

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES**



**"MICROPROPAGACIÓN DE *Cedrela  
lilloi* C. DC. (CEDRO DE ALTURA) A  
PARTIR DE YEMAS APICALES  
PROVENIENTES DE EMBRIONES  
CIGÓTICOS GERMINADOS *in vitro*"**

Presentado por:

**Renzo Carlos Vergara Arellano**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO FORESTAL

---

Lima - Perú  
2018

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos para calificar la sustentación del Trabajo de Tesis, presentado por el ex-alumno de la Facultad de Ciencias Forestales, Bach. **RENZO CARLOS VERGARA ARELLANO**, intitulado "**MICROPROPAGACIÓN DE *CEDRELA LILLOI* C. DC. (CEDRO DE ALTURA) A PARTIR DE YEMAS APICALES PROVENIENTES DE EMBRIONES CIGÓTICOS GERMINADOS *IN VITRO***"

Oídas las respuestas a las observaciones formuladas, lo declaramos:

.....

con el calificativo de .....

En consecuencia queda en condición de ser considerado APTO y recibir el título de INGENIERO FORESTAL.

La Molina, 27 de Abril de 2018

.....  
Ing. Ignacio Lombardi Indacochea  
Presidente

.....  
Mg. Sc. María de Lourdes Tapia y  
Figueroa  
Miembro

.....  
Ing. Fernando Bulnes Soriano  
Miembro

.....  
Dr. Gilberto Domínguez Torrejón  
Asesor

Blgo. Rosa María Cabrera Pintado  
Coasesor

## *DEDICATORIA*

*A mis padres, Alci y Charles.*

*A Chavi y a Nish.*

## *AGRADECIMIENTOS*

*Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Dios, a mis padres, familiares, amigos, asesores y profesores de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional Agraria la Molina y especialmente, a la Blga. Rosa Cabrera Pintado del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Sub dirección de Biotecnología de la Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología del Instituto Nacional de Innovación Agraria del Ministerio de Agricultura y Riego y al profesor Gilberto Domínguez Torrejón.*

## *RESUMEN*

*Cedrela lilloi* C. DC, es una especie que ha sido poco estudiada para mejorar métodos de propagación que conduzca a lograr plantas de calidad. La propagación *in vitro* es un técnica que aporta la posibilidad de multiplicación de plantas de manera más rápida y controlada que los métodos tradicionales empleados en vivero, sin embargo, se debe realizar una elección apropiada de la composición química del medio de cultivo en función de la especie, es por ello, que se desarrolló la presente investigación teniendo como objetivo alcanzar un protocolo de micropropagación de *Cedrela lilloi* C. DC. que permita obtener una tasa de multiplicación, un porcentaje de enraizamiento y un porcentaje de sobrevivencia en su aclimatación, favorables. Esta tarea se realizó a partir de yemas apicales que provienen de embriones cigóticos germinados *in vitro*. Los resultados obtenidos muestran un porcentaje del 72.5 % de germinación a las cuatro semanas, en la fase inicial de su establecimiento en medio MS (Murashige y Skoog, 1962). Se obtuvo una tasa de multiplicación de 3,13 en el primer subcultivo a la quinta semana, en un medio de cultivo MS (1962) enriquecido con 0,5 mg/L de Zeatina-ZEA. Los efectos más favorables para el enraizamiento *in vitro* se mostraron en un medio de cultivo MS (1962) enriquecido con 0,5 mg/L de la auxina ácido indolacético-AIA al igual que en un medio de cultivo MS (1962) sin adicionar auxinas, los cuales no presentaron diferencias significativas a la quinta semana, en cuanto al porcentaje de enraizamiento, número y longitud de raíz promedio. En la fase de aclimatación a las ocho semanas, no existen diferencias significativas al 95% de confiabilidad en cuanto a los sustratos empleados, con la posibilidad de utilizar pastillas Jiffy o Premix #8, obteniéndose un porcentaje de sobrevivencia de 92% y 82% respectivamente.

Palabras claves: Micropropagación, *Cedrela lilloi* C. DC., citoquininas, auxinas, enraizamiento, aclimatación.

# ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>I. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Revisión de Literatura .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Clasificación taxonómica.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Distribución geográfica.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Descripción botánica .....</b>	<b>5</b>
3.1. Aspecto general.....	5
3.2. Corteza.....	5
3.3. Hojas .....	5
3.4. Flores.....	5
3.5. Frutos .....	5
3.6. Semilla .....	5
3.7. Fenología .....	5
3.8. Usos.....	6
<b>4. Situación de amenaza .....</b>	<b>6</b>
<b>5. Métodos de propagación .....</b>	<b>8</b>
5.1. Propagación por semillas .....	8
5.2. Propagación por estacas .....	8
5.3. Propagación <i>in vitro</i> .....	8
<b>6. Biotecnología .....</b>	<b>9</b>
6.1. Cultivo de tejidos vegetales .....	9
6.2. Micropropagación.....	10
6.3. Fases de la micropropagación.....	12
6.3.1. Fase 0: Acondicionamiento o preparación de la planta madre.....	12
6.3.2. Fase 1: Establecimiento o iniciación .....	12
6.3.3. Fase 2: Multiplicación o proliferación.....	13
6.3.4. Fase 3: Enraizamiento.....	14
6.3.5. Fase 4: Aclimatación.....	14
6.4. Medio de cultivo.....	15
6.5. Reguladores de crecimiento.....	16
6.6. Condiciones de incubación .....	17
6.7. Micropropagación de especies forestales.....	17
<b>III. Materiales y Métodos .....</b>	<b>19</b>
<b>1. Ubicación geográfica .....</b>	<b>19</b>
<b>2. Materiales .....</b>	<b>19</b>
2.1. Material vegetal.....	19
2.2. Materiales de laboratorio .....	20
2.3. Insumos (reactivos, sustancias, medios de cultivo y otros).....	20
2.4. Equipos de laboratorio .....	21
2.5. Otros .....	22
2.6. Condiciones de incubación .....	22
<b>3. Métodos .....</b>	<b>23</b>
3.1. Establecimiento del cultivo o iniciación .....	23
3.1.1. Medio de cultivo .....	23
3.1.2. Desinfección de semillas .....	23
3.1.3. Siembra de embriones cigóticos <i>in vitro</i> .....	25
3.1.4. Evaluación de la fase de establecimiento .....	26

3.2.	Multiplicación de brotes.....	27
3.2.1.	Preparación del medio de cultivo.....	28
3.2.2.	Siembra de yemas apicales <i>in vitro</i> .....	30
3.2.3.	Subcultivo de yemas apicales .....	30
3.2.4.	Diseño experimental para la fase de multiplicación.....	31
3.2.5.	Evaluación de la fase de multiplicación.....	32
3.3.	Enraizamiento.....	34
3.3.1.	Diseño experimental para la fase de enraizamiento .....	35
3.3.2.	Evaluación de la fase de enraizamiento .....	36
3.4.	Aclimatación .....	37
3.4.1.	Diseño experimental para la fase de aclimatación .....	39
3.4.2.	Evaluación de la fase de aclimatación.....	39
<b>IV.</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>41</b>
<b>1.</b>	<b>Establecimiento del cultivo o iniciación .....</b>	<b>41</b>
1.1.	Porcentaje de contaminación en siembra CS (%).....	41
1.2.	Porcentaje de germinación (%).....	43
<b>2.</b>	<b>Multiplicación de brotes apicales .....</b>	<b>45</b>
2.1.	Variable: Tasa de multiplicación.....	45
2.1.1.	Tasa de multiplicación subcultivo 1 – siembra de yemas apicales .....	45
2.1.2.	Tasa de multiplicación subcultivo 2.....	47
2.1.3.	Tasa de multiplicación subcultivo 3.....	48
2.1.4.	Tasa de multiplicación subcultivo 4.....	49
2.1.5.	Tasa de multiplicación subcultivo 5.....	50
2.1.6.	Determinación de la tasa de multiplicación en cinco subcultivos .....	50
2.1.7.	Evaluación del sexto subcultivo en el tratamiento T5.....	54
2.2.	Variable: Formación de callo .....	55
2.3.	Variable: Necrosis .....	55
<b>3.</b>	<b>Enraizamiento .....</b>	<b>56</b>
3.1.	Porcentaje de enraizamiento (%).....	56
3.2.	Número de raíces por explante.....	57
3.3.	Longitud de raíz .....	58
3.4.	Formación de callo.....	60
<b>4.</b>	<b>Aclimatación.....</b>	<b>62</b>
4.1.	Porcentaje de sobrevivencia .....	62
4.2.	Incremento en altura ( $\Delta h$ ) .....	63
4.3.	Incremento en el número de hojas ( $\Delta \#h$ ).....	64
<b>V.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>65</b>
<b>VI.</b>	<b>Recomendaciones .....</b>	<b>67</b>
<b>VII.</b>	<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>69</b>
<b>VIII.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>75</b>

