



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución - 4.0 Internacional \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Vea una copia de esta licencia en <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>





FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

Tesis

**Efecto inductivo *in vitro* de citoquininas sobre el
brotamiento de segmentos nodales de palo de rosa
(*Aniba rosiodora* Ducke)**

Para optar el título profesional de Ingeniero Agrónomo

Autor:

Silvia Kareli Herrera Pinedo
<https://orcid.org/0000-0001-7486-5494>

Asesor:

Dr. Geomar Vallejos Torres
<https://orcid.org/0000-0001-7084-977X>

Coasesor:

Ing. Henri Delgado Hayas
<https://orcid.org/0000-0002-9833-5831>

Tarapoto, Perú

2022



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

Tesis

Efecto inductivo *in vitro* de citoquininas sobre el brotamiento de segmentos nodales de palo de rosa (*Aniba rosiodora* Ducke)

Para optar el título profesional de Ingeniero Agrónomo

Presentado por

Silvia Kareli Herrera Pinedo

Sustentado y aprobado el 01 de julio del 2022, por los siguientes jurados.

Presidente de Jurado
Ing. M.Sc. Patricia Elena García
González

Secretario de Jurado
Ing. M.Sc. Jorge Luis Peláez
Rivera

Vocal de Jurado
Ing. M.Sc. Harry Saavedra Alva

Asesor
Dr. Geomar Vallejos Torres

Coasesor
Ing. Henri Delgado Haya

Tarapoto, Perú

2022

Declaratoria de autenticidad

Silvia Kareli Herrera Pinedo, con DNI N° 70136427, egresada de la Escuela Profesional de Agronomía Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín, autora de la tesis titulada: **Efecto inductivo *in vitro* de citoquininas sobre el brotamiento de segmentos nodales de palo de rosa (*Aniba rosiodora Ducke*)**

Declarajo bajo juramento que:

1. La tesis presentada es de nuestra autoría.
2. La redacción fue realizada respetando las citas y referencia de las fuentes bibliográficas consultadas
3. Toda información que contiene la tesis no ha sido plagiada;
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido alterados ni copiados, por tanto, la información de esta investigación debe considerarse como aporte a la realidad investigada.

Por lo antes mencionado, asumimos bajo responsabilidad las consecuencias que deriven de mi accionar, sometiéndome a las leyes de nuestro país y normas vigentes de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto.

Tarapoto, 01 de julio de 2022.

Silvia Kareli Herrera Pinedo

D.N.I. 70136427



Formato de autorización NO EXCLUSIVA para la publicación de trabajos de investigación, conducentes a optar grados académicos y títulos profesionales en el Repositorio Digital de Tesis

1. Datos del autor:

Apellidos y nombres:	Herrera Pinoelo Silvia Karali		
Código de alumno :	70136427	Teléfono:	947450878
Correo electrónico :	SilviaKaralihermespinoelo@gmail.com	DNI:	70136427

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

2. Datos Académicos

Facultad de:	Ciencias Agrarias
Escuela Profesional de:	Agronomía

3. Tipo de trabajo de investigación

Tesis	(x)	Trabajo de investigación	()
Trabajo de suficiencia profesional	()		

4. Datos del Trabajo de investigación

Título :	Efecto Inductivo <u>in vitro</u> de citoguáninas sobre el brotamiento de segmentos nodales de palo de rosa (<u>Aniba rosioelora Duke</u>)
Año de publicación:	2022

5. Tipo de Acceso al documento

Acceso público *	(x)	Embargo	()
Acceso restringido **	()		

Si el autor elige el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de San Martín, una licencia **No Exclusiva**, para publicar, conservar y sin modificar su contenido, pueda convertirla a cualquier formato de fichero, medio o soporte, siempre con fines de seguridad, preservación y difusión en el Repositorio de Tesis Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indique el sustento correspondiente:

6. Originalidad del archivo digital.

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad Nacional de San Martín, como parte del proceso conducente a obtener el título profesional o grado académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el Jurado.

7. Otorgamiento de una licencia **CREATIVE COMMONS**

Para investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons*, con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>

El autor, por medio de este documento, autoriza a la Universidad Nacional de San Martín, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Digital de Tesis, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra todo el documento.

Según el inciso 12.2, del artículo 12° del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales - RENATI **“Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Repositorio Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA”**.



Firma del Autor



8. Para ser llenado en el Repositorio Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto de la UNSM.

Fecha de recepción del documento.

13 / 09 / 2022



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN
Repositorio Digital de Ciencia, Tecnología e
Innovación de Acceso Abierto - UNSM.


Ing. Grecia Vanessa Fachin Ruíz

Responsable

***Acceso abierto:** uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

** **Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.

Ficha de identificación

<p>Título del proyecto</p> <p>Efecto inductivo <i>in vitro</i> de citoquininas sobre el brotamiento de segmentos nodales de palo de rosa (<i>Aniba rosiodora</i> Ducke)</p>	<p>Área de investigación: Ciencias Agrícolas y Forestales</p> <p>Línea de investigación: Silvicultura y Manejo Forestal Sostenible</p> <p>Sublínea de investigación: Agroforestería</p> <p>Grupo de investigación: Manejo Forestal Sostenible, con resolución - 050-2021-UNSM-T/FCA/CF/NLU</p> <p>Tipo de investigación:</p> <p>Básica <input type="checkbox"/>, Aplicada <input checked="" type="checkbox"/>, Desarrollo experimental <input type="checkbox"/></p>
---	--

<p>Autor:</p> <p>Silvia Kareli Herrera Pinedo</p>	<p>Facultad de Ciencias Agrarias</p> <p>Escuela Profesional de Agronomía</p> <p>https://orcid.org/0000-0001-7486-5494</p>
---	---

<p>Asesor:</p> <p>Geomar Vallejos Torres</p>	<p>Dependencia local de soporte:</p> <p>Facultad de Ciencias Agrarias</p> <p>Escuela Profesional de Agronomía</p> <p>Unidad o Laboratorio Agronomía</p> <p>https://orcid.org/0000-0001-7084-977X</p>
--	---

<p>Coasesor:</p> <p>Henri Delgado Haya</p>	<p>Contraparte científica:</p> <p>Facultad o Institución: Instituto Nacional de Investigación Agraria - INIA</p> <p>Unidad o Laboratorio: Laboratorio</p> <p>País: Perú</p> <p>https://orcid.org/0000-0002-9833-5831</p>
--	---

Dedicatoria

“A mi amada madre, Guillermina Pinedo Linarez por formarme con principios, valores y virtudes, los cuales me ayudaron a salir adelante en los momentos más difíciles, y también a mi querido padre Glauber Herrera Tuanama y hermano Glauber Herrera por su amor incondicional y motivación para seguir adelante”.

“De igual forma a mi novio; José Neyver Ylatoma Silva, por ser mi motor y motivo para poder lograr mis metas propuestas en mi vida”.

Agradecimientos

A mi familia, por su constante apoyo, principalmente a mi madre y hermano por ese amor incondicional que me brindan y hacen de mí una mejor persona cada día.

Al Instituto de investigación y desarrollo de la UNSM - T, por brindarme el solvento económico para el desarrollo de mi trabajo de investigación, mediante el concurso de proyectos de tesis, periodo 2020, con resolución N° 017-2020-UNSM-T/FCA/NLU.

Al ing. Henri Delgado Haya por su consejo y asesoramiento en el proceso de ejecución de mi proyecto de tesis.

Al Dr. Carlos Daniel Vecco Giove, por el asesoramiento técnico y el tiempo dedicado a transmitirme algunos de sus conocimientos en el proceso de realización y redacción del trabajo.

Al Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria (INIA) por permitirme realizar la investigación en su prestigiosa organización y obtener toda la ayuda.

Al M.Sc. Jorge Miguel Pérez Vela, por haberme permitido realizar las diversas recolecciones de los explantes en el fundo del Centro de Investigación, Enseñanza y Producción Agroforestal (Cepiagry) - Yurimaguas.

Mis amigos, los técnicos del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del INIA – EEA “El Porvenir San Martín”, en especial a Juliana Rodríguez García, Alexander Altamirano Salazar, la Ing. Mar Asunción Gárate Navarro y a todos los que han contribuido de alguna manera en mi aprendizaje.

A cada uno de ellos, muchas gracias.

Índice general

Ficha de identificación	6
Dedicatoria	7
Agradecimientos.....	8
Índice general.....	9
Índice de tablas	11
Índice de figuras	12
ABSTRACT	16
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	17
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	19
2.1. Antecedentes de la investigación	19
2.2. Fundamentos teóricos.....	22
2.3. Definición de términos básicos.....	25
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. Ámbito y condiciones de la investigación	29
3.1.1. Lugares de estudio.....	29
3.1.2. Periodo de ejecución.....	29
3.1.3. Autorizaciones y permisos	29
3.1.4. Control ambiental y protocolos de bioseguridad.....	29
3.1.5. Aplicación de principios éticos internacionales.....	29
3.2. Sistema de variables	30
3.2.1 Variables principales	30

	10
3.2.2 Variables secundarias.....	30
3.3. Procedimientos de la investigación	30
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES.....	49
RECOMENDACIONES.....	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXOS	57

Índice de tablas

Tabla 1. Ensayos establecidos para el proceso de esterilización superficial de segmentos nodales de palo de rosa (<i>Aniba rosiodora</i> Duke).	34
Tabla 2. Tratamientos en estudio.....	35
Tabla 3. Ensayos aplicados en los tres últimos establecimientos.	36
Tabla 4. Porcentaje de contaminación en segmentos nodales de palo de rosa (<i>Aniba rosiodora</i>) por tipos de protocolo de descontaminación a 90 días después de la instalación en medio de cultivo in vitro	37
Tabla 5. Análisis de varianza para el número de brotes mediante la interacción: Fuente y concentración de citoquininas, evaluados a 90 ddi. Datos transformados $\sqrt{X+1}$	38
Tabla 6. Análisis de varianza para el número de callos mediante la interacción: Fuentes y concentraciones de citoquininas, evaluados a 90 ddi. Datos transformados $\sqrt{X+1}$	42
Tabla 7. Análisis de varianza para la longitud del brote (mm) mediante la interacción: Fuentes y concentraciones de citoquinina, evaluadas a 90 ddi.....	45
Tabla 8. Componentes de estudio	57
Tabla 9. Plan de experimentación.....	58
Tabla 10. Cantidad de citoquinina a aplicar en 100 ml.....	58
Tabla 11. Proceso de preparación de hormona	66

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de la citoquinina 2Ip	26
Figura 2. Estructura química de la citoquinina BAP y Kinetina.....	26
Figura 3. Características en consideración para la identificación y selección de la planta madre. 3. A Cada planta madre fue debidamente rotulada como se muestra en el círculo rojo e indicación de la flecha. 3. B Número de ramas por planta. 3. C Diámetro de tallo	31
Figura 4. Extracción de los explantes. 4. A Segmento nodal de 10 cm de longitud. 4. B Segmento nodal de palo de rosa con las hojas extraídas para evitar la deshidratación. 4. C El círculo rojo muestra el corte transversal en la parte basal del explante. Escala 1 cm.....	31
Figura 5. Método de traslado. 5. A Segmentos nodales de palo de rosa, recolectados. 5. B Explantes envueltos con papel toalla, acondicionados en cooler. Debajo del papel se encuentra el hielo envasado en paquetes plásticos (gel pack)	32
Figura 6. Esterilización superficial de los explantes. 6. A Segmentos lavados con una solución jabonosa. 6. B Segmentos sumergidos en una solución de alcohol etílico por 15 minutos. 6. C Segmentos sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio por 20 minutos	33
Figura 7. Siembra. 7. A División por segmentos.7. B Segmentos de 0,4 cm. 7. C Un segmento por tubo. Escala 1 cm.....	33
Figura 8. Medio de cultivo. 8. A Distribución del medio de cultivo según distribución de tratamientos. 8. B Insumo (Vitrofurax) aplicado en el medio de cultivo. 8. C Balanza analítica muestra la dosis de vitrofurax utilizado en el medio de cultivo (0,0114 gL ⁻¹).	34
Figura 9. Unidad experimental. 9. A El medio de cultivo se dispensó en tubos de 25 mm x 150 mm. 9. B La flecha roja, indica el tubo contenido con 10 ml medio de cultivo M&S.....	35
Figura 10. Ambientes. 10. A Cámara oscura.10. B Segmentos acondicionados en el área de incubación o crecimiento con temperatura y fotoperiodo según su necesidad.	36

- Figura 11. Prueba de Tukey ($p < 0,01$) número de brotes por explante, efecto de fuentes de citocininas, registrado a 90 ddi 39
- Figura 12. Prueba de Tukey ($p < 0,01$) número de brotes por segmento, efecto principal concentraciones de citocininas, resgistrado a 90 ddi 40
- Figura 13. Prueba de Tukey ($p < 0,01$) número de brotes, interacción fuente de citoquinina x concentración de citoquinina (FA x FB), registrado a 90 ddi 40
- Figura 14. Prueba de Tukey ($p < 0,01$) número de callos por segmento, efecto principal fuente de citocininas, registrado a 90 ddi 42
- Figura 15. Prueba de Tukey ($p < 0,01$) número de callos por segmento, efecto principal de concentraciones de citocininas, evaluados a 90 ddi 43
- Figura 16. Prueba de Tukey ($p < 0,01$) número de callos por segmento, interacción fuente de citoquinina por concentración de citoquinina registrado a 90 ddi 44
- Figura 17. Prueba de Tukey ($p < 0,01$) longitud de brotes (mm) para el efecto principal de fuentes de citocininas, registrado a 90 ddi 45
- Figura 18. Prueba de Tukey ($p < 0,01$) longitud del brote (mm), efecto principal de concentraciones de citocininas, evaluados a 90 ddi 46
- Figura 19. Prueba de Tukey ($p < 0,01$) longitud del brote (mm), interacción fuentes de citocininas por concentración de citocininas (FA x FB), registrado a 90 ddi 47
- Figura 20. Cada planta madre se dividió en tres partes iguales desde el estrato inferior hasta el punto más alto, y se designó el estrato inferior, medio y superior 57
- Figura 21. BAP a concentración de $2,32 \mu\text{M}$. 21. A Brote a los 15 días (d.). 21. B Brote a los 30 d. 21. C Brote a los 45 d. Barras corresponden a escala 1 cm 60
- Figura 22. BAP a concentración de $2,32 \mu\text{M}$. 22. A Brotes a los 60 días (d.). 22. B Brote a los 75 d. 22. C Brote a los 90 d. Barras corresponden a escala 1 cm 60
- Figura 23. 2 isopentil adenina (2Ip) a concentración de $23,32 \mu\text{M}$. 23. A Brote a los 15 días (d.). 23. B Brote e a los 30 d. 23.C Brote a los 45 d. Barras corresponden a escala 1 cm 61
- Figura 24. 2 isopentil adenina (2Ip) a concentración de $23,32 \mu\text{M}$. 24. A Brote a los 60 días (d.). 24. B rote a los 75 d. 24. C La figura rombo de color rojo muestra

- la etapa inicial de la formación de callo y círculo color rojo muestras un brote a los 90 d. Barras corresponden a escala 1 cm 61
- Figura 25. Kinetina (KIN) a concentración de 23,32 μ M. 25. A Brote a los 15 días (d.). 25. B Brote a los 30 d. 25. C Brote a los 45 d. Barras corresponden a escala 1 cm 62
- Figura 26. Kinetina (KIN) a concentración de 23,32 μ M. 26. A Brote a los 60 días (d.). 26. B Brote a los 75 d. 26. C Brote a los 90 d. Barras corresponden a escala 1 cm 62
- Figura 27. 2 isopentil adenina (2Ip) a concentración de 2,32 μ M. 27. A Brote a los 60 días (d.). 27. B La figura rombo de color rojo te muestras la formación de un brote a los 90 d. y el círculo de color rojo muestras formación de un callo a los 90 d. Barras corresponden a escala 1 cm 63
- Figura 28. Segmentos contaminados. 28. A Segmento contaminado a 15 días (d.). 28. B Segmento contaminado por hongo y bacteria a los 30 d. 28. C Segmento contaminado por hongo y bacteria a los 30 d. Barras corresponden a escala 1 cm 63
- Figura 29. Brotes contaminados. 29. A Brote afectado con hongo a 75 días (d.). 29. B brote afecto por hongo a 45 d. 29. C Segmento afectado por hongo a los 90 d. Barras corresponden a escala 1 cm 64
- Figura 30. Estereoscopio. Permitió obtener imágenes con escala de un 1cm. Como se muestra en el panel fotografico 64
- Figura 31. Muerte del brote. 31. A El círculo rojo muestra la ausencia de raíz en el segmento a 90 días (d.). 31. B Los círculos rojos indican la presencia de necrosis en la parte basal del explante a 90 d. 31. C El círculo rojo muestra la presencia de necrosis en las estructuras del segmento a los 90 d. 31.D Brote aún vivo. Barras corresponden a escala 1 cm..... 64
- Figura 32. Mapa de ubicación. El mapa de ubicación referencia la ubicación del origen del material vegetativo..... 65

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se ejecuto en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ubicado en el distrito de Juan Guerra, región San Martín. El objetivo consistió en evaluar el efecto inductivo de tres fuentes y concentraciones de citoquininas sobre el brotamiento de segmentos nodales de palo de rosa (*Aniba rosiodora*) *in vitro*. Se empleó segmentos vegetativos y un medio de cultivo M&S suplementado con: T₁ (KIN - 0,45 µM); T₂ (KIN - 2,32 µM); T₃ (KIN - 23,23 µM); T₄ (BAP- 0,45 µM); T₅ (BAP - 2,32 µM); T₆ (BAP - 23,23 µM); T₇ (2Ip - 0,45 µM); T₈ (2Ip - 2,32 µM); T₉ (2Ip - 23,23 µM). Se distribuyeron en diseños totalmente aleatorizados con arreglo factorial 3A (Fuentes) x 3B (Concentraciones) y un tratamiento control. Se obtuvieron 10 tratamientos y 8 repeticiones. Para reducir la incidencia de microorganismos patógenos en el medio de cultivo, se realizaron aplicaciones preventivas en campo con una solución fúngica a razón de 1 gL⁻¹, 30 días antes de cada extracción, sumado a la adición de vitrofural a nivel del medio de cultivo; los segmentos se esterilizaron con una solución de NaClO al 2 % + tween 80 durante 20 minutos. Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de varianza y la prueba de rango múltiple Tukey (p <0,01). Se determinó que realizando aplicaciones preventivas en campo 30 días antes de la instalación *in vitro* logramos tener una supervivencia mayor al 88 %. Asimismo, el T₅ (BAP- 2,32 µM) y T₆ (BAP-23,23 µM) lograron un mayor número de brotes y promediós altos con respecto a la longitud del brote, logrando una logitud de (8,41 mm y 6,13 mm) respectivamente. Finalmente se identificó que los T₉ (2Ip - 23,23 µM) y T₈ (2Ip - 2,32) optuvieron mejor promedio en la formación de callo con 1,2 callos. Se concluye, que la fuente de citoquinina BAP induce una mayor activación de brotes en la especie forestal palo de rosa a nivel *in vitro*.

Palabras clave: *Aniba rosiodora*, regeneración *in vitro*, reguladores del crecimiento, establecimiento *in vitro*, citoquininas, vitrofural.

ABSTRACT

The present research work was carried out at the Biotechnology Laboratory of the National Institute for Agrarian Innovation (**INIA**), located in the district of Juan Guerra, in the San Martín region. The objective was to evaluate the inductive effect of three sources and concentrations of cytokinins on the sprouting of Brazilian rosewood (*Aniba rosiodora*) nodal segments under in vitro conditions. Vegetative segments and M&S culture medium supplemented with: T1 (KIN - 0.45 μ M); T2 (KIN - 2.32 μ M); T3 (KIN - 23.23 μ M); T4 (BAP- 0.45 μ M); T5 (BAP - 2.32 μ M); T6 (BAP - 23.23 μ M); T7 (2Ip - 0.45 μ M); T8 (2Ip - 2.32 μ M); T9 (2Ip - 23.23 μ M) were used. They were distributed in totally randomized designs with a 3A (Sources) x 3B (Concentrations) factorial arrangement and a control treatment. Ten treatments and eight replicates were obtained. In order to reduce the incidence of pathogenic microorganisms in the culture medium, preventive applications were made in the field with a fungal solution at a rate of 1 gL⁻¹, 30 days before each extraction, together with the addition of Vitrofurax at the culture medium level; the segments were sterilized with a solution of 2% NaClO + tween 80 for 20 minutes. The data obtained were submitted to analysis of variance and the Tukey multiple range test ($p < 0.01$). It was determined that by applying preventive applications in the field 30 days before in vitro installation, a survival rate of more than 88 % was reached. Likewise, T5 (BAP- 2.32 μ M) and T6 (BAP-23.23 μ M) reached a higher number of shoots and high averages with respect to shoot length, obtaining a shoot length of (8.41 mm and 6.13 mm) respectively. Finally, it was identified that T9 (2Ip - 23.23 μ M) and T8 (2Ip - 2.32) obtained better average in callus formation with 1.2 callus. It is concluded, that the BAP cytokinin source induces greater shoot activation in Brazilian rosewood timber species at the in vitro level.

