

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



“PROPAGACIÓN SEXUAL Y CLONAL DE SANGRE DE GRADO (*Croton* sp.) *in vitro* E INVERNADERO EN TARAPOTO - PERÚ”.

TESIS:

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

**PRESENTADO POR EL BACHILLER:
JORGE LOZANO DEL ÁGUILA**

TARAPOTO – PERÚ

2004



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL
ÁREA DE MEJORAMIENTO Y PROTECCIÓN DE CULTIVOS

TESIS

**“PROPAGACIÓN SEXUAL Y CLONAL DE SANGRE DE GRADO
(*Croton sp.*) *in vitro* E INVERNADERO EN TARAPOTO - PERÚ “**

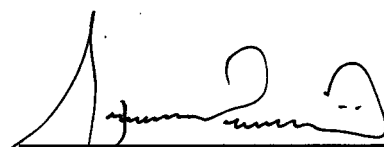
Presentado por el Bachiller:

JORGE LOZANO DEL ÁGUILA

MIEMBROS DEL JURADO



Blgo. M.Sc. WINSTON FRANZ RÍOS RÚIZ
Presidente



Ing° GILBERTO RÍOS OLIVARES
Miembro



Ing° ELÍAS TORRES FLORES
Miembro



Dr. JORGE SANDOVAL ROJAS
Patrocinador

1-20050118

DEDICATORIA

Este es un esfuerzo eminentemente de voluntad, superación y ejemplo para mis hijas Laith y Raquel.

A mis padres: Rafael Lozano y Socorro del Águila, por darme la vida y su apoyo moral.

AGRADECIMIENTO

A los docentes de la Facultad de Ciencias, docentes de ciencias básicas y trabajadores administrativos de la Universidad Nacional de San Martín por permitirme estudiar en esta primera casa superior de estudios.

Al decano de la Facultad de Ciencias Agrarias por concederme el laboratorio de tejidos vegetales para desarrollar la presente Tesis.

Al Biólogo Dr. Jorge Sandoval Rojas asesor del presente trabajo de investigación.

Al Biólogo Marco A. León Martínez, por su orientación en el desarrollo del presente trabajo.

A los bachilleres en agronomía Dikerson Vásquez, Federico Mendo y Henry Haya, por su colaboración en trabajos de laboratorio.

A mis hermanos Alberto, Hilda, Rafael, Raúl, Edilter, Gunter y Angélica porque siempre me han levantado la moral en estudiar esta carrera.

CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA	4
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	19
V. RESULTADOS	29
VI. DISCUSIONES	45
VII. CONCLUSIONES	58
VIII. RECOMENDACIONES	59
IX. RESUMEN	60
X. SUMMARY	61
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
XII. ANEXOS	64

I. INTRODUCCIÓN.

En el mundo existe una marcada tendencia a utilizar plantas medicinales para el tratamiento de diferentes enfermedades de los seres humanos con el objeto de reducir los efectos colaterales que tienen las medicinas provenientes de materias primas sintéticas.

Para el tratamiento de sus dolencias, las comunidades nativas ancestrales del mundo, vienen utilizando plantas medicinales desde tiempos inmemorables, habiéndose formado una cultura médica que hasta los laboratorios europeos y del mundo han tomado como punto de partida para fabricar los medicamentos que se venden a lo largo y ancho del globo terráqueo. **BARRIGA (1998)**

En el Perú las plantas medicinales se vienen utilizando hasta la fecha y se seguirán utilizando por muchos años más, quizá hasta que se extingan, ya que poseemos una biodiversidad incalculable de plantas medicinales que son efectivas contra enfermedades antiguas y nuevas, y por el menor costo que significa el tratamiento en comparación con la medicina convencional.

El bosque tropical del Perú, representado por la Selva y Ceja de Selva, ostenta una alta diversidad de especies de flora, de la cual las plantas medicinales son un componente importantes, estas vienen siendo explotadas por las comunidades nativas y pobladores rurales desde varios siglos atrás. **ESTRELLA (1995).**

El *Croton* sp. "Sangre de grado" o "Sangre de Drago" (*Cortón* sp) es una especie forestal que crece en el bosque tropical muy húmedo y tiene valor

económico debido a sus propiedades medicinales: es antibacteriano, anti-hemorrágico, anti-inflamatorio, antiséptico, antiviral, hemostático, cicatrizante, anticonceptivo, etc. **Durand y Rivero (1996)**.

Los trabajos realizados hasta el momento en sangre de grado (***Croton sp.***) son escasos, repetitivos y no proporcionan información confiable en relación con su propagación. Mediante éste trabajo de investigación, se buscó ampliar el conocimiento sobre metodologías adecuadas de propagación de esta especie, tanto en condiciones de cultivo *In Vitro* como en invernadero utilizando semillas y partes vegetativas: brotes, hojas y pecíolos.

II. OBJETIVOS

- 2.1. Desarrollar metodologías de propagación clonal de ***Croton sp.*** In Vitro en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional de San Martín.

- 2.2. Determinación del porcentaje de germinación de semillas de ***Croton sp.*** en el invernadero y descripción de algunas características morfológicas de la plántula.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Aspectos generales

Durand y Rivero (1996) manifiestan que en estos últimos años se está dando gran importancia al estudio del Género *Croton sp.*. En la Región Amazónica, especialmente en Colombia, Ecuador y Perú, se conocen con el nombre de “Sangre de Drago” a unas pocas especies del género *Croton sp.* productoras de una resina de color rojo sangre, en la que se han identificado varias propiedades medicinales. En la Selva peruana existen varias especies productoras de esta resina, las cuales pertenecen a la familia Euphorbiaceae, la misma que comprende 283 géneros y cerca de 7,300 especies con una distribución prácticamente universal. Principalmente se les encuentra en los trópicos, pero se extienden también hacia las regiones templadas del hemisferio Norte y Sur. Los dos centros de mayor incidencia de plantas de la familia Euphorbiaceae, son la América Tropical y el África. El género *Croton* comprende unas 700 especies.

Lechler (1828) citado por **Durand y Rivero (1996)** describe la especie *Croton lechleri* Muell. Arg. en el “Prodromus Systematis Universalis Regni Vegetabilis”, denominándola con el nombre vulgar de “Sangre de Grado”. **McBride (1951)** citado por **Durand y Rivero (1996)** en su publicación Flora of Perú, hace un estudio detallado de todas las especies del Género *Croton* que segregan “Sangre de Grado”.

Wettstein 1955, citado por **Durand y Rivero (1996)** manifiesta que de varias especies del género *Croton* se beneficia un producto resinoso rojo, una suerte de “Sangre de Grado” y diversos órganos de muchas especies se

emplean como medicinales en sus respectivos países de origen.

Ferreira 1950, citado por **Durand y Rivero (1996)**, en su informe sobre las expediciones científicas a la cuenca central del Huallaga, se refiere a la "Sangre de Grado" y la forma como es utilizada por los naturales de esa región en el cual menciona al ***Croton palanostigma*** y ***Croton tarapotensis*** como "Sangre de Grado", haciendo ver la necesidad de realizar estudios profundos sobre esta especie.

Betteta 1964, citado por **Durand y Rivero (1996)** realizó estudios en la especie de ***Croton palanostigma*** Klotzsch y determinó que tenía acción carcinolítica y carcinostática. Además **Pérez (1973)**, citado por **Durand y Rivero (1996)**, determinó la presencia de 2 alcaloides en macerados de hojas, corteza y raíces de ***Croton lechleri***. **Miranda 1974**, citado por **Durand y Rivero (1996)** realiza estudios sobre los contenidos de las hojas de la especie ***Croton palanostigma*** Klotzsch, en la Universidad Cayetano Heredia y en ese mismo año, Centella, Pogy y Solís presentan estudios de la mezcla de sangre de grado con otras plantas y concluyeron que la mezcla con "ayahuasca" y "masha" tiene una posible acción carcinostática.

Los árboles de "sangre de Grado" tienen copa amplia, globosa y redondeada **Durand y Rivero (1996)**, y **Pinedo (1999)**, alcanza medir hasta 14 metros de altura a 10 años de la plantación **Pinedo (1999)** (**Fotografía N° 01**), con corteza de color grisáceo blanquecino que exuda un látex viscoso color rojizo **Durand y Rivero (1996)**, y **Pinedo (1999)**, hojas cordadas,

alternas, a veces opuestas o verticiladas de 12 a 20 cm de largo, 5 cm, a 14 cm de ancho, con 2 glándulas en la base, las más jóvenes presentan una coloración rojiza tomentosa en ambas caras, flores de color ámbar, estambres numerosos, fruto capsular globoso, deprimido, elásticamente dehiscente de 3 mm de largo y 4.5 mm de ancho, presenta 3 mono-carpo bivalvos, semillas lisas con carúnculas y endospermo lechoso (**Fotografías N° 2, 3 y 4 Durand y Rivero (1996)**).

Preferentemente se desarrolla en suelos de tierra firme, se adapta bien a condiciones degradadas, desde el punto de vista agrícola, incluyendo pastizales, las restingas altas constituyen una opción interesante, de textura media a arcillosa y con buen drenaje; la propagación se puede realizar con semilla colectada directamente o colectando plántulas de regeneración natural con un distanciamiento de 5 x 5 hasta 10 x 10 m. no se han observado problemas fitosanitarios; también puede concentrarse en sistemas agroforestales de la región, la combinación con yuca y plátano a un distanciamiento 5 x 5; la cosecha podría ser de 7 – 8 años de la plantación en un diámetro de 30 cm; la explotación va acompañada de un programa de reforestación de los árboles, **Pinedo (1999)**.

Estrella (1995) menciona que en Colombia se obtiene la resina especialmente de *Croton funckeanus*, que es un árbol pequeño de 3 a 5 m de altura: En el Ecuador *Croton lechleri*, que es un árbol de hasta 25 metros de alto con un tronco de 40 a 50 cm de diámetro, conocido entre los “Quechuas” como “lan huiqui” y entre los Cofanes como “Masujin”. En el Perú

se han reportado cinco especies de *Croton* designados popularmente como “Sangre de Drago” o “Sangre de Grado” de los cuales dos han recibido especial atención por parte de los investigadores *C. palanostigma* Klotzsch y *C. lechleri* Muell Arg. En Bolivia *C. draconoides* Muell Arg conocido como “sangre de drago” en Pando y Beni, es un árbol pequeño con savia amarillo rojiza, usada como cicatrizante y para el dolor de estómago é hígado.

Durand y Rivero (1996) manifiestan que la “Sangre de grado”, se encuentra distribuida en América Tropical y Sub-Tropical. En el Perú se encuentra en los Departamentos de Loreto: Llachapa – Río Napo, Indiana-Río Amazonas, Padre Cocha y Momón – Río Nanay; San Martín, Huanuco, Cerro de Pasco: Oxapampa, Satipo, Puerto Bermúdez, Izcozacín y Villa Rica, Junín: Chanchamayo, Cuzco y Puno. Sus propiedades terapéuticas según **Durand y Rivero (1996)**, **Ducke y Vásquez (1997)** y **Pinedo (1996)** son: astringente, hemostático, cicatrizante, antiséptico, analgésico, depurativo, regenerador de tejido muscular, desinfectante, anticancerígeno. Tiene efectos beneficiosos en la cicatrización de heridas y úlceras estomacales y en General contra cualquier herida, cortadura, úlcera en el cuerpo, en el tratamiento de las diarreas, cáncer uterino, utilizándole inclusive para realizar irrigaciones internas en caso de vaginitis y para aumentar la fertilidad de la mujer, se usa en el tratamiento de las hemorroides y de la leucorrea; se le usa también para gárgaras contra afecciones bucales, amígdalas inflamadas y contra la picadura de culebra. Además **Ducke y Vásquez (1997)** menciona que podrían ser especialmente útiles contra males virales causados por herpes

Ducke y Vásquez (1997) mencionan que la resina de *Croton lechleri*,

tiene varios componentes, entre ellos dimethyl cedrusina y taspina. **Pinedo (1996)** manifiesta que contiene taspina, proantocianidina oligomérica, piridona, indol-aporfina, quinoleína, tropano, ácidos grasos insaturados, antraquinonas, espoxiacidos grasos, triterpenoides.

Foto N° 01: Árbol Adulto de *Croton* sp.



Foto N° 02: Inflorescencia de *Croton* sp.



Foto N° 03: Inflorescencia y Fructificación de *Croton* sp.

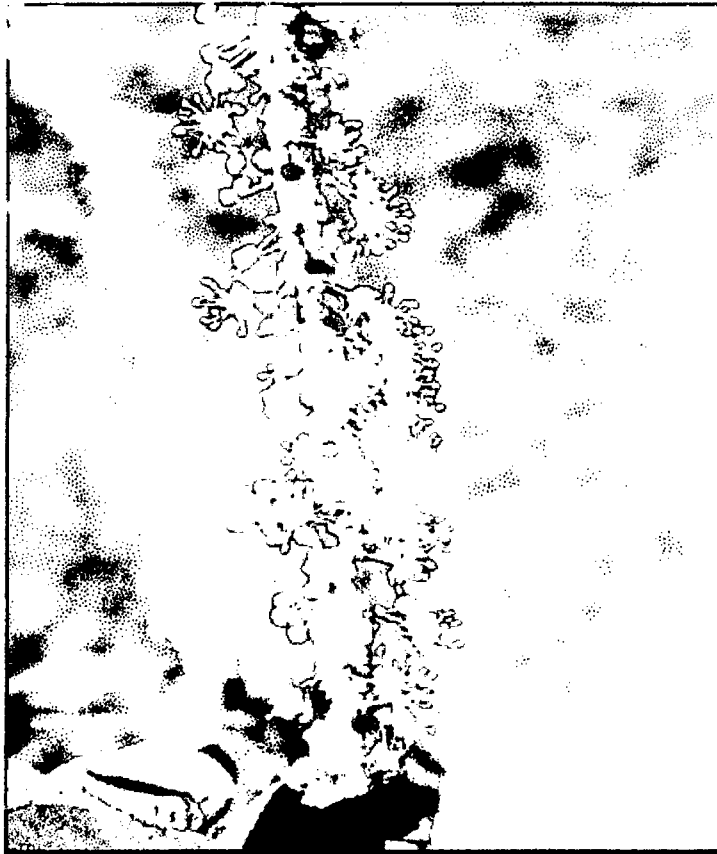
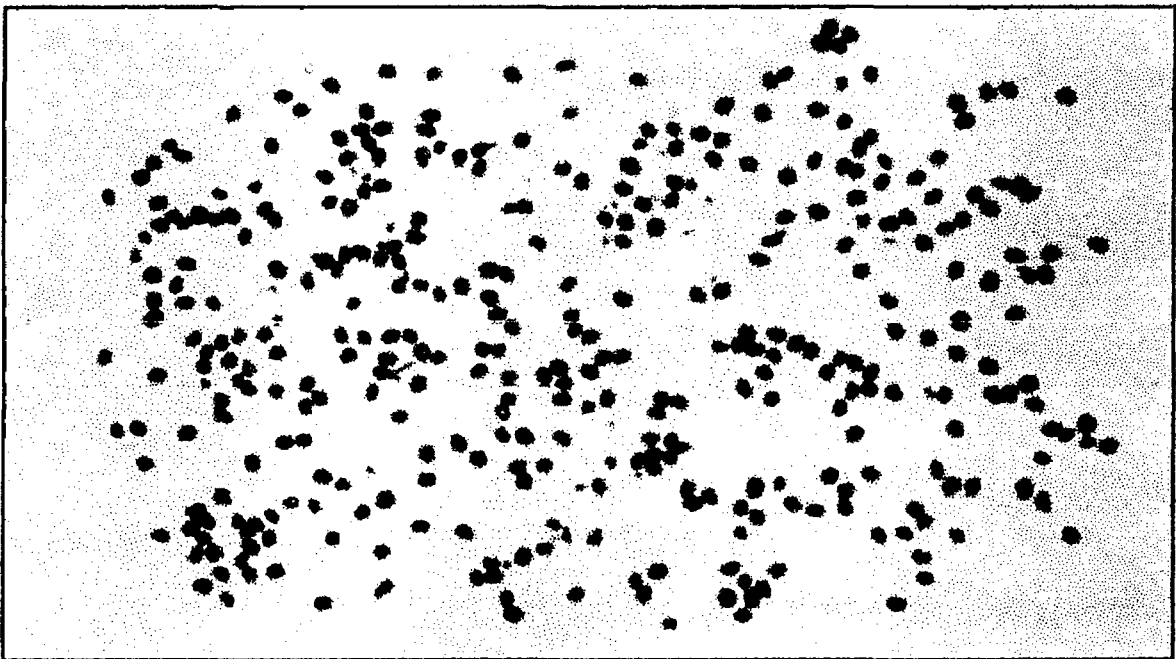


Foto N° 04: Semilla de *Croton* sp.



3.2. Clasificación taxonómica

Durand y Rivero (1996) clasifican a la "Sangre de Grado" de la forma siguiente

División: Anthophyta

S. División: Angiospermae

Clase: Dicotyledonae

S. Clase: Arquiclamideae

Orden: Geraniales

Familia: Euphorbiaceae

Género: *Croton*

Especies: ***Croton lechleri*** Muell Arg.

C. draconoides Muell Arg.

C. palanostigma Klotzsch.

Según **Durand y Rivero (1996)** el ***Croton* sp.** habita en zonas aledañas a quebradas, bosques primarios y secundarios, restingas, chacras nuevas, purma cerrada, purma joven, en suelos inundables con creciente alta, resiste medianamente la inundación. De preferencia se encuentra en zonas sombreadas, aunque también prosperan en zonas iluminadas. Comparte su hábitat con las siguientes especies: cetico (*Creecopia latiloba* miq), charichuelo (*Rheedia gardneriana*), zapote (*Quararibea ochrocalix*), limón (*Citrus* sp.), piñón, chiricsanango, uña de gato (*Uncaria tomentosa*), uvas (*Espondias lutea*), patquina, tangarana (*Tachigalia paniculata*), malva, cañabraba, huamansamana, uvilla (*Pouroma cecropeifolia*), huasaí (*Enterpe precatoria* Mart.), cashapona, bijao, huacapú (*Minquartia punctata*), topa (*Ochroma lagopus*), aguaje (*Mauritia flexuosa*), shimbillo (*Pithecellobium laetum*), carahuasca (*Guatteria elata*), escalera de mono, huacrapona (*Iriarte*

deltoidea) y otros.

3.3. Condiciones de cultivo

Durand y Rivero (1996) manifiesta, que para prosperar *Croton* sp. requiere de las siguientes condiciones:

Clima: Cálido con alta humedad relativa, temperatura media anual entre 17,7 y 30° C, precipitación pluvial entre 2000 a 3300 mm /año con una mínima de 1000 mm, nivel altitudinal entre 300 a 2,080 m. s. n. m.