## Índice de tablas

	Página
Tabla 1:	Composición de medios de cultivo MS y WPM..... 16
Tabla 2:	Concentración de insumos empleados para la preparación del medio de cultivo para el establecimiento..... 23
Tabla 3:	Concentración de insumos empleados para la preparación de medio de cultivo de la fase de multiplicación ..... 28
Tabla 4:	Tratamientos desarrollados en la fase de multiplicación ..... 29
Tabla 5:	Diseño experimental para la fase de multiplicación..... 31
Tabla 6:	Clasificación de grado de formación de callo en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Cedrela lilloi</i> C. DC..... 32
Tabla 7:	Clasificación de grado de necrosis en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Cedrela lilloi</i> C. DC. .... 33
Tabla 8:	Tratamientos evaluados en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Cedrela lilloi</i> C. DC. .... 34
Tabla 9:	Diseño experimental para la fase de enraizamiento de <i>Cedrela lilloi</i> C. DC..... 36
Tabla 10:	Tratamientos de la fase de aclimatación <i>ex vitro</i> de <i>Cedrela lilloi</i> C. DC. .... 38
Tabla 11:	Diseño experimental para la fase de aclimatación de <i>Cedrela lilloi</i> C. DC. .... 39
Tabla 12:	Comparación de medias para la tasa de multiplicación en el subcultivo 1 ..... 46
Tabla 13:	Comparación de medias para la tasa de multiplicación en el subcultivo 2 ..... 47
Tabla 14:	Comparación de medias para la tasa de multiplicación en el subcultivo 3 ..... 48
Tabla 15:	Comparación de medias para la tasa de multiplicación en el subcultivo 4 ..... 49
Tabla 16:	Comparación de medias para la tasa de multiplicación en el subcultivo 5 ..... 50
Tabla 17:	Tasa promedio de multiplicación por subcultivo y por tratamiento ..... 51
Tabla 18:	Comparación de medias para el número de raíces de la fase de enraizamiento... 58
Tabla 19:	Comparación de medias para la longitud de raíz (mm) en la fase de enraizamiento ..... 59
Tabla 20:	Comparación de medias para el incremento en altura de la fase de aclimatación..... 64
Tabla 21:	Comparación de medias del incremento del número de hojas de la fase de aclimatación..... 64



## Índice de figuras

	Página
Figura 1: Muestra botánica de <i>Cedrela lilo</i> C. DC.....	7
Figura 2: <i>Cedrela lilloi</i> C. DC.: (A) Semillas; (B) embrión cigótico.....	19
Figura 3: Desinfección superficial de semillas: .....	25
Figura 4: Disección de cigóticos de <i>Cedrela lilloi</i> C. DC: .....	26
Figura 5: Desarrollo del subcultivo 2 de la fase de multiplicación .....	28
Figura 6: Multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Cedrela lilloi</i> .....	31
Figura 7: Clasificación de grado de formación de callo en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Cedrela lilloi</i> C. DC.....	33
Figura 8: Clasificación de grado de necrosis en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Cedrela lilloi</i> C. DC. ....	34
Figura 9: Desarrollo de la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Cedrela lilloi</i> .....	35
Figura 10: Clasificación visual de grado de formación de callo en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Cedrela lilloi</i> C. DC. ....	37
Figura 11: Desarrollo de la fase de aclimatación <i>ex vitro</i> de <i>Cedrela lilloi</i> .....	38
Figura 12: Plántulas de <i>Cedrela lilloi</i> en cámara de crecimiento vegetal en la fase de aclimatación.....	39
Figura 13: Contaminación de embriones cigóticos en el establecimiento <i>in vitro</i> .....	42
Figura 14: Agentes contaminantes presentes en la fase de iniciación <i>in vitro</i> de <i>Cedrela lilloi</i> .....	42
Figura 15: Porcentaje de germinación de embriones cigóticos sembrados en la fase de establecimiento del cultivo.....	44
Figura 16: Visualización de la respuesta a la germinación <i>in vitro</i> de embriones cigóticos de <i>Cedrela lilloi</i> en la fase de establecimiento del cultivo.....	45
Figura 17: Fase de multiplicación – tercer subcultivo .....	52
Figura 18: Fase de multiplicación – cuarto subcultivo .....	52
Figura 19: Fase de multiplicación – quinto subcultivo .....	53
Figura 20: Número de brotes promedio por subcultivo obtenidos en el tratamiento T5. ....	54
Figura 21: Formación promedio de callo en cinco subcultivos consecutivos expresado en porcentaje (%) por tratamiento en la fase de multiplicación.....	55
Figura 22: Promedio de necrosis en cinco subcultivos consecutivos expresados en porcentaje (%) por tratamiento en la fase de multiplicación.....	56
Figura 23: Porcentaje de enraizamiento por tratamiento evaluado .....	57
Figura 24: Fase de enraizamiento: Plántulas enraizadas a la octava semana en T1 y T6. ....	59

Figura 25:	Formación de callo (%) por grado en cada tratamiento desarrollado de la fase de enraizamiento.....	60
Figura 26:	Fase de enraizamiento. ....	61
Figura 27:	Porcentaje de sobrevivencia (%) por tratamiento en la fase de aclimatación .....	62
Figura 28:	Fase de aclimatación .....	63

## Índice de anexos

	Página
Anexo 1 Constancia de determinación botánica <i>Cedrela lilloi</i> C. DC. ....	75
Anexo 2 Ficha técnica semillas de <i>Cedrela lilloi</i> c. DC.....	76
Anexo 3 Ficha técnica sustrato jiffy 50f .....	77
Anexo 4 Ficha técnica sustrato PREMIX #8 .....	78
Anexo 5 Resultados estadísticos de la tasa de multiplicación .....	79
Anexo 6 Tasa promedio de multiplicación por subcultivo $\pm$ desviación estándar .....	82
Anexo 7 Grado de formación de callo promedio por tratamiento en la fase de multiplicación $\pm$ desviación estándar.....	83
Anexo 8 Grado de necrosis promedio por tratamiento en la fase de multiplicación $\pm$ desviación estándar .....	86
Anexo 9 Resultados estadísticos del número de raíces en la fase de enraizamiento .....	89
Anexo 10 Resultados estadísticos de longitud de raíz en la fase de enraizamiento .....	90
Anexo 11 Preparación de medios de cultivo.....	91
Anexo 12 Fase de multiplicación de brotes <i>in vitro</i> de <i>Cedrela lilloi</i> c. DC. ....	92
Anexo 13 Fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Cedrela lilloi</i> C. DC. ....	93
Anexo 14 Fase de aclimatación <i>ex vitro</i> de <i>Cedrela lilloi</i> C. DC. ....	94
Anexo 15 Proceso de micropropagación de <i>Cedrela lilloi</i> C. DC. ....	95
Anexo 16 Evaluación del número de brotes, formación de callo y necrosis de la fase de multiplicación – primer subcultivo. ....	96
Anexo 17 Evaluación del número de brotes, formación de callo y necrosis de la fase de multiplicación –segundo subcultivo. ....	100
Anexo 18 Evaluación de número de brotes, formación de callo y necrosis de la fase de multiplicación –tercer subcultivo.....	104
Anexo 19 Evaluación del número de brotes, formación de callo y necrosis de la fase de multiplicación – cuarto subcultivo.....	108
Anexo 20 Evaluación del número de brotes, formación de callo y necrosis de la fase de multiplicación –quinto subcultivo. ....	112
Anexo 21 Evaluación del número de brotes, formación de callo y necrosis de la fase de multiplicación sexto subcultivo. ....	116
Anexo 22 Evaluación del número de raíces, longitud de raíz y formación de callo de la fase de enraizamiento. ....	117
Anexo 23 Evaluación de altura y número de hojas inicial y final de la fase de aclimatación. ....	119

Anexo 24 Protocolo para la micropropagación de <i>Cedrela lilloi</i> C. DC. (cedro de altura) a partir de yemas apicales provenientes de embriones cigóticos germinados <i>in vitro</i> .....	120
---	-----

## I. INTRODUCCIÓN

El Perú es reconocido como un país megadiverso, pues posee dentro de sus fronteras 84 de las 117 zonas de vida reconocidas en el mundo. El 57% de su territorio está cubierto por bosques y su gran complejidad vegetal ha sido utilizada por los seres humanos desde tiempos remotos. Uno de los grandes retos ha sido el de propagar y conservar las especies de manera sostenible (MINAM, 2012).

Por un lado, el país pierde anualmente un promedio de 120 782 hectáreas de bosque. Por otro lado, la superficie acumulada de reforestación al 2015, fue de 1,06 millones de hectáreas. Las regiones Cusco, Cajamarca, Ancash y Apurímac destacan por ser las regiones donde hubo mayores índices de reforestación. Sin embargo, la tasa de reforestación ha ido decreciendo en los últimos cinco años (MINAGRI, 2016). En este contexto, el SERFOR (2016) estima que el país posee alrededor de 10,5 millones de hectáreas potenciales para la reforestación, de las cuales 7,5 millones están en la sierra, 2,5 millones en la selva y 0,5 millones en la costa.

Entre las especies forestales plantadas que predominan en la sierra del país para la obtención de madera y leña se encuentran aquellas exóticas, tales como el eucalipto (*Eucalyptus* spp.), el pino (*Pinus* spp.), en menor medida el ciprés (*Cupressus* sp.) y algunas especies nativas como el quinal (*Polylepis* spp.) (Guariguata *et al.*, 2017).

*Cedrela lilloi* C. DC. (cedro de altura) es una especie forestal que en el pasado fue muy abundante en los valles andinos peruanos y posee una madera muy trabajable y durable, excelente para la ebanistería. Sin embargo, la pérdida de viabilidad de sus semillas bajo almacenamiento es acelerada, la cual desciende sustancialmente en el periodo de un año (Reynel *et al.*, 2009).