Keywords: *Aniba rosiodora*, in vitro regeneration, growth regulators, in vitro establishment, cytokinins, Vitrofurax.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Aniba rosiodora Ducke, es una especie maderable de notable valor económico debido a su aceite que contiene una sustancia de fijación aromática conocida como linalool, utilizada en la fabricación de perfumes, fragancias y jabones. La madera de palo de rosa es una de las más bellas y finas de América del sur por sus reconocidas cualidades físicas y mecánicas (Kometter, 2019), la cual ha conllevado a su sobreexplotación y clasificándose entre las especies En peligro (EN) según la IUCN (2019); lo cual se agrava por el hecho de la difícil obtención de semillas viables para su propagación (Cárdenas y Salinas, 2006).

En este sentido, el palo de rosa comparte una problemática común al de muchas especies forestales valiosas difíciles de propagar por la baja producción y viabilidad de sus semillas, lentitud en el crecimiento y retardo de la floración. Carranza *et al.* (2013) indican que, dentro de esas categorías generalmente encontramos a especies leñosas tales como, *Manilkara bidentata*, *Cedrelinga cateniformis*, *Swietenia macrophylla*, *Cedrela odorata* y *Myroxylon balsamum*. Estas características se combinan, con una alta depredación por insectos y aves, ocasionando que la recolección de semillas sea una operación difícil y costosa; las mismas que dificultan la regeneración de una nueva planta (Kometter, 2019).

Dado la importancia y la situación actual de esta especie es necesario buscar nuevas técnicas de propagación, encaminadas a multiplicar y recuperar el estado de las poblaciones en plantaciones comerciales.

Dado que la disposición de semillas utilizables implica una cantidad limitada para la micropropagación, la generación masiva de plántulas puede verse limitada en rendimiento por la disponibilidad o acceso insuficiente de la misma, tanto como por la contaminación o susceptibilidad sanitaria de la semilla. Estos aspectos constituyen limitaciones prácticas de la técnica de micropropagación a partir de semillas.

La propagación clonal permitiría obtener individuos con genotipos élitos. Aunque existen algunos trabajos publicados, los resultados no han sido concluyentes y se requieren desarrollar nuevas vías en las técnicas de micropropagación clonal a partir de explantes vegetativos.

La presente investigación consideró como hipótesis, efecto inductivo de tres fuentes y concentraciones de citoquininas sobre el brotamiento de segmentos nodales de palo de rosa (*Aniba rosiodora* Ducke) en condiciones *in vitro*.

Para ello, el objetivo principal fue evaluar *in vitro*, el efecto inductivo de tres fuentes y concentraciones de citoquininas sobre el brotamiento de segmentos nodales de palo de rosa (*Aniba rosiodora* Ducke); para lo cual se han fijado los siguientes objetivos específicos:

- a) Validar un protocolo para controlar la contaminación de segmentos nodales de palo de rosa (*Aniba rosiodora* Ducke) provenientes de campo.
- b) Evaluar *in vitro* el efecto de tres fuentes y concentraciones de citoquinina sobre el desarrollo de brotes múltiples de segmentos nodales de palo de rosa (*Aniba rosiodora* Ducke).

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Existe pocas investigaciones donden reporten acerca de la producción *in vitro* de palo de rosa (*Aniba rosiodora* Duke), por lo que se consideran los siguientes antecedentes que tienen alguna similitud con el presente proyecto de investigación.

Amasifuén (2019) en la Universidad Nacional de San Martín (Tarapoto), sometió un medio de inducción *in vitro* en sachá inchi, para producción de callos, raíces y brotes a partir de diferentes fuentes y concentraciones de fitohormonas (6-bencilaminopurina - BAP, kinetina, 2-Isopentenil-adenina y Trans zeatina. Demostró que la concentración de citoquinina (6-bencilaminopurina) (0,45 μM) en el medio de cultivo, Aumento de la tasa de reproducción *in vitro* de los brotes de *Plukenetia volubilis* (4,87 brotes/ explante) en 42 días. Asimismo, las concentraciones de (6-bencilaminopurina) (23,23 μM) fue más efectiva para aumentar la producción de callos y raíces. Finalmente, al utilizar (2-Isopentenil-adenina) (0,45 μM) se observó la formación de raíces.

Martínez *et al.* (2018) en la Universidad de Ciego de Ávila (Cuba), encontraron valores significativamente superiores en el control de contaminación en todas las fases de la micropropagación de caña azúcar (var. C 1051-73), utilizando Vitrofurax (0,114 g/L^{-1}) a nivel del medio de cultivo. Asimismo, observaron que no existía fitotoxicidad en los brotes causados por el Vitrofurax.

Tarazona (2017) en la universidad Nacional de Ucayali (Pucallpa), se inocularon segmentos nodulares de *Cedrelinga catenaeformis* en medio de cultivo M&S añadido con diferentes concentraciones de BAP y ácido indolbutírico, indicando que ninguna de las combinaciones utilizadas en el presente trabajo de investigación permitió evidenciar diferenciación meristemática con respecto a activación de brotes, formación de callos y raíces. De igual forma, señala que los resultados probablemente estuvieron influenciados por la pérdida progresiva de los explantes en un 100% a causa de la fenolización y ataque de agentes patógenos.

Solis (2016) en la Universidad Nacional Agraria La Molina en Lima, mencionó que la mejor esterilización para yemas apicales en sachá inchi, se realiza con alcohol etílico (70 %) por 60 segundos y NaOCl 1 % durante 10 minutos.

De manera similar, demostró que 0,1 mg/L de BAP y 0,05 mg/L de ANA proporcionan un mejor resultado en la diferenciación meristemática durante la morfogénesis.

Cordova (2016) en la Universidad Nacional de Ucayali (Pucallpa), utilizó diferentes concentraciones de ácido – 3 indolbutírico para obtener líneas de *Simarouba amara* a través de explantes nodulares. Demostrando que las fracciones de nódulos establecidos en un medio de cultivo suplementado con (1000 µg/ml) de ácido – 3 indolbutírico fueron más efectivas en brotes (11,81 %), formación de callos (9,028 %) y raíces (2,25 %). También, señaló que, por la baja capacidad de enraizamiento, permitió clasificar a esta especie como resistente al cultivo *in vitro*.

Alverca (2015) concluyó que utilizar vitrofural 0,114 g/L⁻¹ en el medio de cultivo, se logra tener un buen control de contaminación en un 100 % para la multiplicación *in vitro* *Ananas comosus* L., utilizando biorreactores.

Reyes (2015) de la Universidad Estatal Amazónica (Ecuador), determinó que la concentración de 15g/L de Ca (ClO)₂ en inmersión por 20 minutos fue más eficaz para reducir la contaminación por patógenos en segmentos nodales de *Swietenia macrophy* bajo condiciones de laboratorio, logró un 95 % de supervivencia. Asimismo, el mencionado autor indica que un medio de cultivo con la combinación de (2mg/L) BAP y (1mg/L) AIB, fue más efectiva para disparar la activación de brotes en un 70%, de la misma manera la combinación de (2mg/L) BAP y (1mg/L) ANA muestra una tasa de supervivencia del 65 %. Sin embargo, ninguna de las combinaciones utilizadas resultó ser efectiva para la formación de raíces en 21 días después del establecimiento.

Delgado y Hoyos (2014) en la Universidad Nacional de Colombia (Medellín), utilizaron diferentes concentraciones de fitohormonas (6 - bencilaminopurina - BAP, kinetina - KIN, ácido indol acético - AIA, 1- ácido naftaleno - ANA y ácido giberélico - AG3) para inducir la formación de los brotes de *Aniba perutilis*. Para el enraizamiento emplearon ANA y ácido indol-3-butírico (AIB) en diferentes concentraciones.

Asimismo, observaron que la combinación de 3 mg/L de BAP y 1 mg/L de AG3 incrementó el promedio de brotes 1,2 y el tratamiento suplementado con 3 mg/L de BAP y 1,5 mg/L de AG3 generó un promedio de 0,6 brotes/explante con una longitud promedio de 0,82 cm. Sin embargo, su baja capacidad de enraizamiento les permitió catalogar a esta especie como resistente al cultivo *in vitro*.

Beltrán y Mesa (2014) en la Universidad del Tolima (Ibagué, Colombia), concluyeron que una concentración de 0,2 % de dicloruro de mercurio (HgCl_2) en inmersión por 20 minutos fue más efectiva para disminuir la presencia de hongos y bacterias endógenas en yemas apicales y segmentos nodales de *Aniba perutilis* bajo condiciones de laboratorio. Para el traslado de material recolectado vegetativo, desde el campo al laboratorio, utilizaron una solución antifúngica de benomil (300 mg i.a./ 0,5 l).

Huamán (2014) desarrolló un método de micropropagación en genotipos individuales de *Cedrela odorata* con explantes obtenidos de semillas germinadas *in vitro*. Usó medio de cultivo MS al 50% complementado con diferentes concentraciones de BAP (2,21; 4,43; 6,65 y 8,87 μM). También, indica que la concentración de BAP (2,21 μM) domina para estimular el desarrollo de brotes laterales, la raíz y aumentar el número de hojas.

Carranza *et al.* (2013) en la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (Ecuador), inocularon diferentes segmentos nodales de *Manilkara bidentata*, *Cedrelinga cateniformis*, *Swietenia macrophylla*, *Cedrela odorata* y *Myroxylon balsamum*, en un medio de cultivo suplementado con diferentes reguladores de crecimiento. Demostrando que no todas las auxinas naturales o sintéticas pueden inducir primordios radicales en la micropropagación. Asimismo, estos autores señalan que las especies leñosas presentan dificultad en la formación de raíces adventicias en la base del esqueje.

Jardím *et al.* (2010) en la Universidad del Estado de Amazonas en Brasil, presentó un medio de inducción para la micropropagación de brotes, callos y raíces de pau rosa a partir de brotes apicales y segmentos nodales de plantas jóvenes propagadas en vivero. Determinaron que el medio de cultivo MS contenido de 4 mg/L^{-1} de la fuente citoquinina BAP, es el medio óptimo para la producción y formación de callos, permitiendo obtener (1,67 callos/ muestra).

Silva *et al.* (2010) en la Universidad del Estado de Amazonas en Brasil, sometieron un medio de inducción para la producción de callos, raíces y brotes a partir de brotes apicales y segmentos nodales de *Aniba rosiodora* Ducke. Demostraron que una mayor concentración de citocinina (6-bencilaminopurina) (4 mg/L) y 2, 4-D (6 mg/L) en el medio de cultivo incrementó la producción de brotes (2,13 unidades/ explante). Asimismo, la combinación de auxinas (Ácido 1-naftalenacético) (3 mg/L), fue más efectiva para aumentar la producción de raíces (2,53 unidades/ vástago). Para el proceso de esterilización de los explantes, utilizaron una solución antifúngica de benomil (4 g/L) durante 24 horas y 2 % de hipoclorito de sodio + tween 20 durante 20 minutos.

Materán *et al.* (2008) reportan que el éxito de los sistemas de fitomejoramiento asistido por biotecnología depende en gran medida del control y la prevención de la contaminación microbiana. Además, muestran que es más costoso controlar la contaminación de las especies vegetales, principalmente porque la contaminación endógena ocurre en los explantes cuando se toman directamente del campo, generalmente en ejemplares maduros, fuertemente influenciados por factores desfavorables de su hábitat natural.

En cada etapa de desarrollo, el medio de cultivo con 0,1 mg/L de BAP y 0,25 mg/L de ANA fue más efectivo para promover el desarrollo de plántulas de mayor longitud (18 mm), mas yemas (2,25), y mayor número de protuberancias (2,35).

Handa *et al.* (2005) en Manaus (Brasil), produjeron embriones libres de contaminación y oxidación fenólica, a partir de la regeneración de plantas madre cultivadas en el vivero. En un medio de Murashige y Skoog (1962) con la adición de sacarosa al 5 % lograron una supervivencia del 71 % y germinación del 53% de los explantes. Para reducir la incidencia de patógenos en el material vegetativo, realizaron aplicaciones preventivas con fungicida benlate (3 g/L) 180 días antes de la instalación.

Asimismo, reportan que el uso de agrimucina a una concentración de 300 mg/L en el proceso de esterilización del material vegetativo, se obtiene un 33 % de contaminación por hongo y 29 % por bacterias, con 48 % de supervivencia.

Merkle y Naim (2005) enfatizan los problemas de enraizamiento como uno de los elementos limitantes en la propagación de especies forestales *in vitro*; de igual forma, la baja proliferación de brotes, la sobreproducción de fenol, formación de callos en la base, la necrosis apical, y el retraso en el crecimiento de los brotes son fenómenos muy comunes en la micropropagación, dichos proceso están directamente relacionados con el estado fisiológicos de la especie.

2.2. Fundamentos teóricos

2.2.1. Generalidades del palo de rosa

- Nombres comunes

Amapola, maculís, palo de rosa, rosa morada, roble blanco, rosa morada, maculishuate, palo blanco, nocoque, palo yugo (Hassler, 2020).

- **Taxonomía** (Hassler, 2020)

Reino: Plantae.

Filo: Tracheophyta.

Clase: Magnoliopsida.

Orden: Laurales.

Familia: Lauraceae.

Género: *Aniba* de Varty, 1998.

Especie: *Aniba rosiodora* Ducke.

- **Distribución geográfica**

Colombia (Amazonas), Brasil (Amapa, Para, Amazonas), Venezuela (Amazonas, Trujillo), Perú (Amazonas y Iquitos), Guyana, Surinam, Francia y Ecuador (Hassler, 2020).

- **Descripción morfológica**

El palo de rosa es una planta arborea que puede crecer 30 m de alto y 200 cm de diámetro. Los tallos son rectos, ramificados en el ápice, formando pequeño cáliz; tiene una corteza de color marrón amarillento o marrón, que se desprende en grandes placas. Con hojas lanceoladas, alternas de 6 - 25 cm. de longitud y 2,5 a 10 cm. de ancho (Cortegano, 2006).

- Las flores ligeramente amarillas, hermafroditas dispuestas en panículas subterminales del ápice. El fruto es tipo baya, púrpura oscura; elíptica o casi esférica, de 2 a 3 cm de longitud y 1,5 a 2 cm de diámetro.
- Las semillas son delgadas y aladas; blanquecinas, de 2 a 3 cm de largo membrana vítrea, claramente separadas de los espermatozoides (Cortegano, 2006).

2.2.2. Requerimientos edafo - climáticos del palo de rosa

- La altitud favorable para el desarrollo de la planta varía entre los 2 400 y 2 600 m (Beltrán y Mesa, 2014).
- El rango óptimo de humedad relativa para el desarrollo de la planta está entre 88 y 91 % (Rojas, 2015).

- Las temperaturas favorables para el desarrollo del palo de rosa son 30 °C (máxima), 26 °C (media) y 22 °C (mínima).
- La precipitación promedio anual registrada en zonas de origen es 3 050 mm (Cortegano, 2006).

2.2.3. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

Capacidad única de las células vegetales de regenerar una planta completa, utilizado (hoja, tallo, partes florales) en un medio artificial y condiciones asépticas (Sultana y Gangopadhyay, 2018).

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es el cultivo de tejidos, semillas y órganos en un medio nutritivo en condiciones estériles. *In vitro* significa “dentro del vaso”, por lo que se cultiva en recipientes de vidrio en condiciones ambientales controladas. Este concepto es ahora muy versátil, porque en muchos casos el vidrio ha sido reemplazado por otros materiales igualmente efectivos. Por ejemplo, plástico y polipropileno, entre otros (Cruzat, 2009).

2.2.4. Etapas de la regeneración *in vitro*

Levitus *et al.* (2010) señalan que la regeneración *in vitro* implica cuatro pasos críticos 1) establecimiento del cultivo, 2) crecimiento y reproducción de brotes o embriones, 3) formación de raíces y 4) Periodo *ex vitro*. En general, los pasos de enraizamiento y aclimatación se pueden combinar en condiciones *ex vitro*.

Etapa 1: Acondicionamiento de las estructuras vegetativas

La selección y preparación adecuada del inóculo (partes de la planta, ya sean órganos y tejidos, afecta directamente la calidad y la reactividad frente a los problemas causados por microorganismos y oxidación del explante, factores que afectan la formación y desarrollo del cultivo (Levitus *et al.*, 2010).

Etapa 2: Acondicionamiento del medio

El acondicionamiento del ensayo, es definido como una metodología heterogénea, cuya característica común es que los cultivos se cultivan asépticamente en medios artificiales de composición química definida y se incuban en condiciones ambientales específicas. La calidad del explante a utilizar es un factor decisivo para el éxito. (Levitus *et al.*, 2010).

Etapa 3: Pululación

La finalidad de este periodo, es preservar y multiplicar el número de embriones para nuevos períodos reproductivos y la posibilidad de transferir algunos de ellos a la siguiente fase de producción, enraizamiento, etc. (Levitus *et al.*, 2010).

Etapa 4: Formación de raíz y periodo ex vitro

En este periodo, se forman raíces adventicias. Esto es relativamente fácil para especies herbáceas, pero es más difícil para muchas plantas debido a su limitada capacidad de enraizamiento.

2.3. Definición de términos básicos

- **Callos.** Es una masa de tejido indiferenciado que se encuentra en estado de división permanente, sus células se consideran totipotentes, ya que pueden dar origen a la planta adulta completa (Ochoa *et al.*, 2015).
- **Citoquininas.** Es el nombre colectivo de muchas sustancias, naturales o sintéticas, que tienen la capacidad de fomentar la división celular.

Mismos autores mencionaron que las citocininas se utilizan para estimular el crecimiento de brotes adventicias a partir de la embriogénesis somática (Azcón – Bieto y Talón, 2013).

- **Clasificación de las citocininas naturales.** Según su naturaleza química, se dividen en dos grandes grupos (isoprenicas y aromáticas) (Azcón – Bieto y Talón, 2013).
- **Citoquininas isoprenicas:** Constituida por el el grupo de las isopenteniladenina (iP), la zeatina (Z) (Figura 1) y la dihidrozeatina (DZ).

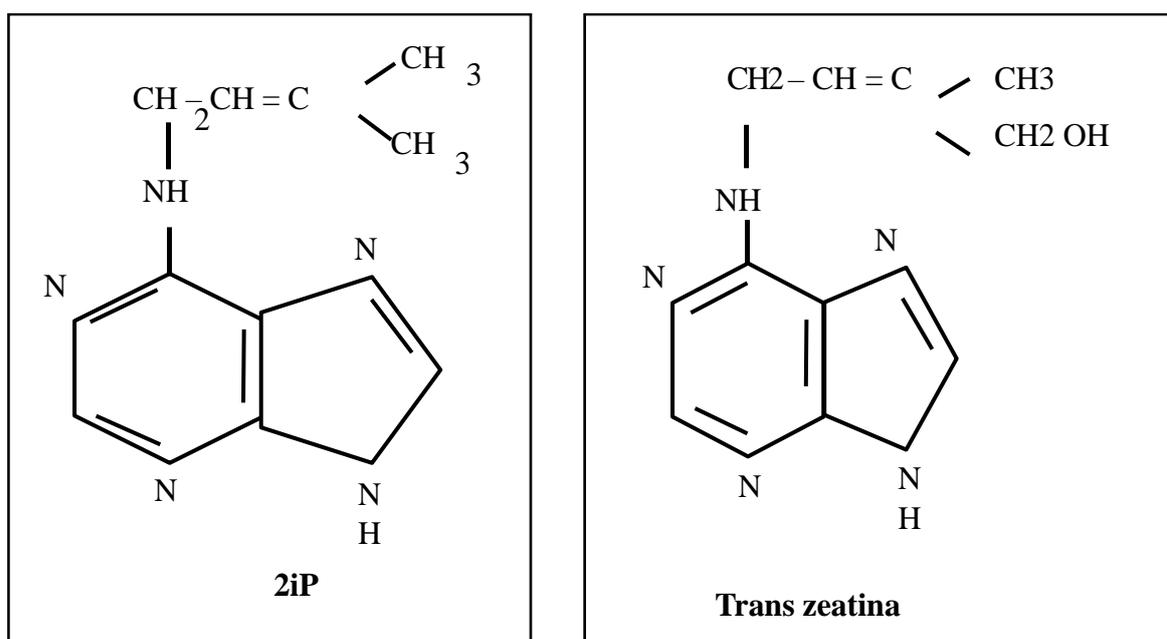


Figura 1. Estructura química de la citoquinina 2iP y Trans zeatina.