Suelo: Se desarrolla bien en suelos arcillosos a arenoso-arcilloso, con abundante o escasa materia orgánica, con buen drenaje y buena aeración y moderadamente ácidas (pH 5,6 a 6) a ligeramente alcalinos (pH 7,4 a 7,8). Es una planta silvestre que crece libre y espontáneamente en las orillas de los ríos y en los valles; cuyo poder germinativo, cuando la semilla está fresca puede alcanzar un 80 % hasta los 14 días.

Época de siembra: En Várzea (restingas inundables), la plantación debe establecerse inmediatamente después de la vaciante (junio en la zona de Iquitos), en los suelos de tierra firme, es ventajoso plantar al inicio de la época lluviosa (noviembre, diciembre y enero.)

Distanciamiento: El distanciamiento es variable dependiendo los cultivos integrados y el ciclo vegetativo, pero se recomienda utilizar distanciamientos de 6m x 6m y 7m x 7m. también se puede emplear

distanciamiento de 5m x 5m y 10m x 10m.

Propagación: Ensayos realizados por Gaviria 1991 citado por **Durand y Rivero (1996)**, menciona que la prueba de germinación con semillas sexuales en las comunidades nativas en la zona del río Perené, encontró que las especies del género ***Croton*** tienen resistencia a la germinación 10 días, en un periodo de germinación de 18 días con un porcentaje de 52%.

El poder germinativo y la viabilidad de las semillas según **Durand y Rivero (1996)** obedecen en gran parte del tiempo en que se colecta para ser sembrado, estudios realizados muestran que se pueden alcanzar un 80% de germinación en 18 días. Utilizando semillas frescas y empleando nebulizador se ha logrado su propagación mediante estacas.

Propagación en vivero: La obtención de semillas para ser propagadas en viveros debe provenir de árboles maduros que se encuentran en perfecto estado de sanidad y el colector de los mismos debe asegurarse de que dichas semillas hayan alcanzado su madurez fisiológica. Para la siembra deben utilizarse bolsas negras de polietileno, con agujeros de tal forma que faciliten el drenaje.

La formulación del sustrato debe hacerse en las proporciones 4:1:1 (tierra del bosque, arena, estiércol), los riegos dos veces por semana y el traslado a campo definitivo cuando crezca hasta 25 o 35 cm de altura. Una

vez establecido su cultivo, existen cuidados importantes que deben tomarse para el buen crecimiento del árbol. Es importante mantener el cultivo desmalezado.

En los primeros meses de crecimiento hay que cuidar que las hierbas no dañen las plántulas de **Croton**. Después de ese tiempo se recomienda una limpieza cada tres meses o en la medida que sea necesario. Otra práctica recomendable es podar las ramas del árbol para que su tronco principal crezca recto y fuerte. Estudios indican que la mejor manera para podar las ramas es dejar una distancia de 10 cm o más a partir de tronco principal.

Esto ayuda evitar la putrefacción de la herida producida por el corte. A partir del tercer año la poda ya no es recomendable, pues puede afectar la capacidad de producción del látex.

3.4. Cosecha y conservación del producto

Cosecha

Según **Durand y Rivero (1996)**, la cosecha puede empezar a partir de séptimo u octavo año cuando el árbol mide aproximadamente 30 cm de diámetro a la altura del pecho. La extracción del látex se debe realizar sin tumbar el árbol, con el método shiringuero, mediante el corte en espiral o el corte en forma de V, sobre la corteza del fuste a la altura del pecho. Con el corte en espiral practicado en el sentido de izquierda a derecha se consigue un mayor rendimiento del látex. Los factores que influyen en el rendimiento del látex son: radiación solar, diámetro del árbol, follaje, ángulo de corte,

precipitación y fase lunar; siendo lo más conveniente entre cuarto creciente y luna llena. El rendimiento del látex en una mañana en zona anegadiza y época lluviosa fue de 250 cc en árboles de 35 cm de diámetro y de 2,000 cc en árboles de 50 cm de diámetro. En Ucayali - Perú, la floración ocurre en Junio a agosto, la fructificación en Septiembre: Se considera que la plantación alcanza rendimientos económicamente rentables a partir del séptimo u octavo año de la siembra. La producción nacional entre los años 1991 y 1993 fue en promedio de 3,600 litros de látex /año y de 3,160 Kg. de corteza por año.

Manejo post - cosecha

El látex después de la extracción debe conservarse envasado herméticamente y en lugares frescos. La adición de aguardiente en pequeñas cantidades evita que el producto se cristalice. Las partes aprovechadas son látex, corteza y madera.

Calidad de semilla

Peretti (1994) dice que una semilla de calidad es una viable y susceptible a desarrollar una plántula normal, aún bajo condiciones ambientales no ideales, tal como puede ocurrir en el campo. **Thomson (1979)**, citado por **Peretti (1994)** menciona que los principales parámetros que determinan la calidad de la semilla son:

Pureza física – botánica.

Indica en que grado la muestra está constituida por semillas intactas y sanas de la especie declarada y por otros eventuales componentes (impurezas)

como tierra, fragmentos seminales, restos vegetales y muy especialmente por semillas extrañas de especies que contaminan el lote (atípicas).

Pureza genética.

Certifica la presencia de un determinado cultivar, y no de otros, o de mezclas de diferentes cultivares.

Poder germinativo.

Expresado por el porcentaje de semillas puras que pueden producir plántulas normales.

Vigor de las semillas

Es un parámetro que informa la respuesta germinativa y la homogeneidad de implantación del cultivo en situaciones no favorables de siembra.

Dormancia

Se refiere a los mecanismos de inhibición activa del crecimiento del embrión propio de la semilla.

Homogeneidad del lote

Entendida como uniformidad de los componentes y del tamaño de las semillas.

Estado fitosanitario.

Referido a la sanidad de las semillas, es decir, impedir el desarrollo de ciertas enfermedades que se desarrollen en la cubierta.

Contenido de humedad

Se refiere a la cantidad porcentual de agua, que posee el grano desde la cosecha hasta la siembra.

3.5. Tratamientos de los órganos vegetativos mediante agua caliente.

Agrios (1995) menciona que el tratamiento de ciertas semillas, bulbos y rizomas de viveros mediante agua caliente se utiliza para destruir a los patógenos que los infectan o que pudieran alojarse en la cubierta de las semillas, las escamas de los bulbos, etc.

La efectividad de este método de control se basa en el hecho de que esos órganos vegetativos latentes pueden soportar temperaturas considerables. La temperatura del agua caliente y la duración de su tratamiento varía de acuerdo a las distintas combinaciones que se establecen entre el patógeno y su hospedante. Así en el caso del carbón descubierto del trigo las semillas se mantienen en agua caliente durante 11 minutos a una temperatura de 52 °C, mientras que los bulbos tratados contra la infección de *Ditylenchus dipsaci*, se mantienen a una temperatura de 43°C durante 3 horas.

Duarte (1981) menciona que los tratamientos físicos se basan

generalmente en el empleo de calor, agua caliente, radiación ultravioleta o infrarroja. Estos tratamientos destruyen al patógeno pero no dan protección posterior a la semilla.

Uno de los tratamientos más usados es el de sumergir la semilla en agua caliente entre 45 a 55 °C (según la especie) por 10 a 30 minutos. Una vez sacada la semilla se debe mantener en agua fría y esparcir para que vuelva a secar. Es un tratamiento que se utiliza en cereales y algunas hortalizas para eliminar bacterias y hongos. Otro tratamiento es el uso de calor seco, por ejemplo para eliminar el Virus del Mosaico del Tabaco. En este caso se mantiene la semilla 4 días a 70 °C.

Las principales desventajas de este son que el control de la temperatura debe ser preciso y que las semillas tienen que secarse antes de venderlas al mercado.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Ubicación de los experimentos

Los experimentos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales y en el invernadero de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín, ubicado en la Ciudad Universitaria, distrito de Morales, provincia y región San Martín.

4.1.1. Ubicación política.

Distrito	:	Morales
Provincia	:	San Martín
Departamento	:	San Martín

4.1.2. Ubicación geográfica.

Longitud Oeste	:	76° 21'
Latitud Sur	:	6° 29'
Altitud	:	350 m. s. n. m
Zona de Vida	:	Bosque seco tropical (Holdridge 1972)

4.2. Metodología.

4.2.1. Preparación de medio de cultivo.

Se utilizó la formulación basal, Murashige & Skoog complementado con sucrosa 20 g/l, gel rite 2.5%, y carbón activo al 2%.

4.2.2. Recolección y preparación de frutos

Los frutos (cápsulas) conteniendo semillas se recolectaron del predio del Sr. Manuel Delgado; Tres de Octubre, Carretera Tarapoto - Juanjui 9 Km.

4.2.3. Preparación de semillas.

- Los frutos fueron beneficiados en laboratorio a temperatura ambiente y expuestos al sol con el fin de separar las semillas del fruto por ser cápsulas dehiscentes.
- Se realizó la clasificación de las semillas separando solamente las semillas de color plomo oscuro para las pruebas y eliminando las semillas pardas que son las no viables.
- Las semillas fueron sumergidas en agua durante 36 horas para separar las no viables de las viables, eliminándose las semillas que flotaron (no viables).
- Seguidamente, las semillas fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2% e introducidas durante 10 minutos en frascos de vidrio (*In Vitro*) y en bandejas germinadoras. Para siembra en invernadero.

4.3. Recolección y preparación de hojas, pecíolos y ápices de brotes.

- Las hojas, pecíolos, ápices de brotes fueron extraídos de plántulas de 70 días de germinado *in vitro*.

- Los ápices fueron esterilizados con hipoclorito de sodio al 1% por 15 minutos, y enjuagados por tres veces con agua destilada estéril, e introducidas en tubo de ensayo con 12 ml de medio de cultivo por tubo y luego fueron transferidos al ambiente de incubación.
- Las hojas y pecíolos fueron esterilizados con hipoclorito de sodio al 0.5% por 15 minutos, enjuagados por tres veces con agua destilada estéril, e introducidos en placas de Petri con 12 ml de medio de cultivo por placa y luego fueron transferidos al ambiente de incubación

4.4. Siembra de semillas en vivero.

4.4.1. Sustrato:

El sustrato utilizado, fue el suelo extraído del mismo hábitat de los árboles de *Croton* de donde se recolectó las semillas. El suelo fue de color oscuro franco arcilloso, el cual fue colocado en bandejas germinadoras y desinfectado con vapor de agua, en un autoclave esterilizador a 121 °C y 15 lb. de presión por 1 hora.

4.4.2. Preparación de las semillas:

A las semillas se aplicaron los mismos tratamientos indicados en la prueba "in vitro". Utilizando 5 tratamientos con 10 repeticiones cada uno y 5 semillas por repetición.

4.4.3. Siembra:

Las celdas de las bandejas germinadoras se llenaron con suelo de

bosque estéril, luego se colocaron 5 semillas de *Croton sp.* en cada celda, sembrándose 200 semillas en 5 tratamientos con 10 repeticiones.

4.5. Siembra de semillas *in vitro*.

La siembra *in vitro* se realizó utilizando una cámara de flujo laminar de aire para evitar la contaminación, en 4 tratamientos con 10 repeticiones, a razón de 5 semillas por frasco, utilizando en total 200 semillas.

4.6. Diseño y características de los experimentos

4.6.1. Diseño de los experimentos

En los experimentos desarrollados se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA) con 4, 5 y 6 tratamientos y 10, 10 y 5 repeticiones por tratamiento según el caso.

Prueba 1: Propagación sexual de *Croton* sp. en invernadero.

Tratamientos en estudio.

- I. Sangre de grado sumergidas en una solución de 150 ml de H₂SO₄ al 1 % durante 10 minutos.
- II. Semillas de sangre de grado sumergidas en agua caliente a 80° C aproximadamente durante 10 minutos.
- III. Semillas de sangre de grado sumergidas en 150 ml de ácido AG3 al 500 ppm durante 36 horas.
- IV. Semillas de sangre de grado sin arilo.
- V. Semillas de sangre de grado sin ningún tratamiento.

Cuadro 1: Diseño experimental para la propagación sexual de *Croton* sp. en invernadero.

Repeticiones	Tratamientos				
	I	II	III	IV	V
1	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
2	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
3	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
4	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
5	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
6	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
7	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
8	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
9	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
10	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX

X: semillas de “Sangre de Grado”

Prueba 2: Propagación sexual *in vitro* de Sangre de Grado – *Croton* sp.

Tratamientos en estudio:

- I. Semillas de sangre de grado sumergidas en 150 ml de H₂SO₄ al 1 % durante 10 minutos.
- II. Semillas de sangre de grado sumergidas en 150 ml de agua caliente a 80° C aproximadamente durante 10 minutos.
- III. Semillas de sangre de grado sumergidas en 150 ml de ácido AG3 al 500 ppm durante 36 horas.
- IV. Semillas de sangre de grado sin arilo.
- V. Semillas de Sangre de grado sin ningún tratamiento.

Cuadro 2: Diseño experimental para la propagación sexual *in vitro* de Sangre de Grado – *Croton* sp. con los diferentes tratamientos.

Repeticiones	Tratamientos				
	I	II	III	IV	V
1	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
2	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
3	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
4	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
5	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
6	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
7	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
8	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
9	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
10	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX

X: semillas de “Sangre de Grado”

**Prueba 3: Propagación clonal a partir de ápice de hoja y pecíolos de
*Croton sp. in vitro***

Tratamientos en estudio:

- I. Siembra de explantes hojas en medio de cultivo sin 2,4-D.
- II. Siembra de explantes hojas en medio de cultivo con 0.25 mg/lit de 2,4-D.
- III. Siembra de explantes hojas en medio con 0.50 mg/lit de 2,4-D.
- IV. Siembra de explantes hojas en medio con 1.00 mg/lit de 2,4-D.

**Cuadro 3: Diseño experimental para la propagación clonal de explantes
hojas *Croton sp. in vitro*..**

repeticiones	tratamientos			
	I	II	III	IV
1	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX
2	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX
3	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX
4	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX
5	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX
6	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX
7	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX
8	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX
9	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX
10	XXXX	XXXX	XXXX	XXXX

X: Hojas de “Sangre de Grado”

Prueba 4: Propagación clonal con segmentos nodales de *Croton sp.* *in vitro*

Tratamientos en estudio:

- I. Nudos de plantas en medio de cultivo sin BAP.
- II. Nudos de plantas en medio de cultivo con 0.25 ml de BAP.
- III. Nudos de plantas en medio de cultivo con 0.50 ml de BAP.
- IV. Nudos de plantas en medio de cultivo con 1.00 ml de BAP.
- V. Nudos de plantas en medio de cultivos con 0.25 ml de ácido 2,4-D.
- VI. Nudos de plantas en medio de cultivos con 0.50 ml de 2,4-D.

Cuadro 4: Diseño experimental para propagación clonal de explantes de nodal de *Croton sp.* *in vitro*

Repeticiones	Tratamientos					
	I	II	III	IV	V	VI
1	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
2	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
3	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
4	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
5	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
6	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
7	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
8	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
9	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
10	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX

X: nudos sembrados.

4.7. Análisis estadístico

Cuadro 5: ANVA para los diseños experimentales 1 y 2 (Pág. 20 y 21)

F. VARIABILIDAD	G. L.
TRATAMIENTO	$t - 1 = 4$
ERROR	$t (r-1) = 45$
TOTAL	$t . r - 1 = 49$

Cuadro 6: ANVA para el diseño experimental 3 (Pág. 23).

F. VARIABILIDAD	G. L.
TRATAMIENTO	$t - 1 = 3$
ERROR	$t (r-1) = 36$
TOTAL	$t . r - 1 = 39$

4.8. Parámetros evaluados:

- Para la propagación sexual in vitro se evaluó del 01-10-2000 al 02-12-2000 con intervalos de cada 3 días.
- Para la propagación sexual en invernadero se evaluó del 18-10-2000 al 02-11-2000 con intervalos de cada 3 días.
- Para la propagación asexual in vitro explantes (Peciolos y hojas) del 08-03-2000 al 30-03-2001 con intervalos de cada 7 días.

Para determinar el número de **vitroplantas germinadas**, se contaron las semillas germinadas en los 5 o 10 frascos (5 semillas por frasco) de cada tratamiento.

Para determinar el número de **vitroplantas que formaron callos** (callogenesis) y raíces (rizogenesis) se contaron las formaciones gelatinosas de color blanco que correspondió al callo alrededor de las vitroplantas, asimismo todas las raíces bien diferenciadas.

Para determinar el número de **hojas de las vitroplantas**, se contaron todas las hojas formadas de las vitroplantas obtenidas en cada uno de los tratamientos

La **altura de las vitroplantas**, se midió utilizando una regla graduada de 30 cm, desde la superficie del medio de cultivo hasta el ápice de la yema.

El número de **vitroplantas vitrificadas**, se determinó contando todas las que mostraron células con turgencia por el exceso de agua acumulada que se denomina hidrosis, dando la apariencia a una estructura de vidrio.

El número de **vitroplantas muertas** se determinó contando todas las que fueron necrosadas después de la vitrificación.

El **color pardo de las vitroplantas**, se determinó contando todas las vitroplantas que se oxidaron por intervención del oxígeno que dio el color marrón.

V. RESULTADOS

5.1. Propagación sexual de “Sangre de Grado” en invernadero.

Al analizar los resultados del análisis de varianza (cuadro 7) de la propagación sexual en invernadero se encontró diferencia altamente significativas entre los tratamientos para la germinación de la semilla, altura de plántula y número de hojas; la germinación de las semillas en invernadero fue mucho mayor que en *in vitro*; y en la muerte de plántulas no existió diferencia estadística.

La prueba de rangos múltiples de Duncan (Gráficos 1, 2, 3 y 4), muestra diferencia estadística en la germinación, altura, número de hojas y muerte de plántulas. De los tratamientos 3, 5 y 4; el tratamiento 3 que corresponde al ácido giberélico dio mejor resultado con 87.53 % de semillas germinadas, 5.00 cm de altura y 6.00 hojas promedios por planta, y la mayor muerte registró el tratamiento 5 con 14.60 %.