La reforestación en el ámbito mundial se está orientando hacia la propagación vegetativa y la silvicultura clonal. La biotecnología por medio del cultivo de tejidos vegetales es una alternativa que ofrece los medios necesarios para lograr mayores ganancias genéticas en el menor tiempo posible, pues, entre otras ventajas, puede evitar la fuerte dependencia de semillas botánicas provenientes de rodales naturales de procedencia desconocida. De esta

manera, se incrementan las posibilidades de una oferta sostenible de semilla vegetativa durante todo el año y se multiplican los genotipos superiores de la especie (Soudre, 2010).

La presente investigación tiene por objetivo proponer un protocolo de micropropagación de *Cedrela lilloi* C. DC. (cedro de altura) a partir de yemas apicales provenientes de embriones cigóticos germinados *in vitro*.

Por tanto, se plantea los siguientes objetivos específicos.

- Evaluar la tasa de germinación de plantas germinadas *in vitro* de *Cedrela lilloi*.
- Evaluar el efecto del medio de cultivo adecuado y diferentes concentraciones de citoquininas en la multiplicación *in vitro* de *Cedrela lilloi* a partir de yemas apicales.
- Evaluar el efecto del medio de cultivo adecuado y diferentes concentraciones de auxinas en el enraizamiento *in vitro* de microestacas de *Cedrela lilloi*.
- Evaluar el sustrato adecuado para la aclimatación de plántulas de *Cedrela lilloi* procedente de la aplicación de técnicas de micropropagación.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Pennington, citado por Toledo *et al.* (2008) refiere que el género *Cedrela* pertenece a la familia Meliaceae, la cual está constituida principalmente por árboles y arbustos pertenecientes al Orden Sapindales. La familia incluye alrededor de 50 géneros y 550 especies distribuidos por todas las regiones tropicales del planeta. En el Neotrópico se han identificado ocho géneros: *Cabrlea*, *Carapa*, *Cedrela*, *Guarea*, *Ruegea*, *Schmardea*, *Swietenia*, y *Trichilia*.

Styles, citado por Lombardi (2014) señala que el género *Cedrela* fue establecido por P. Browne en 1756. En 1981 Styles junto con Ma. T. Germán revisa el género, quienes reconocen siete especies: *Cedrela fissilis* Vellozo; *C. lilloi* C. de Candolle; *C. montana* Moritz ex Turczaninov; *C. oaxacensis* C. de Candolle & Rose; *C. odorata* Linnaeus; *C. salvadorensis* Standley y *C. tonduzii* C. de Candolle. Los mismos autores consideran cuatro especies como imperfectamente conocidas. *C. angustifolia* Moçião y Sessé Ex P. de Candolle; *C. discolor* S.F. Blake; *C. imparipinnata* C. de Candolle y *C. weberbaueri* Harms.

De acuerdo con el sistema de clasificación basado en el Angiosperm Phylogeny Group APG II (2003), la posición taxonómica de *Cedrela lilloi* obedece a la siguiente jerarquía:

División: Angiospermae

Clase: Eurosidas II

Orden: Sapindales

Familia: Meliaceae

Género: *Cedrela*

Especies: *Cedrela lilloi* C. de Candolle

Sinonimia botánica: *Cedrela boliviana* Rusby; *Cedrela steinbachii* Harms; *Cedrela herrerae* Harms; *Cedrela angustifolia* sensu Adr. Jussieu (EMBRAPA 2005).

Nombres vulgares: en Perú, atoc cedro y cedro virgen; en Argentina, cedro salteño y cedro de Tucumán (EMBRAPA 2005).

Etimología: el nombre genérico *Cedrela* viene de Cedrus, porque el árbol emite perfume a semejanza del legítimo cedro. En el griego kedros (cedro) que, a su vez, procede de keein, kaiein (quemar, perfumar, purificar), por el hecho de que el leño del cedro se utiliza para perfumar ambientes; el epíteto específico lilloi es en homenaje a Miguel Lillo (1862 a 1931), botánico argentino, que prestó el nombre al Instituto Miguel Lillo, con sede en Tucumán, Argentina (EMBRAPA 2005).

## **2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA**

La distribución de *Cedrela lilloi* está confinada a Sudamérica, ocurriendo en Bolivia, Perú, Brasil y Argentina. En Bolivia y Argentina en bosques de montaña, en altitudes de 1000 a 3400 msnm, pero también reportada en altitudes hasta de 800 msnm. En Perú, ocurre en valles altos en donde forma bosquetes extensos y es cultivada como árbol de sombra, es una especie resistente al frío, decidua en invierno y tiene importancia local como maderable (Lombardi 2014).

Reynel y Marcelo (2009) señalan que en el Perú, *Cedrela lilloi*, se encuentra mayormente en el centro y sur del país, en áreas de sierra y ceja de selva, en bosques premontanos y montanos, subhúmedos y húmedos, entre 500 y 3 500 msnm. Se le observa cultivada o en zonas de bosque maduro. La biotemperatura en estas zonas de vida se encuentra entre 10-18 °C y precipitaciones anuales entre 1 000 y 2 000 mm.

Una revisión en línea de las colecciones botánicas del Jardín Botánico de Missouri (2017) evidencian ejemplares colectados en las regiones del Perú de Amazonas, Ancash, Apurímac, Cajamarca, Cusco, Junín, Pasco y Piura.

De la misma manera, AGRORURAL (2010) reporta que se encuentra distribuida en el Valle del Urubamba (Cusco), Valle del Mantaro (Junín), Callejón de Conchucos (Ancash) y Cajamarca.



### **3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA**

La descripción botánica de la especie según Reynel *et al.* (2009) es la siguiente:

#### **3.1. ASPECTO GENERAL**

Árbol de porte mediano a grande. Mide entre 18 a 40 metros de altura y de 40 a 200 centímetros de diámetro. Tiene la copa globosa y el follaje denso.

#### **3.2. CORTEZA**

La corteza externa es agrietada, de color marrón claro. Desprende placas leñosas, alargadas, de unos 10 a 15 centímetros de longitud por 3 a 4 de ancho. La corteza interna es de color rosado muy claro. Es fibrosa y tiene un olor tenue similar al de los ajos.

#### **3.3. HOJAS**

Las hojas son compuestas, pinnadas, alternas y dispuestas en espiral. Miden unos 35 cm a 40 cm de longitud y tienen tendencia a agruparse en los extremos de las ramitas. Tienen 7 a 9 pares de láminas oblongas, algo asimétricas, de unos 13 a 16 cm de longitud por 3 a 5 cm de ancho, con el ápice agudo y largo, base obtusa y asimétrica, y borde entero. Las láminas no tienen pelos.

#### **3.4. FLORES**

Las flores se hallan dispuestas en panículas axilares de 25 a 50 centímetros de longitud, con gran cantidad de flores. Las flores son pequeñas, de unos 8 a 10 milímetros de longitud. Son hermafroditas (tienen los dos sexos a la vez). Tienen un cáliz con 5 dientes pequeños y una corola con 5 pétalos blancos, con 5 estambres muy pequeños y un pistilo de 5 a 8 milímetros de longitud.

#### **3.5. FRUTOS**

Los frutos son cápsulas leñosas, de 3 a 5 centímetros de longitud y 2 de diámetro, que se abren en 5 tapas y bajo cada una de ellas se encuentran numerosas semillas de 2 a 2,5 centímetros de longitud (en promedio 50 a 60 semillas por fruto).

#### **3.6. SEMILLA**

Las semillas son aladas y membranosas, de aproximadamente 3 cm x 1.5 cm de largo, de color marrón claro a rojizo.

#### **3.7. FENOLOGÍA**

La floración ocurre entre febrero y junio y la fructificación entre mayo y julio.

### **3.8. USOS**

La madera es de grano recto, textura y densidad medias, de color rojizo; es muy trabajable y durable, excelente para ebanistería. De las hojas se extrae un tinte de color beige empleado para el teñido de textiles, principalmente de algodón y lana (Reynel 2009).

Rodríguez *et al.* (2003) señala que *Cedrela lilloi*, posee la característica de ser de una madera fina y de alto valor económico, lo cual es muy importante para las industrias permitiendo generar muebles de alta durabilidad.

## **4. SITUACIÓN DE AMENAZA**

La calidad excelente de su madera ha determinado que se tale con intensidad, por lo que *Cedrela lilloi*, se encuentra categorizada en una situación En Peligro (EN), de acuerdo a la Lista Roja de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre elaborada por la IUCN (1998) y en la misma situación, de acuerdo a la Categorización de Especies Amenazadas de Flora Silvestre del Ministerio de Agricultura del Perú aprobado mediante Decreto Supremo N° 043-2006-AG, estimando que la especie presenta una reducción en sus poblaciones, su distribución geográfica en el país es limitada y es probable que su extinción en su estado silvestre sea de por lo menos el 20% en 20 años.

En el mismo sentido, la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) citado por el MINAM (2012) señala a la especie *Cedrela lilloi* dentro del Apéndice III, donde se incluye a aquellas especies que están protegidas al menos en un país, el cual, ha solicitado la asistencia de otras partes en la CITES para controlar su comercio.



Figura 1: Muestra botánica de *Cedrela lilloi* C. DC.

FUENTE: Field Museum of Natural History

## **5. MÉTODOS DE PROPAGACIÓN**

El método de propagación más empleado para *Cedrela lilloi* en la región andina del país es a través de semillas empleando almácigos (Ocaña 1996).

### **5.1. PROPAGACIÓN POR SEMILLAS**

El AGRORURAL (2010), informa que la propagación de *Cedrela lilloi* es realizada por semilla botánica y el porcentaje de pureza es entre 85-90% mientras que el porcentaje de germinación es entre el 50-90% y poseen una vialidad corta.

