relación al promedio general.

La prueba de Duncan para los promedios de los niveles del factor A: BAP, respecto a la altura de planta evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento (cuadro 4) ha determinado que los promedios de la altura de planta ha sido efecto de la relación inversa de las concentraciones de BAP, es decir que a menor concentración de BAP menor fue la altura alcanzada por los tratamientos, tanto así que el Nivel A1 (0.5 mg/l = 2,21 uM) con la menor concentración de BAP alcanzó la mayor altura de planta con un promedio de 4.34 cm.

La prueba de Duncan para los promedios de los niveles del factor B. ANA, respecto a la altura de planta evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento (cuadro 5) no detectó diferencias significativas entre los

promedios de los niveles del Factor B: ANA, siendo que los promedios variaron desde 4.01 cm, 4.13 cm y 4.16 cm para B3 (0, 25 mg/l = 1,34uM), B1 (0, 00 mg/l = 0,0 uM) y B2 (0, 1 mg/l = 0,53uM) respectivamente.

Los efectos de la interacción del factor B (ANA) dentro de los promedios de los niveles del factor A (BAP) respecto a la altura de planta evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento, se observan en el gráfico 2. Donde se puede apreciar que los niveles B1 y B2 concuerdan en una disminución de la altura de planta a medida que se incrementa las concentraciones de BAP, sin embargo el efecto de la aplicación de la concentración de B3 (0, 25 mg/l = 1,34uM) en combinación con las concentraciones del factor A (BAP) determinó un incremento de la altura de planta a medida que se se incremento las concentraciones de BAP.

Los efectos de la interacción del factor A (BAP) dentro de los promedios de los niveles del factor B (ANA) respecto a la altura de planta evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento, se observan en el gráfico 3. Donde se puede apreciar que el efecto de la combinación de las concentraciones de BAP en A2 y A1 con las concentraciones de ANA en B1 y B2 determinó un incremento de la altura de planta, contrariamente a lo obtenido cuando estos niveles se combinaron con B3, detectándose una disminución sustancial de la altura de planta. Por otro lado el nivel B3 en combinación con los niveles de A (ANA), solo determinó un incremento de la altura de planta cuando esta se combinó con la concentración B3 (A3B3).

Pequeños mensajeros químicos responsables por la organización, formación y crecimiento de órganos cumplen un papel esencial en plantas y animales. Fitohormonas, descritas hace muchas décadas están involucradas en aspectos como velocidad de crecimiento traduciéndose a una ganancia de altura, pequeñas concentraciones de ANA (0,0 – 1,34uM) no produjeron un efecto principal significativo, sin embargo 2,21 uM de BAP medidos como efecto principal genero diferencia significativa sobre altura de planta, asimismo, concentraciones crecientes de BAP (4,43 – 8,87 uM) disminuye su crecimiento, cabe recordar que el papel esencial de BAP está dirigido a citocinesis indispensable en el ciclo celular.

Basado en estos resultados pequeñas cantidades de BAP evaluados en el experimento estarían favoreciendo el alongamiento celular siendo que su incremento estaría dirigido a un mayor incremento de número de células o formación de nuevos órganos y no a alongamiento celular. Citoquininas fueron relacionadas a la activación de una enzima semejante a fosfatasa, Cdc25, cuyo papel es remover un grupo fosfato inhibitorio de la quinase Cdc2 **(Zhang, 1996).**

Interacción de 2,21 uM de BAP y 0,53 uM de ANA resulta ser favorable en la ganancia de altura en plántulas de cedro (Gráfico 03), respuestas semejantes son reportadas en los tratamientos T5 y T9: 4,43 uM de BAP y 0,53 uM de ANA; 8,85 uM de BAP y 1,34 uM de ANA, de acuerdo a los resultados existe una proporción de 1:4 (auxina/citoquinina) sensible al mejor desempeño de crecimiento (T2), teniendo ciertas alteraciones en disminución de altura en

proporciones 1:6, 1:8 (T5,T9), estas relaciones de balance hormonal en el desarrollo de plantas fueron reportados por **(Skoog & Miller, 1965)**, donde fueron observados que, la diferenciación de callos obtenidos a partir de segmentos de médula, raíces o partes aéreas depende de la razón auxina:citoquinina, una alta razón de auxina:citoquinina favorece a la formación de raíces; una baja razón, lleva a la formación de parte aérea. En niveles intermediarios, el tejido crece como un callo indiferenciado.

Pérez *et al.*, (2002) indican que concentraciones de 2,21uM y 6,65 uM de BAP favorece la brotación de los segmentos nodales, sin embargo el tamaño de los brotes obtenidos (1 cm = 10 mm) no garantiza el éxito para pasar a la fase posterior del cultivo *in vitro* por su difícil manejo y mayor susceptibilidad a la manipulación. A su vez **García-Gonzales *et al.*, (2011)** mencionan que la adición de 8,87 uM de BAP y 16,11 uM de ANA propició la brotación del 100 % de los segmentos nodales *in vitro* y una altura promedio de 3,93 cm a las 8 semanas. Esos resultados difieren de los obtenidos en el presente trabajo ya que 2,21 uM de BAP en interacción con 0,53 uM de ANA permite obtener plantas de 4,82 cm de altura en 35 días.

6.3. Número de Nudos

El cuadro 6 presenta el análisis de varianza para el número de nudos evaluados a los 35 días después de haberse establecido el experimento y el cual detectó diferencias significativas para la fuente de variabilidad ANA (ácido 1-naftalenacetico)) y altamente significativo para interacción BAP (6-

bencil amino purina x ANA, siendo que la significancia estadística para la interacción BAP x ANA anula literalmente la interpretación de los tratamientos en combinación. Así mismo el coeficiente de determinación (R^2) explica muy poco el efecto que han tenido los tratamientos estudiados sobre el número de nudos, por otro lado, el coeficiente de variación (C.V.) con 4.26% no es susceptible de discusión puesto que este valor se encuentra dentro de límites aceptados para este tipo de investigación **(Calzada, 1982).**

La prueba de Duncan para los promedios de los niveles del factor A: BAP, respecto al número de nudos evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento (cuadro 7) ha determinado que el nivel A2 (1.00 mg/l = 4,43 uM) con un promedio de 2.89 nudos superó estadísticamente a los promedios de los niveles A1 (0,5 mg/l = 2,21 uM) y A3 (2.00 mg/l = 8,87 uM) quienes obtuvieron promedios de 2.71 nudos y 2.69 nudos respectivamente

La prueba de Duncan para los promedios de los niveles del factor B. ANA, respecto al número de nudos evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento (cuadro 8) determinó que los niveles B2 (0,1 mg/l = 0,53uM) y B1 (0,00 mg/l = 0,0 uM) con promedios de 2.84 y 2.82 nudos resultaron ser estadísticamente iguales entre si pero estadísticamente superiores al promedio del nivel B3 (0,25 mg/l = 1,34uM) quien obtuvo un valor promedio de 2.63 nudos.

Los efectos de la interacción del factor B (ANA) dentro de los promedios de los niveles del factor A (BAP) respecto al número de nudos evaluado a los 35

días de haberse establecido el experimento, se observan en el gráfico 4. Donde se puede apreciar que los niveles B1 y B2 concuerdan en un incremento del número de nudos cuando estos se combinaron con el nivel A2 (1.00 mg/l = 4,43 uM), decreciendo fuertemente cuando se les combinó con el nivel A3 (2.00 mg/l = 8,87 uM), contrariamente a lo ocurrido con el nivel B3 (0, 25 mg/l = 1,34uM) quien obtuvo un mayor número de nudos cuando se combinó con el nivel A3 (2.00 mg/l = 8,87 uM).

Los efectos de la interacción del factor A (BAP) dentro de los promedios de los niveles del factor B (ANA) respecto al número de nudos evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento, se observan en el gráfico 5. Donde se puede apreciar que el efecto de la combinación de la concentración de BAP en A2 con B1 (A2B1) resultó en un mayor promedio del número de nudos, cayendo fuertemente a medida que se incrementó la concentración de los niveles de B, sin embargo, el nivel A1 obtuvo un mayor promedio de número de nudos cuando este se combinó con el nivel B2 (A1B2). Por otro lado el Nivel A3 resulto con un mayor promedio de nudos cuando este se combinó con el Nivel B3 (A3B3).

Estructuras morfogénicas capaces de dar origen a nuevos individuos son condicionados por yemas laterales o meristemas, nudos establecidos entre la inserción (hoja/tallo) providencian estas yemas que, pueden estar sobre una condición inactiva mientras exista dominancia apical. La abolición de esta dominancia puede traer consigo la activación de yemas inactivas mediante

síntesis y transporte de auxinas, citoquininas, giberelinas, etc. Para efecto de micropropagación mediante organogénesis, número de nudos resulta ser un parámetro indispensable relacionado a tasas de multiplicación.