Cuadro 7: Análisis de varianza para propagación sexual de *Croton* sp. en invernadero. $\sqrt{x+0.5}$

F. V.	G. L.	Germinación				Altura (cm)				Hojas				Muerte de plántulas			
		S. C.	C.M	F. C.	Signif.	S. C.	C.M	F. C.	Signif.	S. C.	C.M	F. C.	Signif.	S. C.	C.M	F. C.	Signif.
Tratam	4	3.090	0.7704	59.61	**	170.24	42.56	286.94	**	16.43	4.11	453.88	**	0.125	0.031	3.390	**
Error	45	0.580	0.030			6.67	0.15			0.41	0.01			0.425	0.009		
Total	49	3.670				176.91				16.84				0.540			
R ² %		84.12				96.22				97.58				99.19			
CV %		5.70				25.17				5.85				5.46			
Prom.		2.00				1.53				1.63				3.66			

**** = Existe diferencia altamente significativo entre tratamientos**

N. S. = No existe diferencia estadística entre tratamientos

Gráfico N° 1: Prueba de rangos medios de Duncan para la Propagación sexual de *Croton* sp. en invernadero (% Germinación)

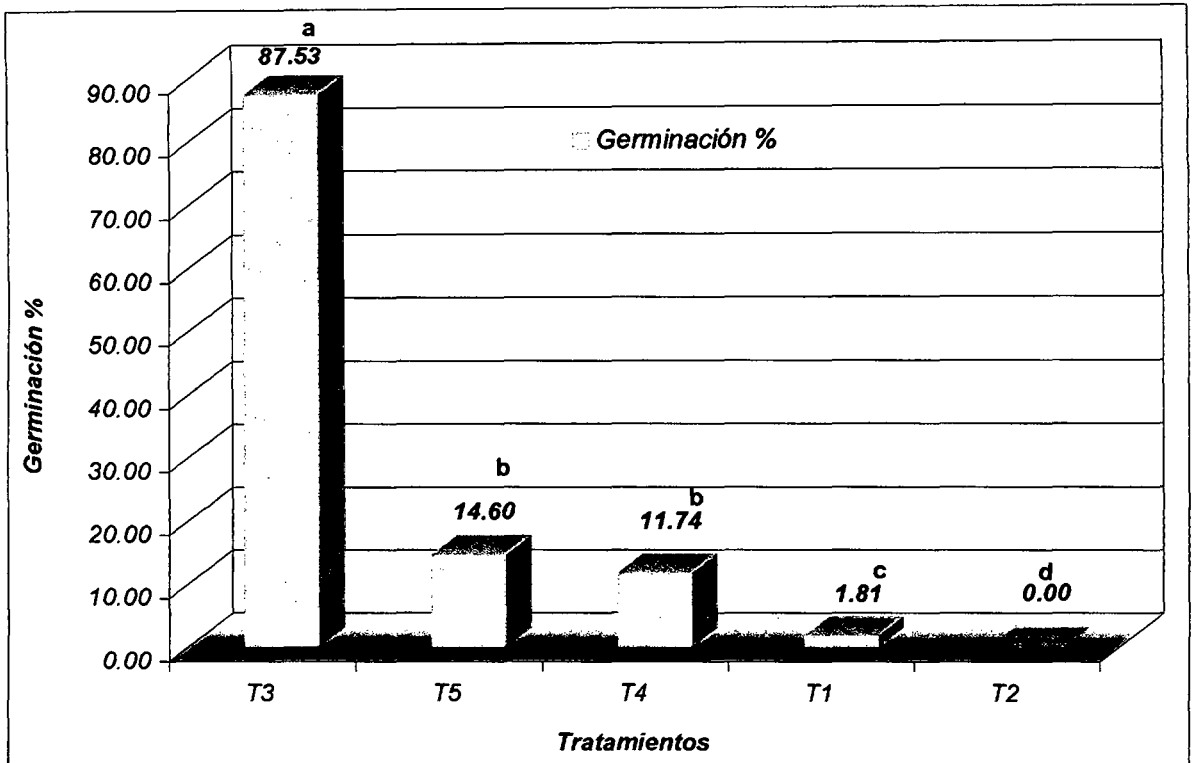


Gráfico N° 2: Prueba de rangos medios de Duncan para la Propagación sexual de *Croton* sp en invernadero (Altura cm)

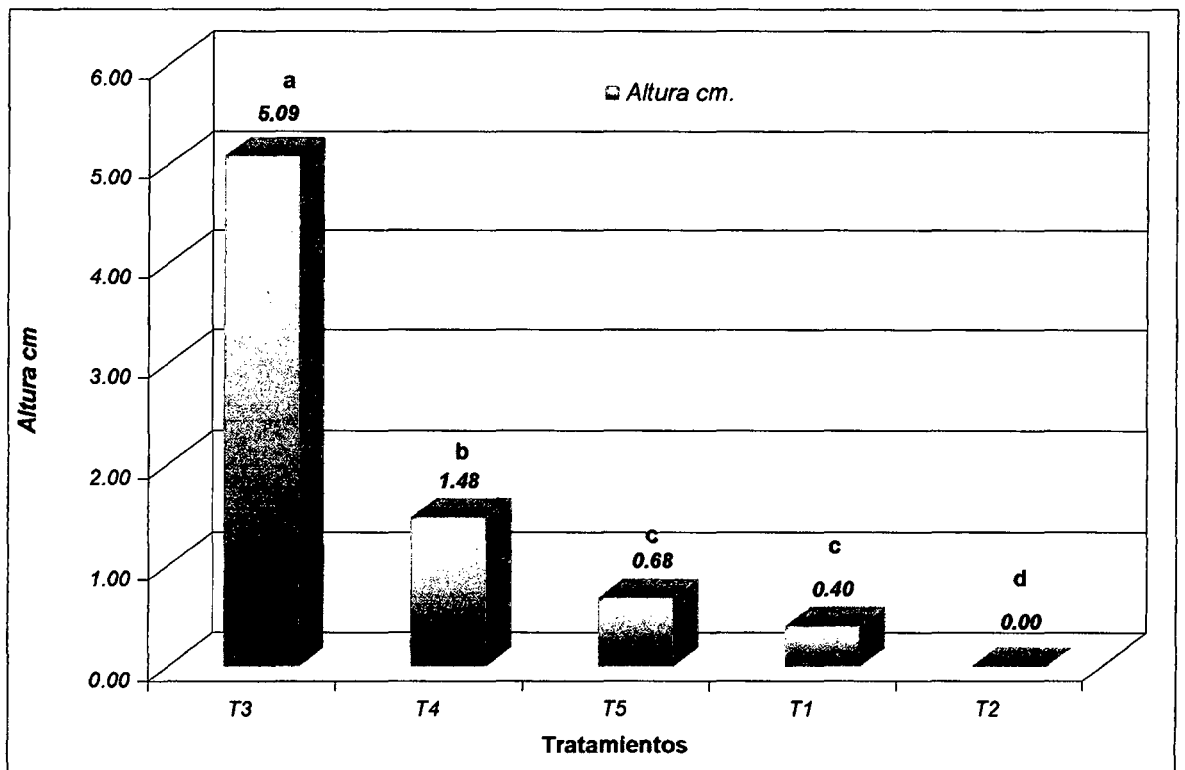


Gráfico N° 3: Prueba de rangos medios de Duncan para la Propagación sexual de *Croton* sp. en invernadero (N° de Hojas)

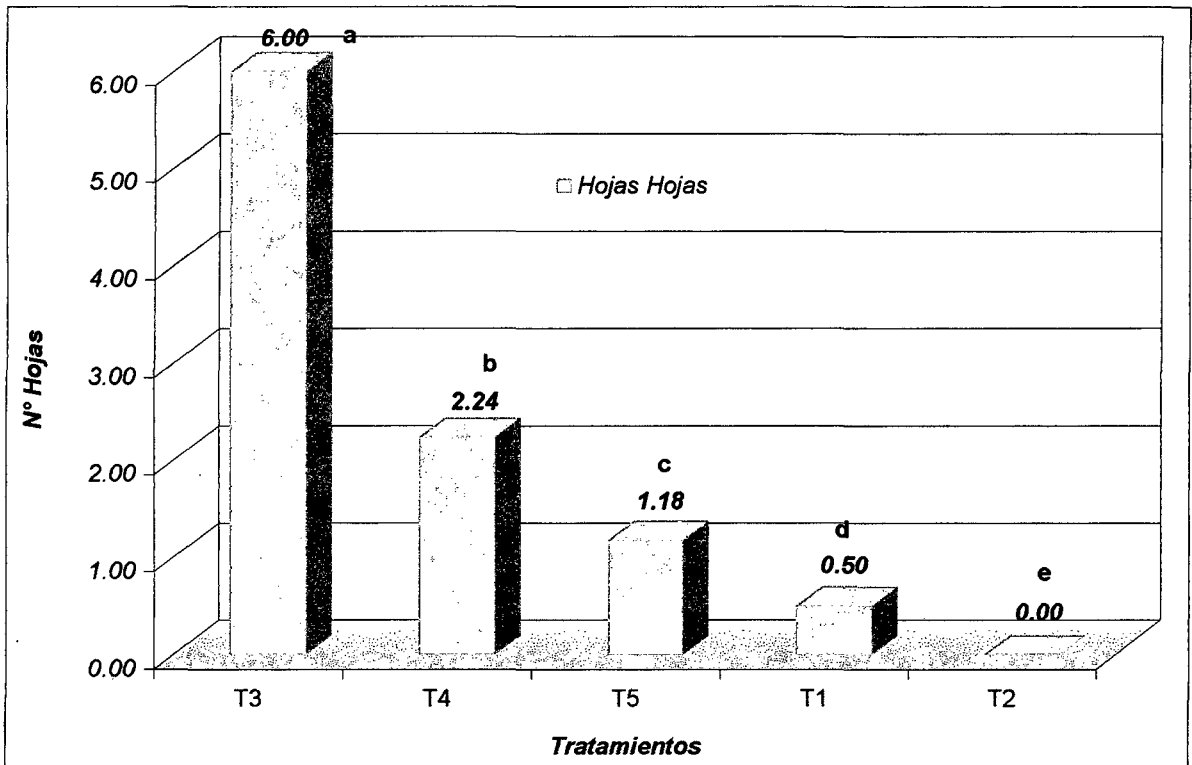
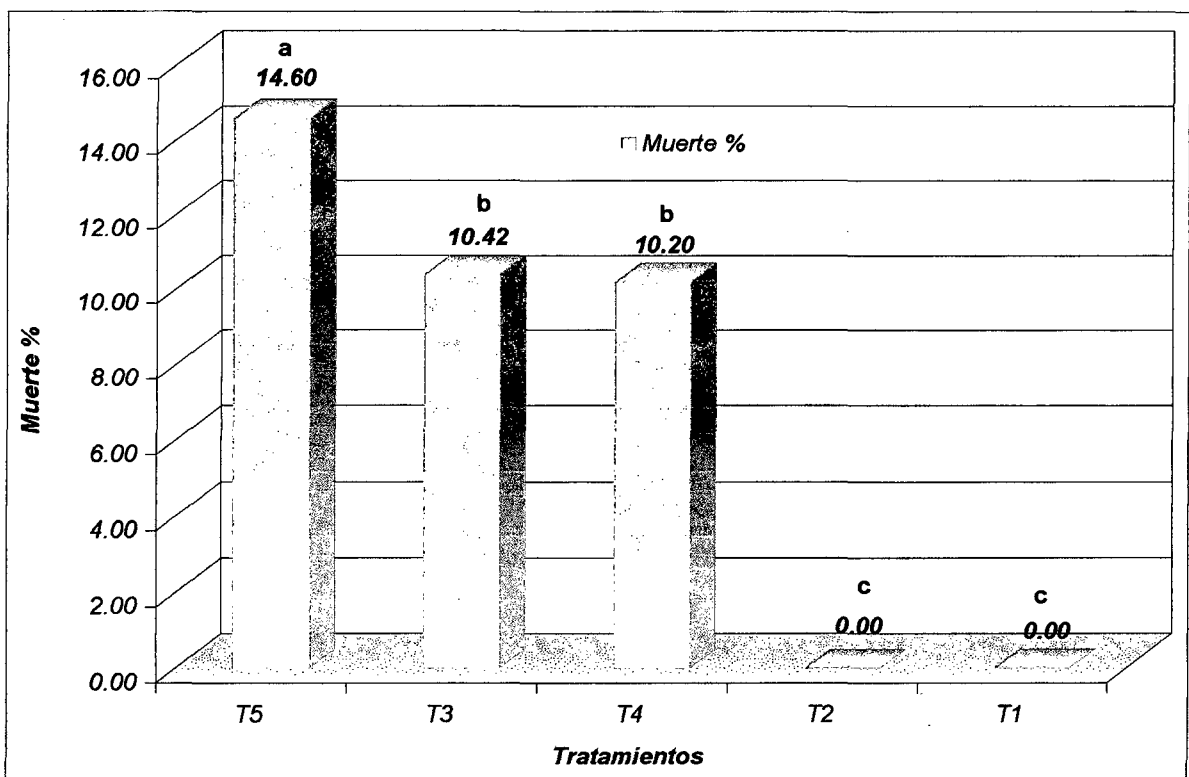


Gráfico N° 4: Prueba de rangos medios de Duncan para la Propagación sexual de *Croton* sp. en invernadero (Muerte %)



5.2. Propagación sexual *in vitro* del *Croton* spp.

Al analizar los resultados del análisis de varianza (cuadros 8 y 9) para la propagación sexual *in vitro*, no se encontró diferencia significativa en cuanto a germinación, callogénesis, rizogénesis, altura de plántula y vitrificación, pero se ha encontrado diferencia significativa en el número de hojas y muerte de plántulas debido a que los grupos de promedio son heterogéneos. La germinación de las semillas de *Croton* sp. de 8 días de cosechada mostró una baja germinación, probablemente se debe a la alta intensidad de luz que fue expuesta durante la fase de germinación..

En la prueba de Duncan (Gráficos 5, 6, 7, 8 y 9) para la germinación de semillas, callogénesis, número de hojas y muerte muestran diferencias significativas, indicando que existe heterogeneidad en los promedios que son respuestas del contenido nutricional de los medios de cultivos ensayados.

Cuadro 8: Análisis de varianza para propagación sexual *in vitro* de Sangre de Grado – *Croton sp.*

F. V.	G. L.	Germinación				Calogénesis				Rizogénesis				Número de hojas			
		S. C.	C.M	F. C.	Signif.	S. C.	C.M	F. C.	Signif.	S. C.	C.M	F. C.	Signif.	S. C.	C.M	F. C.	Signif.
Tratam.	4	206.45	51.61	280.09	**	58.41	14.602	3168.75	**	40.53	10.311	1026.96	**	5.12	1.279	277.59	**
Error	45	8.29	0.18			0.21	0.004			0.37	0.009			0.21	0.004		
Total	49	214.74				58.61				40.89				5.33			
R ² %		96.14				99.65				99.11				96.10			
CV %		7.92				2.89				3.07				5.36			
Prom.		5.42				2.35				3.23				1.27			

Cuadro 9: Análisis de varianza para la propagación sexual de *Croton spp. in vitro*. Datos transformados $\sqrt{x+0.5}$.

F. V.	G. L.	Altura cm				Muerte				Vitrificación			
		S. C.	C.M	F. C.	Signif.	S. C.	C.M	F. C.	Signif.	S. C.	C.M	F. C.	Signif.
Tratam.	4	20.61	5.15	343.01	**	203.57	50.89	916.14	**	125.73	31.43	1658.92	**
Error	45	0.68	0.02			2.50	0.05			0.85	0.02		
Total	49	21.29				206.09				126.58			
R ² %		96.82				98.78				99.33			
CV %		23.75				7.56				3.69			
Prom.		0.52				3.12				3.73			

** = Existe diferencia altamente significativo entre tratamientos

N. S. = No existe diferencia estadística entre tratamientos

Gráfico N° 5: Prueba de rangos medios de Duncan para la Propagación sexual de *Croton* sp in vitro (% Germinación)

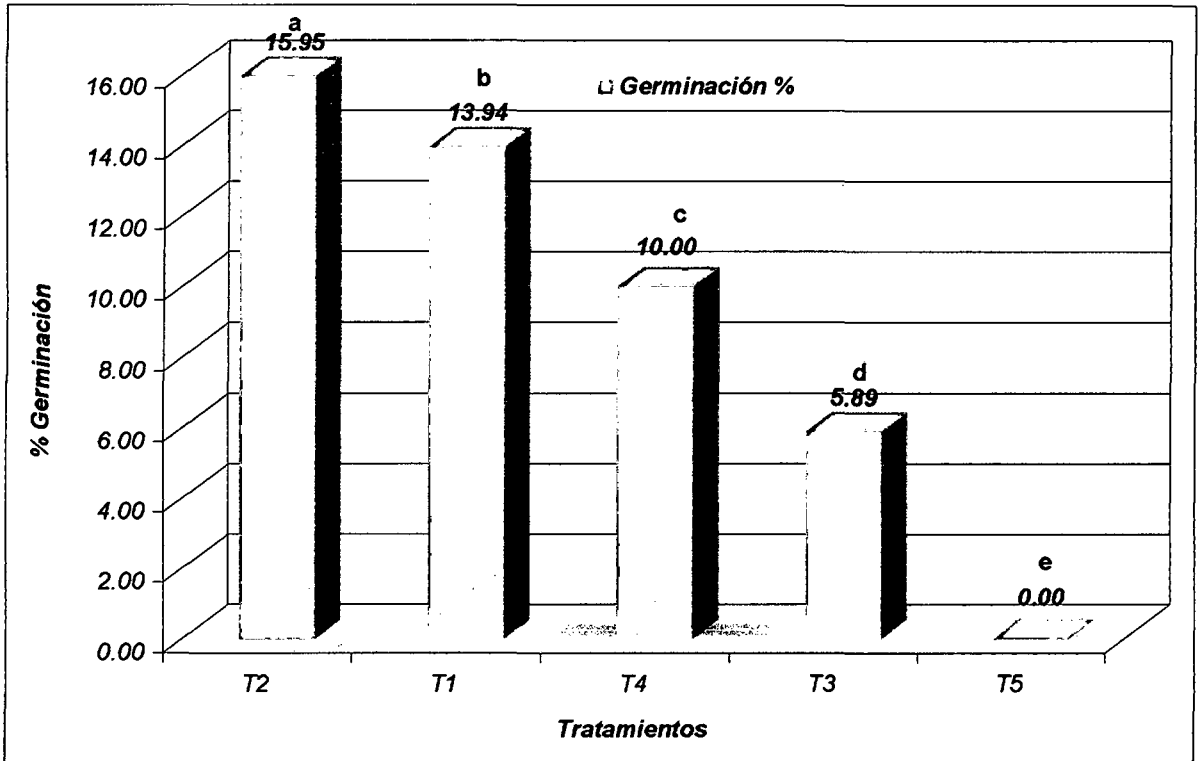


Gráfico N° 6: Prueba de rangos medios de Duncan para la Propagación sexual de *Croton* sp in vitro (% Callogénesis)