### **5.2. PROPAGACIÓN POR ESTACAS**

Mesén (1998) señala que la concentración de 2 mg/L de AIB ha dado los mejores resultados en el porcentaje de enraizamiento en especies forestales, sobre sustrato de arena fina bajo un sistema de subirrigación.

Estudios realizados por Soudre (2010) muestran resultados alentadores en la propagación de estacas juveniles de *Cedrela odorata*, obteniendo 93% de enraizamiento sobre sustrato de arena gruesa con 3 mg/L de AIB bajo un sistema de subirrigación.

### **5.3. PROPAGACIÓN *IN VITRO***

La propagación de especies forestales en condiciones *in vitro* permite conservar y micropropagar material vegetal específico y ofrece nuevas herramientas que se suman a las clásicas de la silvicultura, para cumplir dos objetivos básicos de la gestión forestal: mantenimiento de la diversidad de los bosques naturales para la conservación y la utilización de los recursos genéticos y mejoramiento genético en las plantaciones forestales (Martínez *et al.* 2010).

No se ha encontrado reportes de propagación *in vitro* de *Cedrela lilloi*; los principales problemas que se han presentado con este método de propagación para el caso de *Cedrela odorata* son: la contaminación de las yemas apicales y segmentos nodales, la hiperhidricidad, la poca disponibilidad de explantes, la sensibilidad a la desinfección y la lenta brotación, sin embargo, la obtención de plantas a partir de semillas de genotipos elite y el uso del cultivo *in vitro* para su propagación constituye una alternativa importante para la producción de grandes volúmenes de plantas a corto plazo y obtener semilla vegetativa de alta calidad genética para el establecimiento de plantaciones comerciales (Jiménez-Terry citado por Huamán 2014).

En los últimos quince años se han desarrollado estudios de propagación *in vitro* de *Cedrela odorata*, entre los que destacan las investigaciones desarrolladas por Pérez *et al.* (2002), Pérez *et al.* (2006), García *et al.* (2011), Huamán *et al.* (2014), entre otras, buscando mejoras en la tasa de multiplicación de la especie.

## **6. BIOTECNOLOGÍA**

En un sentido amplio, la biotecnología es el manejo de los sistemas biológicos para el beneficio de la humanidad e incluye los métodos convencionales de fitogenética y cultivo de tejidos. Además, ofrece una serie de técnicas para superar las limitaciones biológicas convencionales debidas a las grandes dimensiones de los árboles y a los procesos sexuales retardados, comunes a las especies leñosas (Sánchez 2000).

### **6.1. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES**

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica que consiste en aislar una porción de una planta (tejido, órgano o célula), llamado explante, para cultivarlo en un medio nutritivo en condiciones físicas y químicas artificiales. El objetivo es conseguir que las células expresen su totipotencia, es decir, la capacidad que tienen las células vegetales de regenerar una planta completa cuando son separadas del organismo.

Roca y Ramírez (2000) mencionan que la totipotencia de las células vegetales cultivadas *in vitro* fue establecida por Steward y colaboradores en 1958. En el cultivo *in vitro* o cultivo de tejidos vegetales, un explante se cultiva asépticamente en un medio de composición definida y en condiciones ambientales controladas.

Villalobos y Thorpe (1991) afirman que las técnicas de cultivos asépticos han contribuido a un aprovechamiento eficiente de las plantas y ofrecen utilidad en el mejoramiento genético; obtención de plantas libres de virus y otros patógenos; conservación de germoplasma; micropropagación.

La regeneración de plantas *in vitro* depende de varios factores, siendo los más importantes: la variedad de la planta (genotipo), la clase de tejido a cultivar (explante), la composición química del medio de cultivo (factor químico) y las condiciones ambientales de la incubación (factor físico). Entre los factores químicos que influyen en el cultivo *in vitro* están: los nutrientes (macro y microelementos y fuentes de carbohidratos) y algunos compuestos orgánicos (vitaminas) y los reguladores de crecimiento. Entre los factores

físicos están: la luz, la temperatura, el pH y la concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Estos factores ejercen un papel importante en el desarrollo y diferenciación celular. (Roca y Ramírez 2000).

Smith y Wood (1998) señalan que el cultivo de tejidos comprende la micropropagación, el aislamiento y cultivo de embriones, la regeneración a partir de callo o de suspensiones celulares, el cultivo de protoplastos, anteras y microesporas. Estas técnicas se están utilizando en particular para la multiplicación de plantas en gran escala. La micropropagación ha resultado especialmente útil en la producción de material de plantación de gran calidad y libre de enfermedades de una amplia variedad de cultivos.

## **6.2. MICROPROPAGACIÓN**

La micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. El cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada (Olmos *et al.* 2010).

Villalobos (1991) refiere que la micropropagación, se ha practicado con éxito en especies hortícolas (Murashige en 1978), ornamentales (Hughes en 1981) y en especies leñosas (Thorpe en 1983).

La mayoría de los cultivos de tejidos vegetales *in vitro* necesitan de reguladores de crecimiento, sin embargo, los requerimientos de la concentración y el tipo de regulador dependerán de cada especie. En general, son tres grupos de hormonas las más empleadas: auxinas, citoquininas y giberelinas (Prieto *et al.* 2005).

La regeneración *in vitro* de plantas se está utilizando como un medio para lograr la multiplicación rápida de individuos que se encuentran en poblaciones amenazadas, a fin de iniciar su conservación *ex situ*. La intensa presión que han sufrido en las últimas décadas las regiones tropicales ha conducido a la desaparición de algunas especies forestales y a poner a otras en peligro de extinción. En Asia se están llevando a cabo trabajos en especies tales como *Santalum album* (sándalo) y *Pterocarpus santalinus* (sándalo rojo) para lograr su regeneración *in vitro*, como medio de multiplicación con fines de conservación (Murugesha *et al.* 1999).

La forma más común de regeneración y la que presenta mayores garantías de estabilidad genética, es la inducción del desarrollo de yemas axilares seguido del enraizamiento (Deshpande *et al.* 1998).

Martínez *et al.* (2010) afirman que entre las especies forestales que han sido investigadas con objetivos, tanto de propagación clonal como de regeneración después de transformación genética, se tiene las siguientes: *Eucalyptus globulus* (Villar *et al.* 1999), *Castanea sativa* y el híbrido *C. sativa* x *crenata* (Ballester *et al.* 1999), *Quercus robur* (Vieitez 1996), *Fagus sylvatica* y *F. orientalis* (Vieitez 1996; Cuenca *et al.* 1999), *Ulmus minor* y e híbrido *U. minor* x *pumilla* (Diez y Gil 1999), *Pinus pinea* (García *et al.* 1994; Ordás y Humara 1999) y *Azadirachta indica* (Martínez *et al.* 1999), entre otras.

Prieto *et al.* (2005) manifiestan que en áreas tropicales, *Hevea brasiliensis*, ha sido ampliamente utilizada para la selección clonal y la propagación de un gran número de plántulas.

Uno de las mayores ventajas que ofrece la propagación vegetativa a través del cultivo de tejidos vegetales es la posibilidad de lograr la multiplicación masiva de plantas en espacio y tiempo reducido, ganancia que es bastante significativa cuando se compara con los métodos convencionales de propagación asexual (Roca y Ramírez 2000).

En general, la micropropagación se puede conseguir a través de dos vías:

- a. Por medio organogénesis;
- b. Por embriogénesis somática.

En la organogénesis, las yemas apicales o axilares se pueden desarrollar *in vitro* promoviendo el crecimiento de las yemas latentes o de las yemas activas. Un segmento de la planta que contenga una sola yema puede originar un solo tallo o puede producir tallos múltiples. A medida que el tallo o las ramas se desarrollan producen a su vez más yemas axilares; por el subcultivo periódico se podrán producir tallos o ramas indefinidamente. Este método de micropropagación ha sido el más popular debido a su aplicabilidad a un mayor número de especies vegetales y a su simple implementación (Roca y Ramírez 2000).

La micropropagación presenta cinco fases principales:

Fase 0: Acondicionamiento o preparación de la planta madre.

Fase 1: Establecimiento o iniciación.

Fase 2: Multiplicación o proliferación.

Fase 3: Enraizamiento.

Fase 4: Aclimatación.

Generalmente, las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *ex vitro* (Olmos *et al.* 2010).

### **6.3. FASES DE LA MICROPROPAGACIÓN**

#### **6.3.1. FASE 0: ACONDICIONAMIENTO O PREPARACIÓN DE LA PLANTA MADRE**

La correcta elección y preparación del explante incide directamente sobre la calidad del mismo y su respuesta frente a los dos principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo, que son la contaminación con microorganismos y la oxidación del explante. Los factores que influyen sobre la calidad del explante son: el tipo de órgano que sirve como explante, la edad, la estación en la cual se colecta el material vegetal, el tamaño y el estado sanitario general de la planta donante (Olmos *et al.* 2010).

#### **6.3.2. FASE 1: ESTABLECIMIENTO O INICIACIÓN**

El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y axénicos (prolifera un solo tipo de organismo). El éxito está determinado por la calidad del explante a utilizar. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes. Los materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, ya sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas en plantas herbáceas y aquellos tejidos meristemáticos que determinan el crecimiento en grosor, como el cambium en las plantas leñosas (Olmos *et al.* 2010).

Es importante considerar el hecho de que el aislamiento de un tejido u órgano del resto de la planta provoca un estado de estrés que altera su metabolismo celular. Un buen explante es aquel cuyas células sobreviven, en una alta proporción, a la descomposición y que luego responde eficientemente a las condiciones *in vitro* (Villalobos y Thorpe 1991).