- **Citocininas aromáticas.** Agrupa a las familias de la benciladenina (BA) y orto-hidroxibenciladenina. Las cadenas laterales de estas citosinas están formadas por 7 átomos de carbonos con estructura de grupo metilbenceno (Figura 2) (Azcón – Bieto y Talón, 2013).

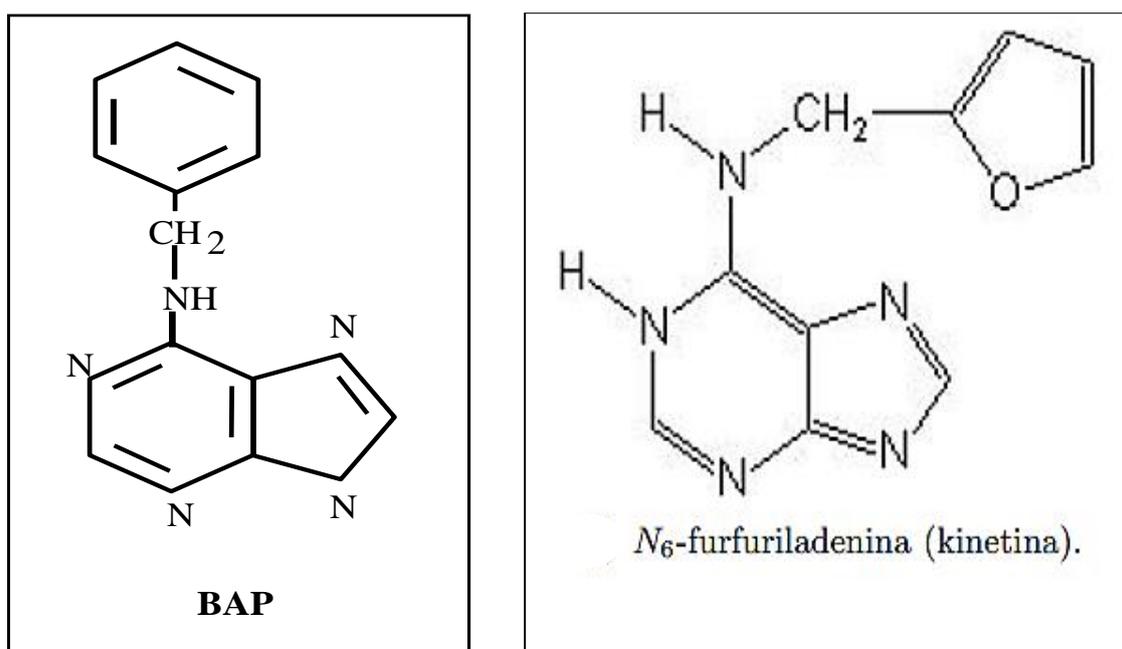


Figura 2. Estructura química de la citoquinina BAP y Kinetina.

- **Efectos fisiológicos de las citoquininas.** Entre los efectos fisiológicos de las citoquininas encontramos la división celular, la multiplicación de brotes laterales (rotura de predominio apical), la organogénesis y la floración (Azcón - Bieto y Talón, 2013).
- **Embrión.** Base de la planta donde aparecen las raíces, tallos y las hojas, junto con su material de conservación (Acosta - Peña y Castro, 2011).
- **Ex vitro.** Situación de las vitroplantas al término de la etapa *in vitro* y su salida a la atmósfera o aclimatación (Ieva, 2011).
- **Factores que participan en la regeneración de plántulas *in vitro*.** Dentro de estos factores se incluye la correcta selección de los explantes, composición de los medios de crecimiento, fitoreguladores y condiciones del cultivo, tales como temperatura, pH, luz y humedad (Smith, 2012).

El medio se compone principalmente de minerales y vitaminas esenciales para el crecimiento y desarrollo de un nuevo individuo, así como fuente de carbono o lo que la planta necesite para crecer, todo ello en condiciones estériles (Cardoza, 2005).

- **Elementos esenciales.** Se clasifican en las siguientes categorías:
 - Macroelementos o macronutrientes.
 - Microelementos ou micronutrientes.
- ***In vitro*.** Técnica que permite cultivar órganos vegetativos en medios nutritivos y condiciones asepticas. *In vitro* significa "sembrado en vidrio", es decir, los cultivos se realizan en recipientes de vidrio en condiciones ambientales controladas (Cruzat, 2009).
- **Medio de cultivo.** Unión de nutrientes que, en dosis adecuada y en condiciones físicas óptimas, permiten el desarrollo de un nuevo individuo (Jardím *et al.*, 2010).
- **Micropropagación.** Técnica universal de clonación masiva, puesto que permite cultivar (tejidos, órganos, semillas, embriones u otros), produciendo plantas genéticamente homogéneas (Jaiswal - Verma y Misra, 2017).
- **Plántulas.** Embrión que está en principio de su desarrollo como consecuencia de la germinación; generalmente se aplica a aquellas que se trasplantan (Acosta - Peña y Castro, 2011).

- **Reguladores de crecimiento.** Definido como un grupo global de sustancias orgánicas, ya sean naturales o sintéticas capaces de influir en los procesos de desarrollo fisiológico de las plantas ($< 1 \mu\text{M}$ frecuentemente $< 1 \mu\text{M}$).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. **Ámbito y condiciones de la investigación**

3.1.1. **Lugares de estudio**

a) **Plantación de origen del material vegetativo**

- Departamento: Loreto.
- Provincia: Alto Amazonas.
- Distrito: Yurimaguas.
- Sector: Vía de evitamiento.
- Predio: Fundo Cepiagry.
- Coordenada referencial: 18M 374 509 m E; 9 346 910 m S.
- Altitud: 146 m.
- Características de la plantación: parcela de 450 m², con plantas de palo de rosa (*Aniba rosiodora*) de seis años (1,5 m de altura), con marco de plantación de 3 m x 3 m.

b) **Laboratorio donde se realizó el experimento**

- Departamento: San Martín.
- Provincia: San Martín.
- Distrito: Juan Guerra.
- Laboratorio: Biotecnología Vegetal de la EEA “El Porvenir”, INIA – San Martín.
- Coordenada referencial: 18M 9 272 220 m E; 352 087 m S.

3.1.2. **Periodo de ejecución**

El presente trabajo de investigación se ejecutò entre agosto de 2020 a febrero de 2022.

3.1.3. **Autorizaciones y permisos**

Registro de plantación: PRMRFFS – YGS; Resolución: N° 001 – 2015. El titular de la parcela autorizó y acompañó los procedimientos.

3.1.4. **Control ambiental y protocolos de bioseguridad**

La presente investigación no generó impactos negativos al medio ambiente.

3.1.5. **Aplicación de principios éticos internacionales**

La presente investigación respetó los principios éticos generales de la investigación, entre los que cabe destacar: integridad, respeto a las personas, al ecosistema y justicia.

3.2. Sistema de variables

3.2.1 . Variables principales

a) Variables independientes

- Fuentes y concentraciones de citoquininas.
- Explante (segmento nodal) de *Aniba rosiodora* Ducke.

b) Variables dependientes

- Porcentaje de contaminación.
- Número de brotes por segmento
- Altura de brotes.
- Formación de callos.

3.2.2 . Variables secundarias

- Contaminación no controlada del explante.
- Condiciones hormonales y fisiológicas del explante inicial.
- Tiempo de transporte del explante desde las zonas de origen.

3.3. Procedimientos de la investigación

3.3.1. Validar un protocolo de control de contaminación en segmentos nodales de palo de rosa (*Aniba rosiodora* Ducke) provenientes de campo

Esta fase implicó el gradual ajuste de los procedimientos de prevención de la contaminación de segmentos nodales de palo de rosa, según lo indicado en la Tabla 1.

a) Extracción y transporte de segmentos nodales de palo de rosa

Se realizó la recolección de segmentos nodales de palo de rosa de ocho plantas (1,5 m de altura de aproximadamente 6 años) establecidas en la parcela experimental, ubicada en Alto Amazonas, Yurimaguas (Figura 3).

Actividad fue realizada en horas de la mañana (6:00 - 7:00). Con la ayuda de un bisturí Nº21 previamente esterilizado con alcohol de 96°, se extrajeron segmentos de aproximadamente 10 cm de largo y 0,8 mm de ancho, con un corte transversal en la parte basal del explante, sin las hojas para evitar su deshidratación (Figura 3).

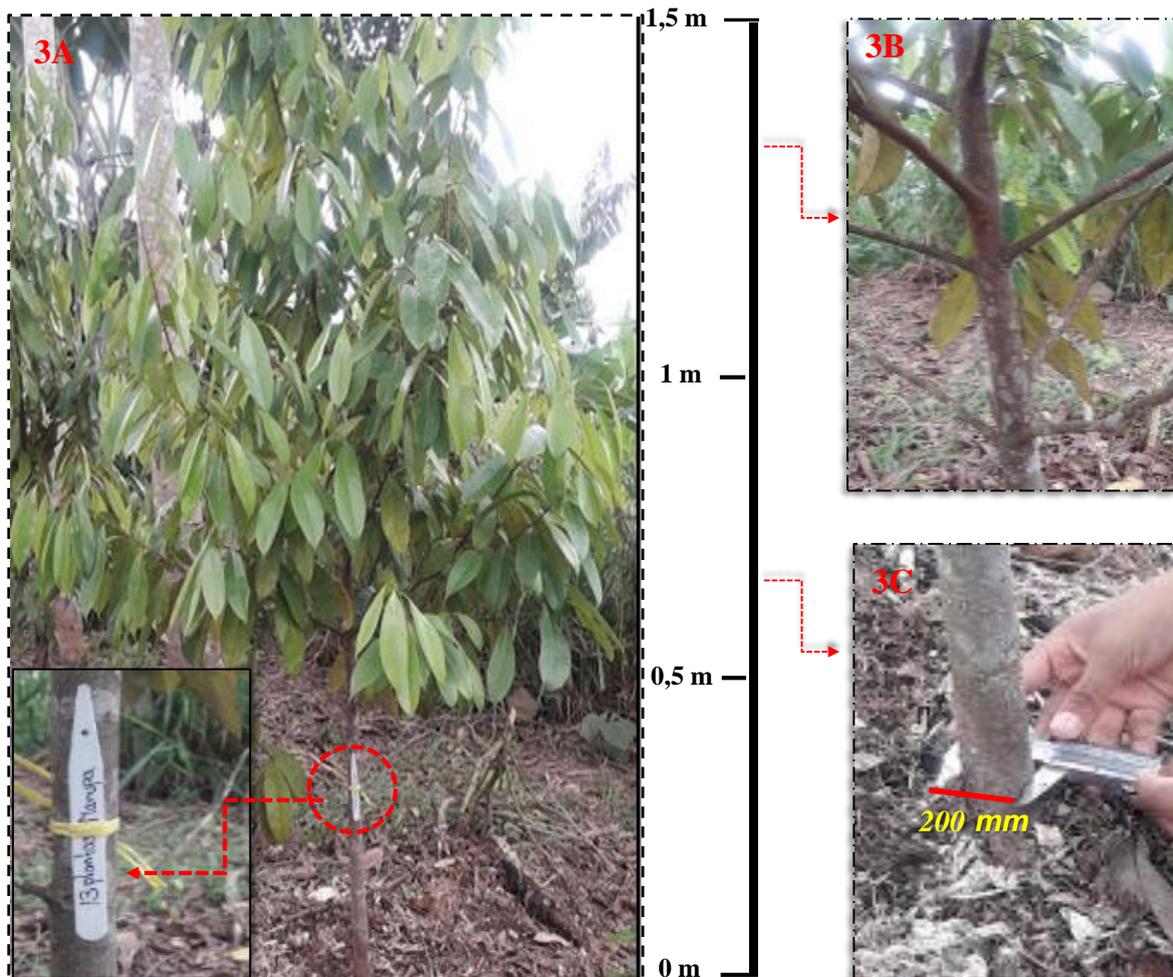


Figura 3. Características en consideración para la identificación y selección de la planta madre.
3. A Cada planta madre fue debidamente rotulada como se muestra en el círculo rojo e indicación de la flecha. **3. B** Número de ramas por planta. **3. C** Diámetro de tallo.

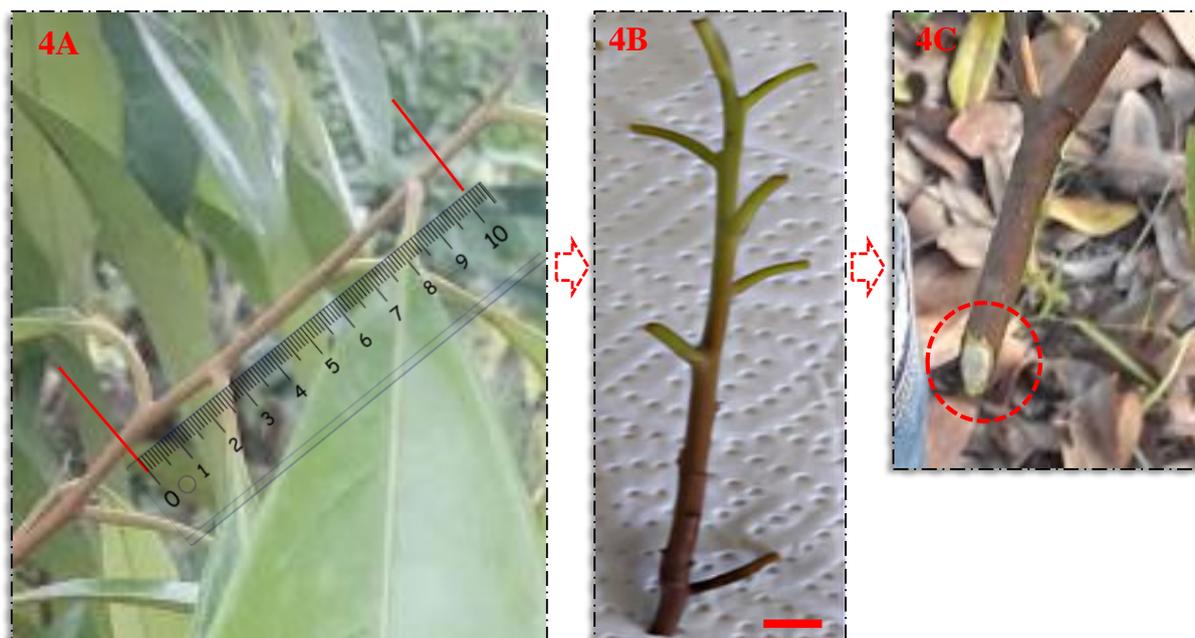


Figura 4. Extracción de los explantes. **4. A** Segmento nodal de 10 cm de longitud. **4. B** Segmento nodal de palo de rosa con las hojas extraídas para evitar la deshidratación. **4. C** El círculo rojo muestra el corte transversal en la parte basal del explante. Escala 1 cm.

Para el traslado al laboratorio (ubicado en la localidad de Juan Guerra, ≈ 142.3 km), los segmentos fueron tratados con una solución de ácido ascórbico (10 mg/L) para controlar la oxidación en la superficie cortada. Los segmentos se envolvieron en papel toalla humedecido con solución fungicida (500 g/kg tebuconazole + 250 g/kg azoxystrobin, a razón de 1 g/L). El conjunto de la muestra fue acondicionado en un *cooler* con hielo (*gel pack*).



Figura 5. Método de traslado. 5. A Segmentos nodales de palo de rosa, recolectados. **5. B** Explantes envueltos con papel toalla, acondicionados en cooler. Debajo del papel se encuentra el hielo envasado en paquetes plásticos (*gel pack*).

b) Aplicaciones preventivas de productos fungicidas en campo

En una fase avanzada de la experimentación se realizaron aplicaciones preventivas en la plantación de palo de rosa, con una solución fungicida (tebuconazole 500 g/kg + azoxystrobin 250 g/kg) a razón de 1 g/L⁻¹, 30 días antes de cada extracción de explantes (T_c).

c) Acondicionamiento *in vitro* de segmentos nodulares

En el laboratorio de INIA (Juan Guerra), los segmentos nodales provenientes de campo fueron lavados con solución jabonosa y enjuagados dos veces con agua estéril. Luego, estos se sumergieron en una solución de etanol al 70 % por 15 minutos y seguidamente de una solución de hipoclorito de sodio al 1,5 % + Tween 80 (2 gotas/100 ml) durante otros 15 minutos (T₁).

Finalmente, los explantes fueron enjuagados repetidamente (cuatro veces) con agua destilada estéril. Todo el procedimiento se llevó a cabo en una cámara de flujo laminar.



Figura 6. Esterilización superficial de los explantes. 6. A Segmentos lavados con una solución jabonosa. 6. B Segmentos sumergidos en una solución de alcohol etílico por 15 minutos. 6. C Segmentos sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio por 20 minutos.

En la cámara de flujo, los explantes fueron divididos por segmentos nodales únicos con un margen superior e inferior de 0,4 cm. Cada segmento nodal fue acondicionado en un tubo de ensayo (25 mm x 150 mm) con 10 ml de medio sólido M&S constituido por tiamina 0,4 mg/L⁻¹, ácido nicotínico 0,5 mg/L⁻¹, ácido ascórbico 10 mg/L⁻¹, sacarosa 20 g/L⁻¹, líquido de coco 20 % y agar 7 g/L⁻¹ (Murashige y Skoog, 1962). El pH del medio fue ajustado a 5,8 con una solución de hidróxido de potasio (KOH).

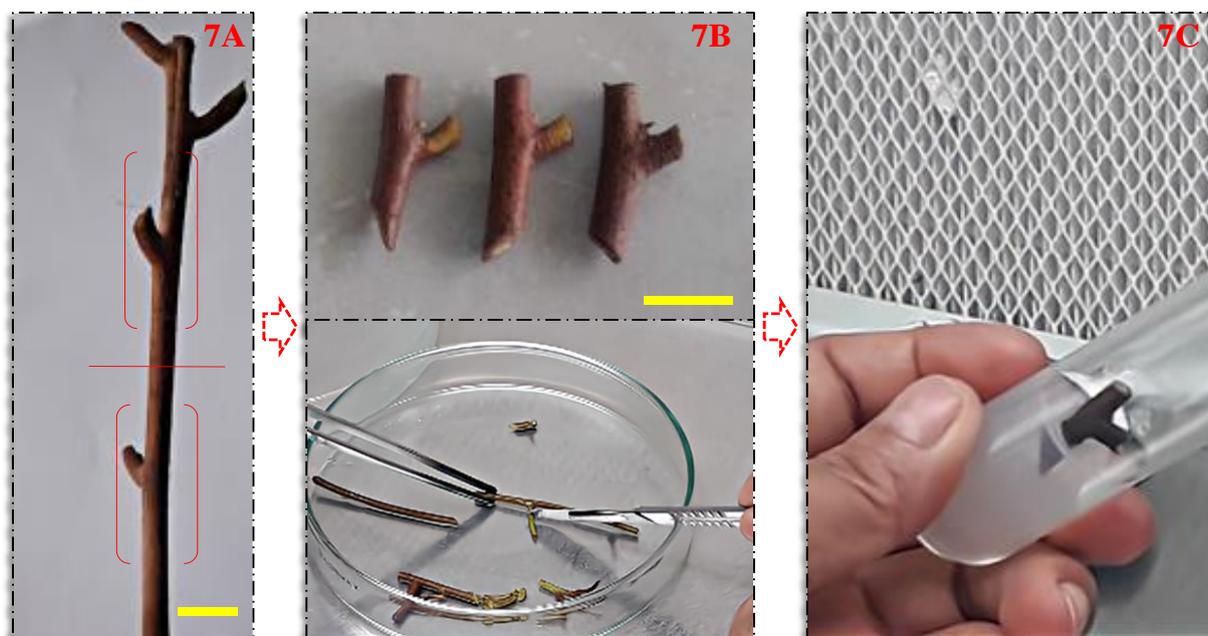


Figura 7. Siembra. 7. A División por segmentos. 7. B Segmentos de 0,4 cm. 7. C Un segmento por tubo. Escala 1 cm.