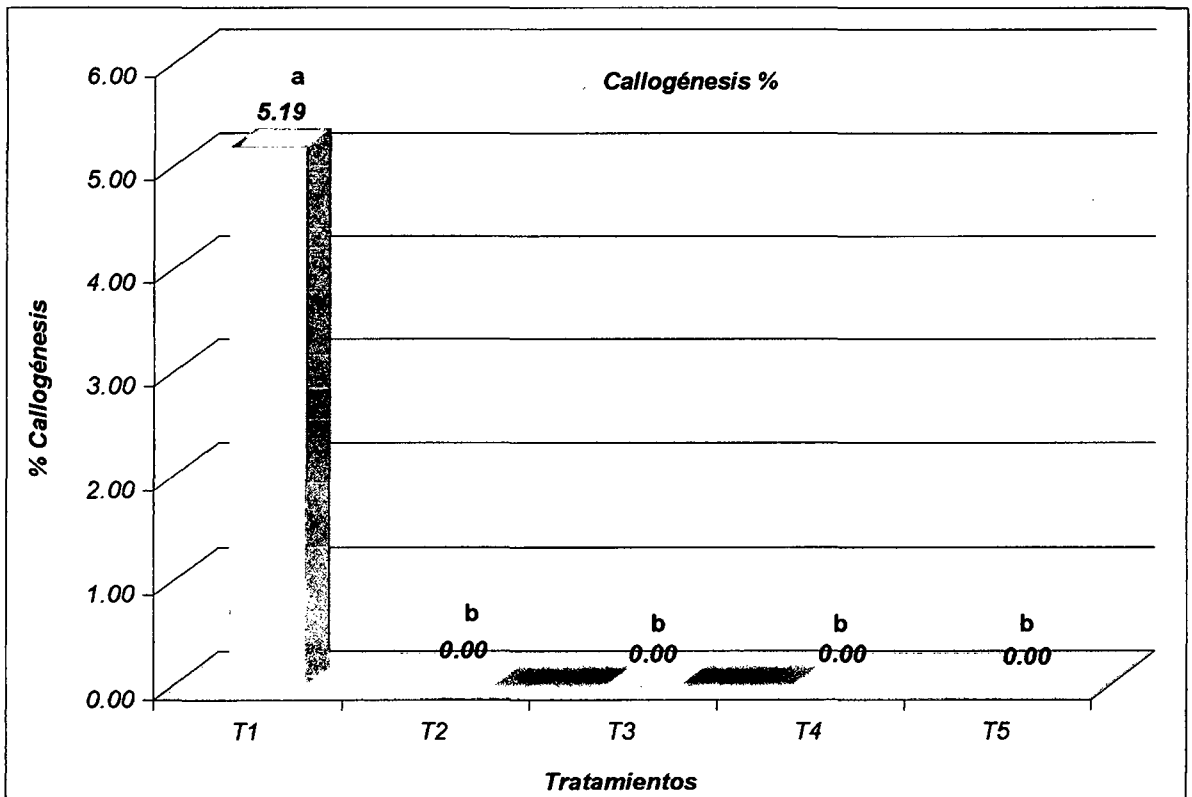


Gráfico N° 7: Prueba de rangos medios de Duncan para la Propagación sexual de *Croton* sp in vitro (% Rizogénesis)

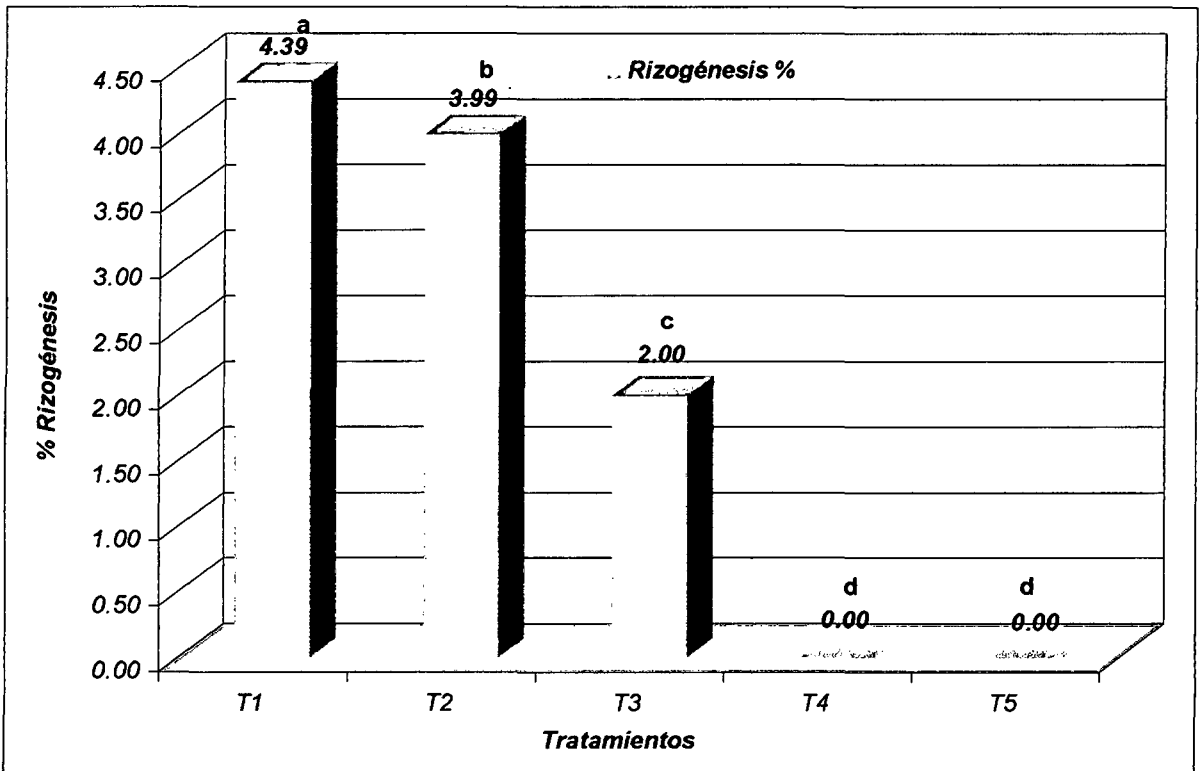


Gráfico N° 8: Prueba de rangos medios de Duncan para la Propagación sexual de *Croton* sp in vitro (N° Hojas)

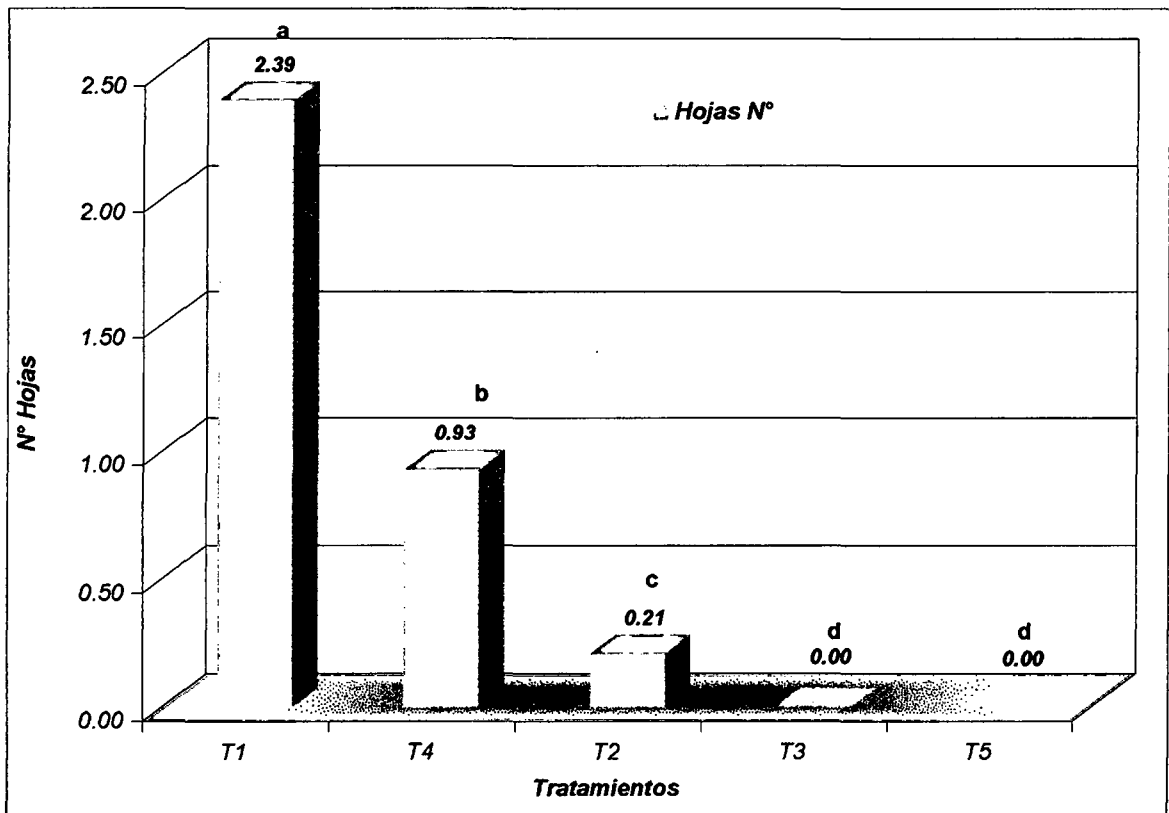


Gráfico N° 9: Prueba de rangos medios de Duncan para la Propagación sexual de *Croton* sp in vitro (Altura cm)

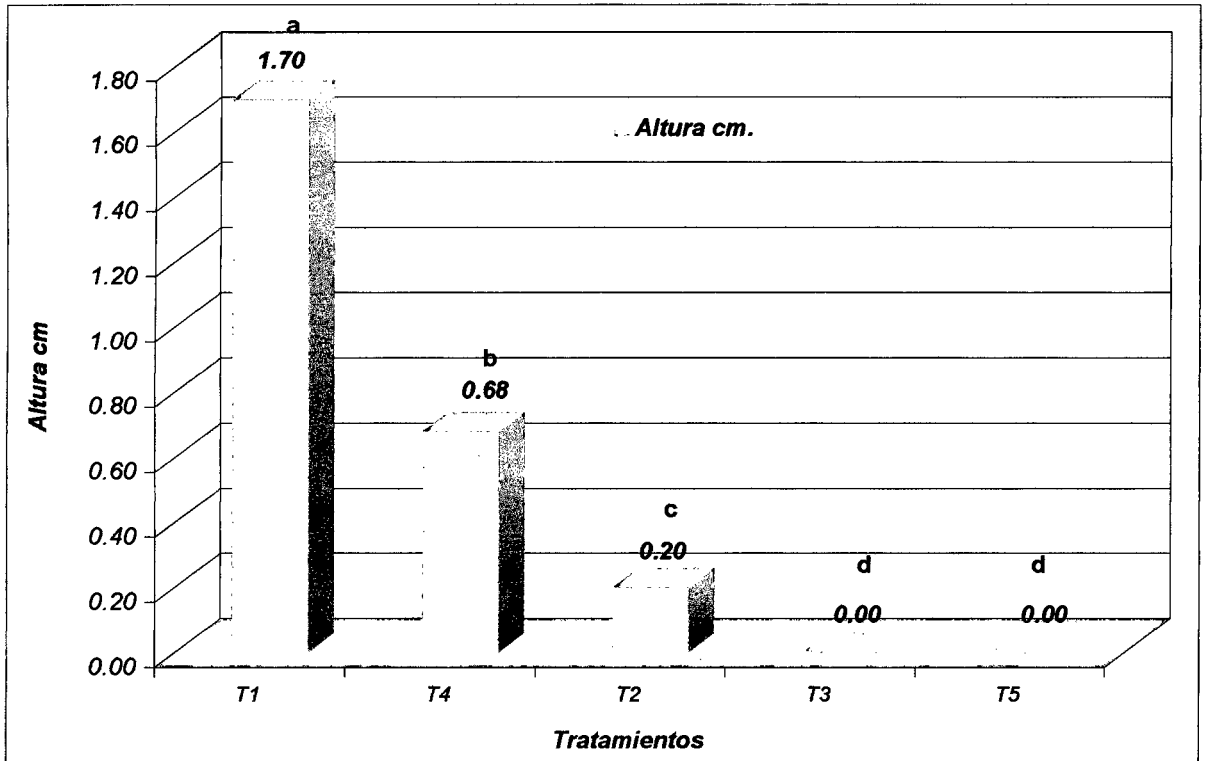


Gráfico N° 10: Prueba de rangos medios de Duncan para la Propagación sexual de *Croton* sp in vitro (% Muerte)

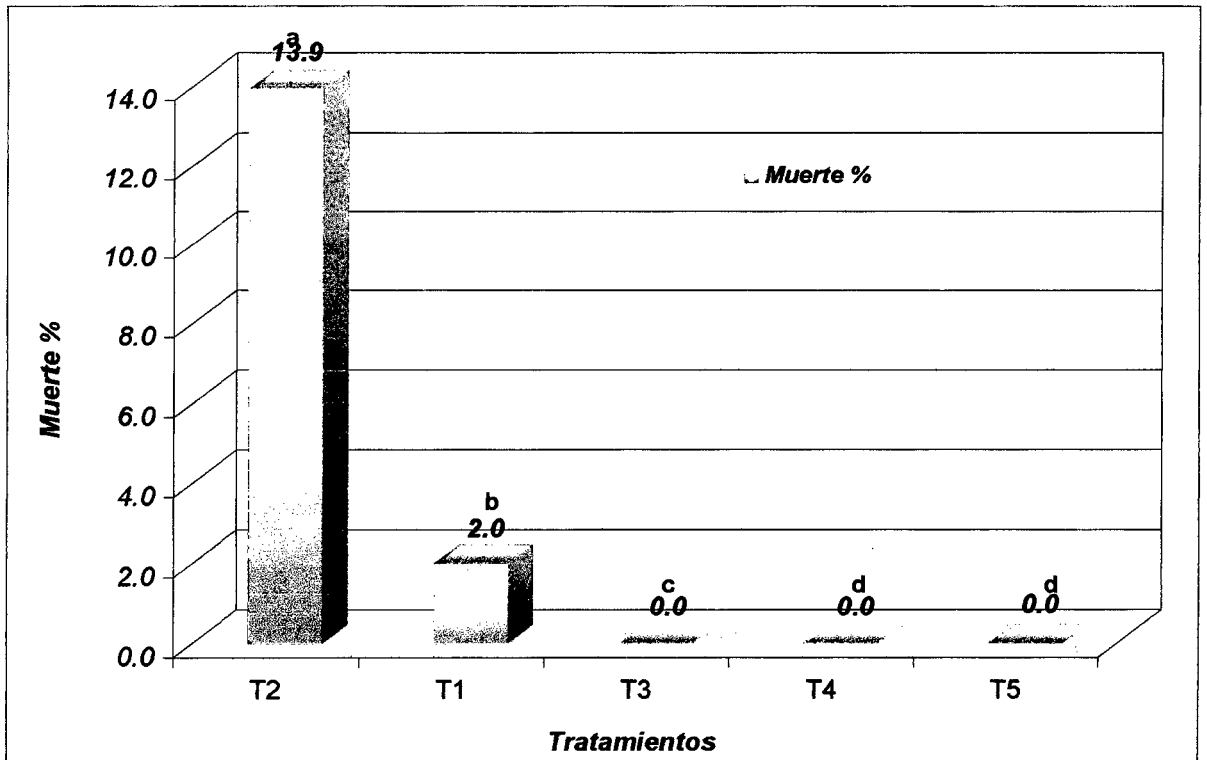
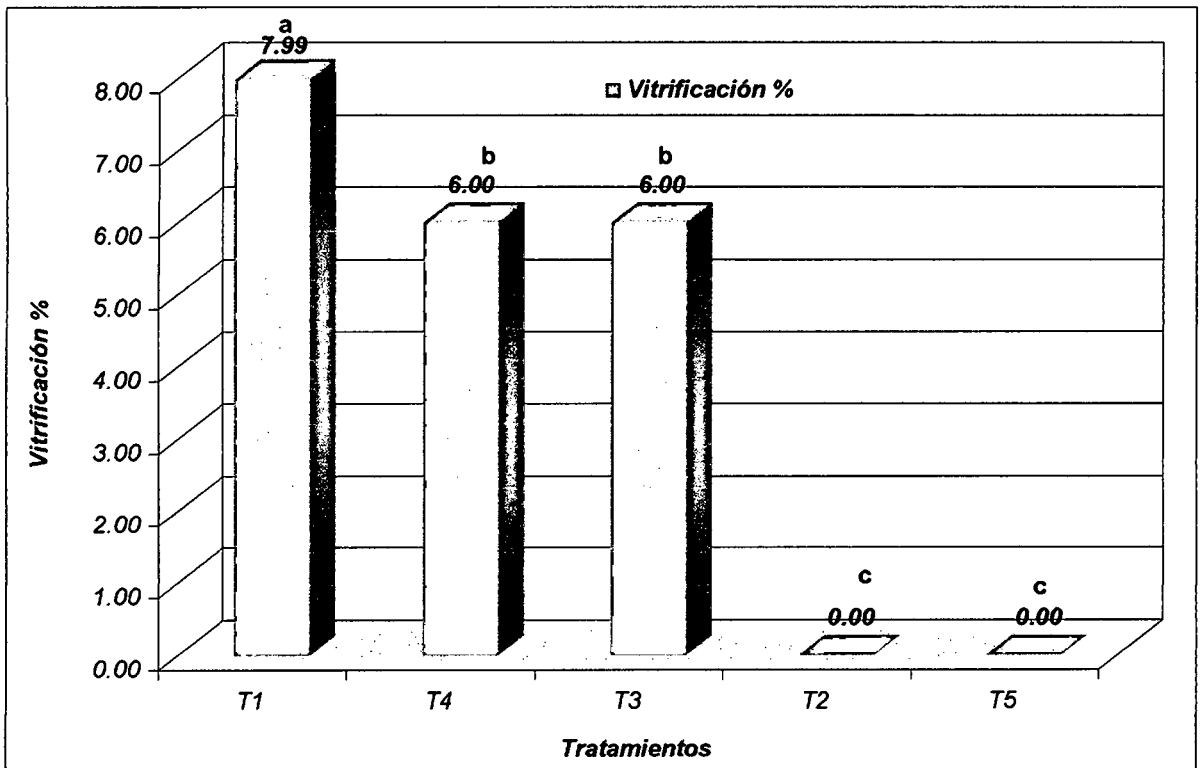


Gráfico N° 11: Prueba de rangos medios de Duncan para la Propagación sexual de *Croton* sp in vitro (% Vitrificación)



5.3. Propagación clonal de “Sangre de Grado” por explantes de hojas y pecíolos.

Al analizar los resultados del análisis de varianza (cuadro 10) correspondiente a la propagación por explantes de hojas y pecíolos, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a callogénesis, rizogénesis, muerte del tejido y fenolización; solo se encontró diferencia altamente significativa en el color marrón de los explantes. Con relación al R^2 existe una asociación entre tratamientos con respecto al color marrón y bajo nivel de asociación con respecto a las demás evaluaciones. Los C. V. que variaron de 2.33 a 2.48 % están dentro de los rangos aceptables para trabajos de laboratorio establecidos por Calzada (1970).