En esta etapa es importante mantener una óptima asepsia. La asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias y hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en su posterior incubación y manipulación (Roca y Ramírez 2000).

Mroginski *et al.* (2010) sostienen que las fuentes de contaminación se deben a microorganismos presentes en el interior o en la superficie de los explantes por un lado y por otro lado a fallas en los procedimientos de cultivo a nivel de laboratorio.

La correcta detección de estas fuentes y del tipo de microorganismo son aspectos importantes para el éxito de los cultivos, ayudando a determinar la fuente de contaminación y a la planificación de los procedimientos para controlarlos.

### **6.3.3. FASE 2: MULTIPLICACIÓN O PROLIFERACIÓN**

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos (subcultivos) y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento). Los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento como auxinas, citocininas y/o ácido giberélico y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantes (Olmos *et al.* 2010).

La inducción de yemas axilares comprende la multiplicación de yemas preformadas, usualmente sin formación de callo. La desventaja radica en que el número de yemas axilares por explante limita la cantidad de plántulas, sin embargo, esto se ve compensado por un aumento en la tasa de multiplicación con los sucesivos subcultivos (Olmos *et al.* 2010).

Las condiciones en las cuales crece el explante son el resultado de la interacción de tres factores: el estado del explante o material vegetal; el recipiente de cultivo y el ambiente externo o condiciones de crecimiento del cuarto de cultivo. La capacidad de respuesta de los explantes a un mismo medio de cultivo cambia con el número de subcultivos, el tipo de explante subcultivado y el método del repique. Por esto mismo, el medio de cultivo debe optimizarse a fin de lograr la mayor tasa de multiplicación vegetativa. Comúnmente se emplea como medio basal el medio de Murashige & Skoog (1962) suplementado con 3 por ciento de

sacarosa como fuente de carbono. A este medio se le adicionan además reguladores de crecimiento, tanto del tipo de auxinas como de citocininas (Olmos *et al.* 2010).

Enrico (2006) en su investigación afirma que sus ensayos *in vitro* con *Cedrela balansae* muestran que el BAP (Bencilaminopurina) es una citoquinina eficiente para inducir la producción y brotación de yemas y que adicionado al medio MS (1962) produce brotes de aspecto vigoroso.

#### **6.3.4. FASE 3: ENRAIZAMIENTO**

En esta etapa se produce la formación de raíces adventicias. En las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en muchas especies leñosas resulta más complicada por su limitada capacidad rizogénica. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (principalmente auxinas) para promover la rizogénesis. Los sustratos incluyen: medio solidificado con agar, perlita y/o vermiculita humedecidas con medio nutritivo o agua. En un medio solidificado con agar, los nutrientes se reducen de ½ a ¼ de la composición original, y la sacarosa se reduce a una concentración final de 1-2%. Medios con baja concentración salina, como el medio de plantas leñosas (WPM por sus siglas en inglés Woody Plant Medium) formulado por Lloyd & McCown (1981) y el medio Gresshoff & Doy (1972) incrementan el porcentaje de enraizamiento de vástagos axilares en plantas latifoliadas (Olmos *et al.* 2010).

#### **6.3.5. FASE 4: ACLIMATACIÓN**

Durante el período de incubación, los cultivos son expuestos a condiciones ambientales disímiles al ambiente externo. La atmósfera interna se caracteriza por presentar una considerable variación diurna en la concentración de CO<sub>2</sub>, humedad relativa elevada, temperatura constante e intensidad lumínica baja. A su vez, el medio de cultivo compuesto por concentraciones elevadas de azúcares, sales y reguladores del crecimiento, sumado a la ausencia de microorganismos, generan anormalidades morfológicas, anatómicas y fisiológicas que las plantas deberán corregir cuando son transferidas al ambiente externo. Este período de adaptación al nuevo hábitat es llamado fase o etapa de aclimatación (Mroginski *et al.* 2010).

Rache *et al.* citados por Ramos (2012) recomiendan que cuando las plantas *in vitro* ya estén listas para la aclimatación se deben limpiar con agua destilada estéril, eliminando

completamente el agar, para evitar la aparición de hongos y la deshidratación en el proceso de cambio de sustrato; además, se debe proporcionar inicialmente a las plantas trasplantadas una sombra del 70% en la cámara húmeda cuya humedad relativa es cercana al 100% y temperatura de  $12 \pm 2^\circ\text{C}$ .

La estrategia a implementarse durante el mencionado ciclo deberá contemplar el control minucioso de los parámetros ambientales (humedad, temperatura y luz) de tal manera que permita disminuir la deshidratación y, al mismo tiempo, estimular la fotosíntesis con el objeto de generar un rápido crecimiento de las plántulas (Mroginski *et al.* 2010).

Torres *et al.*, citados por Indacochea *et al.* (2017) manifiestan que algunas de las características del cultivo *in vitro* radica en que las condiciones ambientales dentro del recipiente garantizan un ambiente con alta humedad relativa (100%) y una nutrición heterótrofa por el suministro de fuentes energéticas (sacarosa) en el medio de cultivo. Estas condiciones propician una baja funcionalidad en la raíces producidas en condiciones *in vitro*, las cuales son por lo tanto poco eficientes en la toma de agua y nutrientes, tornándose, en algunos casos en vías para la pérdida de agua interna, una vez la planta es trasplantada a condiciones *ex vitro*. En el mismo sentido, Mc Crown citado por Indacochea *et al.* (2017) argumenta que es una de las etapas más difícil de un sistema de propagación *in vitro* debido a que las plantas regeneradas deben regresar a condiciones naturales que son fisiológicamente estresantes para las plantas con finas cutículas y con una reducción de su metabolismo dado por las condiciones *in vitro*.

#### **6.4. MEDIO DE CULTIVO**

Mroginski *et al.* (2010) sostienen que existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales, comprenden entre 6 y 40 compuestos pero básicamente los medios de cultivo se componen de compuestos que suministran:

- Sales Minerales
- Vitaminas
- Una fuente de carbono
- Sustancias reguladoras de crecimiento
- Agente gelificante ( en el caso de medios semisólidos)

- Otros compuestos (aminoácidos)

**Tabla 1: Composición de medios de cultivo MS y WPM**

<b>REACTIVOS</b>	<b>MS<sub>1</sub> (mg/L)</b>	<b>WPM<sub>2</sub> (mg/L)</b>
<b>Macronutrientes: NO, S04, H2P04, Ca, Mg, K.</b>		
KNO <sub>3</sub>	1 900,0	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 650,0	400,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,0	170,0
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	440,0	96,0
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	370,0	370,0
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O		556,0
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		990,0
<b>Micronutrientes: Fe, Mn, Zn, B, Mo, Cu, Co, Ni, Cl.</b>		
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	37,3
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	16,9	16,9
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	8,6	8,6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2
KI	0,83	
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,025	

FUENTE: (1) Murashige, T. y Skoog, F. (1962). *Physiol. Plant.* 15:473-497.

(2) Lloyd G. & McCown B. (1981). *Int. Plant Prop. Soc. Proc.*, 30, 421 – 427.

En cuanto a las diferencias entre ambos, se da básicamente en que el WPM presenta un contenido menor de sales, especialmente del ión amonio (NH<sub>4</sub>), la ausencia de yodo y cobalto y un contenido en cobre diez veces superior al del medio MS.

## 6.5. REGULADORES DE CRECIMIENTO

Mroginski y Roca (1991) refieren que en algunos casos se obtienen en los cultivos *in vitro* las respuestas deseadas mediante el empleo del medio básico sin reguladores de crecimiento. Sin embargo, es frecuente agregar al medio, sustancias reguladoras de crecimiento, generalmente del tipo citoquininas o auxinas. Las citoquininas que más se utilizan en el establecimiento de los cultivos son: kinetina (KIN), 6-bencilaminopurina (BAP) y Zeatina (ZEA); las auxinas que más se emplean son: 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 1-naftalenacético (ANA), ácido indol-3-acético (AIA) y ácido indol-3-butírico (AIB).

## **6.6. CONDICIONES DE INCUBACIÓN**

La incubación de los cultivos se debe llevar a cabo en condiciones controladas. Por lo menos en lo que se refiere a temperatura, calidad e intensidad de luz, fotoperiodo, humedad atmosférica y asepsia. Estas condiciones se logran con el empleo de cámaras climatizadas o cuartos especialmente preparados con aire acondicionado y una buena y uniforme circulación de aire en el interior y dotados de un buen sistema de alarma para cortar la iluminación en caso de no funcionar el aire acondicionado. En general, los cultivos son incubados a temperatura adecuada dependiendo del cultivo, con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. La humedad atmosférica debe ser elevada 80 – 90 por ciento (Mroginski *et al.* 2010).

## **6.7. MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES FORESTALES**

Olmos *et al.*, (2010) recapitula señalando que los trabajos pioneros en el cultivo de tejidos en especies forestales se llevaron a cabo durante la década de 1940, formación de yemas adventicias en *Ulmus campestris*; en los años 50's se publicó por primera vez la obtención de organogénesis en coníferas, con la formación de brotes a partir de callos de *Sequoia sempervirens*. En la década 1970-80 se obtuvieron las primeras plantas de álamo (*Populus tremuloides*) y *Pinus palustris*. En ambos casos la formación de plántulas se logró vía organogénesis.