Observando (gráfico 04) que el tratamiento T4, el mismo que contiene 4,43 uM de BAP presenta plantas con mayor número de nudos y es numéricamente superior a otros tratamientos,

6.4. Número de Hojas

El cuadro 9 presenta el análisis de varianza para el número de hojas evaluados a los 35 días después de haberse establecido el experimento y el cual detectó diferencias altamente significativas para las fuentes de variabilidad BAP, ANA y para la interacción BAP x ANA, siendo que la significancia estadística para la interacción BAP x ANA anula literalmente la interpretación de los tratamientos en combinación. Así mismo el coeficiente de determinación (R^2) con 90% explica altamente el efecto que han tenido los tratamientos estudiados sobre el número de hojas, por otro lado, el coeficiente de variación (C.V.) con 5,49% no es susceptible de discusión puesto que este valor se encuentra dentro de límites aceptados para este tipo de investigación **(Calzada, 1982).**

La prueba de Duncan para los promedios de los niveles del factor A: BAP, respecto al número de hojas evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento (cuadro 10) ha determinado que el nivel A2 (1.00 mg/l = 4,43 uM) con un promedio de 3.46 hojas superó estadísticamente a los promedios de

los niveles A1 (0.5 mg/l = 2,21 uM) y A3 (2.00 mg/l = 8,87 uM) quienes obtuvieron promedios de 3.32 hojas y 3.12 hojas respectivamente.

La prueba de Duncan para los promedios de los niveles del factor B: ANA, respecto al número de hojas evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento (cuadro 11) determinó el nivel B2 (0, 1 mg/l = 0,53uM) con un promedio de 5.30 hojas superó estadísticamente a los niveles B1 (0, 00 mg/l = 0,0 uM) y B3 (0, 25 mg/l = 1,34uM) quienes arrojaron promedios de 3.30 hojas y 3.12 hojas respectivamente.

Los efectos de la interacción del factor B (ANA) dentro de los promedios de los niveles del factor A (BAP) respecto al número de hojas evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento, se observan en el gráfico 6. Donde se puede apreciar que los niveles B1 y B2 concuerdan en un incremento del número de hojas cuando estos se combinaron con el nivel A2 (1.00 mg/l = 4,43 uM), decreciendo fuertemente cuando se les combinó con el nivel A3 (2.00 mg/l = 8,87 uM), contrariamente a lo ocurrido con el nivel B3 (0, 25 mg/l = 1,34uM) quien obtuvo un mayor número de hojas cuando se combinó con el nivel A3 (2.00 mg/l = 8,87 uM).

Los efectos de la interacción del factor A (BAP) dentro de los promedios de los niveles del factor B (ANA) respecto al número de hojas evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento, se observan en el gráfico 7. Donde se puede apreciar que los niveles A1 y A2 concuerdan en un

incremento del número de hojas cuando estos se combinaron con el nivel A2 (1.00 mg/l = 4,43 uM), decreciendo fuertemente cuando se les combinó con el nivel A3 (2.00 mg/l = 8,87 uM), contrariamente a lo ocurrido con el nivel B3 (0, 25 mg/l = 1,34uM) quien obtuvo un mayor número de hojas cuando se combinó con el nivel A3 (2.00 mg/l = 8,87 uM).

El abundante desarrollo de follaje en plantas *in vitro* esta relacionado a su capacidad fotosintética. Es necesario que, explantes logren una buena cantidad de follaje para que luego de ser enraizados tengan mayor probabilidad de sobrevivencia durante la etapa de aclimatación.

Se observó además que 4,43 uM de BAP permite obtener plántulas con mayor cantidad de follaje, asimismo 2,21 uM de BAP permite obtener plántulas de mayor tamaño siendo estadísticamente superiores a otras dosis de BAP. A su vez 4,43 uM de BAP muestra la menor altura de plantas, indicando que para obtener plantas de mayor tamaño es necesario el empleo de bajas dosis de BAP. **Solis *et al.*, (2010)** indican que para la proliferación de cedro a través de segmentos nodales es necesario la adición de alguna fuente de citoquinina al medio de cultivo.

6.5. Número de Raíz

El cuadro 12 presenta el análisis de varianza para el número de raíces evaluados a los 35 días después de haberse establecido el experimento y el cual detectó diferencias altamente significativas para las fuentes de variabilidad BAP, ANA y para la interacción BAP x ANA, siendo que la

significancia estadística para la interacción BAP x ANA anula literalmente la interpretación de los tratamientos en combinación. Así mismo el coeficiente de determinación (R^2) con 90.6 % explica altamente el efecto que han tenido los tratamientos estudiados sobre el número de raíces, por otro lado, el coeficiente de variación (C.V.) con 3,73% no es susceptible de discusión puesto que este valor se encuentra dentro de límites aceptados para este tipo de investigación **(Calzada, 1982).**

La prueba de Duncan para los promedios de los niveles del factor A: BAP, respecto al número de raíces evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento (cuadro 13) ha determinado diferencias estadísticas entre los promedios de tratamientos, siendo que a medida que disminuyó las concentraciones de BAP estos obtuvieron mayores promedios de número de raíces, donde el nivel A1 (0.5 mg/l = 2,21 uM) arrojó el mayor promedio con 6.37 raíces seguido de los niveles A2 (1.00 mg/l = 4,43 uM) y A3 (2.00 mg/l = 8,87 uM) quienes obtuvieron promedios de 5.72 y 5.16 raíces respectivamente.

La prueba de Duncan para los promedios de los niveles del factor B: ANA, respecto al número de hojas evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento (cuadro 14) determinó el nivel B1 (0, 00 mg/l = 0,53uM) con un promedio de 6.41 raices superó estadísticamente a los niveles B3 (0,25 mg/l = 0,0 uM) y B2 (0,1 mg/l = 1,34uM) quienes arrojaron promedios de 5.45 raíces y 5.39 raíces respectivamente.

Los efectos de la interacción del factor B (ANA) dentro de los promedios de los niveles del factor A (BAP) respecto al número de raíces evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento, se observan en el gráfico 8. Donde se aprecia que el nivel B1 (0,00 mg/l = 0,0 uM) en combinación con el nivel A3 (2.00 mg/l = 8,87 uM) (tratamiento B1A3) alcanzó el mayor promedio con 6.74 raíces; el nivel B2 en combinación con el nivel A1 (tratamiento B2A1) alcanzó el mayor su mayor promedio con 6.74 raíces y el nivel B3 en combinación con el nivel A2 (tratamiento B3A2) obtuvo su mayor promedio con 6.19 raíces.

Los efectos de la interacción del factor A (BAP) dentro de los promedios de los niveles del factor B (ANA) respecto al número de raíces evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento, se observan en el gráfico 9. Donde se puede apreciar que el nivel A1 (0.5 mg/l = 2,21 uM) en combinación con el nivel B2 (0,1 mg/l = 0,53uM) (tratamiento A1B2) alcanzó el máximo promedio con 8.14 raíces; Los niveles A2 y A3 en combinación con el nivel B1 (0, 00 mg/l = 0,0 uM) (tratamientos A2B1 y A3B1) alcanzaron sus máximos promedios con 6.74 y 6.64 raíces respectivamente. Obviamente que al parecer la ausencia de citoquinina permite obtener plántulas con mayor número de raíces.

Durante el cultivo *in vitro* las plantas crecen bajo un ambiente con alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en compuestos orgánicos, especialmente sacarosa. Estas condiciones provocan cambios en la morfología y la fisiología

de las plantas, que las hacen diferir de las que crecen en invernaderos o en el campo **(Agramonte *et al.*, 1998)**. Para lograr que las plantas micropropagadas sobrevivan al proceso de aclimatación y transplante a campo definitivo es necesario que estas tengan un buen número y tamaño de raíces.

García-Gonzales *et al.*, (2011) mencionan que 8,87 uM de BAP en interacción con 16,11 uM de ANA propiciaron la formación de 3,9 raíces por planta en 6 semanas. El gráfico 10 indica que al combinar ambos factores la interacción entre 2,21 uM de BAP y 0,53 uM de ANA proporciona plantas con 8,3 raíces por planta.

6.6. Longitud de Raíz

El cuadro 15 presenta el análisis de varianza para longitud de raíz evaluados a los 35 días después de haberse establecido el experimento y el cual detectó diferencias altamente significativas para las fuentes de variabilidad BAP, ANA y para la interacción BAP x ANA, siendo que la significancia estadística para la interacción BAP x ANA anula literalmente la interpretación de los tratamientos en combinación. Así mismo el coeficiente de determinación (R^2) con 80.4 % explica altamente el efecto que han tenido los tratamientos estudiados sobre la longitud de raíz, por otro lado, el coeficiente de variación (C.V.) con 7.52% determina una variación ligeramente elevada debido a que no ha podido ser controlada y la cual supera ligeramente el límite aceptado para este tipo de investigación **(Calzada, 1982)**.

La prueba de Duncan para los promedios de los niveles del factor A: BAP, respecto al número de raíces evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento (cuadro 16) ha determinado diferencias estadísticas entre los promedios de tratamientos, siendo que el Nivel A1 (0.5 mg/l = 2,21 uM) con un promedio de 9.79 cm de longitud de raíz superó estadísticamente a los niveles A3 (2.00 mg/l = 8,87 uM) y A2 (1.00 mg/l = 4,43 uM) quienes obtuvieron promedios de 8.82 y 8.21 cm de longitud de raíz respectivamente.