En los resultados de las pruebas de Duncan (Gráficos N° 12, 13, 14 y 15), no existe diferencia estadística en las evaluaciones de callogénesis, rizogénesis, muerte y fenolización de plántulas. Solo hubo diferencia estadística en el color marrón que es una expresión de necrosis. El tratamiento 1 con 84 % de color marrón, 22.25 % de rizogénesis y con 12.75 % de plántulas muertas y fenolizadas se ha mantenido en el primer lugar.

**Cuadro 10: Análisis de varianza de la Propagación clonal por explante de hojas y pecíolos de *Croton* spp. *in vitro*.
Expresado en porcentaje.**

F. V.	G. L.	Color Marrón				Calogénesis				Rizogénesis				Muerte			
		S. C.	C. M	F. C.	Sig.	S. C.	C. M	F. C.	Sig.	S. C.	C. M	F. C.	Sig.	S. C.	C. M	F. C.	Sig.
Tratam.	3	8494.08	2831.36	3953.36	**	1830.98	610.33	680.25	**	32.09	10.69	26.01	**	365.34	121.78	129.74	
Error	16	11.46	0.72			14.36	0.89			6.58	0.41			15.01	0.84		
Total	19	8505.54				1845.33				38.67				380.36			
R ² %		99.86				99.22				82.98				96.05			
C. V. %		3.68				2.54				2.56				5.11			
Promedio		23.00				37.36				25.08				18.94			

**** = Existe diferencia altamente significativo entre tratamientos**

N. S. = No existe diferencia estadística entre tratamientos

Gráfico N° 12: Prueba de rangos medios de Duncan para la Propagación clonal por explante de hojas y peciolo de *Croton* sp in vitro (Color Marrón)

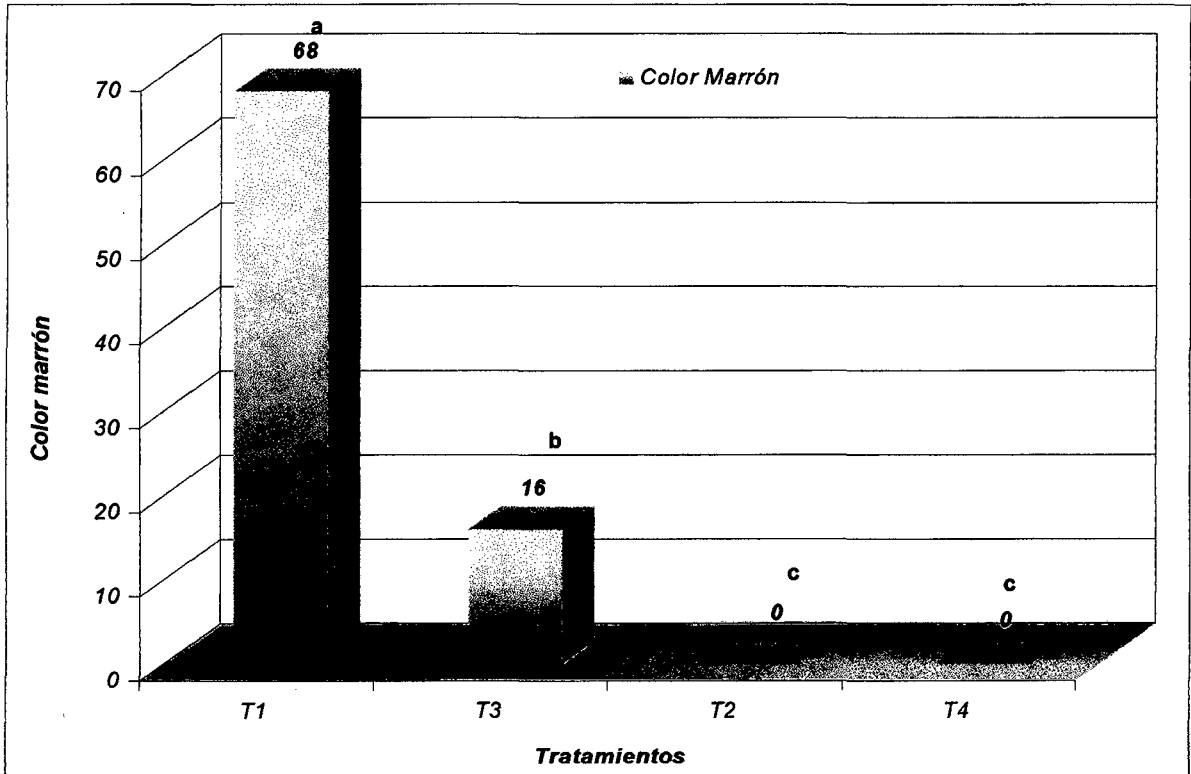


Gráfico N° 13: Prueba de rangos medios de Duncan para la Propagación clonal por explante de hojas y peciolo de *Croton* sp in vitro (Calogénesis)

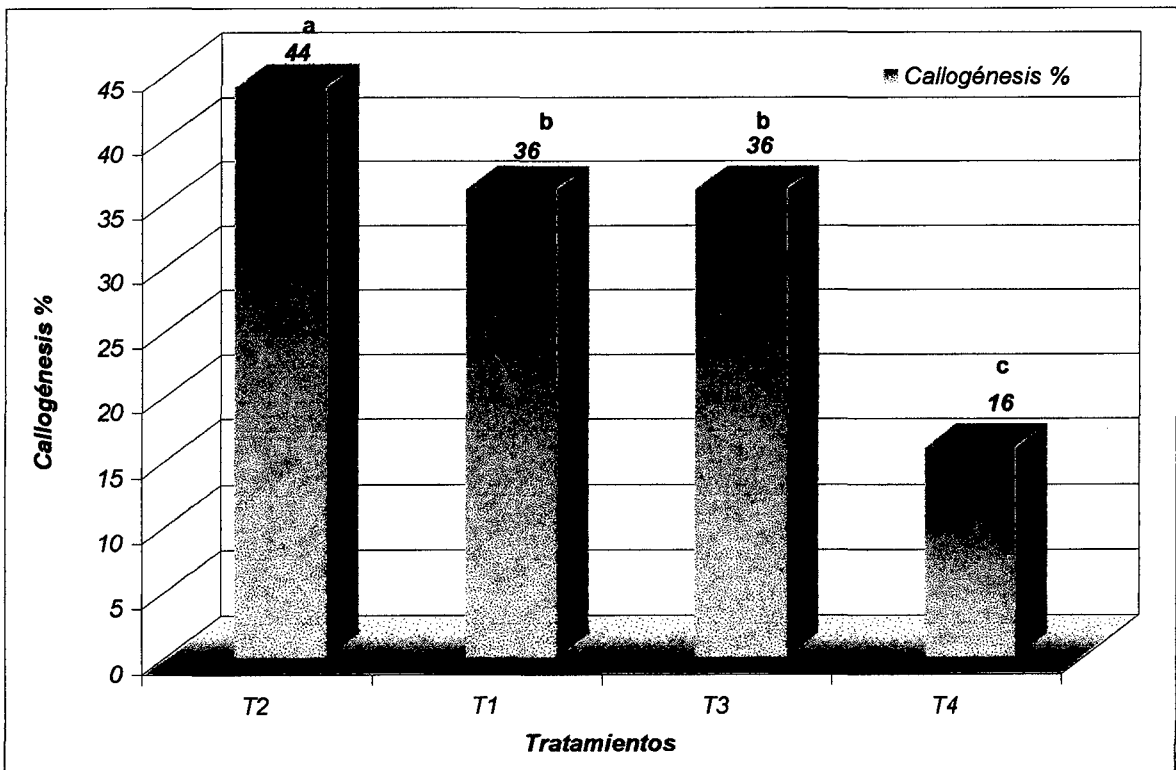


Gráfico N° 14: Prueba de rangos medios de Duncan para la Propagación clonal por explante de hojas y pecíolos de *Croton* sp in vitro (Rizogénesis)

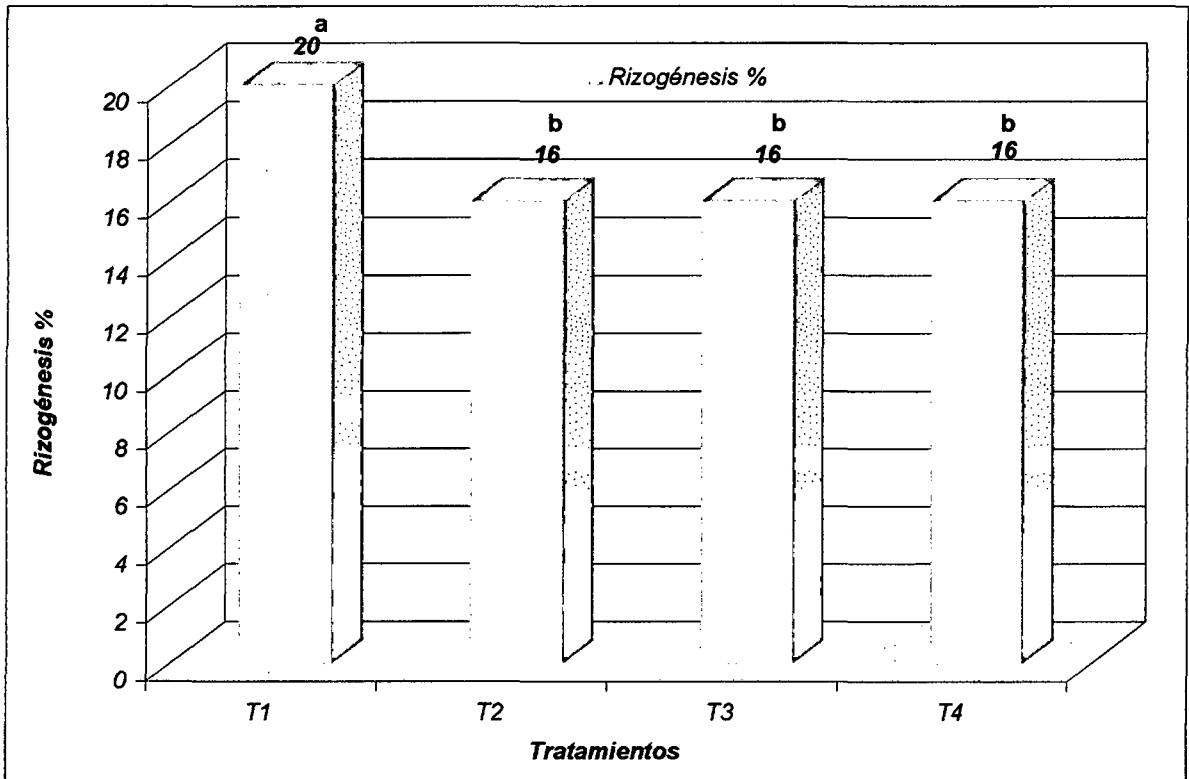
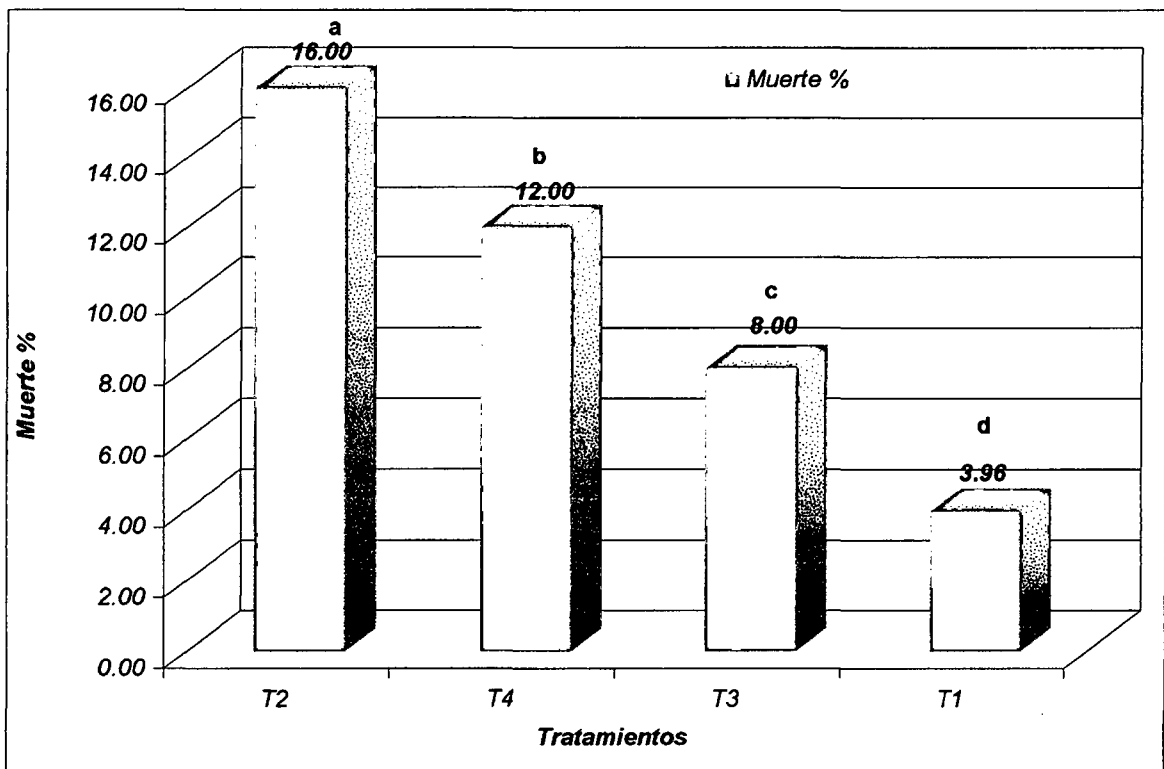


Gráfico N° 15: Prueba de rangos medios de Duncan para la Propagación clonal por explante de hojas y pecíolos de *Croton* spp. in vitro (Muerte %)



5.4. Evaluación cualitativa de la propagación clonal por nudos de Sangre de grado.

En las evaluaciones cualitativas de la propagación clonal de nudos de Sangre de Grado (cuadro N° 11), los tratamientos 1 al 3 mostraron supervivencia, morfogénesis, color y vitrificación en un 100 %. En los tratamientos 4, 5 y 6 la supervivencia, morfogénesis y color verde tienen resultados con variación que fluctúa en 50 %.

Cuadro 11: Evaluación cualitativa de la propagación asexual por nudos de *Croton* sp. *in vitro*.

Repeticiones	Pruebas	Supervivencia	Morfología	Color	Vitrificación
1	1	Vivo	Reg. Hojas	Verde	Vitrificación
	2	Vivo	Reg. Hojas	Verde	Vitrificación
	3	Vivo	Reg. Hojas	Verde	Vitrificación
	4	vivo	Reg. Hojas	Verde	Vitrificación
Total					
2	1	vivo	Reg. Hojas	Verde	Vitrificación
	2	vivo	Reg. Hojas	Verde	Vitrificación
	3	vivo	Reg. Hojas	Verde	Vitrificación
	4	vivo	Reg. Hojas	Verde	Vitrificación
Total					
3	1	vivo	Reg. Hojas	Verde	Vitrificación
	2	vivo	Reg. Hojas	Verde	Vitrificación
	3	vivo	Reg. Hojas	Verde	Vitrificación
	4	vivo	Reg. Hojas	Verde	Vitrificación
Total					
4	1	vivo	Reg. Hojas	Verde	Vitrificación
	2	vivo	Reg. Hojas	Verde	Vitrificación
	3	Muerto	Muerto	Muerto	Muerto
	4	Muerto	Muerto	Muerto	Muerto
Total					
5	1	vivo	Reg. Hojas	Verde	Vitrificación
	2	vivo	Reg. Hojas	Verde	Vitrificación
	3	Muerto	Muerto	Muerto	Muerto
	4	Muerto	Muerto	Muerto	Muerto
Total					
6	1	vivo	Reg. Hojas	Verde	Vitrificación
	2	Muerto	Muerto	Muerto	Muerto
	3	Muerto	Muerto	Muerto	Muerto
	4	vivo	Reg. Hojas	Verde	Vitrificación
Total					
Total General		18	18		

VI. DISCUSIÓN

6.1. Siembra de semillas en vivero

En los análisis estadísticos de la propagación sexual de sangre de grado en invernadero, los análisis de varianza se presentan en el cuadro N° 7 y las pruebas de rangos múltiples de Duncan en los gráficos 1, 2, 3 y 4, se observó lo siguiente:

El análisis de varianza para **germinación**, la prueba de F resultó altamente significativa (**), indicando que existe diferencia estadística entre los tratamientos. El C. V. de 5.70 % está en el rango 4 y 8 % tal como establece **Calzada (1970)**, para experimentos características y calidad. Su R^2 de 84.12 %, nos indica que esta asociado al proceso de la germinación de semillas en los tratamientos. Al comparar los resultados del gráfico 1 y 5 con respecto a la germinación de semilla in vitro, se observa que hay mayor emergencia de plántulas con la aplicación de ácido sulfúrico al 1 %, demostrando que luz difusa o la oscuridad tiene mayor importancia para la germinación de la semilla de sangre de grado, tal como ocurre en su habitat natural.

La prueba de Duncan para germinación, resultó con diferencias estadísticas por que los tratamientos estudiados mostraron valores porcentuales muy marcados entre ellos. El tratamiento 3 que correspondió a las semillas tratadas con 150 ml de ácido giberélico a 500 ppm durante 36 horas registró 87.53 % de semillas germinadas y superó estadísticamente a los demás tratamientos. Los tratamientos 5 y 4 con 14.60 y 11.60 % de semillas germinadas no se diferenciaron entre ellos y ocuparon el segundo

lugar. El 87.53 % de semillas germinadas en el tratamiento 3, se debe a la acción de las giberelinas que han inducido rompiendo los mecanismos de inhibición activa del crecimiento del embrión propio de la semilla. Asimismo es claro notar el efecto de la luz es importante para obtener mayor emergencia de plántulas; para el caso de sangre de grado requiere de baja luminosidad aproximadamente del 1 %.

En el análisis de varianza para promedio de altura de las plántulas, la prueba de F resultó altamente significativa (**), indicando que existe diferencia estadística entre los tratamientos. El CV de 25.17 % y R^2 de 96.22 % están dentro de lo establecido por **Calzada (1970)**, para los análisis de agronómicos y ganaderos.

La prueba de Duncan para promedio de altura resultó con diferencia estadística entre los tratamientos por que fueron heterogéneos en el crecimiento de la planta. El tratamiento 3 mostró plantas desde 0.5 hasta 7.60 cm de altura, dando un promedio de 5.09 cm, superando estadísticamente a los demás tratamientos; en este caso se nota que el ácido giberélico fomenta el desarrollo celular que va en beneficio del crecimiento vertical y horizontal de la plántula, también se debe a buena germinación y emergencia de la semilla. El segundo lugar ocupó el tratamiento 4, con plántulas que registraron alturas desde 1.00 a 4.50 cm y el promedio fue 1.48 cm; los tratamientos con ácido sulfúrico al 1 % y sin eliminación del arilo afecta la germinación de semilla, el primero porque causa daño químico y segundo porque que arilo impermeabiliza a la semilla, no dejando pasar el

agua en cantidades suficientes para cumplir con los procesos fisiológicos en el proceso de la germinación.