De acuerdo con los resultados de contaminación de los explantes:

- Primero se incrementó la concentración en la solución de hipoclorito de sodio, al 2 %, y se amplió el tiempo de inmersión a 20 minutos (T_2). Se continuó utilizando el mismo procedimiento de acondicionamiento *in vitro*, como se describió para T_1 .
- Después se realizó una nueva modificación del protocolo (T_3), a nivel del medio de cultivo, con la adición de Vitrofuroral 0,0114 g/L⁻¹.



Figura 8. Medio de cultivo. 8. A Distribución del medio de cultivo según distribución de tratamientos. **8. B** Insumo (Vitrofuroral) aplicado en el medio de cultivo. **8. C** Balanza analítica muestra la dosis de vitrofuroral utilizado en el medio de cultivo (0,0114 g/L⁻¹).

Tabla 1

Ensayos establecidos para el proceso de esterilización superficial de segmentos nodales de palo de rosa (Aniba rosiodora Duke)

	Descripción del protocolo	Periodo	Ensayo	UE/ ensayo	Total, UE
T_1	NaCl 15% * 15'	18/11/20 –21/01/21	2	80	160
T_2	NaCl 20% * 20'	05/03/21 –11/05/21	2	80	160
T_3	NaCl 20% * 20' + Vitrofuroral	21/06/21 –18/09/21	2	80	160
T_c	NaCl 20% * 20' + Vitrofuroral + Tebuco/azoxy.	24/10/21 –26/01/22	1	80	80
Total			7		560

d) Evaluación de la contaminación en laboratorio

Cada 15 días se actualizó el registro de contaminación de las unidades experimentales y se estableció la proporción de unidades contaminadas sobre el total.

3.3.2. Efecto de fuentes y concentraciones de citoquinina sobre el desarrollo de brotes múltiples de segmentos nodales de palo de rosa

a) Instalación y conducción de ensayos

En esta fase, se realizaron tres ensayos repetidos en laboratorio: dos en el periodo 21/06/21 – 18/09/21 y uno en 09/09/21 – 21/01/22. Cada ensayo consistió en 80 unidades experimentales dispuestas al azar, correspondientes a 10 tratamientos y ocho repeticiones, según el detalle de la Tabla 2.

Los tratamientos estuvieron conformados por dos factores:

A: tres productos comerciales con distinta fuente de citoquininas.

B: tres concentraciones de los productos comerciales y un testigo.

La unidad experimental (UE) consistió en un tubo de (25 mm x 150 mm) con 10 ml de medio de cultivo M&S, en el cual se acondicionó un segmento nodal previamente esterilizado, según el protocolo T₃ descrito en el acápite 3.3.1.c.

Tabla 2.

Tratamientos en estudio

Factor A: reguladores de crecimiento	Factor B: concentración			
	0	0,45 μ M	2,32 μ M	23,23 μ M
Kinetina (KIN)		T ₂	T ₃	T ₅
Bencil amino purina (BAP)	T ₁ (Control)	T ₅	T ₆	T ₇
2 Isopentil adenina (2 Ip)		T ₈	T ₉	T ₁₀

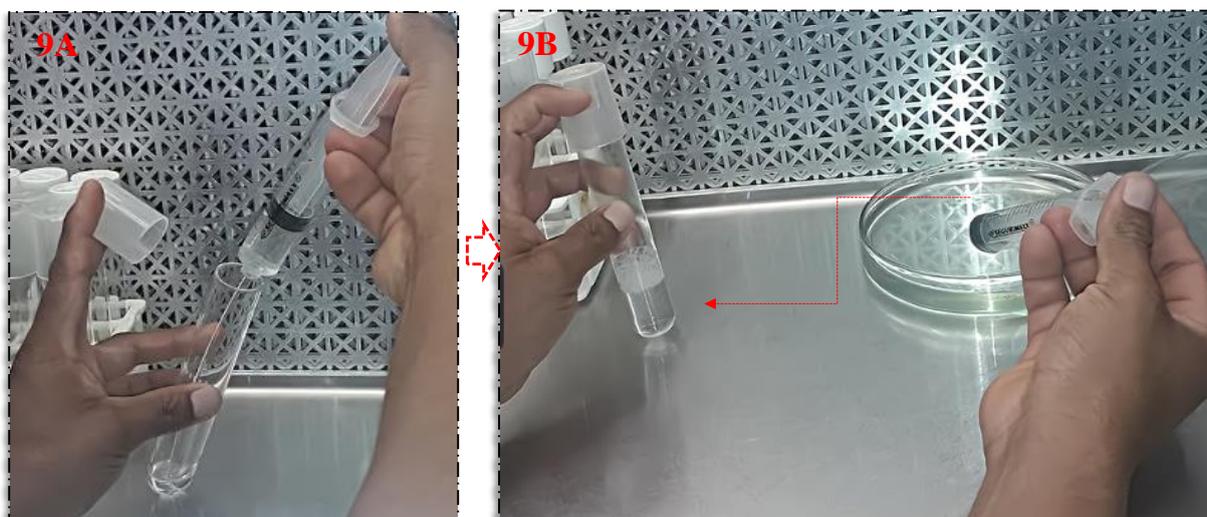


Figura 9. Unidad experimental. 9. A El medio de cultivo se dispensa en tubos de 25 mm x 150 mm. 9. B La flecha roja, indica el tubo contenido con 10 ml medio de cultivo M&S.

Las UE fueron sometidas a condiciones de oscuridad por 48 horas y luego colocados en una sala incubación con un fotoperiodo de 16 horas y temperatura entre 20 °y 22 °C, por 90 días.



Figura 10. Ambientes. 10. A Cámara oscura.**10. B** Segmentos acondicionados en el área de incubación o crecimiento con temperatura y fotoperiodo según su necesidad.

Debido a la baja respuesta de los explantes, se decidió en el último establecimiento considerar solamente segmentos nodales del tercio superior, la instalación y conducción de ensayo estuvo comprendido según lo descrito en el acápite 3.3.2.a y lo indicado en la Tabla 3.

Tabla 3.

Ensayos aplicados en los tres últimos establecimientos.

Recolección	Periodo	Número de ensayos	Repeticiones por ensayo
Tercio medio	21/06/21 – 18/09/21	2	160
Tercio superior	24/10/21 – 26/01/22	1	80
Total		3	240

b) Evaluaciones

Con la ayuda de un estereoscopio binocular digital (Nikon - SMZ- 645C-DS), cada 15 días se registró el número de brotes activados (yema lateral emergida) y formación de callo por segmento en cada unidad experimental. Número de yemas activas y número de callos formados, se empleó transformación de raíz cuadrática ($\sqrt{X+1}$) (Padrón, 1996). Luego, se realizó un análisis de varianza y prueba de rango múltiple de tukey para la diferencia de medias con nivel de confianza $p < 0,01$, coeficiente de (R^2) y coeficiente de (CV) (Calzada, 1982), utilizando el software estadístico InfoStat 2019l.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Contaminación en segmentos nodales de palo de rosa (*Aniba rosiodora*)

Los niveles de contaminación (Tabla 4) fueron elevados (65 – 97,5 %) para los protocolos de descontaminación aplicados exclusivamente en laboratorio (T₁, T₂ y T₃). La contaminación inicial (T₁) se redujo de manera altamente significativa con la adición de vitrofural al medio de cultivo (T₃) (P=0,4 %).

La aplicación preventiva de fungicida en campo (T_c) tuvo un efecto altamente significativo de reducción del porcentaje de contaminación al 11,3 %.

Tabla 4

Porcentaje de contaminación en segmentos nodales de palo de rosa (Aniba rosiodora Duke) por tipos de protocolo de descontaminación a 90 días después de la instalación en medio de cultivo in vitro

Protocolos	UE	Número de tubos contaminados	Número de tubos no contaminados	Porcentaje de contaminación (%)
T ₁	160	156	4	97,5
T ₂	160	147	13	91,9
T ₃	160	104	56	65,0
T _c	80	9	71	11,3
Total UE	560	416	144	

Los niveles de contaminación en T₁, T₂ y T₃ coincidieron en general con los resultados obtenidos por Beltrán y Mesa (2014) en *Aniba perutilis*, con registros de contaminación cercanos al 100 %, al tratar explantes provenientes de campo con hipoclorito de sodio. Estos autores se vieron obligados a cambiar el NaClO por cloruro de mercurio (HgCl₂) y a utilizar yemas apicales en vez de segmentos nodales. La media de contaminación obtenida con este último tratamiento fue de 12,7 %, muy similar a lo registrado por T_c en el presente trabajo.

Si bien Beltrán y Mesa (2014) expusieron varios antecedentes de investigaciones concluyentes sobre las ventajas del HgCl₂ sobre NaClO, cabe considerar que dichos autores también advirtieron fundamentalmente los riesgos de manipulación del mercurio.

Los niveles de reducción en la contaminación en T₃ son parecidos a los resultados obtenidos por Handa *et al.* (2005) en *Aniba rosaeodora*.

Estos autores realizaron aplicaciones preventivas con un fungicida benlate, cada 15 días, 180 días antes de la instalación; registrando así un 33 % de contaminación por hongos y 29 % de contaminación por bacterias.

Asimismo, Parrales *et al.* (2007) realizaron aplicaciones con fumigada dos aplicaciones por semana con una solución de Agrimicin y Benonimil a razón de 1 g/L⁻¹, para reducir la presencia de microorganismos patógenos presentes en la estructura de los segmentos noduladres de *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhyantha* y *Tabebuia billbergii* en la producción *in vitro*.

El producto fungicida utilizado en ambos trabajos, se caracterizan por ser productos sistémicos de acción biosida y forma de translocación acropétala (Del órgano de crecimiento hacia las raíces). Sin embargo, ambos productos son considerados como productos ligeramente peligrosos, deben ser utilizados empleando medidas de bioseguridad (NCP, 2012; UNA, 2005).

4.2. Efecto de tres fuentes y concentraciones de citoquininas, sobre el desarrollo de brotes y formación de callos en segmentos nodales de palo de rosa.

a) Activación de yemas en relación con el efecto de tres fuentes y concentraciones de citoquininas.

El ANOVA (Tabla 5) número de brotes, indica que no existe diferencias significativas para la concentración de citoquininas ni interacción de fuentes y concentración de citocininas al (p<0,01%) de probabilidad. Sin embargo, encontramos diferencias altamente significativas para la fuente de citoquininas, resultado similar a lo reportado por Amasifuén (2019) en el cultivo de sachá inchi. Demostrando que al menos una de las fuentes de citoquinina es diferente a las demás. Del mismo modo, encontramos diferencias estadísticas significativas para factores vs control.

Tabla 5

Análisis de varianza número de brotes mediante la interacción: Fuentes y concentraciones de citoquininas, evaluados a 90 ddi. Datos transformados $\sqrt{X+1}$.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Sign.
Fuentes	0,7	2	0,35	11,67	0,0000	**
Concentraciones	0,1	2	0,05	1,67	0,1963	NS
Fuentes*Concentraciones	0,06	4	0,01	0,33	0,8546	NS
Factores vs control	0,31	1	0,31	9,69	0,0027	**
Error	2,23	70	0,03			
Total	3,4	79				

** = altamente significativo, NS = no significativo, ddi. = Días después de la instalación *in vitro*.

$R^2 = 34 \%$ C.V. = 15,05 % Promedio = 1,86 brotes

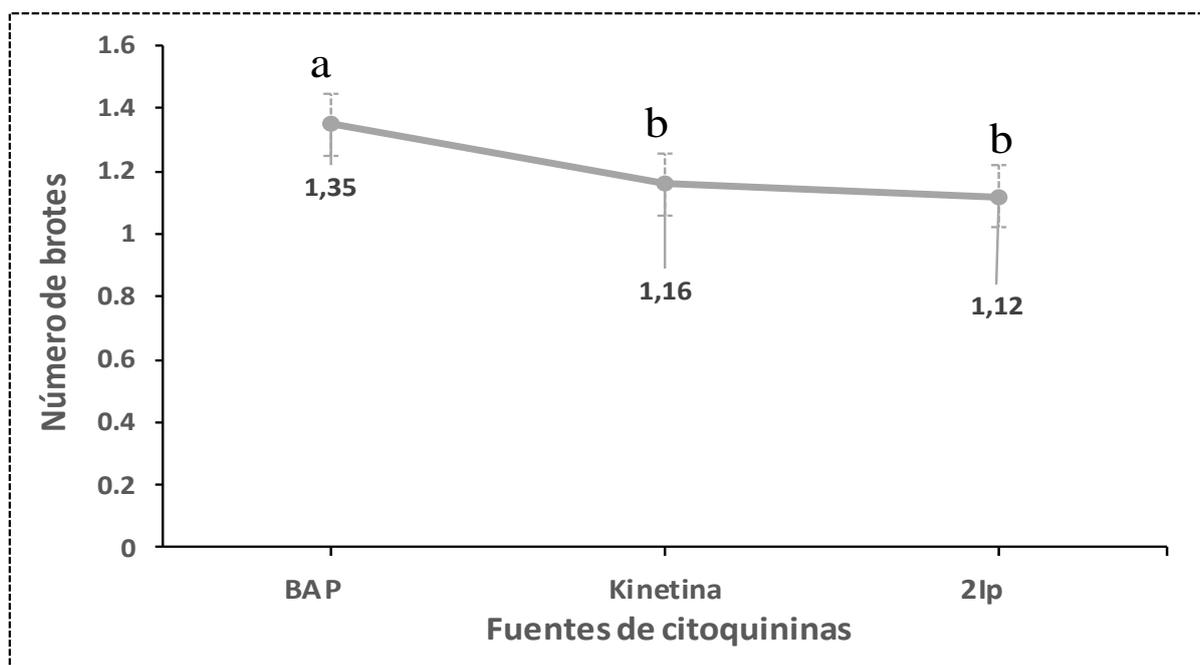


Figura 11. Prueba de Tukey ($p < 0,01$) del número de brotes por explante para el efecto de fuentes de citoquininas, evaluados a 90 ddi.

La prueba de Tukey (Figura 11) efecto principal de fuente de citoquininas versus el número de yemas laterales por segmento, indica que la fuente de citocinina BAP es estadísticamente diferente a la fuente de kinetina y 2Ip, la misma, que presentó mayor promedio en número de brotes activos con 1,35 brotes/ muestra. Sin embargo, el efecto de fuente de citoquinina kinetina es estadísticamente igual a la fuente de citoquinina 2Ip con promedios de (1,16 y 1,12 brotes/ muestra) respectivamente. El resultado obtenido, muestra el efecto que presentó cada fuente de citoquinina, indicando que el uso de BAP genera un mayor número de brotes activos, seguido por la kinetina y 2Ip. Pérez *et al.* (2002), indican que la citoquinina BAP favorece la activación de brotes en segmentos nodales. A su vez García *et al.* (2011), reportan que la adición de BAP en el medio de cultivo MS proporciona la brotación en un 100% en segmentos nodales, corroborando la efectividad del BAP obtenido en el presente estudio.

Asimismo, en la figura se muestra de forma decreciente la influencia de cada fuente de citoquinina. Por tanto, los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Babu *et al.* (2003) y Tallón *et al.* (2012), mencionan que la citoquinina es efectiva en la proliferación a partir de la inducción de yemas axilares y segmentos nodales empleando el BAP (74,6 %); gracias a sus efectos de ruptura en la dominancia apical en explantes cultivadas *in vitro*, seguido en orden descendente por la kinetina (19,4 %) y 2Ip (3 %).

Además, Abbasi *et al.* (2013), creen que el éxito de BAP en la formación de brotes se debe a la capacidad de los tejidos vegetales para sintetizar de manera más eficiente que otros reguladores hormonales sintéticos.

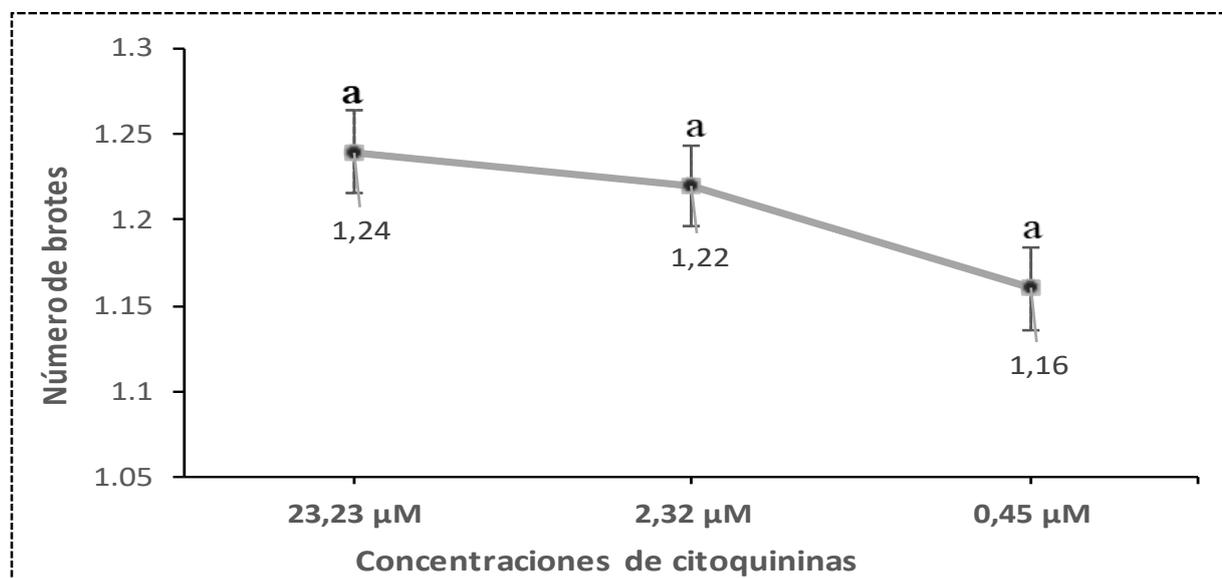


Figura 12. Prueba de Tukey ($p < 0,01$) del número de brotes por segmento para el efecto principal de concentraciones de citoquinina, evaluados a 90 ddi.

La prueba de Tukey (Figura 12) número de brotes/explante, no mostró diferencias significativas entre las concentraciones, esto significa que todos los segmentos de palo de rosa presentan igual número de yemas por segmento. La ausencia de significancia estadística no limita mencionar como resultado de los experimentos realizados que el uso de (2,32 μM y 23,23 μM) nos permite obtener mayor número de brotes activos.