La prueba de Duncan para los promedios de los niveles del factor B: ANA, respecto a la longitud de raíz evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento (cuadro 17) determinó el nivel B2 (0.1 mg/l = 0,53uM) con un promedio de 10.11 cm de longitud de ráiz superó estadísticamente a los niveles B3 (0,25 mg/l = 0,0 uM) y B1 (0,0 mg/l = 1,34uM) quienes arrojaron promedios de 8.36 cm y 8.34 cm de longitud de raíz respectivamente.

Los efectos de la interacción del factor A (BAP) dentro de los promedios de los niveles del factor B (ANA) respecto a la longitud de raíz evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento, se observa en el gráfico 10. Donde se aprecia que todos los niveles de A (A1, A2 y A3) cuando se combinaron con el nivel B2 (0,1 mg/l = 0,53uM) alcanzaron sus mayores promedios de longitud de raíz, con 10.55 cm, 10.43 cm y 9,36 cm para los tratamientos A2B2, A1B2 y A3B2 respectivamente. Estos resultados manifiestan que concentraciones mayores o menores a 0,1 mg/l = 0,53uM de ANA no han influenciado en el crecimiento de la raíz.

Los efectos de la interacción del factor B (ANA) dentro de los promedios de los niveles del factor A (BAP) respecto a la longitud de raíz evaluado a los 35 días de haberse establecido el experimento, se observan en el gráfico 11. Se puede apreciar que el nivel B1 y B3 en combinación con el nivel A1 (0,1 mg/l = 0,53uM) y específicamente en los tratamientos B1A1 y B3A1 alcanzaron sus máximas longitudes de raíz con 9.54 cm y 9.39 cm respectivamente, bajando fuertemente cuando se les combino con 1.00 mg/l (4,43 uM) de BAP. Por otro lado, el nivel B3 alcanzó sus máximos promedios de longitud de raíz cuando estos se combinaron con A1 (0.5 mg/l = 2,21 uM) y A2 (1.00 mg/l = 4,43 uM) y especificamente respecto a los tratamientos B3A1 y B3A2 quienes obtuvieron promedios de 10.43 cm y 10.56 cm respectivamente.

Los variables número y longitud de raíces son de mucha importancia en la fase de aclimatación, debido a que es necesaria que una planta tenga el soporte de las raíces para un mejor desarrollo en el sustrato estéril. Si bien las raíces no son del todo funcionales debido a la escasez de pelos absorbentes que no se desarrollan *in vitro*, un mayor tamaño y un mayor número de raíces inducen la formación *ex vitro* de nuevas raíces y pelos absorbentes, que extraerán del suelo los nutrientes necesarios para el desarrollo de la plántula.

La inducción de auxina sobre la elongación de órganos en plantas, tales como hipocotilos, coleóptilos y raíces, había sido explicado por teoría ácido-crecimiento desde la década de 1970 **(Rayle y Cleland, 1970; Hager *et al*, 1971;. Moloney *et al.*, 1981).** La teoría establece que la auxina mejora la extrusión de protones a través de la membrana plasmática por bombas H^+ - ATPse constado en pocos minutos. Este proceso reduce el pH en el medio

extracelular (apoplasto), promoviendo así la extensión de la pared mediado por expansinas y extensivas que, permiten el aflojamiento de la pared celular mediante complejos (pared-proteína). Estos procesos permiten la expansión de células, lo que lleva al crecimiento mediante **elongación (Katou y Okamoto, 1992; Cosgrove, 2000; Hager, 2003).** Para nuestro experimento efectos principales de BAP a 2,21 (gráfico 11) uM y ANA 0,53 uM (gráfico 12) poseen diferencias significativas a dosis elevadas para ambos casos, siendo que el crecimiento de raíces en cedro como se demuestra aquí, necesitaría pequeñas dosis de ANA y BAP.

Por otro lado interacciones constatados por los tratamientos (T5 y T2), donde concentraciones de 2,21; 4,43 uM de BAP interactuando con 0,53 uM de ANA poseen mejores índices de crecimiento en raíces con respecto a otros tratamientos, resultados que predicen que pequeñas dosis de ANA a 0,53uM son suficientes y pueden interactuar hasta un cierto nivel de concentraciones de BAP, siendo 2,21 uM de BAP la más sensible a su balance hormonal.

VII. CONCLUSIONES

7.1. Semillas de cedro pre-tratadas con detergente comercial y benomil; continuado por una desinfección por inmersión sobre alcohol etílico 70% por 60 segundos y 1,5% de hipoclorito de sodio (NaOCl) por 15 minutos, redujo la contaminación en un 42,22% y elevo la germinación en un 76% de embriones establecidos a condiciones *in vitro*.

7.2. Nulas o pequeñas concentraciones de ANA (0,00 - 0,53uM) favorecen el crecimiento longitudinal de raíces y el aumento de número de hojas en segmentos nodales de cedro.

7.3. Concentraciones de BAP (2,21uM) estimula preponderantemente el crecimiento de brotes laterales, formación y crecimiento de raíces. En tanto que, concentraciones duplicadas (4,43uM) favorece el incremento de hojas por planta.

7.4. Pequeñas concentraciones de ANA (0,53uM) y BAP (2,21uM) en función mutua, actúan sinérgicamente sobre el crecimiento y desarrollo de raíz y tallo. Sin embargo, ausencia de ANA y duplicación de BAP (4,33uM) actúa de forma positiva sobre el número de nudos y hojas.

7.5. De acuerdo a los resultados aquí mostrados, el papel de 6-bencil amino purina (BAP) se torna esencial sobre el desarrollo y crecimiento de segmentos nodales en cedro.

7.6. Se logró establecer una metodología base para la obtención de plántulas de cedro in vitro a través de segmentos nodales.

VIII. RECOMENDACIONES

8.1. Desarrollar estudios de organogénesis a partir de yemas apicales, hojas, inflorescencia y otras partes de la planta, utilizándose referencialmente los mejores resultados aquí mostrados.

8.2. Realizar estudios de aclimatación y comportamiento de la especie a nivel de vivero y terreno definitivo, como segunda y tercera fase.

8.3. En el marco de la metodología desarrollada y obtenida se recomienda afinar y validar el protocolo propuesto.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Albert, PD; López, AA; Rodríguez, TM; Duarte, RM. 1995. Recursos fitogenéticos forestales, 1. Familia Meliaceae. Fontqueria 42:329-351.

Alvarez, M. 1999. Caracterización de frutos y semillas de *Cedrela odorata* L., *Tabebuia rosea*, *Alnus acuminata* y *Cupressus lusitanica*. *In* Simposio sobre avances en la producción de semillas forestales en América Latina (2,1999, Santo Domingo, República Dominicana. Memorias. Coordinador Rodolfo Salazar. Turrialba, Costa Rica. p. 145-150.

Biondi,S;Canciani,L;Bagni, N. 1984. Uptake and translocation of benzyladenine by elm shoots cultured *in vitro*. Canadian Journal of Botany 62:2385-2390.

Calzada B, J. 1984. "Métodos estadísticos para la investigación"

Cintron, Barbara B. 1990. *Cedrela odorata* L. Cedro hembra, Spanish cedar. En: Burns, Russell M.; Honkala, Barbara H., eds. Silvics of North America: 2. Hardwoods. Agric. Handb. 654. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service: 250-257.

Corbineau, F.; Defresne, P & Come, D. 1985. Algunas características de germinación y crecimiento de Cedrela odorata L.. Bois et Forets des Tropiques. N° 207. 11 p.

Cosgrove DJ (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. Nature 407: 321–326.

Daquinta, M, M Cid, Y Lezcano, D Pina, R Rodríguez y M Escalona (2003) Callogénesis en Meliáceas exóticas (*Khayanyasica* Stapf. y *Toona ciliata*). Biotecnología Vegetal 3(2):123-125.

Galván, O. 1996. Análisis comparativo del crecimiento de *Cedrela odorata, Swietenia macrophylla, Anburana cearensis* en fajas de enriquecimiento y viales de extracción. Tesis para optar el Título de Ingeniero Forestal. UNALM-Perú.

Hager A, Menzel H, Krauss A (1971) Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachtum. Planta 100: 47–75.

Hager A (2003). Role of the plasma membrane H+-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. J Plant Res 116: 483–505.

Katou K, Okamoto H (1992) Symplast as a functional unit in plant growth. Int Rev Cytol 142: 263–304.

Krikorian, A. 1991. Medios de Cultivo. "Generalidades Composición y Formulación". Departament of Biochimestry of New York – EEUU.42 p.

Lahera W.; Alvarez A. & Gomez S. 1995. Estado del Programa de mejoramiento genético de Cedrela odorata L. Desarrollado en Cuba. Recursos Genéticos Forestales N° 22. FAO. p 27-28. Roma-Italia.

Larco, I. 2000. Estudio drendológico, Anatómico y Físico Mecánico del "Cedro Virgen" (Cedrela montana moritz ex turczaninov) de la provincia de Satipo". Tesis para optar el título de Ingeniero Forestal. UNALM-Perú.

Mejía, R. 1994. Propagación comercial 312 especies de plantas por cultivo in vitro. Agrobiotegnologia: Fundamentos y aplicaciones. Lima-Perú.

MINAM 2000. Mapa de Deforestación de la Amazonía Peruana – Memoria descriptiva. Parte 3:40 – 44 p. Lima-Perú.