En el análisis de varianza del número de hojas por plántulas, la prueba de F resultó altamente significativa (**), indicando que existe diferencia estadísticas entre los tratamientos. Su CV de 5.85 % y R^2 de 97.58 % nos indica que están de acorde a lo establecido por Calzada (1970), para experimentos de laboratorio, invernaderos y análisis de calidad o características de plantas. La variación del número de las hojas de las plántulas en los tratamientos fueron dependientes del contenido nutricional de los medios de cultivos utilizado en los tratamientos.

La prueba de Duncan para el número de hojas de las plántulas en invernadero; dio como resultado con diferencia estadística significativa entre los tratamientos por que existe heterogeneidad en la formación de hojas por planta. El tratamiento 3 con promedio de 6.00 hojas por plántulas, superó estadísticamente a los demás tratamientos, demostrando que el ácido giberélico intervino en la multiplicación celular y como consecuencia formó mayor número de hojas. El tratamiento 4, ocupó el segundo lugar con promedios 2.24 hojas por plántulas. En estos casos se explica que las plántulas han formado hojas hasta que termine sus nutrientes acumulados, por otra parte es posible que el ácido sulfúrico actúa inhibiendo el crecimiento celular y como consecuencia no se formaron mas hojas. Este efecto tiene relación con el efecto observado en la altura.

En el análisis de varianza de la muerte de plántulas, la prueba de F resultó altamente significativa (**), indicando que existe diferencia estadística entre los tratamientos. Su CV de 5,46 % esta acorde con lo establecido por **Calzada (1970)**, para experimentos de laboratorio, invernaderos y análisis de calidad ó características de plantas. Su coeficiente de determinación 99.19, nos indica que tiene una buena asociación con respecto a la evaluación realizada

En la prueba de rangos múltiples de Duncan de muerte de plántulas obtenidas de semillas en invernadero, donde encontramos diferencia estadística entre los tratamientos. El tratamiento 5 con promedio 15.95 % de semillas germinadas, superando estadísticamente a los demás tratamientos. Los tratamientos 1 no registró plantas muertas.

La semilla germinada de ***Croton sp*** de 87.07 % en el invernadero con el tratamiento de ácido giberélico es superior al 80 % obtenido **Gaviria en 1991** citado por **Durand y Rivero (1996)** y con respecto a la siembra de la semilla *in vitro*; la alta iluminación no permitió la mayor germinación de plantas *in vitro*.

La altura de 5.09 cm y número de hojas de 6.00 por planta obtenida por el tratamiento 3, superan a los resultados obtenidos por el tratamiento 4 de la propagación *in vitro* por semillas sexuales que muestran plántulas con 1.48 cm de altura y 2.24 hojas planta; así mismo se observó que existió menor número de plantas muertas. Referente a las observaciones realizadas

en la propagación de semillas sexuales *in vitro* e invernadero, es necesario realizar mayor observación en cuanto al comportamiento de la semilla con respecto a los factores ambientales.

6.2. Propagación sexual *in vitro* con los diferentes tratamientos

En los análisis estadísticos de la propagación sexual *in vitro* de Sangre de Grado, los análisis de varianza se presentan en los cuadros N° 8 y 9, y las pruebas de Duncan en los gráficos N° 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11. Luego de los análisis se llegó a las siguientes observaciones:

En los resultados de la **germinación** de semillas sexuales, se encontró diferencia estadística altamente significativa entre los tratamientos mostrando heterogeneidad en el porcentaje de plantas emergidas porque las semillas no tuvieron buena viabilidad y vigor, y por otra parte se debe al efecto de los tratamientos ensayados. Su C. V. de 7.92 %, está en los rangos 4 y 8 %, como establece **Calzada (1970)** para calidad y características. El R^2 de 96.14 % muestra un buen nivel de asociación entre los tratamientos tal como establece el mismo autor.

La prueba de Duncan para la germinación de semillas en medios de cultivo en el laboratorio (gráfico 5), resultó con diferencias estadísticas entre los tratamientos. El tratamiento 2 con 15.95 % de semillas germinadas, superó estadísticamente a los demás tratamientos. El segundo lugar ocupó el tratamiento 1 con 13.94 %. No se observó semilla germinada en el tratamiento 5 (semillas sumergidas en agua caliente a temperatura 80 °C),

porque la altas temperatura ocasionaron la muerte del embrión. Este tratamiento no estuvo de acorde con las recomendaciones para el tratamiento de patógenos en la mayoría de semillas botánicas que establecen **Duarte (1981), Agrios (1978 y 1995), French y Teddy (1980)**, entre 48 y 52 de °C por 20 a 30 minutos.

El tratamiento 1 que corresponde a la aplicación de ácido sulfúrico al 1% obtuvo 15.95 % de semillas germinadas, 5.19 % de formación de callos, 2.39 hojas por planta, 1.70 cm de altura, 2.20 % de muerte y 2.60 % de vitrificación superando a todas las pruebas estudiadas en la propagación *in vitro* de las semillas sexuales.

Los niveles de germinación de los tratamientos en estudio (1 al 5), es menor en comparación con los resultados obtenidos en invernadero en las comunidades nativas del Río Perenne por Gaviria 1991, citado **Durand y Rivero (1996)** de 52 %.

En la rizogénesis (gráfico 7) las semillas sumergidas en 150 ml de ácido sulfúrico al 1 % durante 10 minutos y semillas sin arilo (tratamientos 1 y 4) registraron 4.39 y 3.99 % de explantes con raíces y el tratamiento 3 con 2.00 %. Las semillas sumergidas en ácido sulfúrico al 2 % y con ácido giberelico a 500 ppm (tratamiento 1), permitieron que el arilo se destruya, dejando libre a la semilla, provocando mayor enraizamiento.

En las evaluaciones de **callogénesis** de las vitroplantas, no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos por que las respuestas

de las semillas variaron de acuerdo al tratamiento efectuado. Su C. V. de 2.89 % es bajo y está inferior a los rangos 4 y 8 % que establece Calzada (1970) para los datos de calidad o de características pero tiene concordancia para experimentos en laboratorio. El R^2 de 99.65 % nos indican buen nivel de asociación entre los tratamientos estudiados, tal como establece **Calzada (1970)** para el coeficiente de determinación múltiple.

La prueba de rangos múltiples de Duncan, de la formación de callogénesis (gráfico 6) de las vitroplantas en medios de cultivos en el laboratorio, resultó con diferencia estadística altamente significativas entre ellos entre los tratamientos. El tratamiento 1 con 5.19 %, superó estadísticamente a los demás tratamientos que no registraron callos. Se nota claramente la intervención del ácido sulfúrico al 1 % en el proceso de la multiplicación celular, dando como resultado formación de callos, hecho importante para el proceso de multiplicación *in vitro* de plántulas de sangre de grado

En las evaluaciones de rizogénesis, no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos, porque las raíces formadas no difieren en función a los tratamientos. Su C. V. de 3.07 % está dentro del rango de 1 y 8 % como establece **Calzada (1970)** para los datos de laboratorio, calidad o de características de plantas. El R^2 de 99.11 % nos indica un buen nivel asociado en los tratamientos tal como establece **Calzada (1970)** para el coeficiente de determinación múltiple.

La prueba de Duncan de rizogénesis (gráfico 7) de propagación sexual *in vitro*, resultó con diferencia estadística altamente significativa entre los

tratamientos. El tratamiento 1 ocupó el primer lugar con promedios 4.39 % de formación de raíces, variando entre las pruebas, pero no se diferenció de los demás tratamientos; los tratamientos 4 y 5 no formaron raicillas. Las semillas de sangre de grado sin tratamientos no formaron raíces por que no existió un inductor que active a los genes responsables de la formación de raíces

En las evaluaciones de **altura** de vitroplantas, se encontró diferencias altamente significativas entre los tratamientos porque las plántulas fueron heterogéneas en el crecimiento. Su C. V. de 23.75 % es alto y no se encuentra en los rangos 4 y 8 % como establece **Calzada (1970)** para trabajos en laboratorios y datos de calidad o de características. El R^2 de 96.82 % nos indican que están asociados con el resultado de la altura de plántulas.

La prueba de Duncan para la altura de las vitroplantas (gráfico 9), resultó con diferencia estadística entre los tratamientos. El tratamiento 1 con una altura de 1.70 cm superó estadísticamente a los demás tratamientos, demostrándonos que las plantas que formaron callos y raíces tienen mayor altura. Los tratamientos 4 y 2 que formaron raíces después de la germinación dieron como resultados plantas de menor altura. Es claro notar que la función del ácido sulfúrico al 1 % ha inducido en la multiplicación celular horizontal y vertical de las plántulas de sangre de grado.

En las evaluaciones del número de **hojas** de las vitroplantas, se encontró diferencia significativa entre los tratamientos, debido a que no todas

las plantas emergidas formaron la misma cantidad de hoja. Su C. V. de 5.36 % es bajo y está en los rangos 4 y 8 % como lo establece **Calzada (1970)** para los datos de calidad o de características. El R^2 de 96.10 % nos indican que están asociados y 3.90 % no están asociados a los tratamientos tal como establece **Calzada (1970)** para el coeficiente de determinación múltiple.

La prueba de Duncan para el número de hojas de las vitroplantas (gráfico 8), resultaron con diferencia estadística entre los tratamientos. El tratamiento 1 con 2.39 hojas por vitroplanta, superó estadísticamente a los tratamientos 4 y 2 que registraron menor hoja en las vitroplantas, este resultado nos indica que las plántulas obtenidas de callos. forman mayor número de hojas que las plantas procedentes de raíces. El tratamiento 3 no formó plántulas y como consecuencia tampoco hojas a pesar de haber formado raíces.

En la **muerte** de las vitroplantas, se encontró diferencia significativa entre los tratamientos. Su C. V. de 7.56 % es bajo y está en los rangos de 4 y 8 % como establece **Calzada (1970)** para los datos de calidad. El R^2 de 98.78 %, nos indican que están asociados con respecto a esta evaluación.

La prueba de Duncan para muerte de vitro plantas (gráfico 10) de semillas botánicas en el laboratorio, resultó con diferencias estadísticamente significativa. El tratamiento 5 con 100 % registró el mayor porcentaje de vitroplantas muertas. Los tratamientos 2 y 1 no registraron vitroplantas muertas. La muerte de las vitroplantas se debió a la presencia de micelio de

hongos fitopatógenos endófitos que fueron introducidas en el interior de la semilla.

En las evaluaciones para la **vitrificación**, se encontró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Su C. V. de 3.69 % es aceptable, como establece **Calzada (1970)** para los rendimientos características y calidad. El R^2 de 99.33 % están asociados a los tratamientos con respecto a la vitrificación.

La prueba de Duncan para la vitrificación de semillas (gráfico 11) en medios de cultivos en el laboratorio, resultó con diferencia estadística entre los tratamientos. No se observó vitrificación en el tratamiento 2 y 5. El tratamiento 1 al otorgar un balance nutricional adecuado y el tratamiento 4, que correspondió al agua caliente aproximadamente 80 °C, que inactivó las reacciones respiratorias y así mismo éste tratamiento no permitió la vitrificación.

6.3. Propagación asexual por explante de hojas y pecíolos de sangre de grado.

En los análisis estadísticos de la Propagación Asexual (explante de hojas y pecíolos de vitro plantas) de sangre de grado en invernadero, los análisis de varianza se presentan en el cuadro N° 10 y las pruebas de rangos múltiples de Duncan en el Gráfico 12, 13, 14 y 15. Luego de los análisis se llegó a lo siguiente:

En el análisis de varianza para el color marrón, la prueba de F resultó

altamente significativa (**), indicando que existe diferencia estadística altamente significativa, existiendo variación en la respuesta al color de cada uno de los explantes durante el experimento. El CV de 3.68 % y R^2 de 99.86 %, nos indica que se encuentra en un rango óptimo, conforme establece **Calzada (1970)**, para experimentos agronómicos y ganaderos.

La prueba de Duncan para el color marrón (gráfico 12), resultó con diferencia estadística entre los tratamientos. El tratamiento 1 con 68.00 % del color marrón, superó estadísticamente a los demás tratamientos. El tratamiento 3 ocupa el segundo lugar con 16 % y los tratamientos 2 y 4 no registran el color marrón, no existiendo diferencia estadística entre ellos.

En el análisis de varianza para callogénesis, la prueba de F resultó No Significativa (N. S.), indicando que no existe diferencia estadística entre los tratamientos. Su CV de 2.54 %, nos indica que está de acorde a lo establecido por **Calzada (1970)**, para trabajos en experimentos ganaderos y agronómicos. El R^2 de 99.22%, nos indica un buen nivel de asociación de los tratamientos en función de la callogénesis, respuesta que se debe probablemente a la influencia de factores ambientales o la desnaturalización de la hormona al ser esterilizado a 130 °C por 20 minutos en el autoclave.

La prueba de Duncan para Callogénesis (gráfico 13); resultó con diferencia estadística entre los tratamientos. El tratamiento 2 con 44 % de explante formaron callos, superando a los demás tratamientos. Ocupó el segundo lugar los tratamientos 1 y 3 con 36 % de callos formados. El último

lugar ocupó el tratamiento 4 con 16.00 % de callos. En esta evaluación se nota que todo los tratamientos han formado callos inferiores al 50 %.

En el análisis de varianza para rizogénesis, la prueba de F resultó con diferencia estadística altamente significativa, por que entre tratamiento hubo respuestas divergentes. Su C. V. de 2.56 % estando de acorde con lo establecido por **Calzada (1970)**, cuando menciona para experimentos de laboratorio, invernaderos y análisis de calidad ó características de plantas. El R^2 de 82.98 % nos indica la baja asociación entre los tratamientos.

En la prueba de Duncan para rizogénesis (gráfico 14), encontramos diferencia estadística entre los tratamientos. El tratamiento 1 con 20 % de raíces formó mayor porcentaje, superando a los tratamientos de 4, 3, 1 que registraron un promedio de 16 % de explantes que formaron raíces.

En el análisis de varianza para la muerte, la prueba de F resultó estadísticamente altamente significativa, indicando que no existe homogeneidad. Su CV de 5.11 % estando de acorde con lo establecido por **Calzada (1970)**, cuando menciona para experimentos de laboratorios e invernaderos. El R^2 de 96.05 % nos indica una buena asociación entre los tratamientos.

En la prueba de Duncan para la muerte (gráfico 15), donde encontramos diferencia estadística entre los tratamientos. El tratamiento 2 con 16 % de explantes muertos, superando a los demás tratamientos.

Los explantes de hojas y pecíolos de *Croton sp. in vitro*, formaron callos y raíces. El color marrón en el tejido tiene relación con los cortes

realizados por que se destruye algunas células, exponiendo a la oxidación a los fenoles con la enzima fenoxidaza al ponerse en contacto con el oxígeno. La formación de callos de semillas sexuales de 57 % y explante de hojas y pecíolos de 56.82 %, difieren 18 centésimas, indicando que tienen respuestas similares en los medios de cultivos. Existe 12.75 % de explantes muertos en tratamiento 1, que es inferior 47.73 % obtenida por el mismo tratamiento en la propagación *in vitro* por semilla.

6.4. Evaluación cualitativa de Propagación Asexual por segmentos nodales.

El Cuadro N° 11 (Ver Anexos) de Propagación Asexual por Explante de Nudos nos indica lo siguiente:

Los tratamientos 1, 2, y 3 fueron los que obtuvieron mejores resultados tanto en Supervivencia, Morfología (regeneración de hojas) y Color varió de verde: claro a oscuro; el cambio de tonalidad de verde se debe a la multiplicación de las células y al envejecimiento. A los 16 días de sembrado los explantes se mantiene vivos con color verde claro pero se vitrifican; probablemente se deba a la pérdida del agua en todos los medios que provocó la cristalización del cultivo que fueron materia de estudio.

VII. CONCLUSIONES

- 7.1. Los mejores tratamientos en la propagación sexual fueron: en **invernadero** el tratamiento 3 (Semillas sumergidas en 150 ml de ácido giberélico a la dosis de 500 ppm durante 36 horas) con 87.53 % de germinación, 5.09 cm de altura y 6.00 hojas por plántula.
- 7.2. El mayor número de callos se presentó en el tratamiento 3 (Semillas sumergidas en 150 ml de ácido giberélico a la dosis de 500 ppm durante 36 horas) con 5.19 % de la propagación sexual *in vitro*.
- 7.3. En el experimento de la propagación asexual *in vitro* por explante de hojas y pecíolos, el tratamiento 2 (dosis de 0.25 de ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético) formó 44.00 % de callos.
- 7.4. Formó mayor número de raíces en la propagación asexual por explante de hojas y pecíolos, los tratamientos 1 (siembra de hojas y pecíolos en medio de cultivo sin ácido 2-4, dicloro-fenoxi-acético) con 20.00 %
- 7.5. La vitrificación es el estado brillante que muestra el tejido o las vitro plantas por la acumulación de agua.
- 7.6. Los tratamientos 1, 2 y 3 (siembra de segmentos nodales: sin ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético, con 0.25 % de 2,4-D y 0.50 de 2,4-D) del ensayo de la propagación asexual *in vitro* con 100 % supervivencia, morfogénesis y color verde dieron los mejores resultados.

VIII. RECOMENDACIONES

- 8.1. Se recomienda realizar estudios de viabilidad y vigor de la semilla de ***Croton* sp.** para optimizar su momento de siembra y su conservación.
- 8.2. Para una mejor explotación de ***Croton* sp.** en plantaciones comerciales es necesario determinar el momento del inicio y la máxima producción del taspine dentro de la savia.
- 8.3. Se recomienda buscar la temperatura óptima y el tiempo requerido para el tratamiento semilla sexual de ***Croton* sp.** con agua caliente para que no afecte la germinación.
- 8.4. Probar cambios en el contenido nutricional y hormonal del medio de cultivo para lograr un equilibrio en la formación de callos y raíces de los explantes por hojas, pecíolos y segmentos nodales de ***Croton* sp.**
- 8.5. Determinar el momento óptimo de aplicación de las hormonas en los medios de cultivos para evitar la desnaturalización por efecto del calor.
- 8.6. Se debe trasladar los explantes antes de los 16 días de sembradas a otro medio de cultivo con la misma composición nutricional que los medio de cultivos anteriores, para mantenerlos sin vitrificar.