Martínez *et al.* (2010) menciona que en los últimos veinte años las investigación sobre aspectos forestales están siendo dirigidas al aumento de la productividad (turnos cortos y alto índice de producción) y en la búsqueda de la calidad de maderas (forma y uniformidad del fuste, óptima resistencia a plagas, enfermedades y al estrés ambiental) de los árboles que tienen una importancia económica.

Rodríguez (2011) refiere que el empleo de clones en programas de reforestación de muchas especies genera al menos un 10 % de incremento en ganancia genética (homogeneidad en volumen de madera) en relación al empleo de plantas regeneradas por semillas de árboles selectos. La reproducción asexual permite la multiplicación de individuos seleccionados de una población elite, que exhiben una significativa ganancia genética debida a efectos no aditivos de genes.

Tradicionalmente, las especies forestales fueron propagadas vegetativamente mediante el enraizamiento de estacas, de braquiblastos en coníferas, así como por injertos; sin embargo,

para la mayoría de los árboles propagados por estacas se observa una rápida pérdida de capacidad de rizogénesis al aumentar la edad de la planta donante de las estacas. En este sentido, una de las principales ventajas de la micropropagación es la capacidad potencial de desarrollar protocolos de multiplicación optimizados para multiplicar árboles adultos que han demostrado ser fenotípicamente superiores (Olmos *et al.* 2010).

El principal método utilizado para especies latifoliadas es la brotación de yemas adventicias, empleando ápices de vástagos, yemas laterales y microestacas. En las coníferas, la elongación de las yemas axilares a partir de braquiblastos de plantas adultas no ha sido muy exitosa. Los medios basales más usados para angiospermas son el medio MS (1962) y el WPM (1981). Para el caso de gimnospermas, el empleo de medios reducidos en sales minerales y baja cantidad de nitrógeno resulta mucho mejor que el empleo de un medio altamente salino y nitrogenado como el MS. Para la inducción de brotes, se requiere el empleo de citocininas. La más usada son BA, BAP y thidiazuron (Olmos *et al.* 2010).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA

El estudio se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Sub dirección de Biotecnología de la Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología-DRGB del Instituto Nacional de Innovación Agraria-INIA del Ministerio de Agricultura y Riego. Ubicado en el departamento de Lima, provincia de Lima, perteneciente al distrito de La Molina ( $12^{\circ}04'36''\text{S}$  /  $76^{\circ}56'43''\text{O}$ ) a una altura de 241 m.s.n.m., con una precipitación media anual de alrededor de 60 mm y temperaturas entre  $14,6-28,7^{\circ}\text{C}$ .

#### 2. MATERIALES

##### 2.1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal empleado para el desarrollo de la investigación fueron las yemas apicales de la especie *Cedrela lilloi* C. DC. provenientes de embriones cigóticos germinados *in vitro*. Las semillas proceden de árboles semilleros ubicados a una altura de 1 800 msnm en la provincia de Caraz, departamento de Ancash y posteriormente almacenadas en refrigeración a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ .

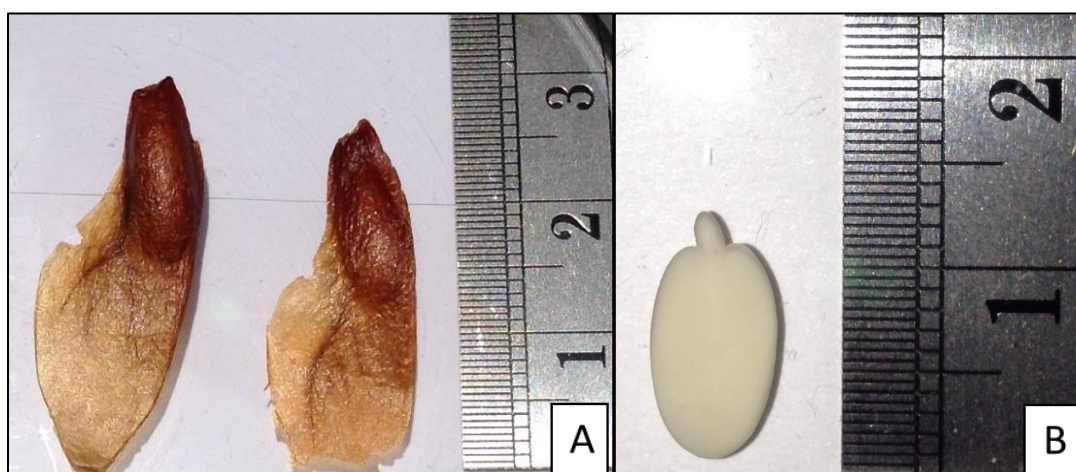


Figura 2: *Cedrela lilloi* C. DC.: (A) Semillas; (B) embrión cigótico.

FUENTE: *Elaboración propia*

## **2.2. MATERIALES DE LABORATORIO**

- Algodón
- Bagueta
- Espátula
- Frascos de vidrio (70 x 90 mm)
- Hojas de bisturí N° 10 y 11
- Mango de bisturí N° 7
- Matraz Erlenmeyer 250 ml
- Mechero de alcohol
- Papel de aluminio
- Papel toalla
- Parafilm
- Pinzas de 15 y 30 cm
- Pipeta volumétrica
- Placa petri
- Probetas de 100 y 1000 ml
- Tubos de ensayo de vidrio (25 x 150 mm)
- Tijeras

## **2.3. INSUMOS (REACTIVOS, SUSTANCIAS, MEDIOS DE CULTIVO Y OTROS)**

- Ácido clorhídrico (HCl 1N)
- Agar (Sigma A4550)



- Agua destilada
- Alcohol de 70° y 96°
- Auxinas: ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA)
- Benomil
- Detergente
- Citoquininas: bencilaminopurina (BAP) y zeatina (ZEA)
- Hipoclorito de sodio comercial 4.5% (p/v)
- Hidróxido de Sodio (NaOH 1N)
- Medio de cultivo MS (Sigma M5519)
- Medio de cultivo WPM (Sigma M6774)
- Sacarosa, grado cultivo de tejidos vegetales (Sigma S5391)
- Tween 20

#### **2.4. EQUIPOS DE LABORATORIO**

- Agitador magnético
- Autoclave (Systec DB45)
- Balanza digital
- Cámara de flujo laminar horizontal unipersonal (Esco IEC61010-1)
- Cámara climática (Biotronette Mark III)
- Desionizador (Elga)
- Estufa (Binder ED400)
- Horno microondas

- pH-metro (Hanna edge HI2020)
- Microscopio estereoscópico binocular
- Refrigeradora

## **2.5. OTROS**

- Bandejas de plástico (40 x 30 cm)
- Cámara fotográfica
- Computadora de escritorio
- Plumón indeleble
- Plástico film
- Sustrato en pastilla prensada (Jiffy #50F)
- Sustrato (Sunshine PREMIX #8)
- Regla milimétrica
- Vasos de plástico (355 ml)

## **2.6. CONDICIONES DE INCUBACIÓN**

- Temperatura:  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Humedad relativa: 70%
- Fotoperiodo: 16 horas luz y 8 horas oscuridad
- Luminosidad: 3180 lux

### 3. MÉTODOS

Realizar estudios en propagación *in vitro* comprende desarrollar varias etapas, considerando desde la selección del explante inicial hasta la obtención de plantas aclimatadas dispuestas a llevar a campo definitivo.

#### 3.1. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO O INICIACIÓN

##### 3.1.1. MEDIO DE CULTIVO

En la fase inicial, se preparó un medio de cultivo con concentraciones de macro y micro nutrientes conforme a los establecido por Murashige y Skoog (1962), sacarosa como fuente de carbono y agar como agente gelificante, de acuerdo a la siguiente tabla 2.

**Tabla 2: Concentración de insumos empleados para la preparación del medio de cultivo para el establecimiento**

<i>Insumo</i>	<i>Concentración</i>	<i>Marca/Código</i>
Medio Murashige & Skoog (MS,1962)	4,43 g/L	Sigma/M5519
Sacarosa	30,00 g/L	Sigma/S5391
Agar	7,00 g/L	Sigma/A4550
pH: 5,7 ± 0,01 ajustado con ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH) 1N.		

FUENTE: Catálogo-ficha técnica Sigma

Se dispuso un volumen de 10 ml del medio de cultivo en tubos de ensayo de 25 x 150 mm sellados con tapas de papel aluminio, luego se procedió a esterilizar haciendo uso de una autoclave a una temperatura de 121°C a 15 libras de presión durante 15 minutos.