Moloney MM, Elliott MC, Cleland RE (1981) Acid growth effects in maize roots: Evidence for a link between auxin-economy and proton extrusion in the control of root growth. Planta 152: 285–291

Mroginski, E. Rey. Hebe Y. Mroginski, L. 2006. Resumen A-036. Obtención de Plantas a Partir del Cultivo *in vitro* de Explantes Foliares de *Arachis correntina* (*Leguminosae*). 1-4 pp.

Muñoz, T., S. 2003. Embriogénesis Somática en Cedro (*Cederla Odorata* Linnaeus) a partir de Cotiledones. Tesis Biol. Universidad Nacional Agraria de la Molina. Lima, Perú.

Matsubayashi, Y.; Sakagami, Y. Peptide hormones in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 649–674, 2006.

Murashige T & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497.

Patiño, F (1997) Recursos genéticos de Swetenia y Cedrela en los neotrópicos: Propuesta para acciones coordinadas. FAO.Roma.

Rayle DL, Cleland R (1970). Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. Plant Physiol 46: 250–253.

Riveros, L. 1998. Respuesta de 5 especies forestales *Jacaranda mimosifolia, Swietenia macrophylla, Cedrela odorata, Caesalpinia spinossa* y *Spathode campanulata* a diversas técnicas de injerto.

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

Skoog, F. and C. O. Miller. 1965. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue culture in vitro, p. 481–494. In E. Bell [ed.], Molecular and Cellular Aspects of Development. Harper & Row, New York, NY.

Tullume, C. 2000. Características anatómicas y propiedades físico mecánicas del Cedro (Cedrela odorata L) proveniente de Satipo. Tesis para optar el título de Ingeniero Forestal. UNALM – Perú.

Urbina, M. 2000. Manejo y poda de raíces en árboles de *Schinus molle* "molle peruano, *jacaranda mimosifolia* "Jacaranda", *Grevillea robusta* "Grevillea" y *Cedrela odorata* "cedro". Tesis para optar el Título de Ingeniero Forestal. UNALM –Perú.

Villalobos, V. 1991. Cultivo de Tejidos aplicado a especies forestales. Peculiaridades del trabajo en forestales. In : Resúmenes del curso Técnicas y Aplicaciones de Biotecnología en Especies Forestales.. (ed)

Villegas Leopoldo. Corporación Andina de Fomento. Caracas. Venezuela. pp 91 – 107

Zhang K, Letham DS, John PCL (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2 -like H1 histone kinase. Planta 200: 2–12

X. RESUMEN

Desde muchas décadas, especies forestales vienen recobrando gran importancia aditiva. Actividades de sobre explotación forestal selectiva practicada durante los años 80 en regiones amazónicas de América del Sur han generado gran disturbio sobre su distribución poblacional, colocando en riesgo hábitats o lugares de origen. El Cedro (*Cedrela odorata* L.), una de las especies explotadas, paso a ser considerada desde 1981 como una especie prioritaria para conservación **(Lahera, 1995)**; desde ese entonces fueron realizados numerosos esfuerzos para su conservación y/o multiplicación, desarrollándose estudios básicos en aspectos genéticos y fisiológicos. Basado sobre estas líneas de ciencia básica direccionada a reguladores de crecimiento (fitohormonas), fueron probadas diferentes dosis de ANA (0,00; 0,53 y 1,43 µM) y BAP (2,21; 4,43 y 8,87 µM) sobre segmentos nodales de cedro provenientes de plántulas *in vitro* (iniciadas por semilla botánica). Eventos morfológicos de respuesta constatados en altura de planta, número de hojas, número de nudos, número de raíces y longitud de raíces, reportaron que: nulas o pequeñas concentraciones de ANA (0,00 - 0,53µM) favorecen el crecimiento longitudinal de raíces y el aumento de número de hojas; asimismo concentraciones de BAP (2,21µM) estimularon preponderantemente el crecimiento de brotes laterales, formación y crecimiento de raíces y el incremento del número de hojas en concentración duplicada (4,43µM). Entretanto, concentraciones de ANA (0,53µM) y BAP (2,21µM) en función mutua, actúan sinérgicamente sobre el crecimiento y desarrollo de raíz y tallo; siendo que, la ausencia de ANA y duplicación de BAP (4,33µM) actúa de forma positiva sobre el número de nudos y hojas. Existiendo así, un papel

esencial de 6-bencil amino purina (BAP) sobre el crecimiento y desarrollo de segmentos nodales en cedro.

Palabras clave: Organogénesis, segmentos nodales, reguladores de crecimiento.

XI. SUMARY

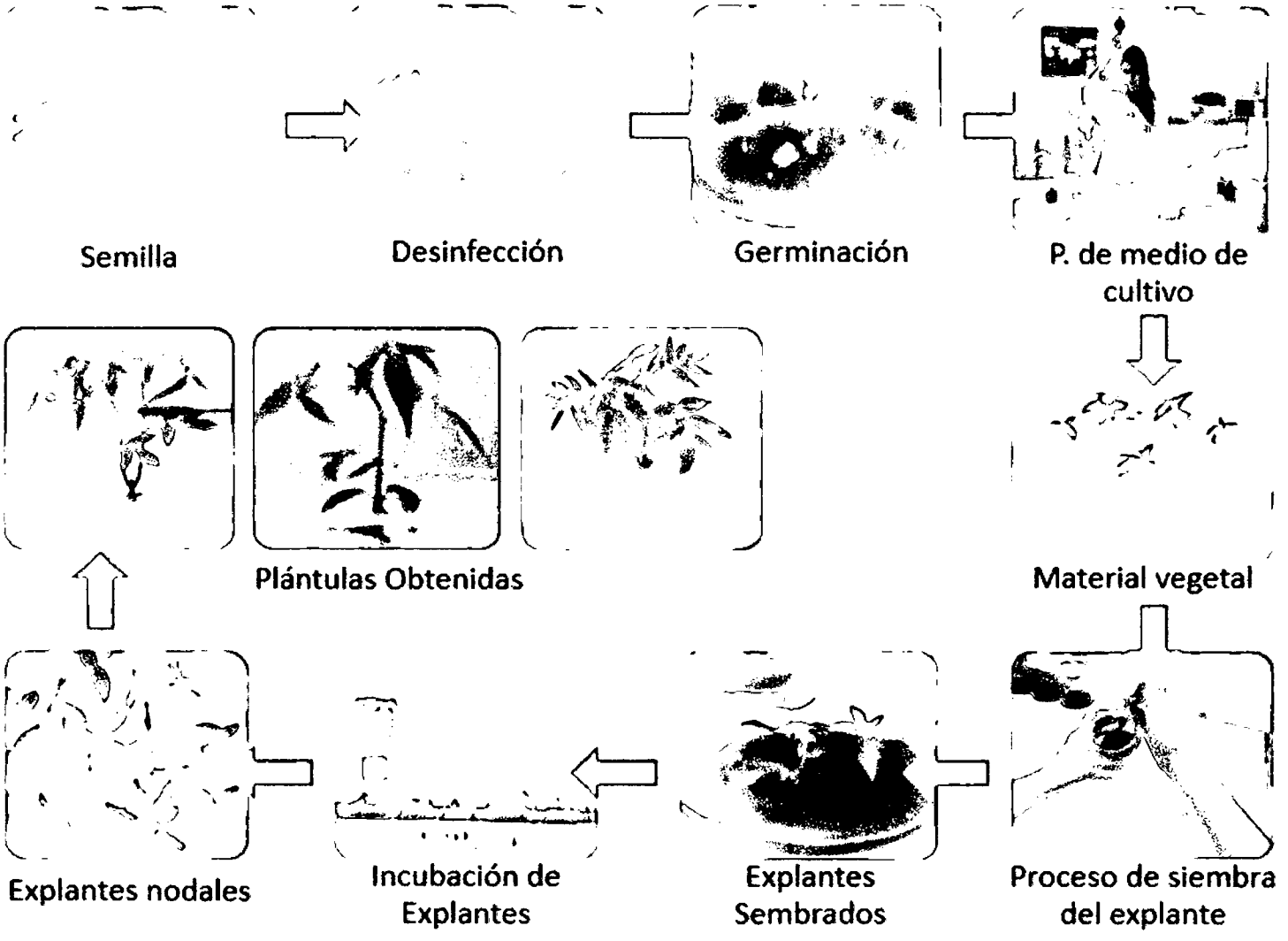
Since many decades, forest species coming retaking additive importance. Selective activities in overexploitation practiced during the 80s in the Amazonian regions have to generate great disturbance on population distribution, placing at risk habitats or places of origin. Cedro (*Cedrela odorata* L.), one of the target species, came to be considered since 1981 as a priority species for conservation **(Lahey, 1995)**, numerous efforts were made to conservation and/or multiplication, basic research were development on aspects genetics and physiological. Based about this efforts and focusing in growth regulators (phytohormones), were tested different doses of ANA (0.00, 0.53 and 1.43 µM) and BAP (2.21, 4.43 and 8.87 µM) on nodal segments from in vitro plants (started by botanical seeds). Events of morphological response observed in plant rise, number of leaves, number of nodes, number and lengthof roots, reported that: no or low concentrations of ANA (0.00 to 0.53 µM) increase the longitudinal growth of roots and increased number of leaves; also, BAP concentrations (2.21 µM) stimulated predominantly lateral shoot, growth and formation root; the increase in the number of leaves in duplicate concentration (4.43 µM). Moreover, ANA concentrations (0.53 µM) and BAP (2.21 µM) in mutual function, act synergistically on the growth and development of root and stem; being that, the absence of ANA and BAP duplication (4.33 µM) acts positively on the number of nodes and leaves. Exist an essential role of 6-benzylaminopurine (BAP) on the growth and development of segment nodal of cedro.