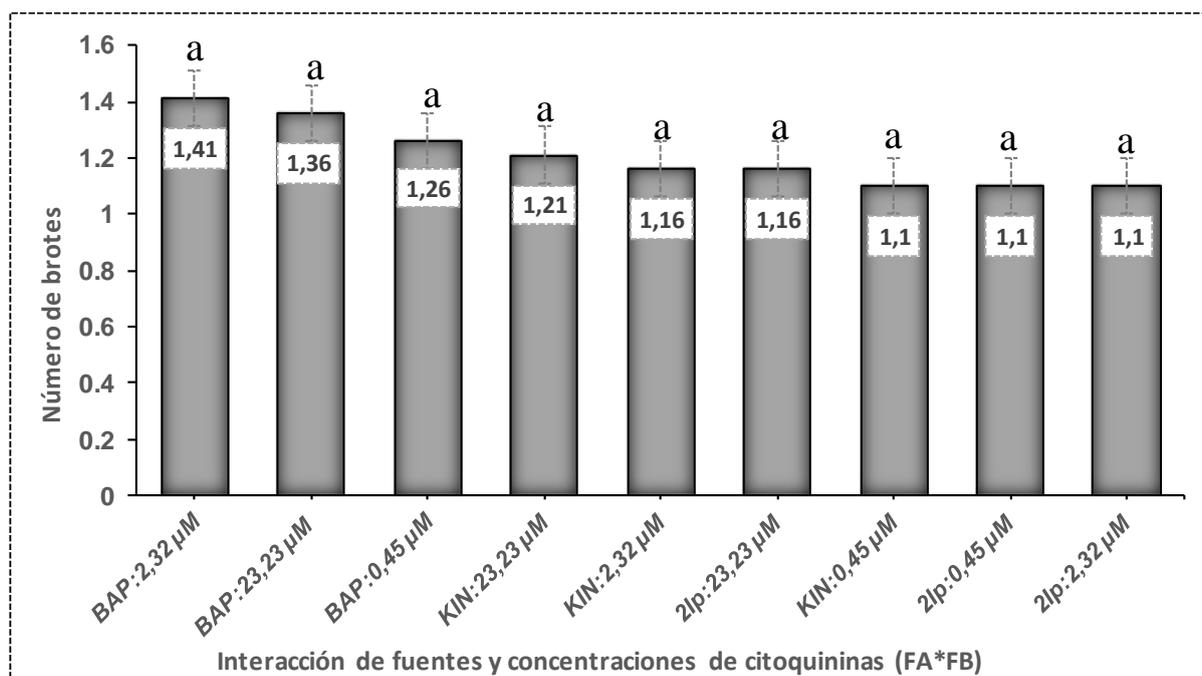


Figura 13. Prueba de Tukey ($p < 0,01$) del número de brotes para la interacción fuente de citoquinina x concentración de citoquinina (FA x FB), evaluados a 90 ddi.

La interacción de la fuente de citoquinina y la concentración de citoquinina (Figura 13), indica que todos los tratamientos son estadísticamente iguales habiendo variaciones numéricas en el número de brotes activos según fuente y concentración de citoquininas. Probablemente se deba al bajo número de unidades experimentales empleadas, no obstante, se debe señalar que en los tratamientos T₅ (BAP - 2,32 µM) y T₆ (BAP - 23,23 µM) obtuvieron mayor promedio en número de brotes con (1,41 y 1,36 brotes/muestra), seguido de los tratamientos T₄ (BAP - 0,45 µM) con 1,26 brotes; T₃ (KIN - 23,23 µM) con 1,21 brotes; T₂ (KIN - 2,32 µM) y T₉ (2Ip - 23,23) con 1,16 brotes; T₁ (KIN - 0,45 µM), T₇ (2Ip - 0,45 µM) y T₈ (2Ip - 2,32 µM) con 1,1 brotes en promedio. Aunque Kumar *et al.* (2009) en un estudio de regeneración *in vitro* del guayabo, utilizaron segmentos nodulares establecidos en medio MS suplementado con un 1 mg/L⁻¹ BAP, obteniendo una mayor germinación y crecimiento con 2,45 brotes por muestra en promedio.

De acuerdo a los datos obtenidos podemos mencionar que el tratamiento suplementado con la fuente de citoquinina BAP muestra un mejor comportamiento en la activación de brotes con respecto a los demás tratamientos. Por lo tanto, los resultados obtenidos coincidieron en general con los resultados obtenidos por Silva *et al.* (2010) en *Aniba rosiodora* y Suárez *et al.* (2006) en *Tabebuia rosea* Bertol, estos autores demostraron que al utilizar una mayor concentración de citoquinina BAP (6-bencilaminopurina) en el medio de cultivo incrementa la producción de brotes.

Así mismo, Delgado y Hoyos (2014) mencionan la efectividad del uso de 3 mg/L de kinetina, para el incremento en el número promedio de brotes (1,2) similar a lo registrado por T₃ en el presente experimento.

Los resultados obtenidos en la (Figura 13), indican que en los tratamientos T₅ (BAP - 2,32 µM) y T₆ (BAP - 23,23 µM) lograron obtener mayor número de brotes activos con (1,41 y 1,36 brotes/ explante), resultados distintos a lo obtenido por Amasifuén (2019) donde menciona que la concentración de citoquinina BAP (0,45 µM) en el medio de cultivo incrementó la mayor tasa de multiplicación *in vitro* de brotes de sachá inchi con (4,87 brotes/explante) en 42 días; probablemente los resultados obtenidos en el presente estudio de investigación estuvo influenciado por las características morfológicas que presentan cada especie, la especie empleada presenta una textura leñosa a comparación del sachá inchi que es una especie semi leñosa o especie suculenta (Gárate, 2009).

b) Formación del número de callos en relación a la influencia de tres fuentes y concentraciones de citoquininas.

El ANOVA de la formación de número de callos (Tabla 6), indica que no existe diferencias significativas para la concentración de citoquininas, interacción de fuentes y concentración de citoquininas ni con respecto a la interacción de los factores vs control, encontramos diferencias altamente significativas en las fuentes de citoquininas. Demostrando que al menos una de las fuentes de citoquinina es diferente a las demás.

Tabla 6

Análisis de varianza para el número de callos mediante la interacción: Fuentes y concentraciones de citoquininas, evaluados a 90 ddi. Datos transformados $\sqrt{X+1}$.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Sign.
Fuentes	0,36	2	0,18	6	0,0039	**
Concentraciones	0	2	0	0	1,0000	NS
Fuentes*Concentraciones	0,03	4	0,01	0,33	0,8546	NS
Factores vs control	0,03	1	0,03	1,22	0,2737	NS
Error	1,97	70	0,03			
Total	2,39	79				

** = altamente significativo, NS = no significativo, ddi. = Días después de la instalación in vitro.

$R^2 = 18 \%$ C.V. = 15,36 % Promedio = 1,09 callos

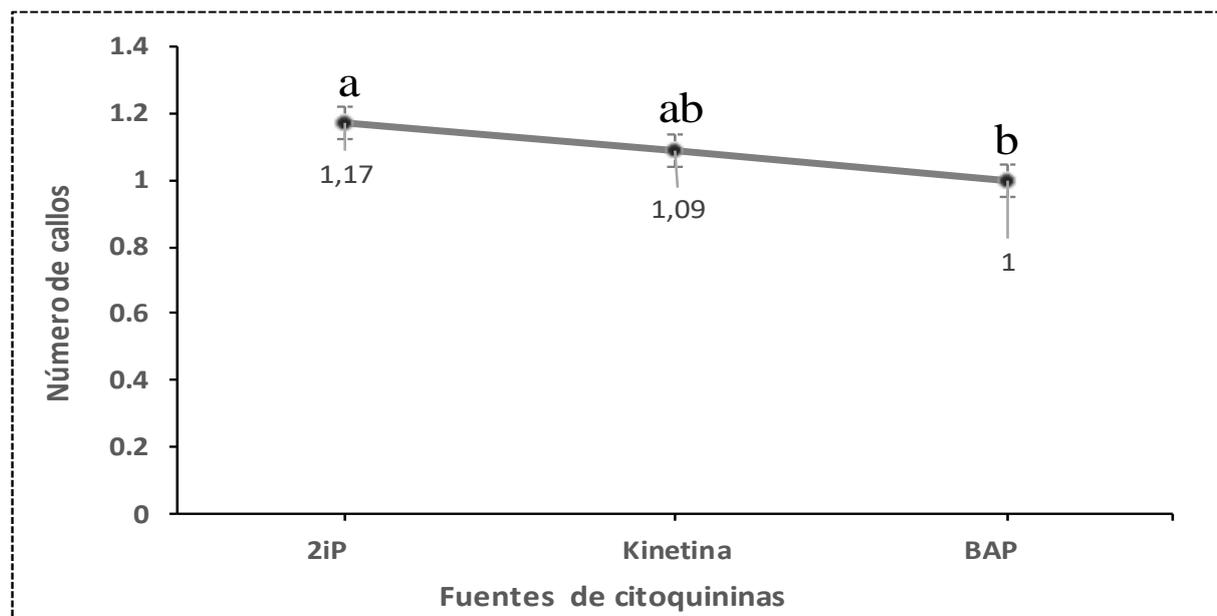


Figura 14. Prueba de Tukey ($p < 0,01$) del número de callos por segmento para el efecto principal fuente de citoquinina, evaluados a 90 ddi.

La prueba de Tukey (Figura 14) para determinar el número de callos por explante, indica que la fuente de citoquininas 2Ip y kinetina son los que alcanzaron mayor número de callos con (1,17 y 1,09 callos/ explante), siendo iguales estadísticamente, en cambio la fuente de citoquinina BAP fue el que tuvo menor número de callos formados con 1 callo en promedio. Sin embargo, la ausencia de significancia estadística no limita señalar como resultado que el uso de la fuente citoquinina 2Ip genera un mayor número de callos formados, resultados distintos a lo obtenido por Amasifuén (2019) en *Plukenetia volubilis*, donde menciona que la fuente de citoquinina BAP fue más efectiva para aumentar la producción de callos y raíces; probablemente los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación estarían influenciado por las características morfológicas que presentan cada especie.

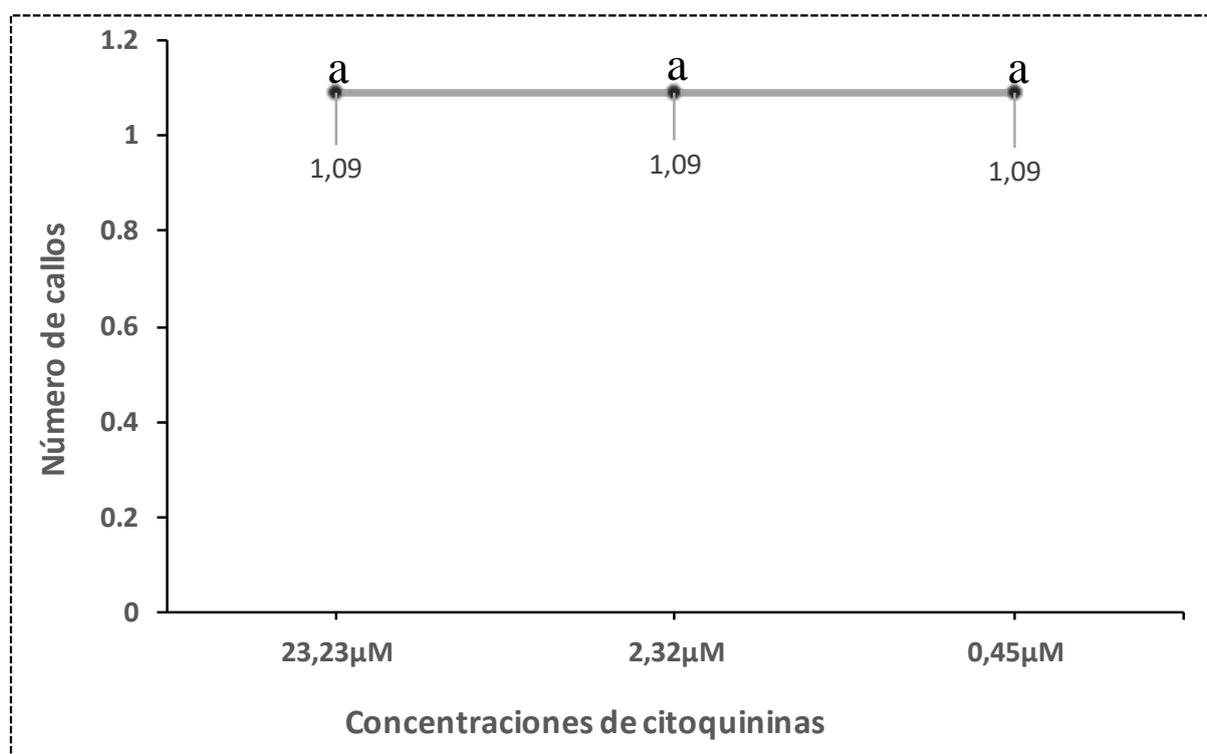


Figura 15. Prueba de Tukey ($p < 0,01$) del número de callos por segmento para el efecto principal de concentraciones de citoquininas, evaluados a 90 ddi.

La prueba de Tukey (Figura 15), para el efecto principal concentración de citoquinina con respecto al número de callos formados por explante, indica que no existe diferencias significativas entre concentraciones de citoquininas, esto significa que todos los segmentos de palo de rosa presentan igual número de callos por explante.

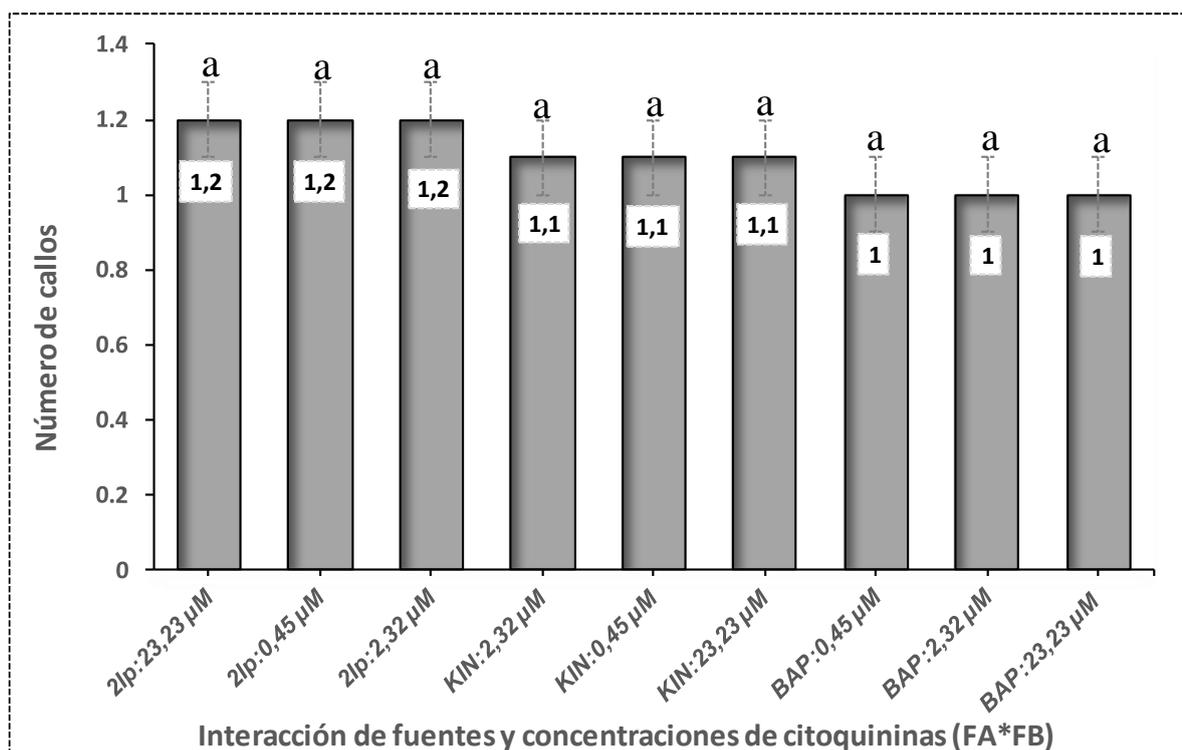


Figura 16. Prueba de Tukey ($p < 0,01$) del número de callos por segmento para la interacción fuente de citoquinina x concentración de citoquinina (FA x FB), evaluados a 90 ddi.

El origen de las interacciones de citoquininas y las concentraciones de citoquininas (Figura 16) indican, que todos los tratamientos son estadísticamente iguales, con diferencias en el número de callos formados según fuente y concentración de citoquininas, no obstante, se debe señalar que en los tratamientos T₇ (2Ip - 0,45 µM; T₈ (2Ip - 2,32 µM; y T₉ (2Ip - 23,23 µM) se logró obtener un mayor promedio en número de callos formados con 1,2 callos/muestra, resultados distintos a lo obtenido por Amasifuén (2019) en *Plukenetia volubilis* donde menciona que la concentración de citoquinina BAP (23,23 µM) fue más efectiva para aumentar la producción de callos y raíces; probablemente los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación estuvo influenciado por las características morfológicas que presentan cada especie, se conoce que palo de rosa es un especie leñosa en comparación del sacha inchi que es una especie semi leñosa o especie suculenta (Gárate, 2009).

Por su parte, Jardím *et al.* (2010) en *Aniba rosaeodora*, inocularon brotes apicales y segmentos nodales en medio de cultivo suplementado con diferentes reguladores del crecimiento, demostrando que la concentración de citoquinina BAP a (4.0 mg/L⁻¹) permiten un mayor número promedio en la formación de callos (1,67 callos/ muestra), Esos resultados son diferentes de lo obtenido en el presente trabajo de investigación ya que (23,23 µM de BAP) permite obtener (1 callos/muestra), probablemente se deba a la etapa fisiológica que presenta cada explante utilizado en el experimento.

c) Longitud del brote en relación con el efecto de tres fuentes y concentraciones de citoquininas.

El ANOVA, longitud del brote (Tabla 6) muestra que existe diferencias altamente significativas para fuentes y concentraciones de citoquininas, así como en la interacción de fuentes* concentraciones y factores vs control al ($p < 0,01\%$) de probabilidad, resultados que tienen similitud a lo reportado por Amasifuén (2019)) indica que existe diferencias estadísticas significativas con respecto a fuentes de citoquininas, concentración de citoquininas, así como para la interacción de fuentes por concentración de citoquininas.

Tabla 7

Análisis de varianza para la longitud del brote (mm) mediante la interacción: Fuentes y concentraciones de citoquininas, evaluadas a 90 ddi.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Sign.
Fuentes	60,33	2	30,16	754,0	0,0000	**
Concentraciones	14,48	2	7,24	181,0	0,0030	**
Fuentes*Concentraciones	27,21	4	6,8	170,0	0,0006	**
Factores vs control	5,45	1	5,44	136,0	0,0001	**
Error	1,07	27	0,04			
Total	154,51	35				

** = Altamente significativo, ddi. = Días después de la instalación in vitro.

$R^2 = 99\%$ C.V. = 3,99% Promedio = 1,90 mm

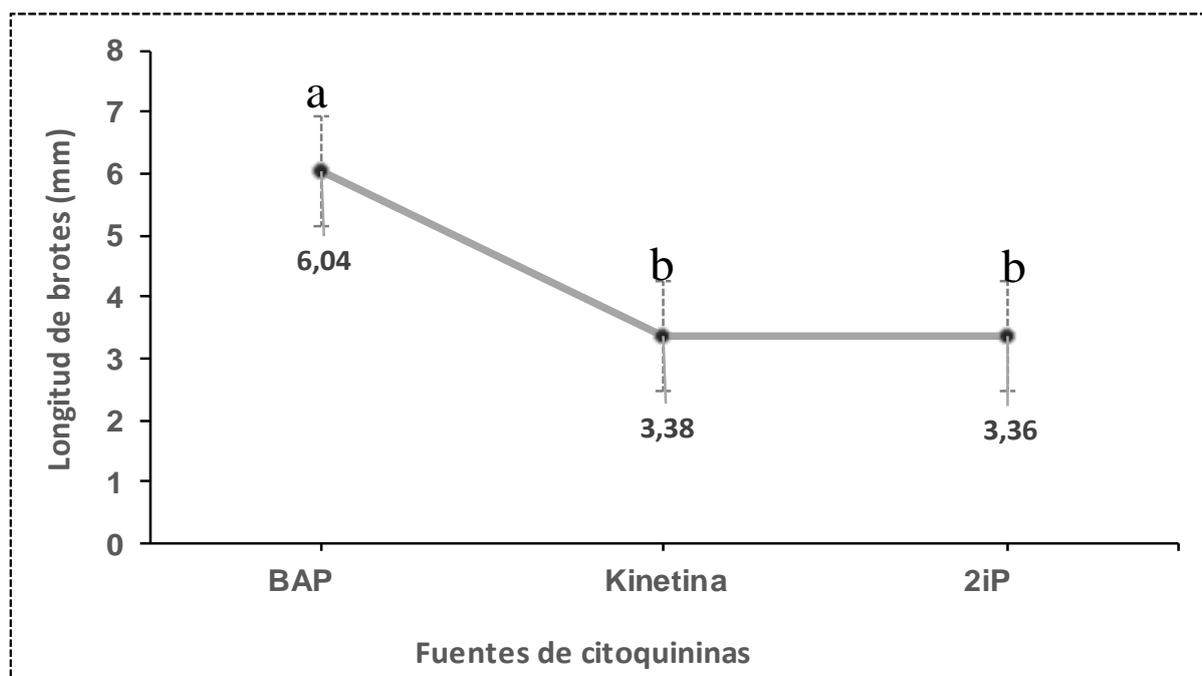


Figura 17. Prueba de Tukey ($p < 0,01$) longitud del brote (mm) para el efecto principal fuente de citoquinina, evaluados a 90 ddi.