##### 3.1.2. DESINFECCIÓN DE SEMILLAS

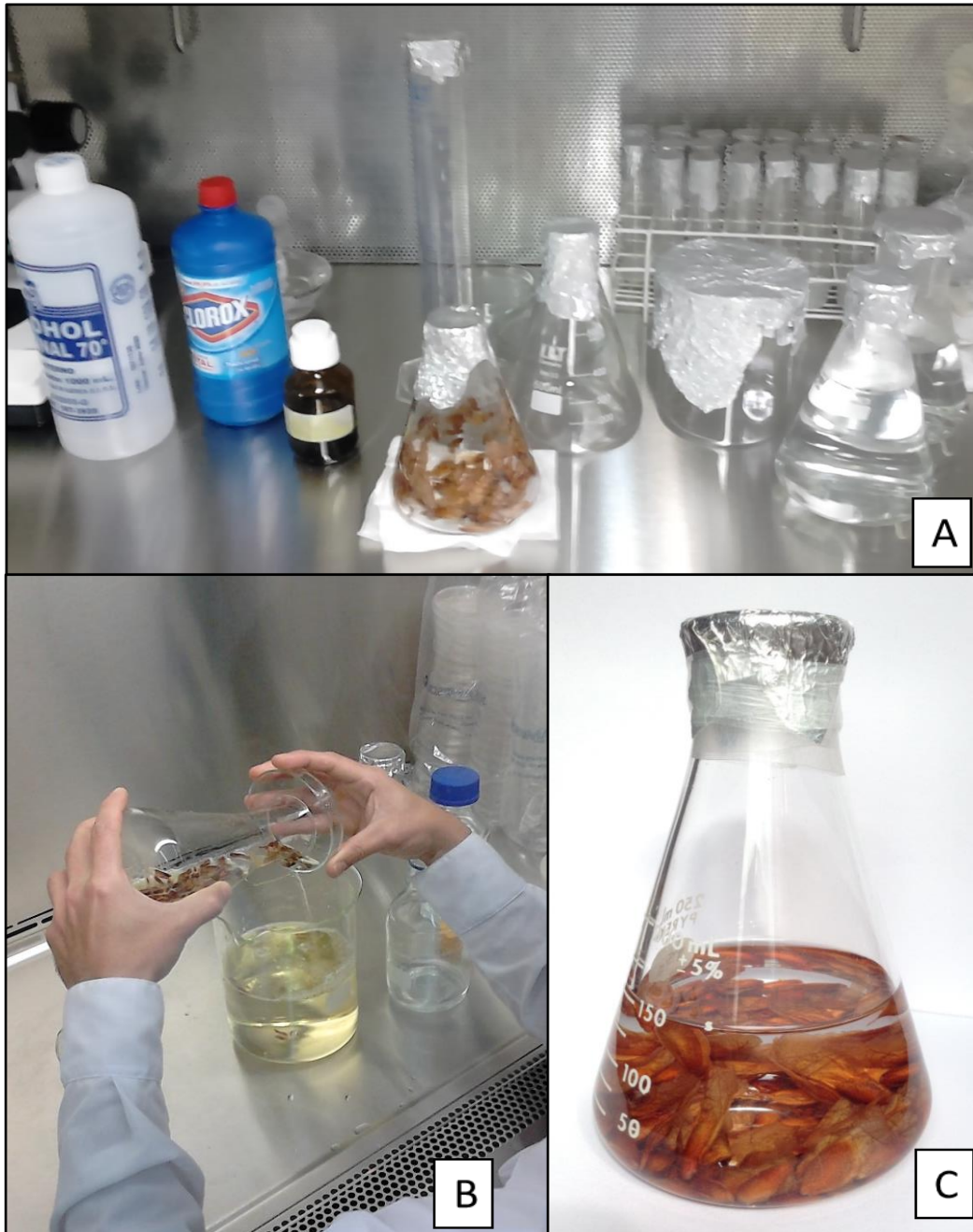
La desinfección de las semillas se realizó bajo “El protocolo de desinfección para la especie forestal *Cedrela lilloi*” desarrollado por el laboratorio de cultivos de tejidos la SDB de la DRGB del INIA durante el año 2015, mediante ensayos con diferentes soluciones para la desinfección y la evaluación de material vegetal (Cabrera 2016), los cuales se describen a continuación:

Se seleccionó 880 semillas de mayor tamaño y volumen y se hizo grupos de 120 semillas aproximadamente, para facilitar el trabajo. Se colocaron en un erlenmeyer a fin de proseguir con el lavado con agua de caño y detergente corriente, seguidamente se enjuagó con agua destilada por tres veces. A continuación se adicionó una solución de Benomil al 0,2 % como

agente fungicida y dejó reposar por una hora. Una vez transcurrido el tiempo, se enjuagó por tres veces con agua destilada, evitando que queden excedentes.

Luego en condiciones asépticas, empleando una cámara de flujo laminar, se realizó la desinfección superficial, siguiendo los siguientes pasos:

- Sumergir las semillas en alcohol al 70% por un minuto, desechar el excedente.
- Remojo de semillas en una solución de 100 ml de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0,9 % (v/v) adicionando dos gotas de Tween20 (para romper la tensión superficial y permitir que el explante tenga mejor contacto con el agente desinfectante) durante 20 minutos.
- Enjuagar con agua destilada estéril por cuatro veces.
- Adicionar agua destilada estéril y dejar hidratar por 24 horas en refrigeración (4-8 °C).



(A) Insumos y materiales empleados en la desinfección de semillas de *Cedrela lilloi*; (B) Enjuague con agua destilada para eliminar los excedentes de NaOCl; (C) Semillas de *Cedrela lilloi* desinfectadas.

Figura 3: **Desinfección superficial de semillas:**

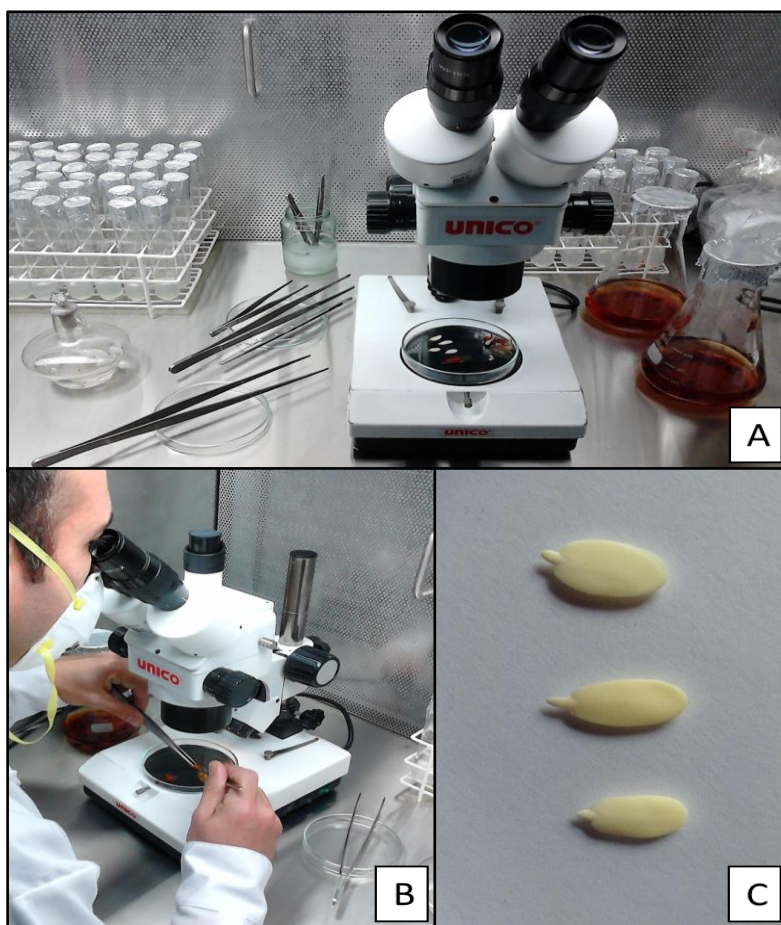
*FUENTE: Elaboración propia*

### 3.1.3. SIEMBRA DE EMBRIONES CIGÓTICOS *IN VITRO*

Una vez culminado el protocolo de desinfección superficial de las semillas de *Cedrela lilloi*, haciendo uso de un microscopio estereoscópico y con la ayuda de pinza y bisturí esterilizados, se procedió a la extracción del embrión cigótico contenido en cada semilla. Para ello, se retiró

la testa y el endocarpo, evitando dañar su estructura mediante cortes precisos. Posteriormente se sembró un embrión cigótico por tubo de ensayo conteniendo 10 ml del medio MS, finalmente se selló con papel aluminio y parafilm.

Los tubos de ensayo con los embriones cultivados fueron llevados a sala de incubación o cámara de crecimiento a una temperatura de  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$  con 70% de humedad relativa y fotoperiodo de 16 horas luz 8 horas oscuridad a una intensidad lumínica de 3180 lux, por un periodo de 4 semanas. En esta fase se sembraron 880 embriones cigóticos y cada tubo de ensayo fue rotulado asignándole un número de identificación a cada uno.



(A) Equipos y materiales empleados en la obtención de embriones; (B) Disección con ayuda de microscopio estereoscópico; (C) Embriones cigóticos obtenidos.

Figura 4: **Disección de cigóticos de *Cedrela lilloi* C. DC:**

*FUENTE: Elaboración propia*

### 3.1.4. EVALUACIÓN DE LA FASE DE ESTABLECIMIENTO

La evaluación se realizó por observación directa a la 4ta semana de sembrados los embriones de *Cedrela lilloi*.