IX. RESUMEN

Los experimentos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales e invernadero de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín, con los objetivos de desarrollar diferentes estrategias de propagación sexual y clonal *in vitro* e invernadero y describir algunas características morfológicas de las plántulas de "Sangre de grado" (*Croton lechleri*). Fue ubicado en la Ciudad Universitaria, distrito de Morales, provincia y Región San Martín, Longitud Oeste 76° 21', Latitud Sur 6° 29', Altitud, 350 m. s. n. m y Clima bosque seco tropical (Holdridge 1972).. En la propagación sexual por invernadero los mejores resultados fueron, el tratamiento 3 con 87.53 % de germinación de semillas y 5.09 cm de altura; en la propagación *in vitro* el tratamiento 1 con 13.94 % de germinación y 5.19 % de formación de callos. En la propagación asexual por explante de hojas y tallos, formó mayor número de raíces el tratamiento 2 con 20.00 %. El color marrón es un proceso de transición en el aspecto fisiológico del explante de hojas y pecíolos; la vitrificación es el estado brillante que muestra el tejido o las vitroplantas por exceso del agua. En la propagación asexual de explante de hojas y pecíolos, la fenolización de los callos tienen relación con la muerte de los callos en mayoría de los tratamientos. Los tratamientos 1, 2 y 3 con 100 % supervivencia, morfogénesis y color verde son los mejores resultados en la propagación asexual por explante de nudos.

X. SUMMARY

The experiments were carried out in the facilities of the Plant tissue culture laboratory and greenhouse of the Faculty of Agrarian Sciences of the National University of San Martín, with the objectives of developing different strategies of sexual propagation and clonal in vitro and greenhouse and to describe some characteristic morphological of the small plants of "degree Blood" (*Croton lechleri*). It was located in the University City, district of Morales, county and Region San Martín, Longitude West 76° 21 ' , South Latitude 6° 29 ' , Altitude, 350 m. s. n. m and Climate tropical dry forest (Holdridge 1972).. In the sexual propagation for greenhouse the best results were, the treatment 3 with 87.53% of germination of seeds and 5.09 cm of height; in the propagation in vitro the treatment 1 with 13.94 germination% and 5.19% of formation of tripes. In the asexual propagation for explante of leaves and shafts, it formed bigger number of roots the treatment 2 with 20.00%. The brown color is a transition process in the physiologic aspect of the explante of leaves and petioles; the vitrificación is the brilliant state that it shows the fabric or the vitroplantas for excess of the water. In the asexual propagation of explante of leaves and petioles, the fenolización of the tripes has relationship with the death of the tripes in majority of the treatments. The treatments 1, 2 and 3 with 100% survival, morfogénesis and green color are the best results in the asexual propagation for explante of knots.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. AGRIOS, G. N. 1995. "Fitopatología". 2da Edición. Traduced of the 3th edition of Plant Pathology- Academic Press, Inc. por Guzman, M. Edito. LIMUSA, México. Pág. 196-197
2. ARÉVALO, G. 1994. "Las Plantas Medicinales y su Beneficio en la Salud Shipibo-Conivo. Lima – Perú.
3. BARRIGA, R. 1998. "Plantas Útiles de la Amazonía Peruana, características, usos y posibilidades. Lima -Perú.
4. CALZADA, J. 1970. Métodos Estadísticos para la Investigación. Tercera Edición. Editorial JURDICA S.A. Lima – Perú. 643 p.
5. DUARTE B. O. 1981. " Biblioteca Agropecuaria del Perú: Propagación Sexual de las Plantas". Editorial NETS, Vol. 5. Pág. 30.
6. DUCKE, J. & R. VÁSQUEZ (1997). Amazonian Ethnobotanical Dictionary. ERC Press. Boca Ratón. F. L. USA
7. DURAND, V. y A. RIVERO 1996. "Sangre contra sangre; propiedades cicatrizantes, antiinflamatorias y analgésicos de la Sangre de Grado, Resumen Preliminar. Lima – Perú.
8. ESTRELLA, E. 1995. Plantas Medicinales Amazónicas: Realidad y perspectivas Tratado de la Cooperación Americana. Lima - Perú. 301 p.
9. FRENCH E. R. 1980. "Métodos de Investigación Fitopatológica". Edit. IICA. San José Costa Rica. Pág.
10. HOLDRIDGE, L. 1972. Ecología Basada en Zonas de Vida IICA. San José – Costa Rica. 216 p.
11. INRENA – INMETRA. 1997. Manual para el Aprovechamiento de la Uña de Gato en Bosques naturales. Lima-Perú.

12. MEZA, Elsa. 1998. *Croton lechleri*, Sustainable Harbets, Management in Pharmaceutical, Phytomedicine. Lima – Perú.
13. McBRIDE, J. F. 1951. Botanical Series Field Museum of Natural History Vol. XIII. Part. III A number 1, Flora of Peru. Chicago – USA.
14. MEJIA, K y ELSA RENGIFO. 1995 - "Plantas Medicinales de uso popular en la Amazonía Peruana – Agencia Española de Cooperación Internacional.
15. PERETTI, ANNA. 1994. " Manual para Análisis de Semilla. Lima – Perú
16. PINEDO, M. 1999. Sistemas de Producción de Plantas Promisorias con Principios Activos en la Selva.
17. SILVA, H. 1998. "Plantas Medicinales de la Amazonía Peruana, utilizados por Curanderos y chamanes con fines anticonceptivos. Iquitos – Perú.

ANEXO

Cuadro 19: Promedios de las pruebas de la propagación sexual en invernadero

Tratamientos	N° de Pruebas	Germinación %	Altura (cm)	N° de hojas	Muerte %
1	1	0.00	0.00	0.00	0.00
1	2	0.00	0.50	0.00	0.00
1	3	0.00	0.00	0.00	0.00
1	4	0.00	0.50	0.00	0.00
1	5	0.00	0.00	0.00	0.00
1	6	0.00	0.00	0.00	0.00
1	7	20.00	3.50	5.00	0.00
1	8	0.00	0.00	0.00	0.00
1	9	0.00	0.00	0.00	0.00
1	10	0.00	0.00	0.00	0.00
2	1	0.00	0.00	0.00	0.00
2	2	0.00	0.00	0.00	0.00
2	3	0.00	0.00	0.00	0.00
2	4	0.00	0.00	0.00	0.00
2	5	0.00	0.00	0.00	0.00
2	6	0.00	0.00	0.00	0.00
2	7	0.00	0.00	0.00	0.00
2	8	0.00	0.00	0.00	0.00
2	9	0.00	0.00	0.00	0.00
2	10	0.00	0.00	0.00	0.00
3	1	80.00	5.95	7.25	0.00
3	2	80.00	7.60	6.33	0.00
3	3	100.00	4.94	5.80	0.00
3	4	0.00	0.00	0.00	0.00
3	5	100.00	4.14	7.00	0.00
3	6	80.00	4.45	6.00	0.00
3	7	100.00	4.60	7.00	20.00
3	8	80.00	7.00	6.75	0.00
3	9	100.00	6.10	7.20	0.00
3	10	80.00	5.63	6.67	20.00
4	1	0.00	0.00	0.00	0.00
4	2	0.00	0.00	0.00	0.00
4	3	0.00	0.00	0.00	0.00
4	4	20.00	1.00	2.00	0.00
4	5	20.00	4.50	7.00	0.00
4	6	0.00	0.00	0.00	0.00
4	7	0.00	0.00	0.00	0.00
4	8	0.00	0.00	0.00	0.00
4	9	40.00	4.20	6.00	20.00
4	10	40.00	5.10	7.50	0.00
5	1	80.00	0.60	2.00	80.00
5	2	20.00	0.00	0.00	20.00
5	3	20.00	3.00	4.00	20.00
5	4	0.00	0.00	0.00	0.00
5	5	0.00	0.00	0.00	0.00
5	6	0.00	0.00	0.00	0.00
5	7	0.00	0.00	0.00	0.00
5	8	20.00	3.20	6.00	20.00
5	9	0.00	0.00	0.00	0.00
5	10	20.00	0.00	0.00	20.00

Cuadro 21: Evaluación de la propagación clonal a partir ápices de hojas y pecíolos de *Croton* sp. in vitro

Repeticiones	Pruebas	Color marrón	Callogenesis	Rizogenesis	Muerte
		%	%	%	%
1	1	40.00	0.00	60.00	20.00
1	2	80.00	40.00	0.00	0.00
1	3	80.00	80.00	0.00	0.00
1	4	80.00	20.00	0.00	0.00
1	5	60.00	40.00	40.00	0.00
2	1	0.00	80.00	0.00	0.00
2	2	0.00	0.00	20.00	80.00
2	3	0.00	80.00	20.00	0.00
2	4	0.00	60.00	20.00	0.00
2	5	0.00	0.00	20.00	0.00
3	1	0.00	60.00	0.00	20.00
3	2	0.00	0.00	80.00	0.00
3	3	0.00	0.00	0.00	20.00
3	4	0.00	80.00	0.00	0.00
3	5	80.00	40.00	0.00	0.00
4	1	0.00	0.00	0.00	60.00
4	2	0.00	20.00	0.00	0.00
4	3	0.00	60.00	0.00	0.00
4	4	0.00	0.00	80.00	0.00
4	5	0.00	0.00	0.00	0.00

Cuadro 18: Presupuesto y financiamiento

N°	DESCRIPCIÓN	UNIDAD	CANTIDAD	P/U. (S/.)	TOTAL (S/.)
I.	REMUNERACIONES				2,325.00
	*Recolección Semilla	Jornales	10	25.00	200.00
	Beneficio de Semilla	Jornales	2	25.00	50.00
	Recolección Suelo Monte	Jornales	5	15.00	30.00
	Preparación Vivero	Jornales	2	22.50	45.00
	Conducción experimento	Salar.Mens	500	2,000	2,000
II	BIENES				2,121.00
	Papel aluminio	Rollos	5	96.00	480.00
	Papel plástico(Clear Wrap)	Rollos	5	50.00	250.00
	Pinzas 12 cm	Unidad	1	32.00	32.00
	Algodón	1 g.	1	38.00	38.00
	Bisturios 10 u 11 cm	Caja 100 u	1	116.00	116.00
	Sucrosa	Fco 500 g.	1	186.00	186.00
	Guantes quirúrgicos	Caja 50 u.	1	118.00	118.00
	Carbón activo	Fco 250 g.	1	172.00	172.00
	Alcohol 96%		5	6.00	6.00
	Buffer PH-7	Caja	1	92.00	92.00
	Lejía		5	4.00	20.00
	Escarificador H ₂ SO ₄ 2%	Fco.	1	94.00	94.00
	Inducción (AG ₃)		1	78.00	78.00
	Trifenil – Tetrazolium		1	80.00	80.00
	BAP		1	80.00	80.00
	2- 4 -D		1	100.00	100.00
	Rollo Slide	Unidad	2	20.00	40.00
	Rollo Copias	Unidad	2	15.00	30.00
	Papel Bond 80°	Millar	1	20.00	20.00
	Papel Bulki	Millar	1	15.00	15.00
	Papel Carbón	Millar	1	15.00	15.00
	Libreta de Campo	Unidad	2	5.00	5.00
	Lápiz, lapicero	Unidad	4	4.00	4.00
	Mandil,	Unidad	1	50.00	50.00
III.	SERVICIOS				1,410.00
	Transporte Semilla	Pasaje	10	20.00	200.00
	Traslado Suelo	Transp..	1	20.00	20.00
	Análisis de suelo	Análisis	1	40.00	40.00
	Servicio laboratorio	Contrato	1	1,000	1,000.00
	Servicio Computadora	Copias	150	1.00	150.00
COSTO TOTAL:					5,856.00