La prueba de Tukey (Figura 17) para la longitud del brote, indica que la fuente de citoquinina BAP es estadísticamente diferente a la fuente de kinetina y 2Ip, la misma, que presentó mayor promedio en longitud y desarrollo con (6,04 mm/ brote). Sin embargo, el efecto de fuente de citoquinina kinetina es estadísticamente igual a la fuente de citoquinina 2Ip, habiendo variaciones numéricas con respecto al promedio en la longitud del brote KIN (3,38 mm/ brote) y 2Ip (3,36 mm/ brote) respectivamente. Por lo tanto, el resultado obtenido coincide con los resultados obtenidos por Suárez *et al.* (2006) en *Tabebuia rosea* Bertol, reportan que los explantes cultivados en los medios suplementados con BAP desarrollaron una mayor longitud con 1,2 cm respectivamente. Por su parte, Huamán (2014) en *Cedrela odorata* y García *et al.* (2011) indican que el medio de cultivo MS suplementado con fuente de citocinina BAP, resulta ser favorable para obtener plántulas con mayor longitud promedio de (3,93 cm) en 64 días.

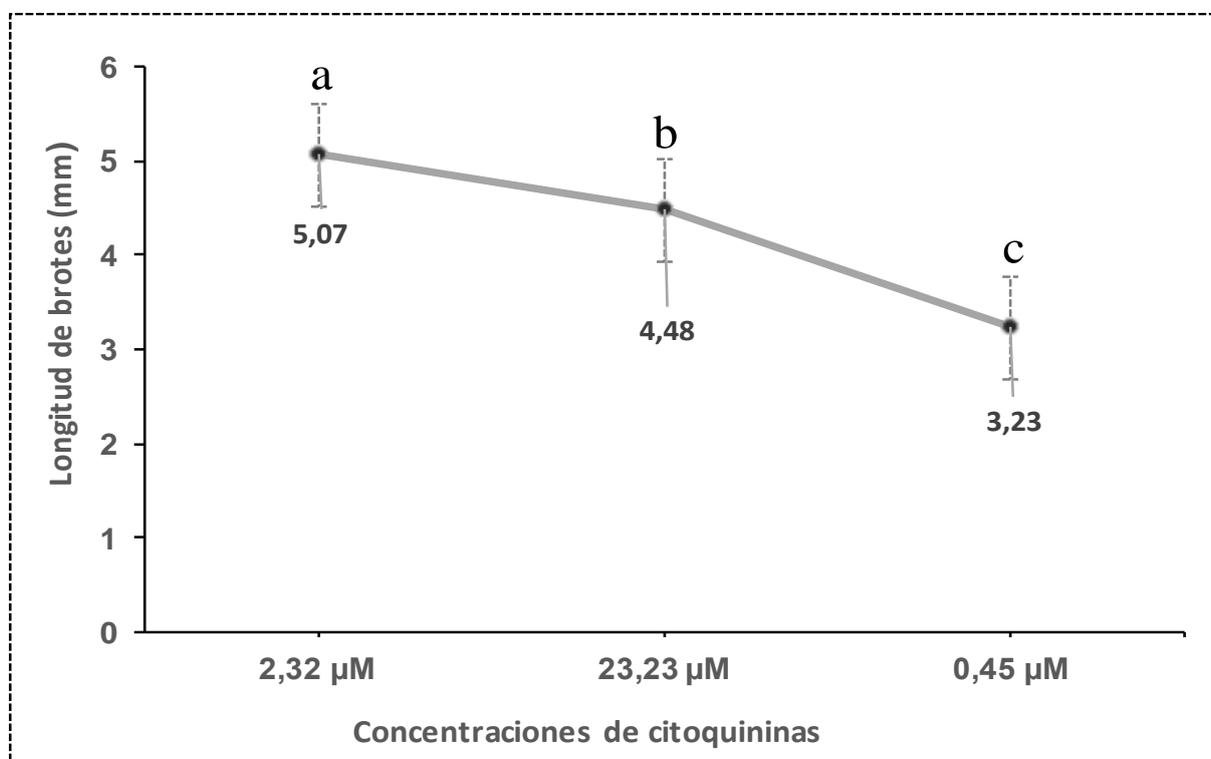


Figura 18. Prueba de Tukey ($p < 0,01$) longitud de brote (mm) para el efecto principal de concentraciones de citoquininas, evaluados a 90 ddi.

La prueba de Tukey (Figura 18) para determinar el efecto principal de las concentraciones de citoquinina en la longitud de los brotes, muestra que existe diferencia estadísticamente significativa entre las tres concentraciones de citoquinina (0,45 µM; 2,32 µM y 23,23 µM), habiendo variaciones numéricas con respecto al promedio en longitud del brote, siendo la concentración 2,32 µM la que mostró mayor promedio en longitud con (5,07 mm/brote), seguido de 23,23 µM con (4,48 mm/ brote) y (0,45 µM) con (3,23 mm/ brote) respectivamente.

Huamán (2014) en *Cedrela odorata*, indica que las concentraciones de 2,21 μM y 6,65 μM , favorecen la obtención de brotes con mayor longitud en promedio. A su vez García *et al.*, (2011) mencionan que la utilización de 8,87 μM en el medio de cultivo MS permite obtener yemas con longitud promedio de (3,93 cm).

Esos resultados difieren de los obtenidos en el presente trabajo de investigación, ya que (0,45 μM ; 2,32 μM y 23,23 μM) permite obtener brotes de (5,07 mm, 4,48 mm y 3,23 mm) respectivamente. Probablemente se deba a la etapa fisiológica que presenta cada explante utilizado en el experimento o al aumento μM de la concentración.

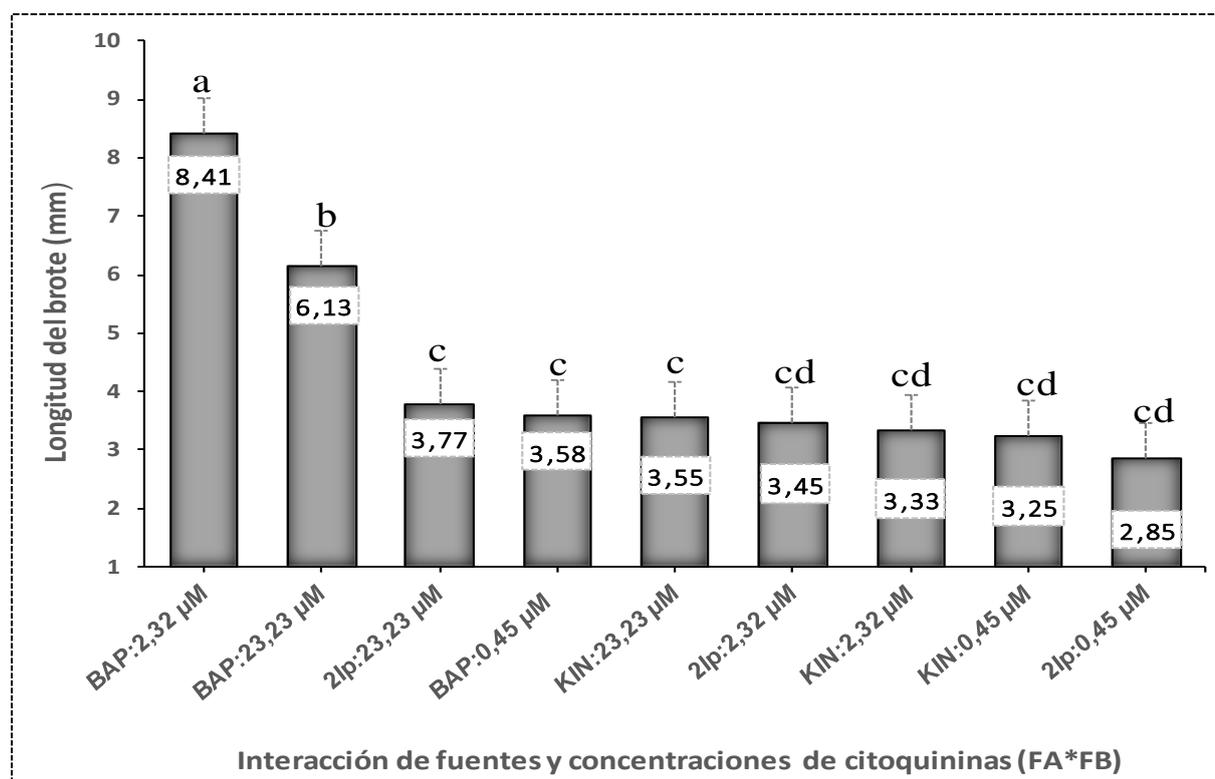


Figura 19. Prueba de Tukey ($p < 0,01$) de la longitud del brote (mm) para la interacción entre fuentes de citoquinina x concentración de citoquinina (FA x FB), evaluados a 90 ddi.

La interacción de fuentes y concentraciones de citoquinina (Figura 19), indica que la combinación BAP: 2,32 μM , es estadísticamente diferente con respecto a las demás combinaciones, la misma que representó un mejor comportamiento con respecto a la longitud de brote (8,41 mm), seguido por la combinación BAP: 23,23 μM (6,13 mm) resultado coincidente con lo reportado por Díaz (2012) en *Cedrela montana*, en la cual menciona que al utilizar BAP 2,0 mg/L^{-1} , obtuvo brotes con longitud promedios de (6,0 mm). De igual forma podemos mencionar que no existe diferencias significativas entre las demás combinaciones, pero sí variaciones numéricas con respecto al promedio en longitud del brote 2Ip: 23,23 μM (3,77 mm); BAP: 0,45 μM (3,58 mm); KIN: 23,23 μM (3,55 mm); 2Ip: 2,32 μM (3,45 mm); KIN: 2,32 μM (3,33 mm); KIN: 0,45 μM (3,25 mm) y 2Ip: 0,45 μM (2,85 mm).

Huamán (2014) en *Cedrela odorata*, indica que las concentraciones de 2,21 μM y 6,65 μM de BAP, permiten la obtención de brotes con 10 mm de longitud en promedio, sin embargo, no garantiza el éxito para pasar a la fase ex vitro por susceptibilidad a la manipulación. A su vez García *et al.* (2011) en *Psidium guajava*, mencionan que la utilización de 8,87 μM de BAP en el medio de cultivo MS permite obtener brotes con longitud promedio de (3,93 cm.).

Estos resultados difieren de los obtenidos en el presente trabajo de investigación ya que (2,32 μM y 23,23 μM de BAP) permite obtener brotes con longitud promedio de 8,41 mm y 6,13 mm) respectivamente, probablemente se deba a la etapa fisiológica que presenta cada explante utilizado en el experimento o al aumento μM de la concentración.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio y dentro de los lineamientos perseguidos a través de los objetivos trazados, se concluye:

1. Para la fase de esterilización superficial del material vegetal (segmentos nodales) se debe emplear alcohol al 70 % por 15 minutos seguido de una solución de hipoclorito de sodio al 2 % por 20 minutos de inmersión, con la adición de vitrofural $0,0114 \text{ gL}^{-1}$ a nivel del medio de cultivo, incluido las aplicaciones preventivas en la plantación de palo de rosa, con una solución fúngica a razón de 1 gL^{-1} , 30 días antes de cada establecimiento *in vitro*.
2. En la fase de activación y crecimiento del brote, debe usarse el medio de cultivo (Murashige y Skoog, 1962) compuesto por macro – elementos, adicionando $2,32 \text{ }\mu\text{M}$ BAP y $23,23 \text{ }\mu\text{M}$ BAP, el cual ha inducido a obtener un mayor número de brotes activos y con mayor longitud. El pH del medio está ajustado a 5,8.
3. Para la fase de formación de callos, debe usarse el medio de cultivo (Murashige y Skoog, 1962) compuesto por macro – elementos, adicionando $23,23 \text{ }\mu\text{M}$ 2Ip, el cual ha inducido un mayor número de callos. El pH del medio ajustado a 5,8

RECOMENDACIONES

1. Utilizar explantes recolectados del tercio superior de la planta madre, para fomentar la formación de más brotes y callos.
2. Durante el desarrollo del proyecto, no logramos evidenciar la formación de raíces, lo que inhibió el crecimiento de los brotes, seguido de la presencia de necrosis y posteriormente causando la muerte del brote (Figura 31), es por ello en posteriores estudios deberían considerar la combinación de auxinas y citoquininas, ya que la unión de estas incrementa la división celular, ayudando a los brotes a reproducirse más.
3. Posteriores estudios de propagación de palo de rosa (*Aniba rosiodora* Duke) deberían considerar, no obstante, la propagación de yemas apicales versus los segmentos nodales bajo la metodología validada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, MA, Peña EJ, Castro D. (2011). Evaluación de medios de cultivo para la producción *in vitro* de *Annona muricata* L. mediante la técnica de microinjertación seriada. *Acta Agronómica* 60(2): 140-146.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122011000200005
- Alverca, W. (2015). *Micropropagación de Ananas comosus (L.) Merr. Cultivar MD-2 "Golden", mediante un sistema de inmersión temporal*. Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú.
https://repositorio.unsm.edu.pe/bitstream/handle/11458/670/TFCA_69.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Azcón - Bieto, J., & Talón, M. (2013). *Fundamentos de fisiología Vegetal* (Segunda ed). Madrid: McGraw-Hill - Interamericana de España, S. L.
<http://www.untumbes.edu.pe/vcs/biblioteca/document/varioslibros/0749.%20Fundamentos%20de%20fisiolog%C3%ADa%20vegetal.pdf>
- Amasifuén, A, K, P. (2019). *Efecto de cuatro fuentes de citoquininas en la multiplicación In Vitro de Sacha Inchi (Plukenetia volubilis L.) bajo un sistema de biorreactores de inmersión temporal en la Región San Martín*. (Tesis para optar el título profesional de Ingeniero agrónomo). Universidad Nacional de San Martín, Facultad de Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Agronomía; Tarapoto, Perú.
<https://repositorio.unsm.edu.pe/bitstream/handle/11458/3527/AGRONOMIA%20-%20Katerin%20Paola%20Amasifu%20a9n%20Alvarado.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Abbasi, N. A., Pervaiz, T., Hafiz, I. A., Yaseen, M., & Hussain, A. (2013). Assessing the response of indigenous loquat cultivar Mardan to phytohormones for in vitro shoot proliferation and rooting. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 14(9), 774-84.
<http://doi.org/10.1631/jzus.B1200277>
- Babu, K. N., Sajina, A., Minoo, D., John, C. Z., Mini, P. M., Tushar, K. V., ... Ravindran, P. N. (2003). Micropropagation of camphor tree (*Cinnamomum camphora*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(2), 179-183.
<http://doi.org/10.1023/A:1023988110064>
- Beltrán, P, D, M; Mesa, L, N. (2014). *El dicloruro de mercurio como desinfectante en la micropropagación del comino (Aniba perutilis Hemsley)*. (Tesis para optar al grado de Maestro en Ciencias Biológicas). Universidad del Tolima; Ibagué, Colombia.
<https://www.crossref.org/iPage?doi=10.15446%2Frev.colomb.biote.v16n1.44302>

- Cárdenas L, D y Salinas, N. R. (2006). *Libro rojo de plantas de Colombia: especies maderables amenazadas*. Bogotá, D.C.: Instituto Amazónico de Investigaciones Sinchi/ Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.
https://sinchi.org.co/files/publicaciones/publicaciones/pdf/LR_MADERABLES.pdf
- Cortegano Chota, B. (2006). *Evaluación del crecimiento inicial del palo de rosa (Aniba rosaedora Ducke) en dos tipos de ambientes en Tamshiyacu, Perú*. (Tesis para optar al grado de Ingeniero Forestal). Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, Facultad de Ciencias Forestales; Iquitos, Perú.
file:///C:/Users/PC%20Escritorio/Downloads/Betsabeth_Tesis_Titulo_2006.pdf
- Cruzat, R. (2009). *Resultados y Lecciones en Sistema de Inmersión Temporal en Especies Anuales, Frutales y Vides*. Chile.
- Cardoza, V. (2005). *Tissue culture: the manipulation of plant development. Chapter. Book Plant biotechnology and genetics. Principles, techniques and applications*. Stewart, C.N.
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782012000700005&lng=pt&tlng=pt.
- Carranaza, M.; Reyes, H.; Mora, W.; Cevallos, O.; Escobar, A.; Nieto, J. y Morante, J. (2013). Propagación clonal *in vitro* de especies forestales. Universidad Técnica Estatal de Quevedo- Ecuador. Ciencia y tecnología. 6(2): 1- 8.
<https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/15287/Campos%20%2c%20.pdf?=1&isAllowed=y>
- Calzada, J. (1982). *Métodos estadísticos para la investigación*. 5° ed. Lima: M
<https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/2372/1/T-UTEQ-0284.pdfilagros>.
- Cordova, F. (2016). Selección y efecto del ácido -3 indolbutírico en la producción de clones de *Simarouba amara* Aubl (Marupa) en Pucallpa – Perú. Universidad Nacional de Ucayali.
<http://repositorio.unu.edu.pe/bitstream/handle/UNU/3355/000001508T.pdf?seque>
- Díaz, G. (2012). Procesos morfogénicos *in vitro* de cedro (*Cedrela montana* Moritz ex Turcz) inducidos, a partir de semillas, para propagación y conservación de germoplasma. Tesis Lic. Universidad Nacional de Loja. Ecuador. 124 p.
- Delgado, G, M; Hoyos, S, R. (2013). Multiplicación clonal *in vivo* e *in vitro* de la especie forestal (*nativa Aniba perutilis* Hemsl). *Acta Agron*. 65 (2):190-196.
<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/21758>

Gárate, M. (2009). Efecto de cuatro dosis de ácido- 3- indol butírico en el enraizamiento de ápices y segmentos nodales de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú.

<https://tesis.unsm.edu.pe/bitstream/handle/11458/1893/ITEM%4011458-56.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

García, R; Mulwa, M; Norton, A. Skirvin, M. (2011). Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.) Pakistán. *Journal of Horticultural Science and biotechnology* 78(5):739-741.

Hassler M. (2020). *World Plants: Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World* (version Nov 2018). In: *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life*. <https://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/007ce1c8e20a3a1127b3e7ce9435fe22/common/8a1a8de246d2028cb52284bb7abc1f95>.

Handa, L; de Tarso, B, P; Caetano, Q, R. (2005). Cultura vitro embriones y palo de rosa árboles jóvenes brote (*Aniba rosaeodora* Ducke). *Embrapa Amazonia Occidental Manaus, Brasil. Acta Amazonica*. 35 (1): 29-33.

[SciELO - Brasil - Cultivo in vitro de embriones y brotes de plántulas de palo de rosa \(Aniba rosaeodora Ducke\) Cultivo in vitro de embriones y brotes de plántulas de palo de rosa \(Aniba rosaeodora Ducke\)](#)

Huamán, C, G, X. (2014). Propagación *in vitro* de cedro (*Cedrela odorata* L.) vía organogenesis. Para optar el título de ingeniero agrónomo. Universidad nacional de San Martín – Tarapoto. Facultad de ciencias Agrarias. Escuela profesional de Agronomía.

https://repositorio.unsm.edu.pe/bitstream/handle/11458/589/TFCA_127.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Jaiswal, N; Verma, Y; Misra, P. (2017). Micropropagation and *in vitro* elicitation of licorice (*Glycyrrhiza* spp.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, (53): 145–166. DOI 10.1007/s11627-017-9832-7.

Jardím, L, S; Sampaio, P; de T, B; Costa, S, de S; Gonçalves, C, de Q, B; Brandão, H, L, M. (2010). Efecto de diferentes reguladores de crecimiento en la regeneración *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). *Acta Amazonica*, 40(2), 275-279.

<https://old.scielo.br/pdf/aa/v40n2/v40n2a05.pdf>

Kometter, R. (2019). Poblaciones naturales de *Aniba rosaeodora* Duke. “Palo de rosa”. Diagnóstico general, *Bio Modus Tropical*.