Key words: Organogenesis, nodal segments, growth regulators.

ANEXOS

ANEXO 01

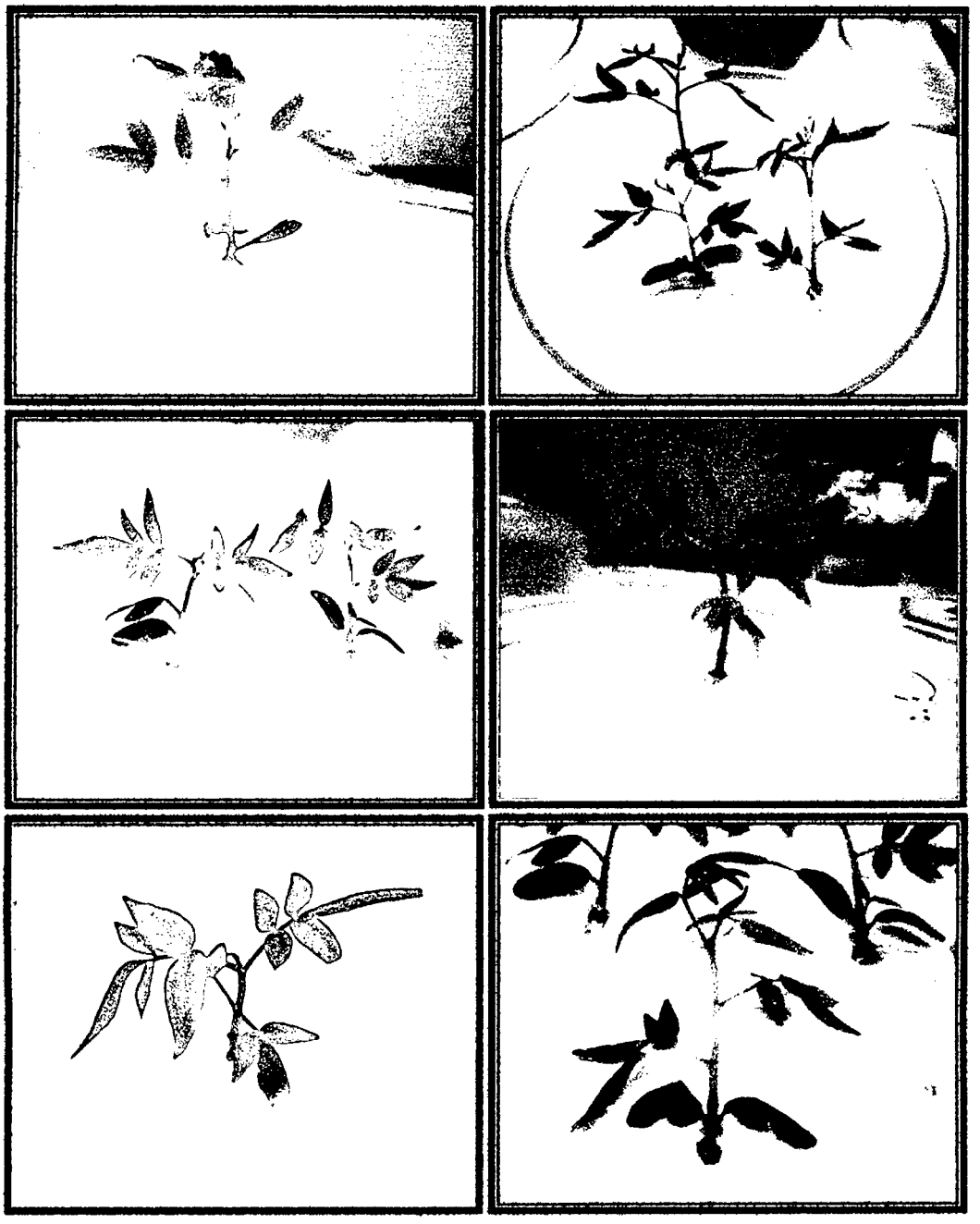
METODOLOGÍA BASE PARA LA OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS DE CEDRO EN CONDICIONES DE CULTIVO *In vitro*:



ANEXO 02

FOTOGRAFÍAS DE PLANTAS OBTENIDAS CON EL TRATAMIENTO 01:

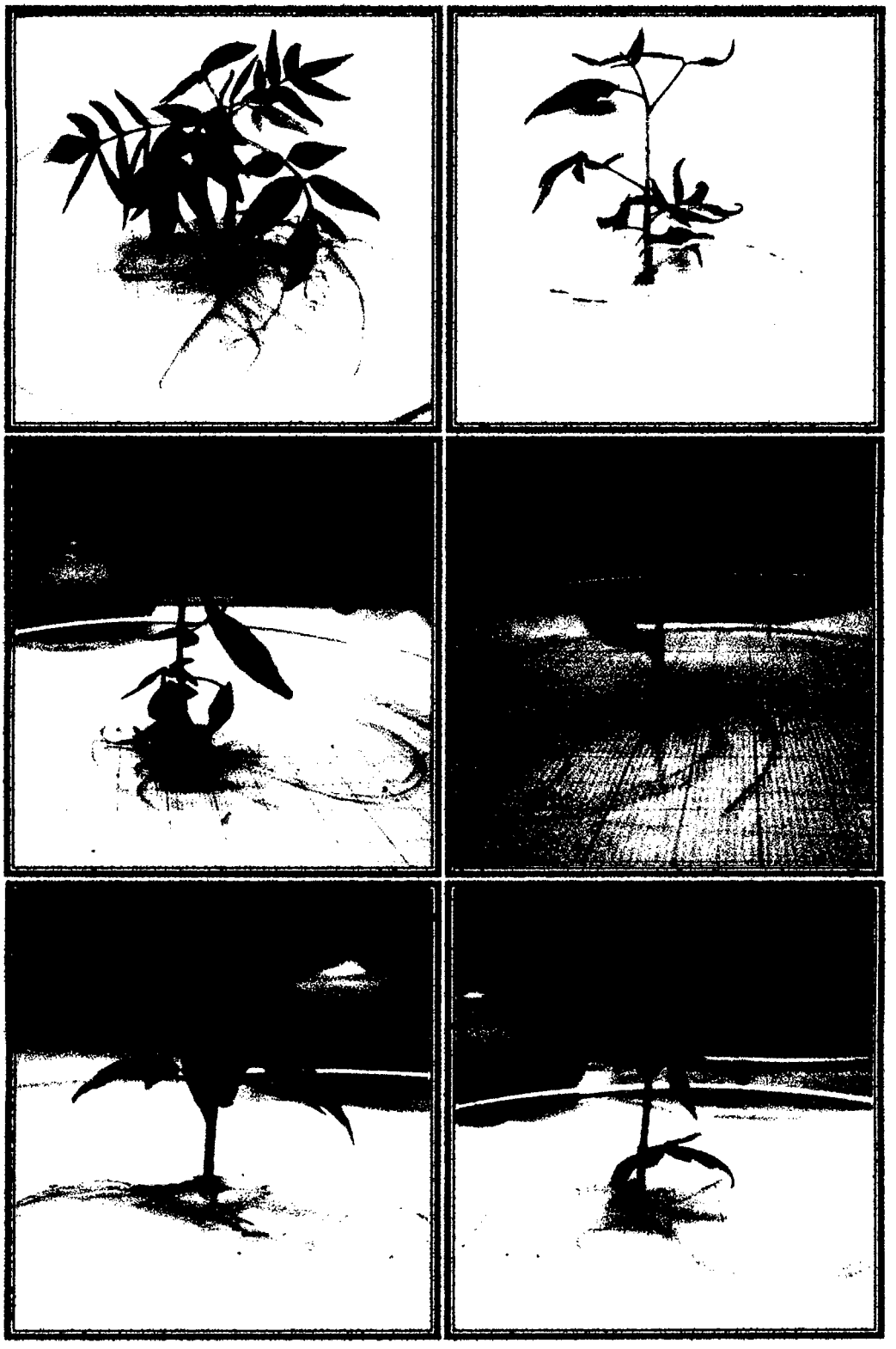
a1b1 (0.5 mg/l BAP + 0.0 mg/l ANA, bajo 35 días de inducción)



ANEXO 03

FOTOGRAFÍAS DE PLANTAS OBTENIDAS CON EL TRATAMIENTO 02:

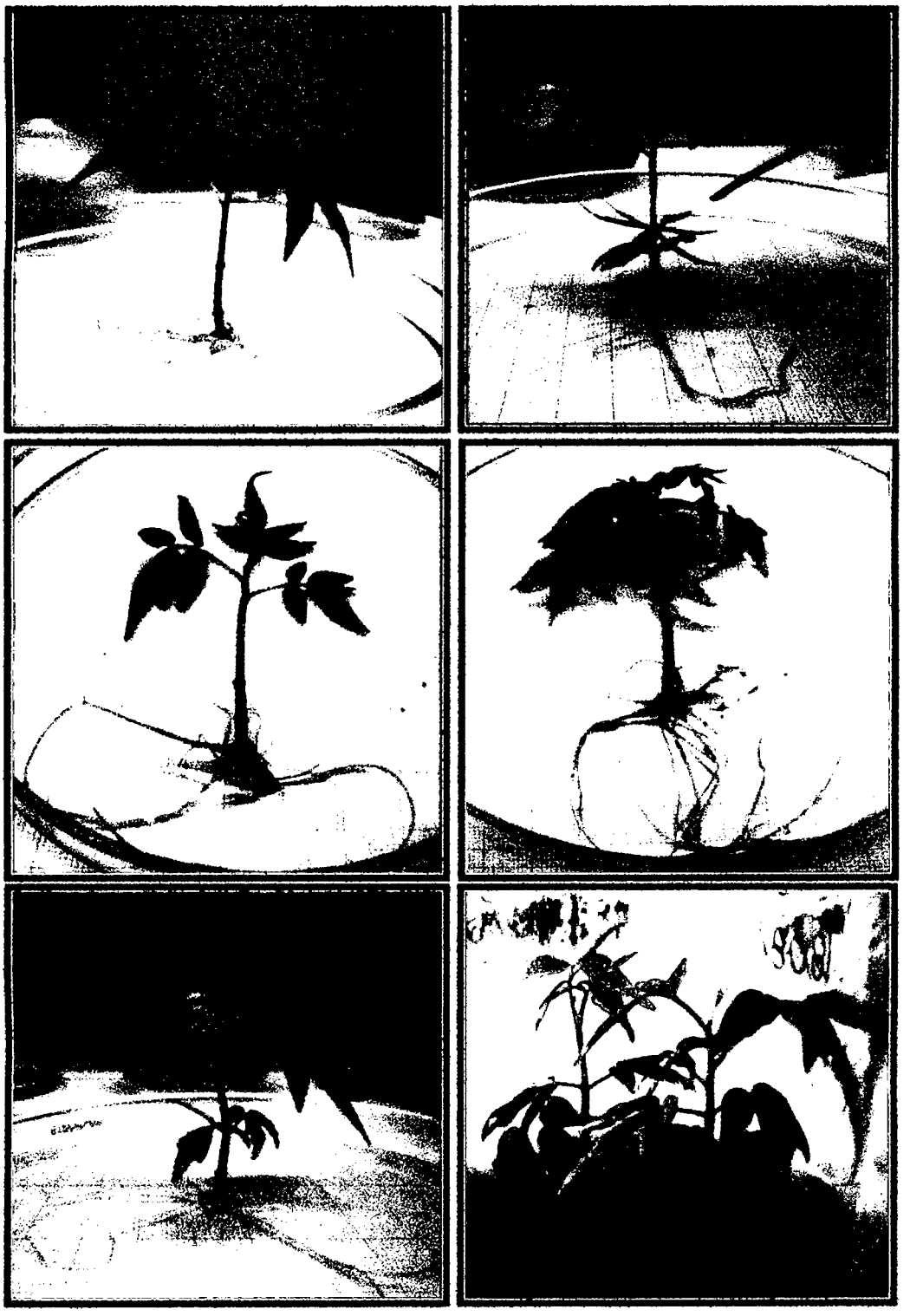
a1b2 (0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l ANA, bajo 35 días de inducción)



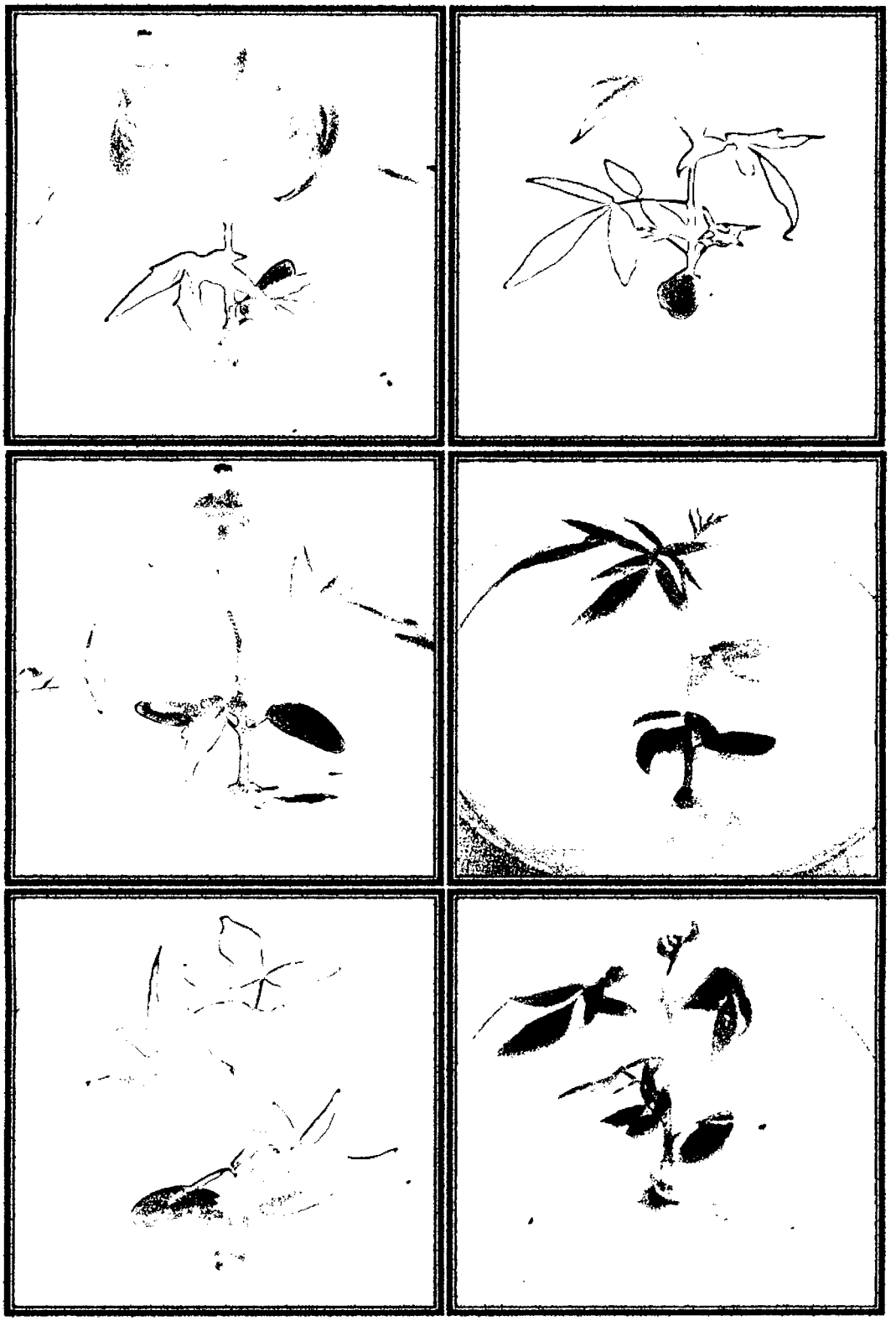
ANEXO 04

FOTOGRAFÍAS DE PLANTAS OBTENIDAS CON EL TRATAMIENTO 03:

a1b3 (0.5 mg/l BAP + 0.25 mg/l ANA, bajo 35 días de inducción)