Foto 01: Excisión de segmentos nodales de *Croton spp*



Foto 02: Separación de segmentos nodales *Croton spp*



Foto 03: Colocación de segmentos de *Croton spp* en tubo de ensayo



Foto 04: Aislamiento de segmentos nodales de *Croton spp*

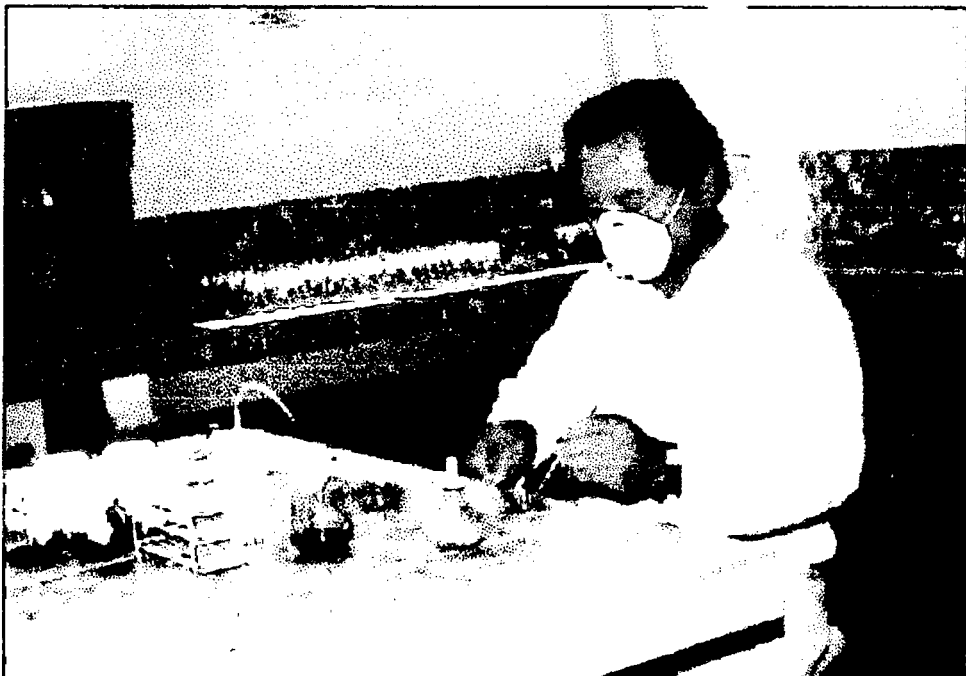


Foto 05: Frasco conteniendo segmentos de *Croton spp*

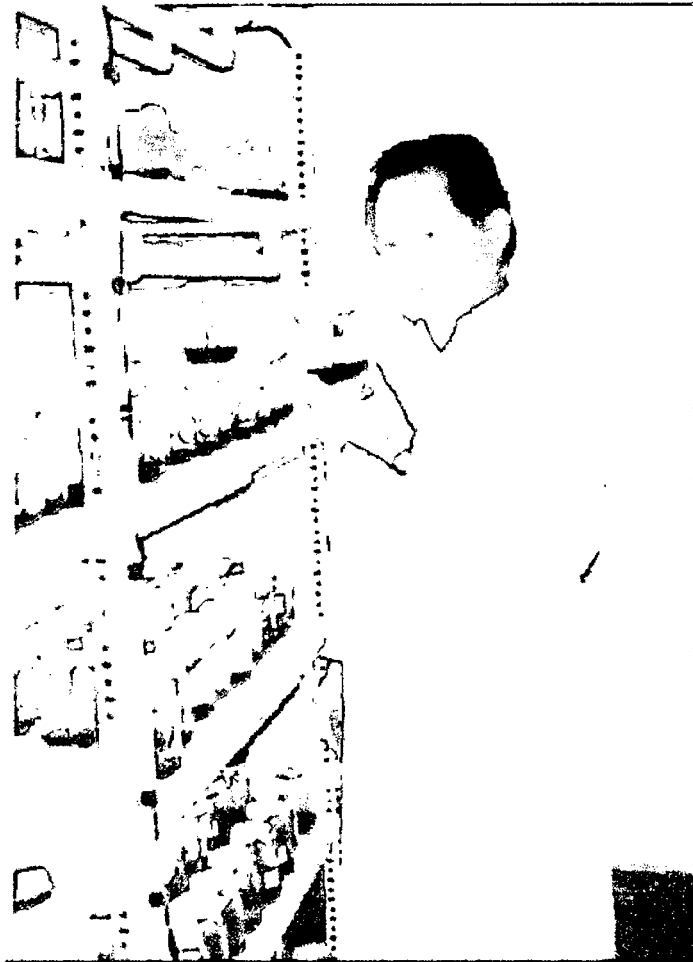


Foto 06: Placas Petri con explantes de *Croton spp*



Foto 07: Placa Petri con explante de hoja *Croton spp*

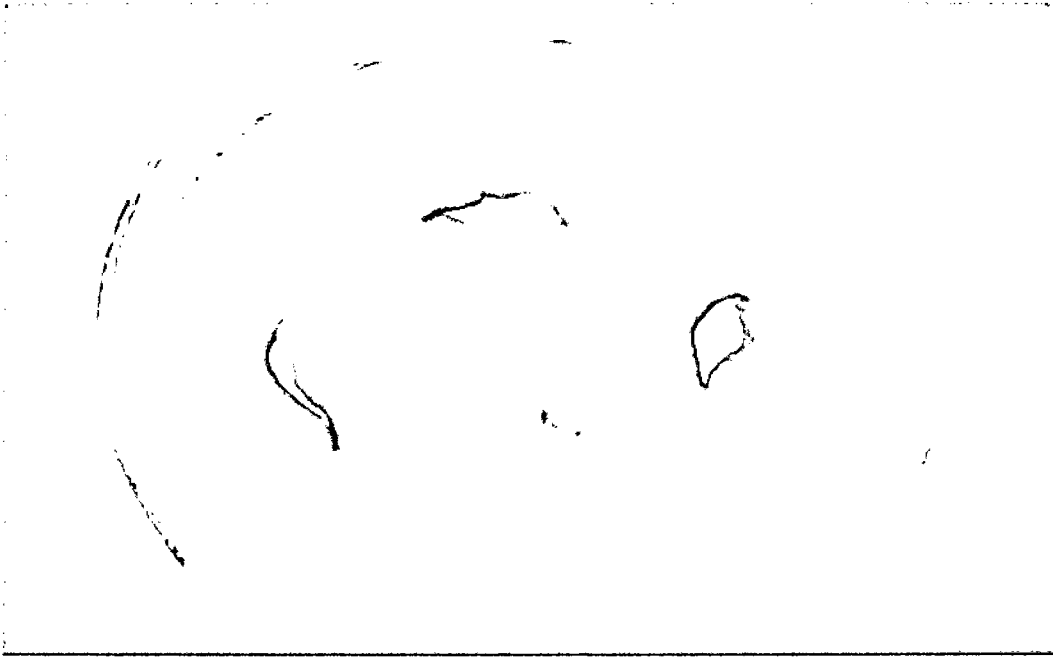


Foto 08: Frascos conteniendo explantes de hoja de *Croton spp*

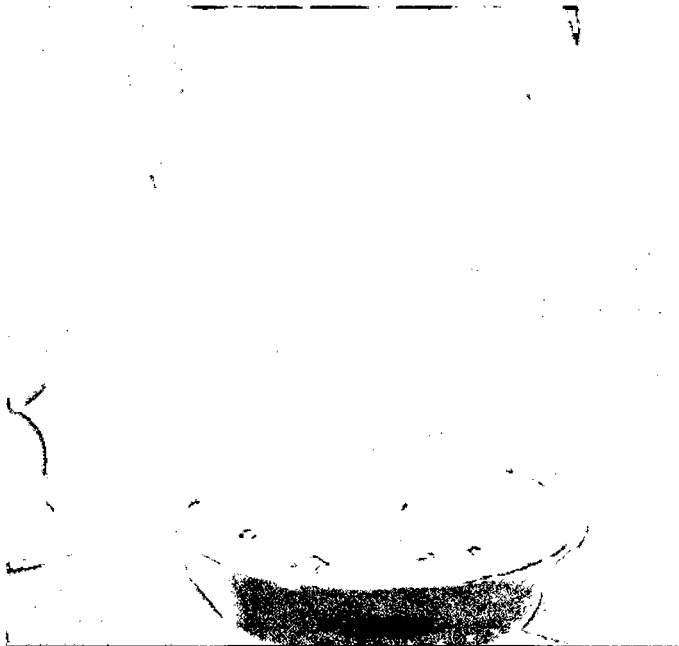


Foto 09: Frascos conteniendo explantes de nudos de *Croton spp*

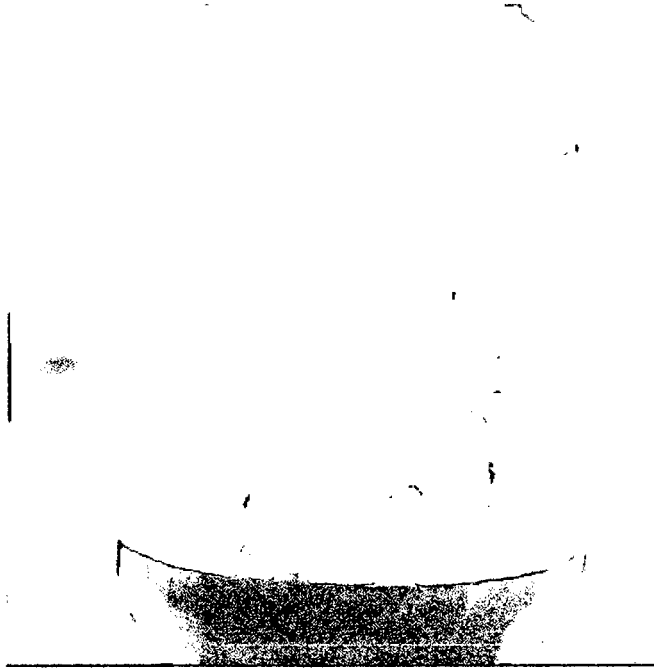


Foto 10: Bandejas conteniendo plántulas de *Croton spp*

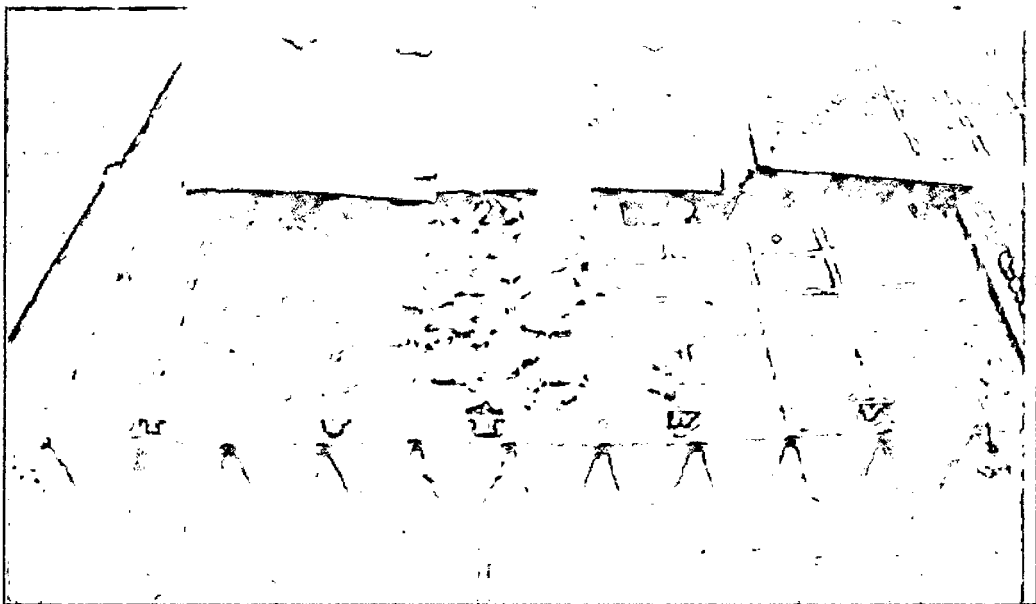


Foto 11: Bandejas conteniendo plántulas de *Croton* spp

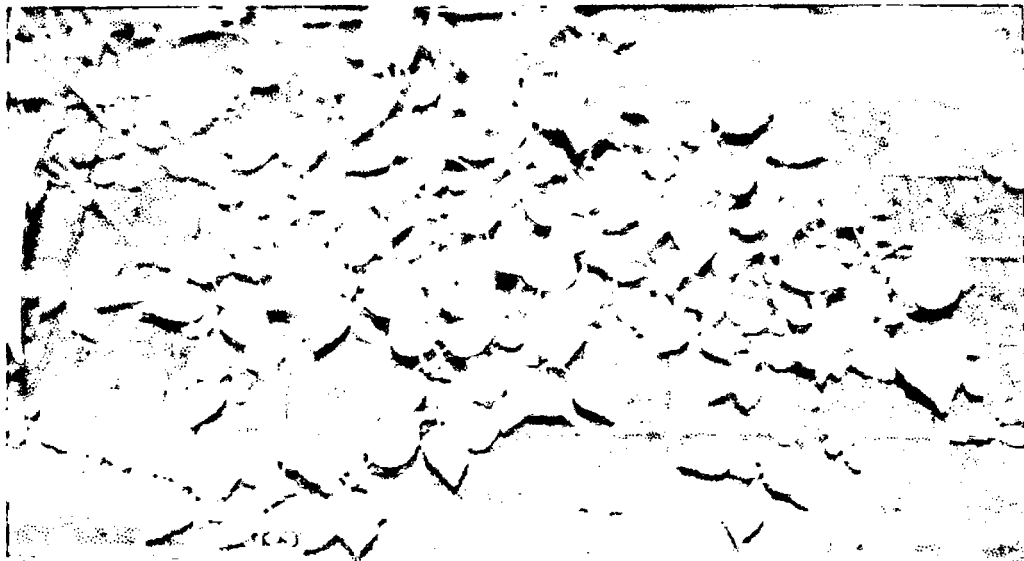


Foto 12: Bandejas conteniendo plántulas de *Croton* spp

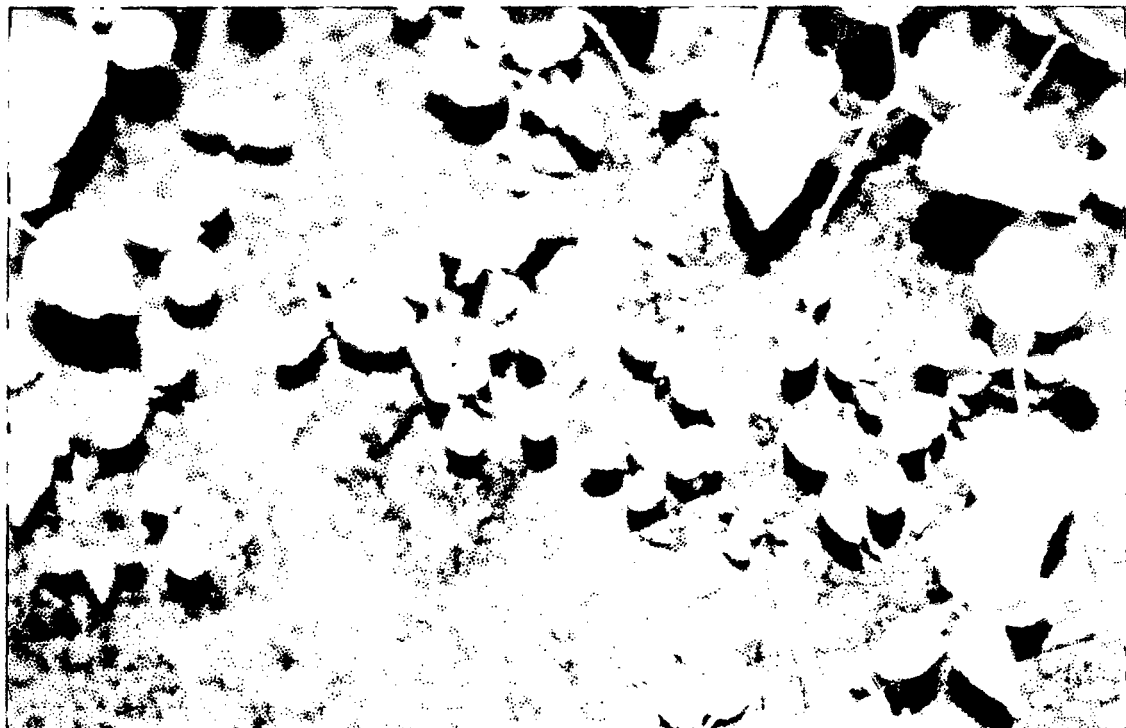


Foto 13: Plántulas de *Croton spp*

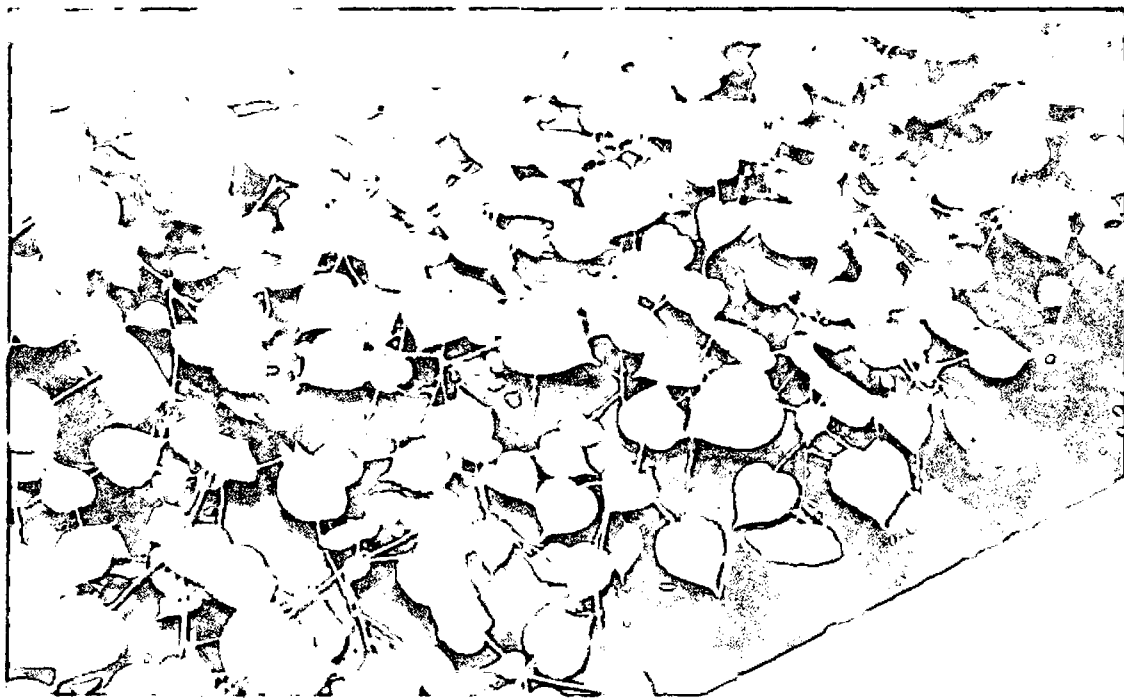
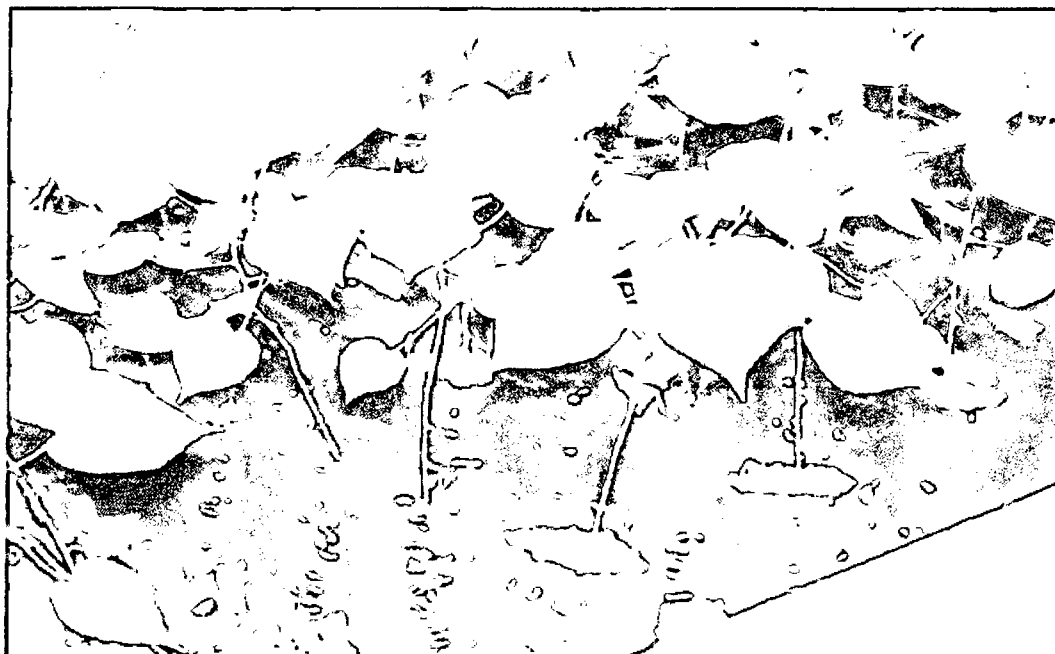


Foto 14: Plántulas de *Croton spp*



Edad de plántulas: 80 días

Foto 15: Plántulas de *Croton spp*

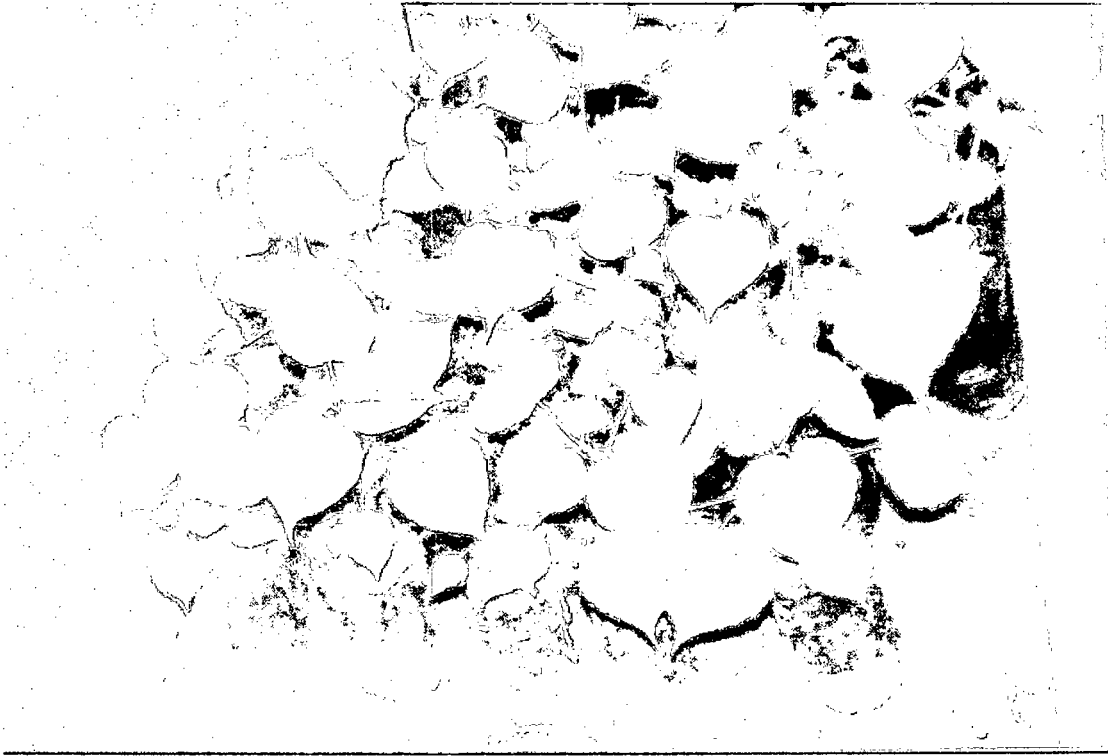


Foto 16: Plántula de *Croton spp*

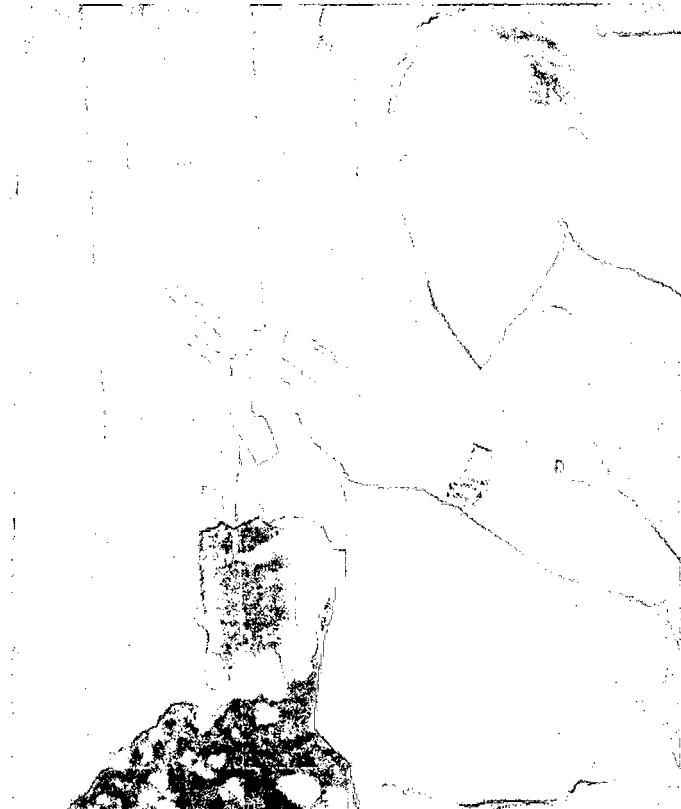


Foto 17: Planta establecida de *Croton spp*



Foto 18: Planta de *Croton spp*