<file:///C:/Users/PC%20Escritorio/Downloads/DIAGNOSTICOpalorosa.pdf>

- Kumar, M; Shanker, V; Jaiswal, U. (2009). Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of in vitro raised plantlets. India. J. Fruit Orn. Plant Res. 17(1):29-38.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II (Segunda ed). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
https://es.scribd.com/document/467571168/ACFrOgANgXkuZXLpyogOQ7TR5R9CJB0mh0iZYW51-K-15vmbQVih8-vx3TS_rw6zIVsYU5cKDDWPGC7TUCGQMedMUBDIw5tfXQ3-d-Nc6C5vvBJcQ2By6d0IZgT8GITIr2Cdr8w1GpFkxhq0D-gT-p
- Leva, A. (2011). Innovative protocol for "ex vitro rooting" on olive micropropagation. Central European Journal of Biology 6(3): 352-358.
<https://link.springer.com/article/10.2478/s11535-011-0010-3#Abs1>
- Murashige, T; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plants* 15: 473 – 497.
[https://sciencedirect.com/journal/Physiologia/issue/S0032-0839\(62\)90001-6](https://sciencedirect.com/journal/Physiologia/issue/S0032-0839(62)90001-6)
- Materán M. E., Vega M. C., Sánchez-Olate M., Sáez K., Rodríguez R. y Ríos D. (2008). Reactivación de material vegetal élite de *Pinus radiata* d. Don. Mediante microinjerto *in vitro*. *Interciencia*. 33(1): 66-70.
- Martínez, R, A; Mosqueda, F, O; Daquinta, M; Escalona M, M. (2018). Efecto del Vitrofurax en la calidad morfofisiológica de brotes de caña de azúcar var. C 1051-73 propagado en Biorreactores de Inmersión Temporal. Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila. *Biotecnología Vegetal*. 18 (2): 87 – 95.
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/579/html>
- Merkle, S; Nairn, J. (2005). Tree biotechnology. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41:602–619.
- NCP (Nova Crop Protección CO. LTD). (2012). Silvestre Perú SAC de protección vegetal. Código: GS-SPS-RG-HS-126.
https://www.silvestre.com.pe/Epico_750_WG-HS/NOVA_CROP.
- Ochoa, V, M; Howat, S; Jang, M.O. et al. (2015). Cambial meristematic cells: a platform for the production of plant natural products. *New Biotechnol*, 32 (6): 581-586.
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.02.003>.
- Padrón, E. (1996). Diseños experimentales con aplicación a la agricultura. México: Trillas.
- Rojas, R, D. (2015). Árbol de comino (*Aniba perutilis* Hemsley): una planta maderable en peligro de extinción en el sur del departamento del Huila. (Trabajo presentado como

requisito para obtener el título de Ingeniera Agroforestal). Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD).

<https://es.scribd.com/document/404335554/UNAD>

Parrales, J; Hernández, A; Castro, C; Vera, M; Zhindón, A. (2017). Evaluación de medios de cultivo *in vitro* para especies forestales nativas en peligro de extinción en Ecuador. *Agronomía Costarricense*. 42(1), 63-89.

<https://www.redalyc.org/journal/436/43654703004/html/>

Pérez, M; Balch, E; Dávila, F. (2002) *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38: 73-78.

<https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/53954>

Reyes, H. (2015). Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Caoba). Facultad de Ciencias Ambientales. Universidad Estatal Amazónica - Ecuador. *Dirección de Investigación Científica y Tecnológica, Laboratorio de Biotecnología*. CP-6(2): 1-8.

https://www.researchgate.net/publication/283514154_PROPAGACION_CLONAL_in_vitro_DE_Swietenia_macrophylla_King_CAOPA

Solis Leyva, R. (2016). Morfogénesis invitro de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

Silva, J, L; Barbosa, S, P, de T; Gonçalves, de Q, B, C; Moura, H, L. (2010). Efecto de diferentes reguladores del crecimiento de regeneración *in vitro* de palo de roasa (*Aniba roseodora* Duke).

<https://www.semanticscholar.org/paper/Efeito-de-diferentes-reguladores-de-crecimento-na-Jardim-Sampaio/99c3d1c2dd8b190caabdaf8ca921106379919753>

Sultana, M; Gangopadhyay, G. (2018). Early expression of Wuschel is a marker for *in vitro* shoot morphogenesis in tobacco and Beta palonga. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC): 1–12.

https://www.researchgate.net/publication/325247628_Early_expression_of_WUSCHEL_is_a_marker_for_in_vitro_shoot_morphogenesis_in_tobacco_and_Beta_palonga

Smith, R. (2012). *Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments*. USA 3^{era} edition.

https://books.google.com.pe/books/about/Plant_Tissue_Culture.html?id=By8psdGWgbkC&redir_esc=y

Suárez, I. E., Jarma, A.J., Avila, M. (2006). Desarrollo de un protocolo para propagación *in vitro* de roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). Universidad de Córdoba. Departamento de Ingeniería Agronómica y Desarrollo Rural. 11(2), 52-62.

[Dialnet-DesarrolloDeUnProtocoloParaPropagacionInVitroDeRob-5002448.pdf](#)

Tarazona, F. (2017). Efecto de bencil aminopurina y ácido indolbutírico en la propagación *in vitro* de segmentos nodales de *cedrelinga catenaeformis* Ducke (tornillo). Universidad Nacional de Ucayali – Pucallpa.

<http://repositorio.unu.edu.pe/bitstream/handle/UNU/3389/000002343T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Tallón, C. I., Porras, I., & Pérez-Tornero, O. (2012). Efficient propagation and rooting of three citrus rootstocks using different plant growth regulators. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 48(5), 488-499.

<http://doi.org/10.1007/s11627-012-9457-9>

IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza). (2019). Lista Roja de Especies Amenazadas.

[Aniba rosaeodora. 2006 IUCN Lista Roja de Especies Amenazada.](#)

UNA (Universidad Nacional, Costa Rica). (2005). Manual de plaguicidas de Centroamérica. Benomil. N°CAS: 17804-35-2.

<http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/58-benomil>.

Varty, N. (1998). *Aniba rosodora*. *The IUCN Red. List of Threatened Species*.

<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1998.RLTS.T33958A68966060>.

ANEXOS

A. Fase de campo

- Extracción de los explantes

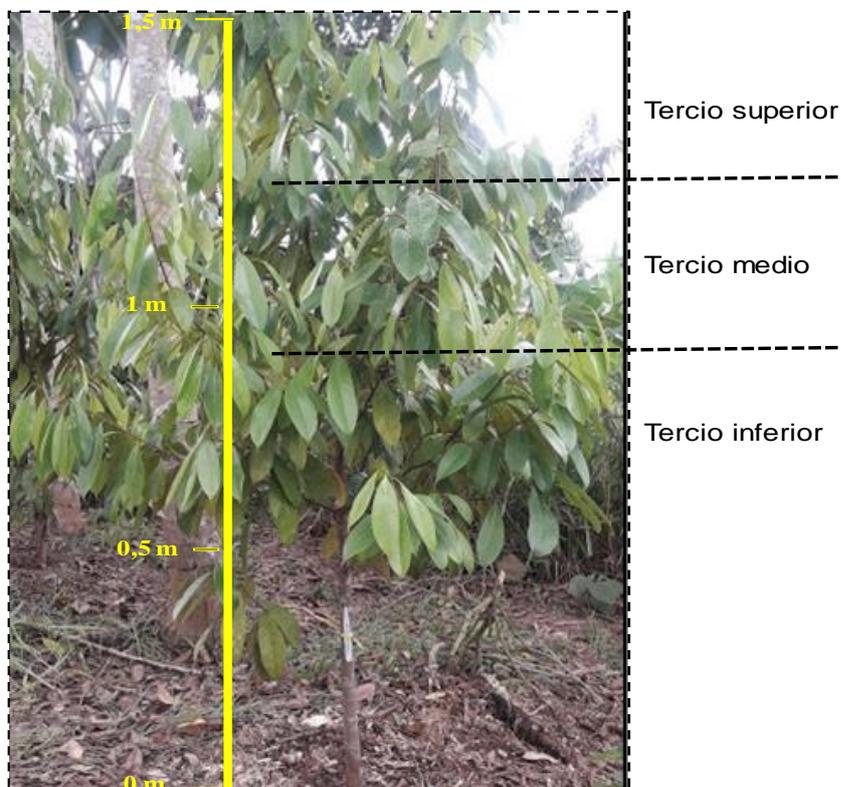


Figura 20. Cada planta madre fue dividida en tercios desde el suelo hasta el punto más alto, para designar los estratos inferior, medio y superior.

B. Tratamientos en estudio

Tabla 8.

Componentes de estudio.

Factores	Tipo de factor	Niveles de factores	Descripción de los factores
A	Fuente de citoquinina	A ₁	Kinetina
		A ₂	BAP
		A ₃	2ip
B	Tipo de explante	B ₁	Segmento nodal
C	Concentración	C ₁	0,45 μ M
		C ₂	2,32 μ M
		C ₃	23,23 μ M

Fuente propia

Tabla 9.*Plan de experimentación.*

Tratamientos	Factores	
	A	B
T ₁	Control	0
T ₂		0,45 uM
T ₃	Kinetina	2,32 uM
T ₄		23,23 uM
T ₅		0,45 uM
T ₆	BAP	2,32 uM
T ₇		23,23 uM
T ₈		0,45 uM
T ₉	2lp	2,32 uM
T ₁₀		23,23 uM

*Fuente propia***C. Cantidad de hormona aplicar****Tabla 10.***Cantidad de citoquinina a aplicar en 100 ml.*

Fuente de citoquinina	Tratamiento	Concentración (µM)	Concentración en ppm	Volumen de hormona (ml)
Kinetina	T ₁	-	-	-
	T ₂	0,45	0,09684	0,09684
	T ₃	2,32	0,499264	0,499264
	T ₄	23,23	4,999096	4,999096
BAP	T ₅	0,45	0,101385	0,0101385
	T ₆	2,32	0,522696	0,0522696
	T ₇	23,23	5,233719	0,5233719
	T ₈	0,45	0,09144	0,009144
2 lp	T ₉	2,32	0,471424	0,0471424
	T ₁₀	23,23	4,720336	0,4720336

Para convertir de μM a ppm se utilizó la siguiente fórmula

De ppm a μM :

$$\mu\text{M} = [\text{ppm}] \times 1000 / \text{Peso molecular}$$

De μM a ppm:

$$\text{ppm} = \text{Peso molecular} \times [\mu\text{M}] / 1000$$

Posteriormente para determinar el volumen final a aplicar en 800 ml de medio de cultivo se utilizó la fórmula de concentraciones:

$$C1 V1 = C2V2$$

Ejemplo en el caso del tratamiento 1

Se utilizó Kinetina cuyo peso molecular es 215,2; se convirtió a ppm de la siguiente manera:

$$X \text{ ppm} = \text{Peso molecular} \times [\mu\text{M}] / 1000$$

$$X \text{ ppm} = 215,2 \times 0,45 \mu\text{M} / 1000$$

$$X \text{ ppm} = 0,0968 \text{ ppm}$$

Seguidamente se calculó el volumen final aplicar de la solución stock de la hormona.

$C1 = 100 \text{ ppm}$ (la concentración en la que fueron preparadas las hormonas)

$V1 =$ Por determinar

$C2 =$ concentración en ppm transformadas para cada tratamiento

$V2 = 100 \text{ ml}$ cantidad de medio a utilizar en todos los tratamientos.

$$C1 V1 = C2 V2$$

$$100 \text{ ppm} \times X = 0,009684 \text{ ppm} \times 100 \text{ ml}$$

$$X = 0,0968 \text{ ppm} \times 100 \text{ ml} / 100 \text{ ppm}$$

$$X = 0,009684 \text{ ml}$$

D. Panel fotográfico

Resultados obtenidos según fuente de citoquina, concentración de citoquina y explantes del tercio superior.

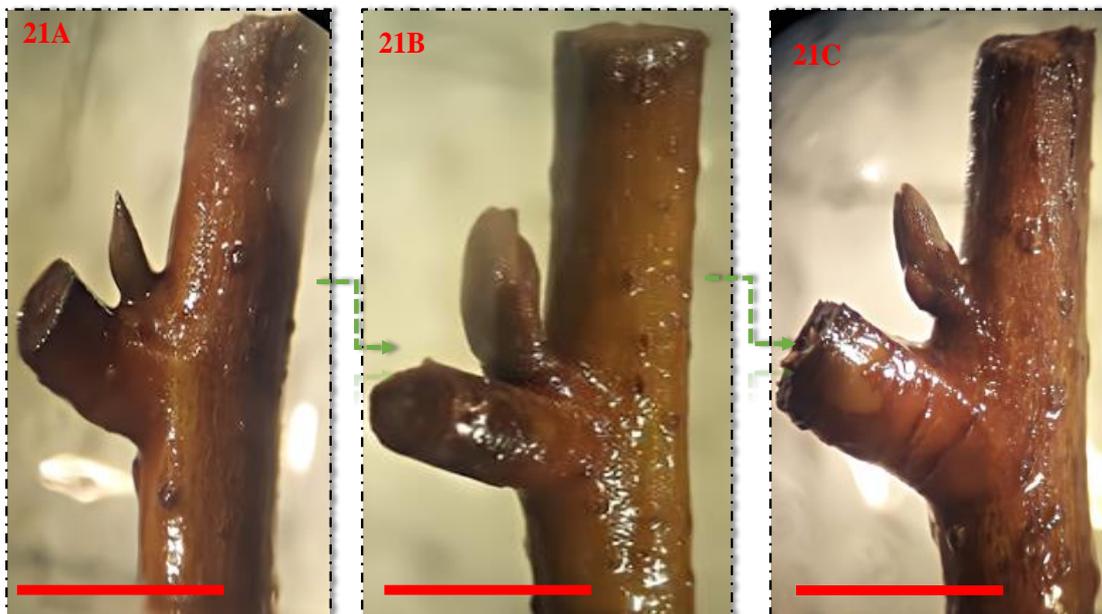


Figura 21. Bencil amino purina (BAP) a concentración de 2,32 μM . 21. A Brote a los 15 días (d.). 21. B Brote a los 30 d. 21. C Brote a los 45 d. Barras corresponden a escala 1 cm.

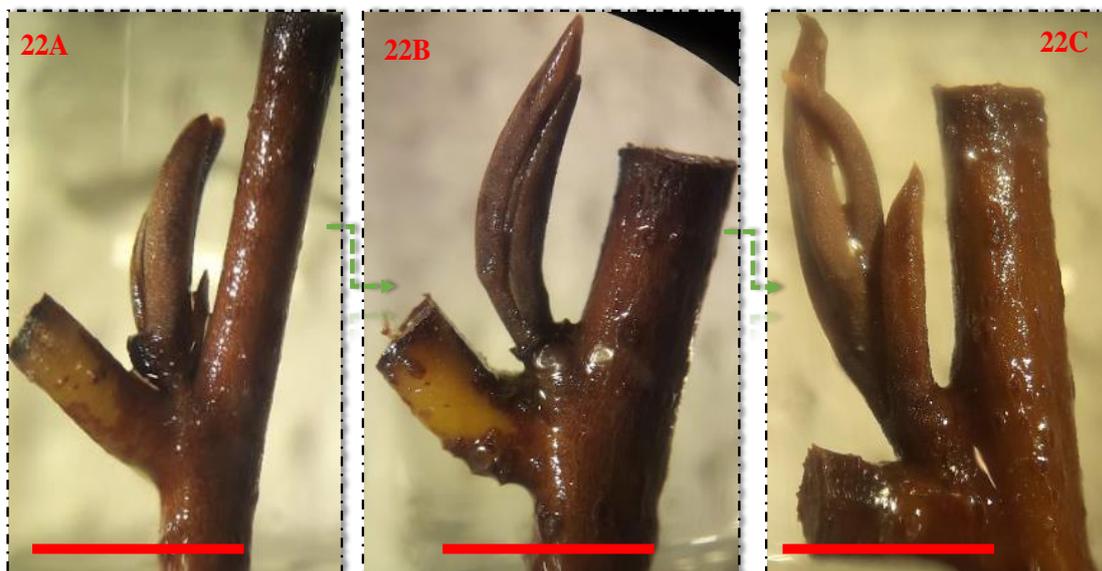


Figura 22. Bencil amino purina (BAP) a concentración de 2,32 μM . 22. A Brotes a los 60 días (d.). 22. B Brote a los 75 d. 22. C Brote a los 90 d. Barras corresponden a escala 1 cm.

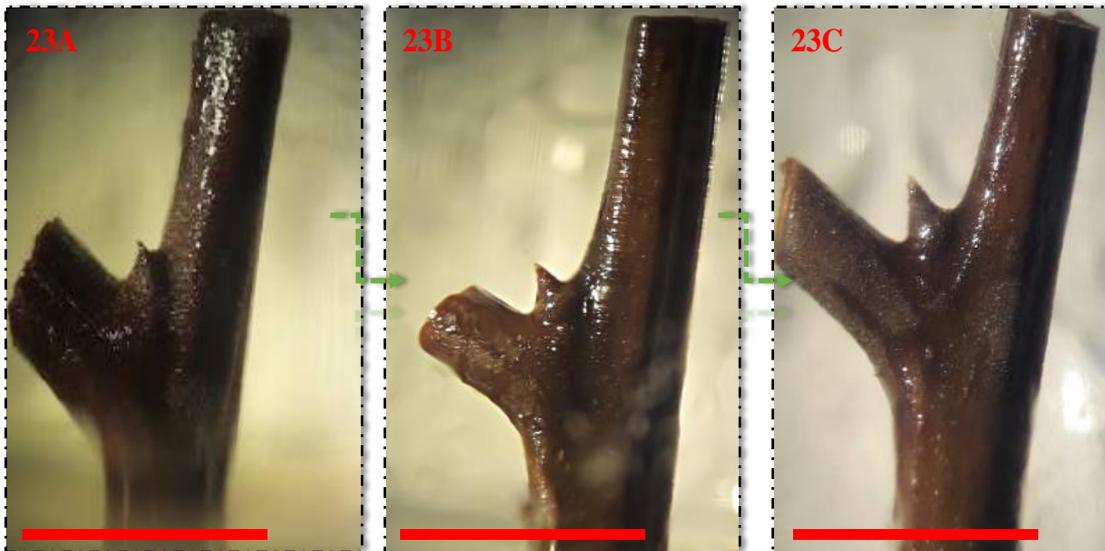


Figura 23. 2 isopentil adenina (2Ip) a concentración de 23,32 μM . **23. A** Brote a los 15 días (d.). **23. B** Brote e a los 30 d. **23.C** Brote a los 45 d. Barras corresponden a escala 1 cm.

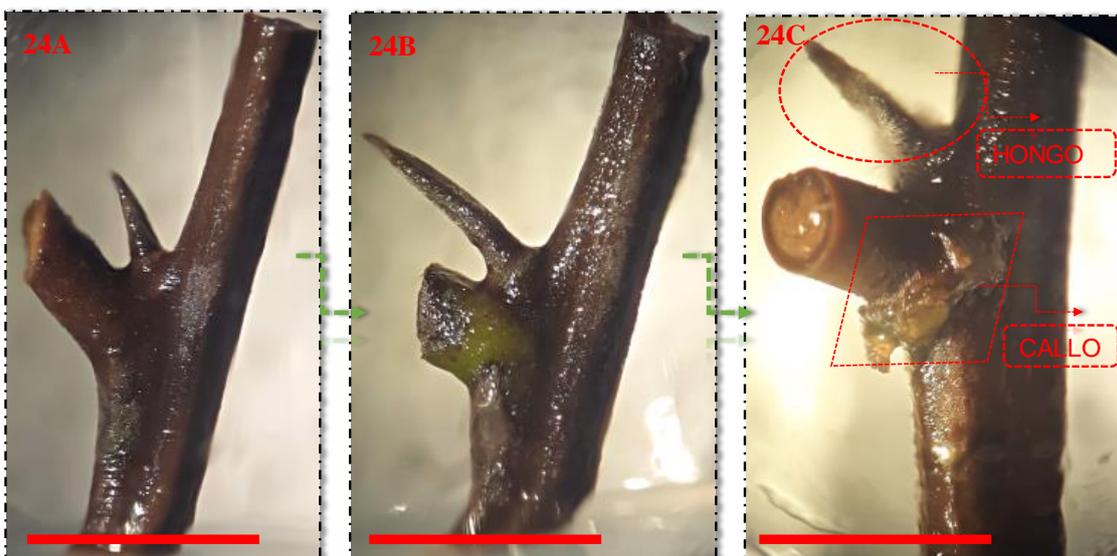


Figura 24. 2 isopentil adenina (2Ip) a concentración de 23,32 μM . **24. A** Brote a los 60 días (d.). **24. B** Brote a los 75 d. **24. C** La figura rombo de color rojo muestra la etapa inicial de la formación de callo y círculo color rojo muestras un brote a los 90 d. Barras corresponden a escala 1 cm.