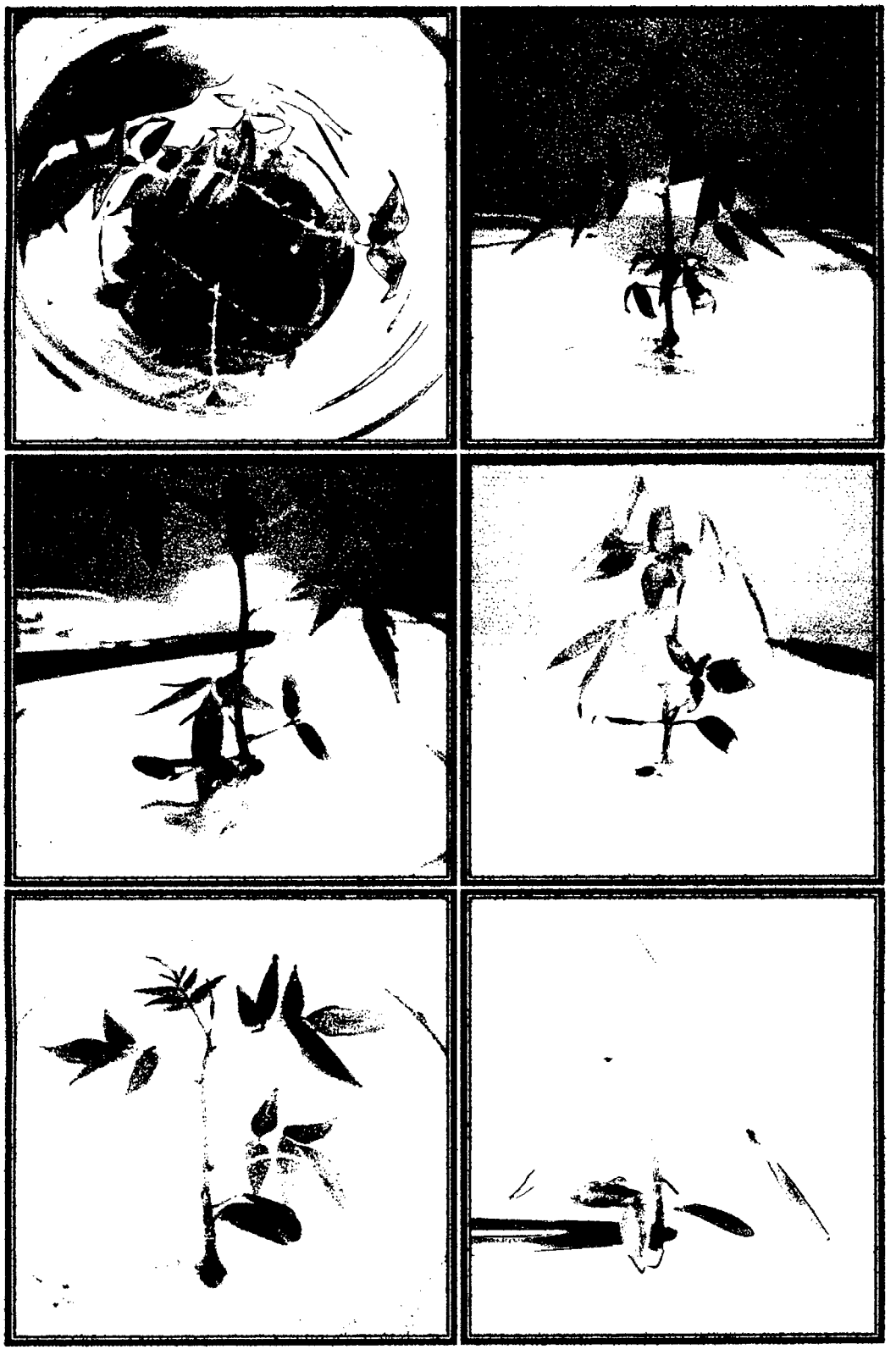
ANEXO 05
FOTOGRAFÍAS DE PLANTAS OBTENIDAS CON EL TRATAMIENTO 04:
a2b1 (1.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l ANA, bajo 35 días de inducción)



ANEXO 06

FOTOGRAFÍAS DE PLANTAS OBTENIDAS CON EL TRATAMIENTO 05:

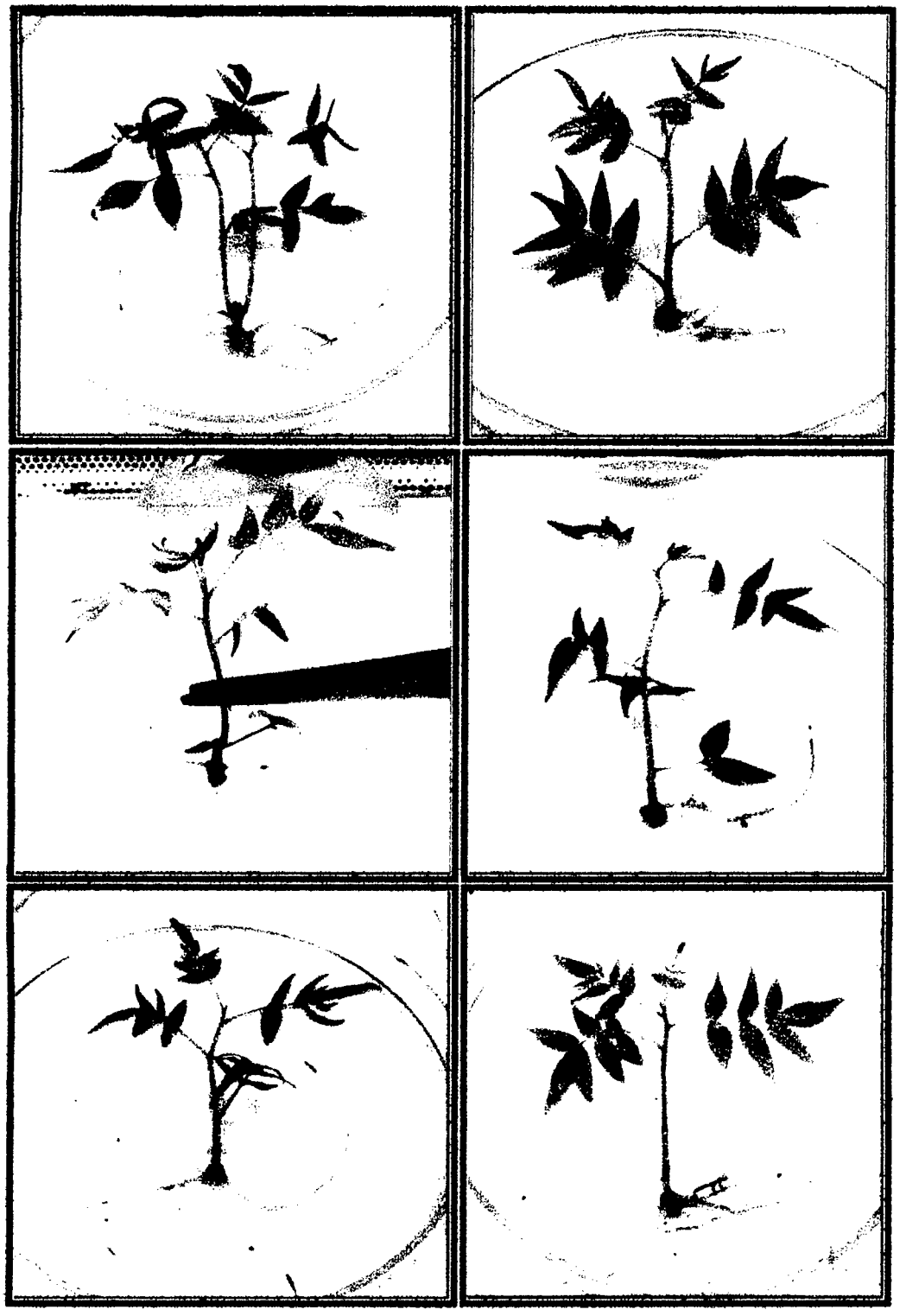
a2b2 (1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l ANA, bajo 35 días de inducción)



ANEXO 07

FOTOGRAFÍAS DE PLANTAS OBTENIDAS CON EL TRATAMIENTO 06:

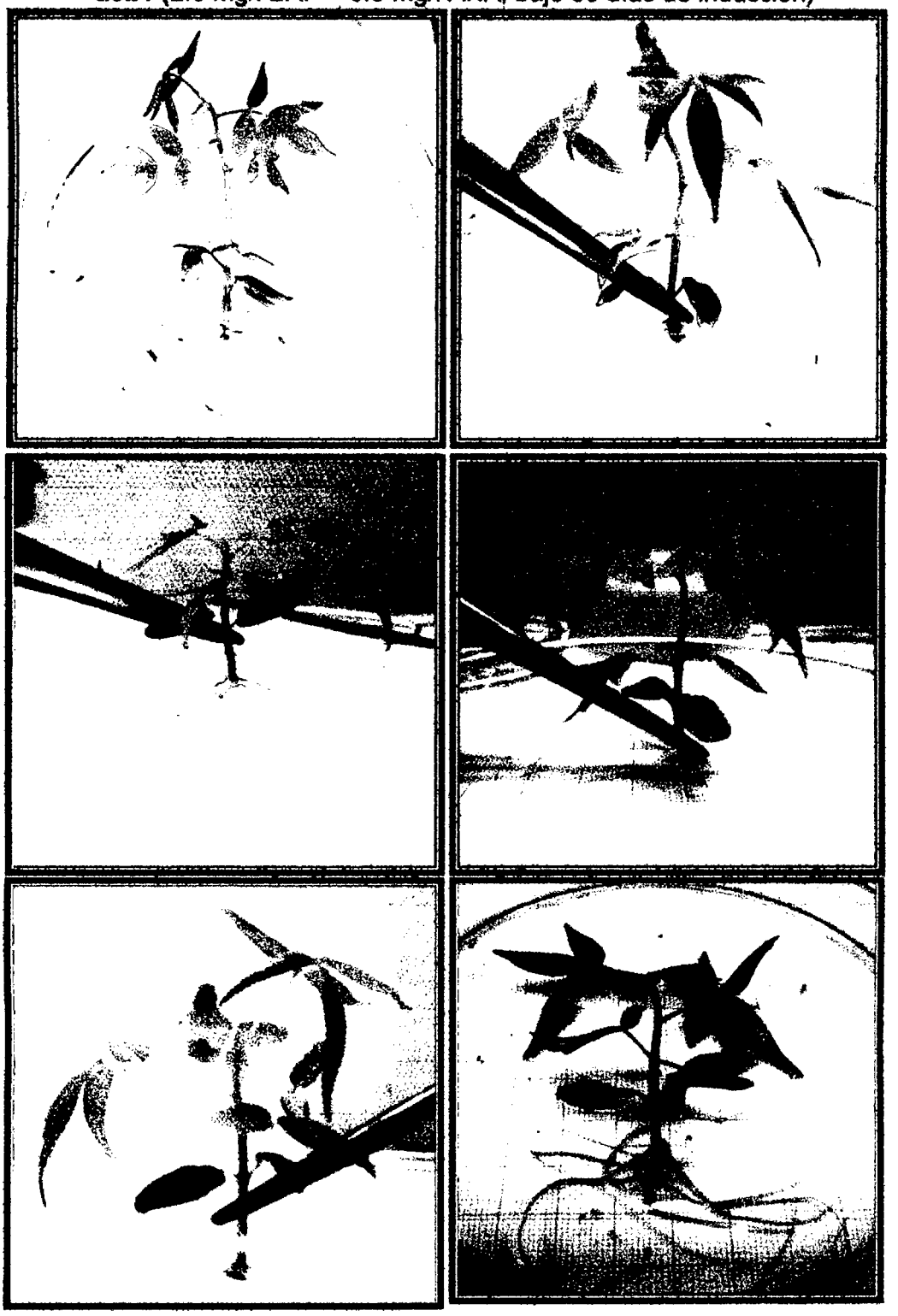
a2b3 (1.0 mg/l BAP + 0.25 mg/l ANA, bajo 35 días de inducción)