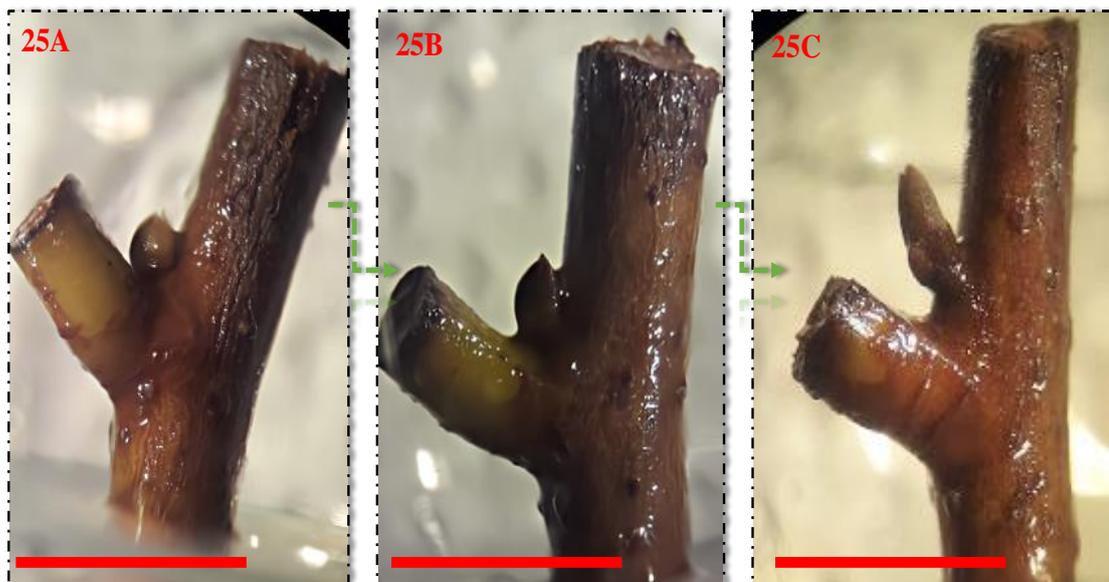


Figura 25. Kinetina (KIN) a concentración de $23,32 \mu\text{M}$. 25. A Brote a los 15 días (d.). 25. B Brote a los 30 d. 25. C Brote a los 45 d. Barras corresponden a escala 1 cm.

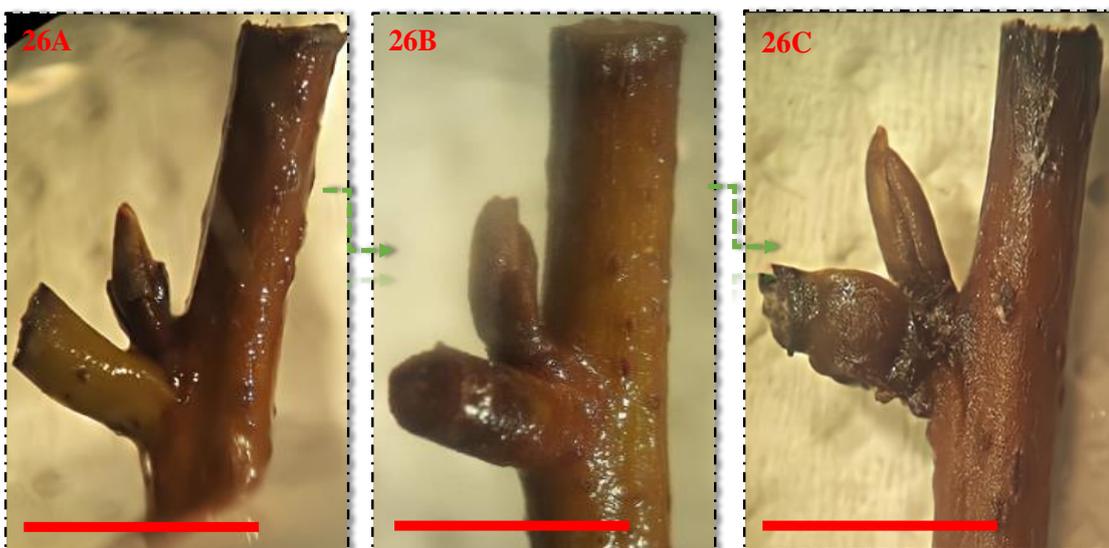


Figura 26. Kinetina (KIN) a concentración de $23,32 \mu\text{M}$. 26. A Brote a los 60 días (d.). 26. B Brote a los 75 d. 26. C Brote a los 90 d. Barras corresponden a escala 1 cm.

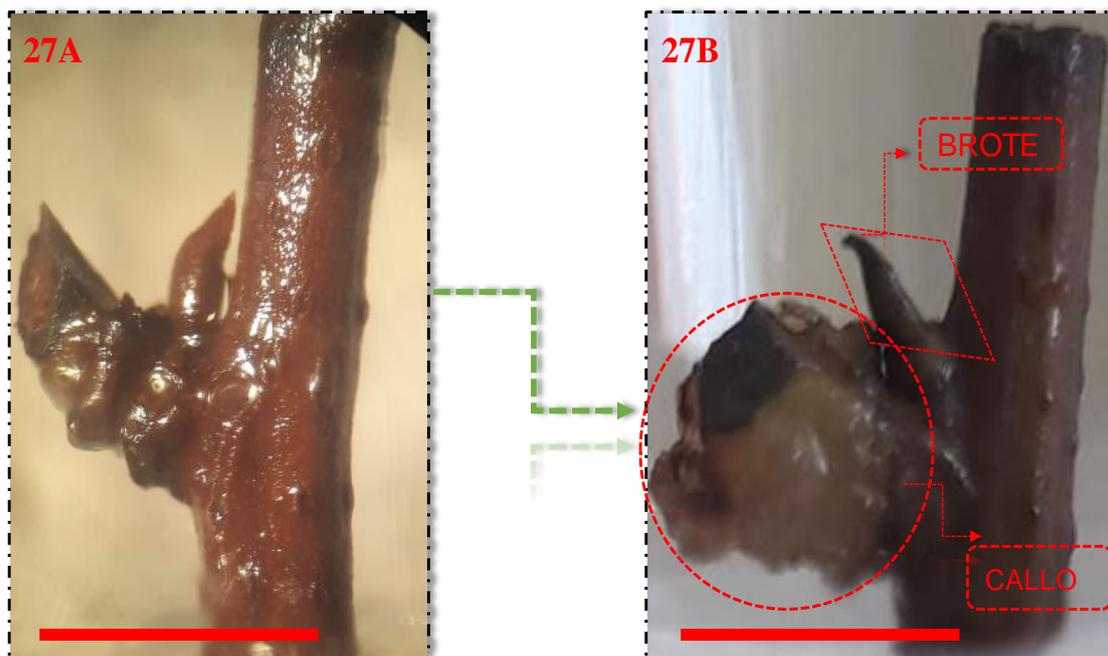


Figura 27. 2 isopentil adenina (2Ip) a concentración de 2,32 μM . 27. A Brote a los 60 días (d.). 27. B La figura rombo de color rojo te muestras la formación de un brote a los 90 d. y el círculo de color rojo muestras formación de un callo a los 90 d. Barras corresponden a escala 1 cm.

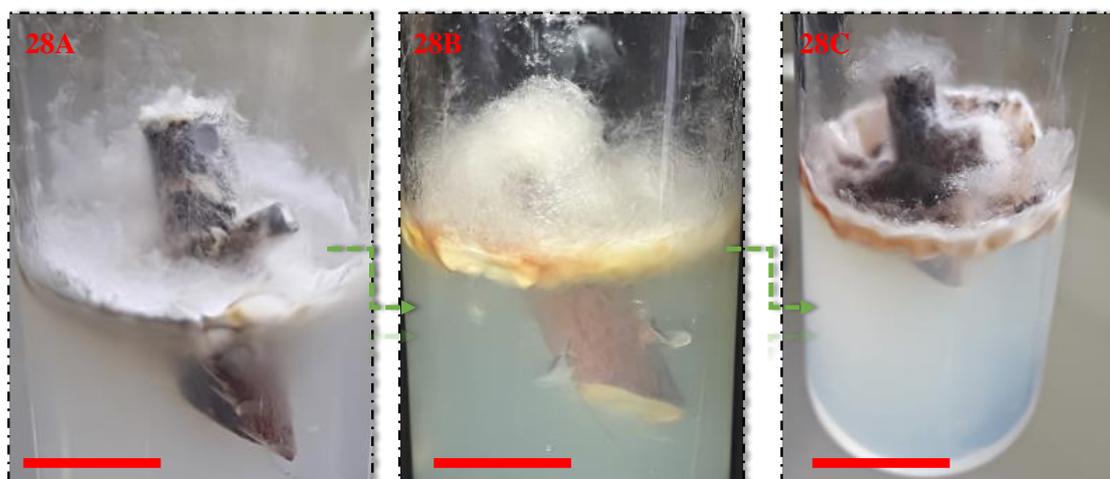


Figura 28. Segmentos contaminados. 28. A Segmento contamiando a 15 días (d.). 28. B Segmento contaminado por hongo y bacteria a los 30 d. 28. C Segmento contaminado por hongo y bacteria a los 30 d. Barras corresponden a escala 1 cm

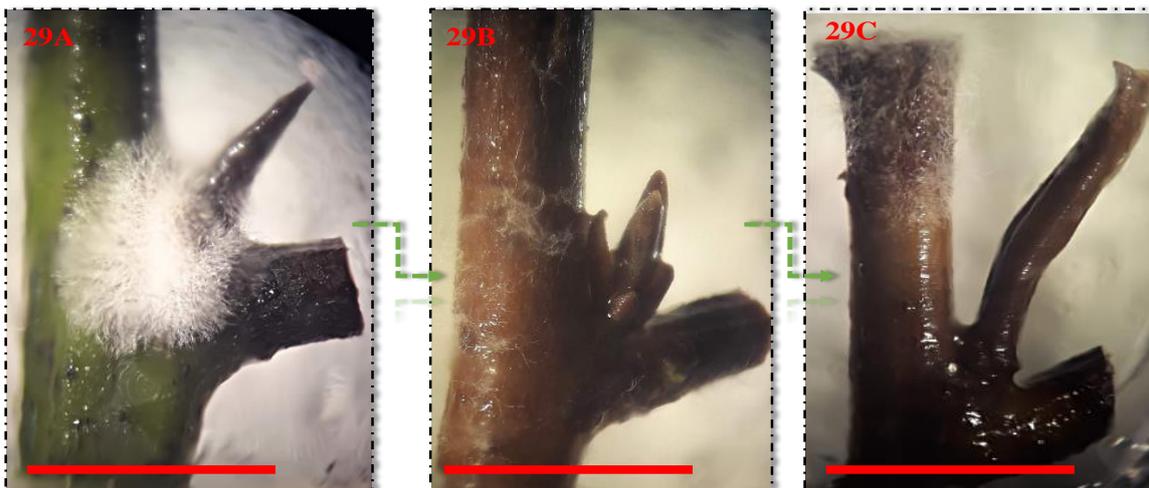


Figura 29. Brotes contaminados. 29. A Brote afectado con hongo a 75 días (d.). 29. B brote afecto por hongo a 45 d. 29. C Segmento afectado por hongo a los 90 d. Barras corresponden a escala 1 cm.



Figura 30. El estereoscopio. Nos permitio obtener imágenes con escala de un 1cm. Como se muestra en el panel fotografico.

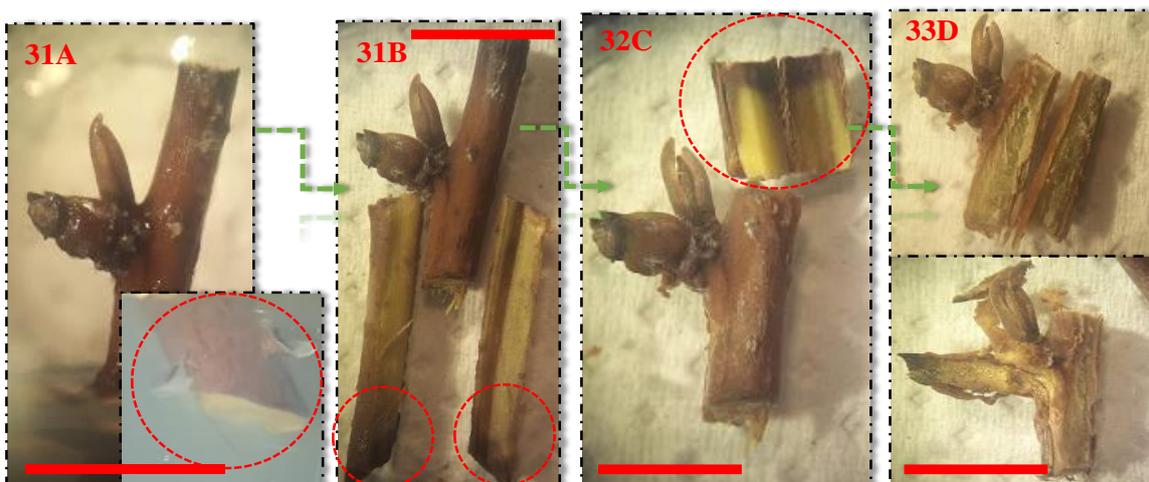


Figura 31. Muerte del brote. 31. A El círculo rojo muestra la ausencia de raíz en el segmento a 90 días (d.). 31. B Los círculos rojos indican la presencia de necrosis en la parte basal del explante a 90 d. 31. C El círculo rojo muestra la presencia de necrosis en las estructuras del segmento a los 90 d. 31. D Brote aún vivo. Barras corresponden a escala 1 cm.

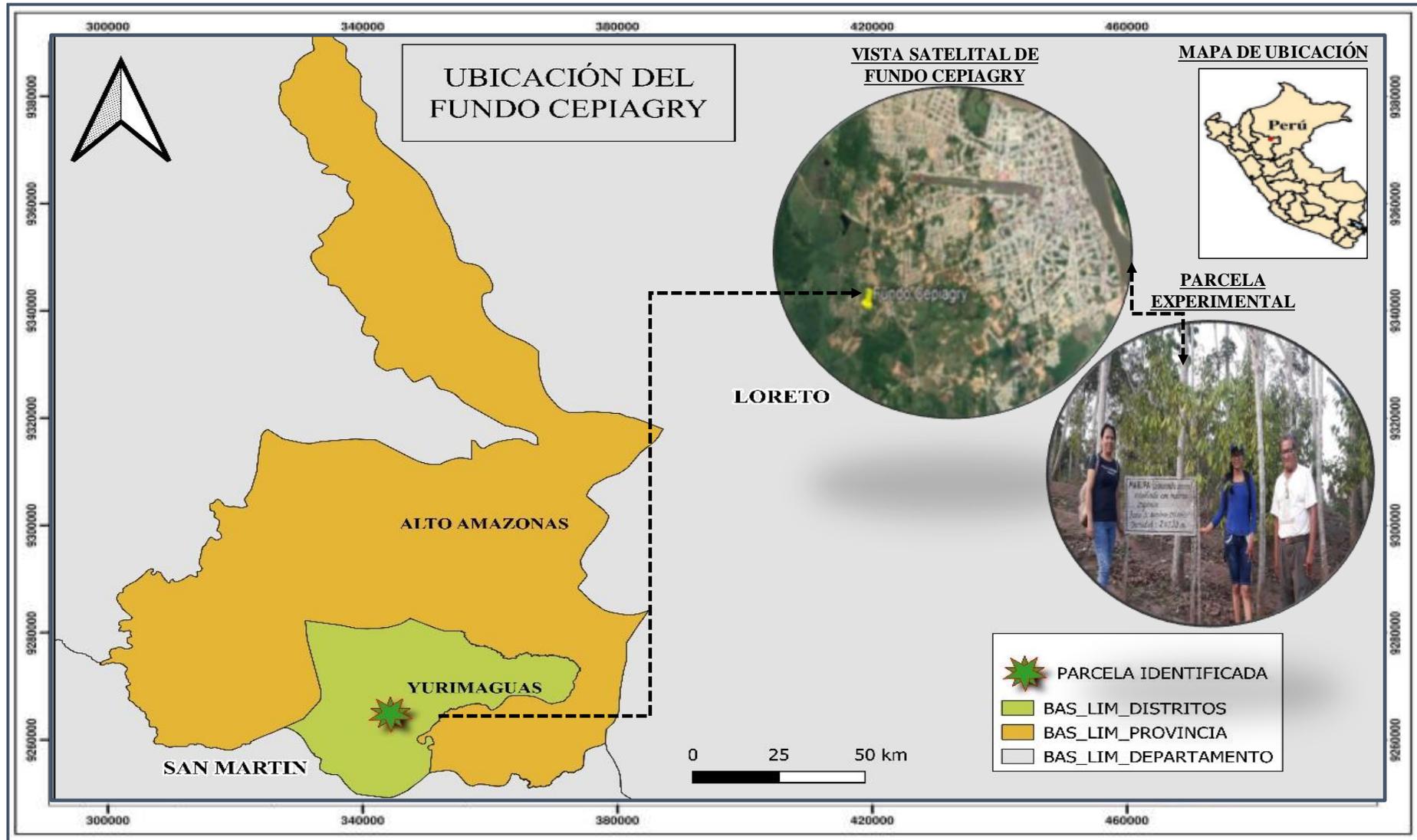


Figura 32. Mapa de ubicación. El mapa de ubicación referencia la ubicación del origen del material vegetativo. (Fuente propia)

E. Proceso de preparación de hormonas vegetales

Tabla 11.

Proceso de preparación de hormonas

	Nombre	Abreviatura	Peso molecular	Conc. de stock	Unid	Vol final Stock	Unid	Pesar	Unid	Solvente	Diluyente	Preparación
1	Bencil amino purina	BAP	225,3	100	mg/L	100	mL	0,0100	g	1N NaOH	Agua	Se agrega NaOH 1N hasta disolver completamente, luego agregar agua destilada estéril hasta enrazar a 100 mL. Se guarda en refrigeración.
3	2 isopentil adenina	2Ip	203,2	100	mg/L	100	mL	0,0100	g	1N NaOH	Agua	Se agrega NaOH 1N hasta disolver completamente, luego agregar agua destilada estéril hasta enrazar a 100 mL. Se guarda en refrigeración.
4	Kinetina	KIN	215,2	100	mg/L	100	mL	0,0100	g	1N NaOH	Agua	Se agregó NaOH 1N hasta disolver completamente, luego agregar agua destilada esteril hasta enrazar a 100 mL. Se guardó en refrigeración.

Fuente: (Amasifuén, 2019).

Efecto inductivo in vitro de citoquininas sobre el brotamiento de segmentos nodales de palo de rosa (*Aniba rosiodora* Ducke)

por Silvia Kareli Herrera Pinedo

Fecha de entrega: 01-sep-2022 10:53a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 1890715304

Nombre del archivo: INFORME_D_INFORME_DE_TESIS_-_PALO_DE_ROSA_KARELI.docx (21.62M)

Total de palabras: 12960

Total de caracteres: 71690

Efecto inductivo in vitro de citoquininas sobre el brotamiento de segmentos nodales de palo de rosa (*Aniba rosiodora* Ducke)

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unsm.edu.pe Fuente de Internet	3%
2	doi.org Fuente de Internet	3%
3	Submitted to Universidad Nacional de San Martín Trabajo del estudiante	1%
4	www.scielo.org.co Fuente de Internet	1%
5	www.scielo.sa.cr Fuente de Internet	1%
6	bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet	1%
7	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1%
8	docplayer.es Fuente de Internet	<1%