ANEXO 08

FOTOGRAFÍAS DE PLANTAS OBTENIDAS CON EL TRATAMIENTO 07:

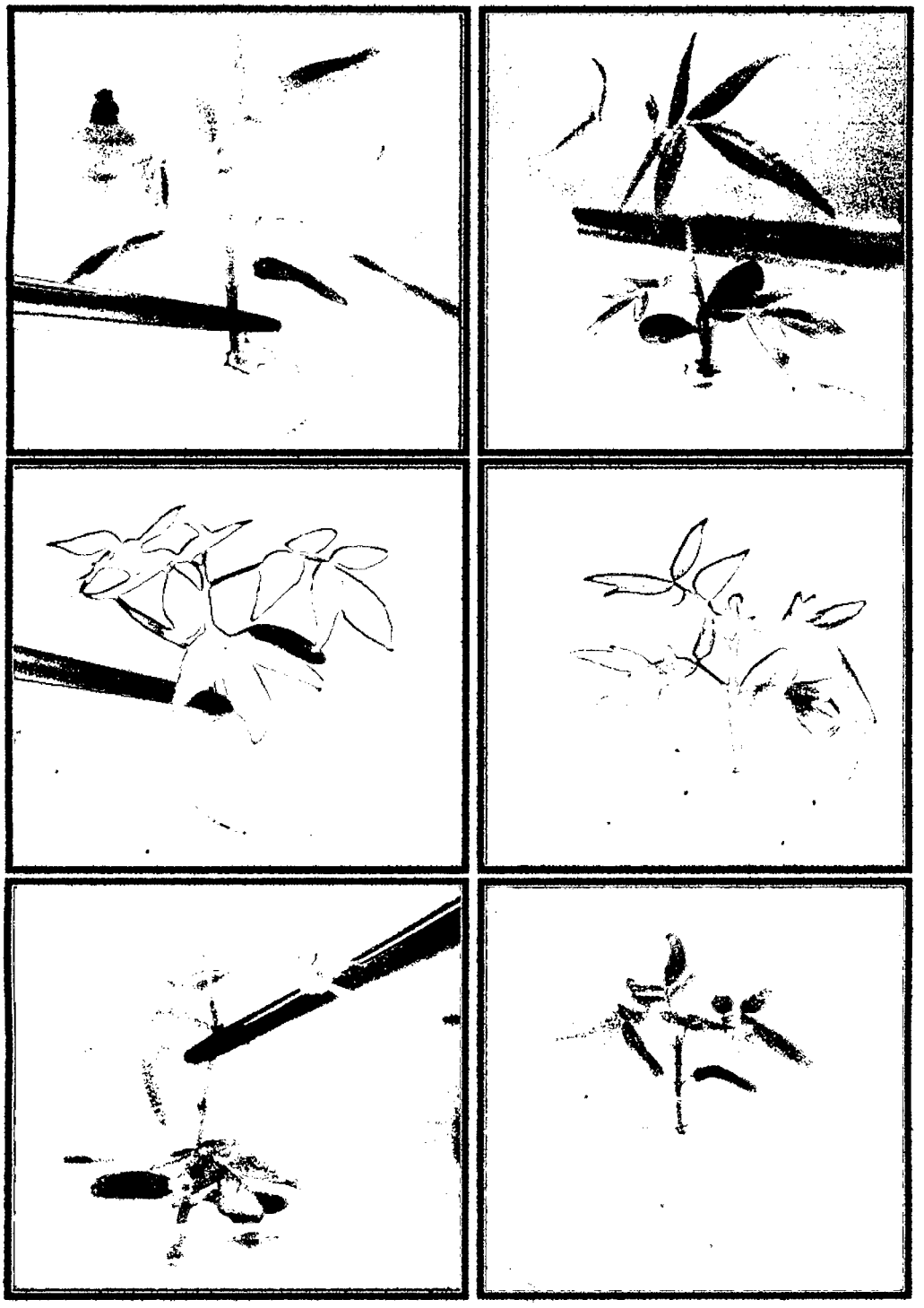
a3b1 (2.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l ANA, bajo 35 días de inducción)



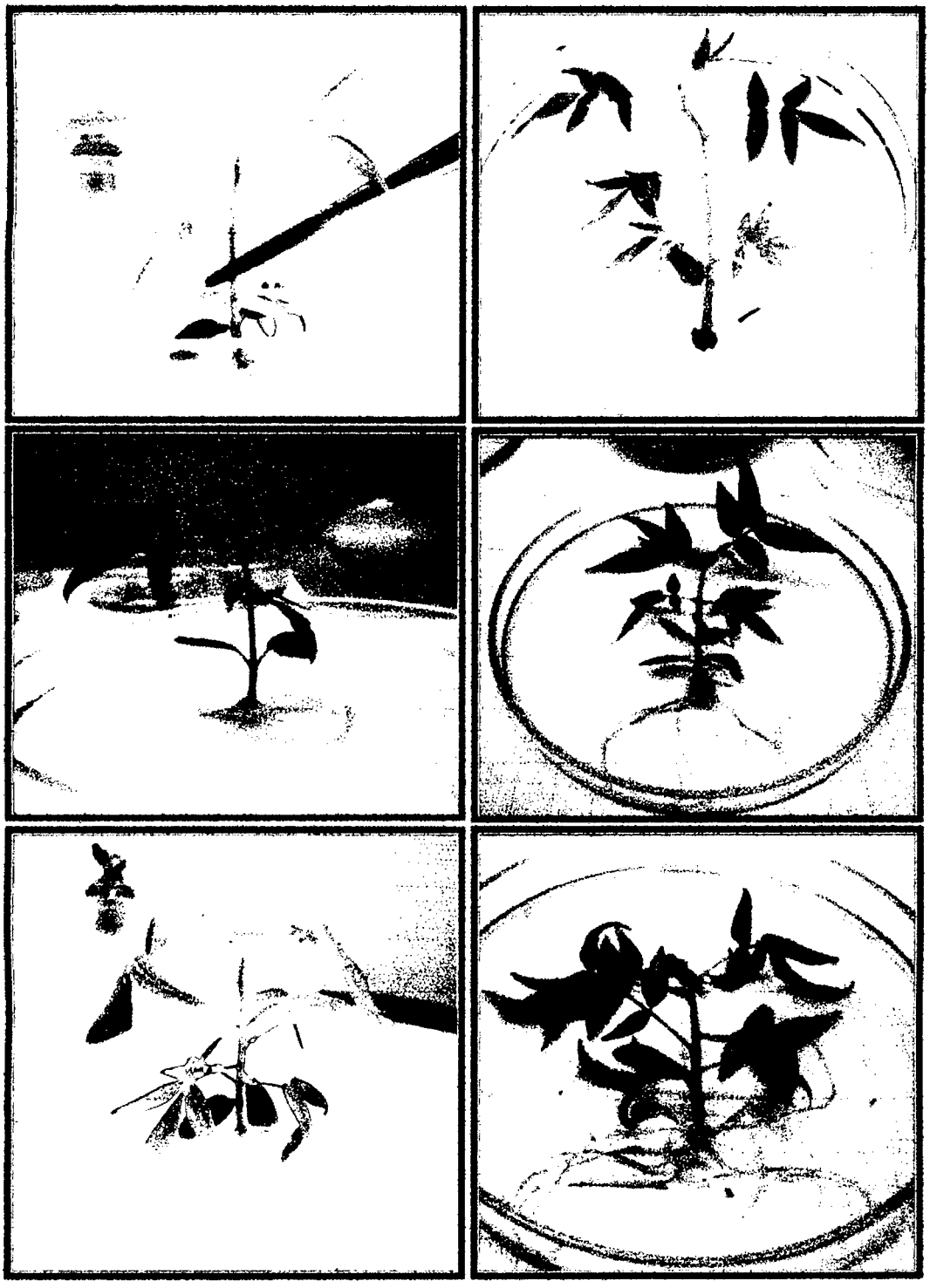
ANEXO 09

FOTOGRAFÍAS DE PLANTAS OBTENIDAS CON EL TRATAMIENTO 08:

a3b2 (2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l ANA), bajo 35 días de inducción)



ANEXO 10

FOTOGRAFÍAS DE PLANTAS OBTENIDAS CON EL TRATAMIENTO 09:

a3b3 (2.0 mg/l BAP + 0.25 mg/l ANA, bajo 35 días de inducción)