**a. Porcentaje de contaminación en el establecimiento CE (%)**

El porcentaje de contaminación en la fase de iniciación se obtuvo como resultado del cociente del conteo total de explantes contaminados con hongos y/o bacterias en relación al total de explantes sembrados expresado en porcentaje, conforme a la siguiente fórmula:

$$CE (\%) = (Ec/Et) \times 100$$

Donde:

Número total de embriones cigóticos sembrados: Et

Número de embriones cigóticos contaminados: Ec

**b. Porcentaje de germinación PG (%)**

El porcentaje de germinación en la fase de iniciación se obtuvo como resultado del cociente del conteo total de embriones cigóticos germinados en relación al total de embriones cigóticos sembrados, indiferentemente del vigor de la planta germinada, expresado en porcentaje, conforme a la siguiente fórmula:

$$PG (\%) = (Eg/Et) \times 100$$

Donde:

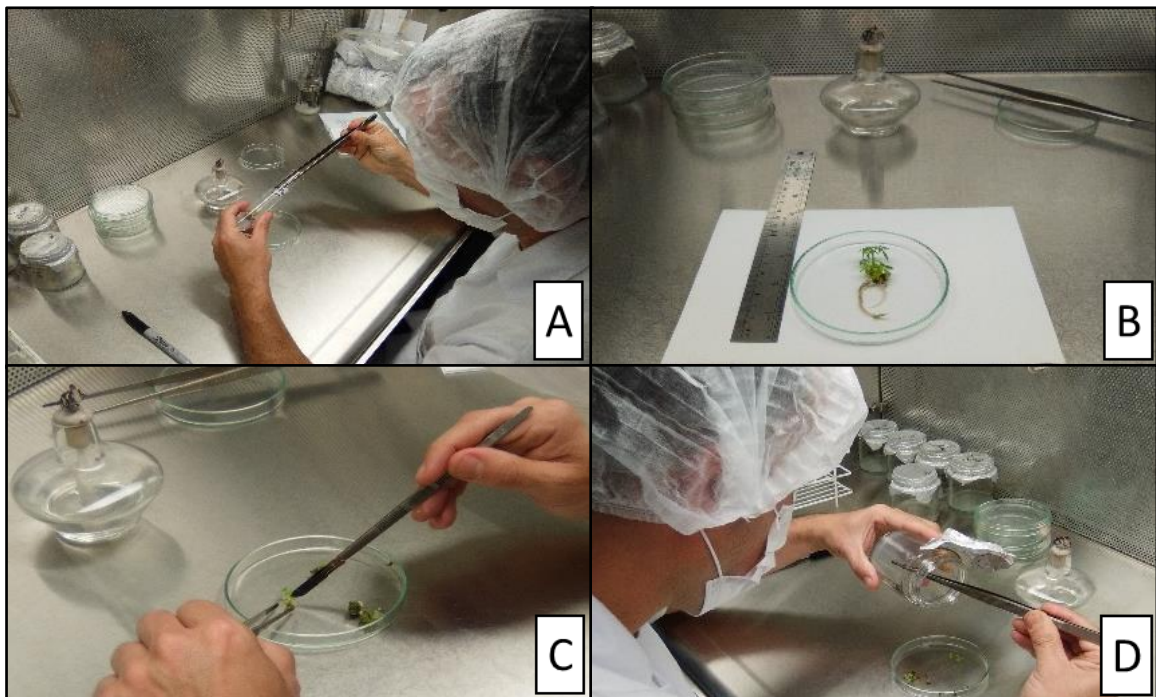
Número total de embriones cigóticos sembrados: Et

Número de embriones cigóticos germinados: Eg

**3.2. MULTIPLICACIÓN DE BROTES**

Una vez germinados los embriones de *Cedrela lilloi*, las plántulas obtenidas fueron extraídas de los tubos de ensayo, colocadas en una placa petri y seccionadas generando segmentos de tejido vegetal de entre 5-10 mm de longitud (yemas apicales) los cuales fueron cultivados en tubos de ensayos de 25 x 150 mm según los tratamientos señalados en la tabla 4.

En la Figura 5, se puede observar el procedimiento de subcultivo de la fase de multiplicación



(A) Extracción de la plántula; (B) Plántula con brotes inducidos; (C) Disección de brotes; (D) Subcultivo en nuevo medio.

Figura 5: **Desarrollo del subcultivo 2 de la fase de multiplicación**

*FUENTE: Elaboración propia*

### 3.2.1. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Se preparó un medio de cultivo MS (1962), adicionando sacarosa como fuente de carbono y agar como agente gelificante. De la misma manera, se preparó un medio de cultivo bajo en sales WPM (Lloyd & McCown, 1981). De acuerdo a las especificaciones de la tabla 3.

**Tabla 3: Concentración de insumos empleados para la preparación de medio de cultivo de la fase de multiplicación**

<b>Insumo</b>	<b>MS (Murashige &amp; Skoog, 1962)</b>		<b>WPM (Lloyd &amp; McCown, 1981)</b>	
	<b>Cantidad</b>	<b>Marca</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Marca</b>
Medio Base	4,43 g/L	Sigma	2,47 g/L	Sigma
Sacarosa	30,00 g/L	Sigma	30,00 g/L	Sigma
Agar	7,00 g/L	Sigma	7,00 g/L	Sigma

*FUENTE: Catálogo-ficha técnica Sigma*



A los medios de cultivo descritos se adicionó citoquininas (BAP y ZEA) en distintas concentraciones, ensayando dieciséis tratamientos con tres repeticiones cada uno, de acuerdo a la tabla 4. El pH se ajustó a  $5,7 \pm 0,01$  con HCL o NaOH 1N, luego se adicionó el agar y en un horno microondas se homogenizó, finalmente se dispensaron 10 ml de medio en tubos de ensayo de 25 x 150 mm para ser esterilizados en autoclave a 121°C de temperatura a 15 libras de presión por 15 minutos.

**Tabla 4: Tratamientos desarrollados en la fase de multiplicación**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>MEDIO</b>	<b>CITOQUININA</b>	<b>CONCENTRACIÓN (mg/L)</b>
1	MS	BAP	0,5
2	MS	BAP	1,0
3	MS	BAP	1,5
4	MS	BAP	2,0
5	MS	ZEA	0,5
6	MS	ZEA	1,0
7	MS	ZEA	1,5
8	MS	ZEA	2,0
9	WPM	BAP	0,5
10	WPM	BAP	1,0
11	WPM	BAP	1,5
12	WPM	BAP	2,0
13	WPM	ZEA	0,5
14	WPM	ZEA	1,0
15	WPM	ZEA	1,5
16	WPM	ZEA	2,0

*Fuente: Elaboración propia*

### **3.2.2. SIEMBRA DE YEMAS APICALES *IN VITRO***

Se seleccionó aquellas plantas germinadas con mejor vigor (mínimamente con presencia de cotiledones), se esterilizó placas petri, bisturí y pinzas en una autoclave a 121°C de temperatura y 15 libras de presión durante 15 minutos. Luego, en una cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, se realizó el corte de las plantas germinadas *in vitro* a fin de obtener yemas apicales, de un tamaño aproximadamente de 10 mm, y posteriormente inocularlas en los tubo de ensayo de 25 x 150 mm con los diferentes tratamientos antes descritos, a razón de tres repeticiones de 10 unidades cada una por tratamiento.

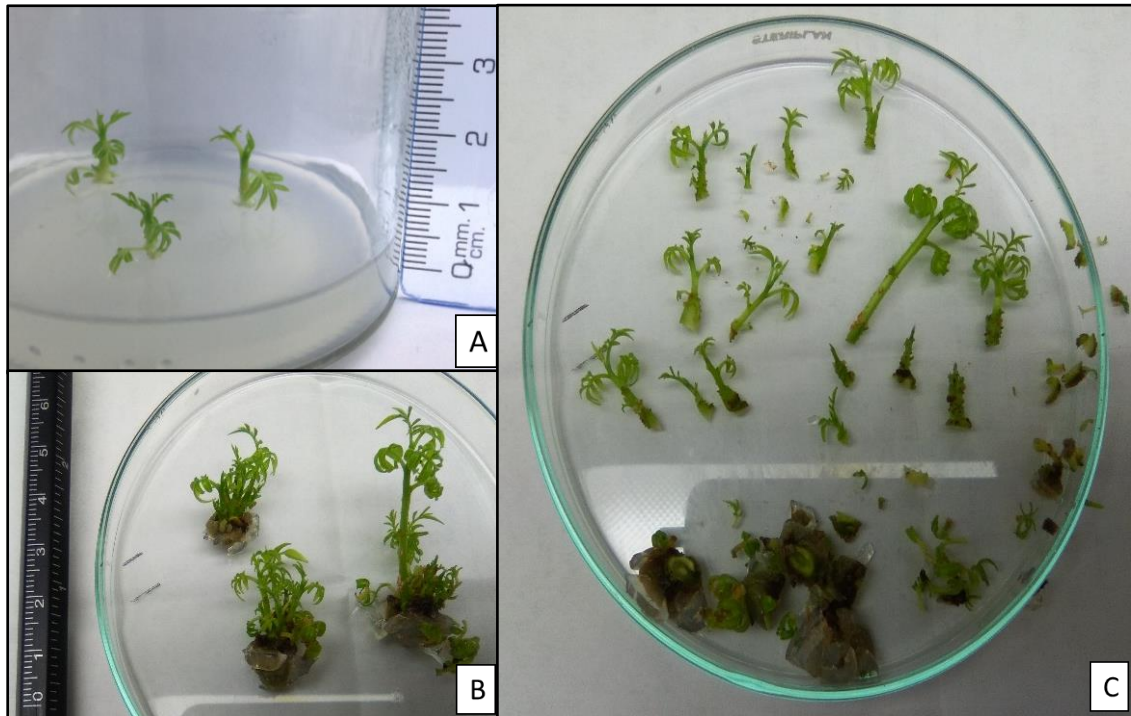
Una vez rotulados los tubos de ensayos con las yemas apicales en los diferentes tratamientos fueron llevados a sala de incubación a una temperatura de 21±2°C con 70% de humedad relativa y fotoperiodo de 16 horas luz 8 horas oscuridad a una intensidad lumínica de 3180 lux, por un periodo de 5 semanas. En esta etapa se cultivaron 480 yemas apicales.

### **3.2.3. SUBCULTIVO DE YEMAS APICALES**

Transcurrido un periodo de 5 semanas se seccionó las yemas apicales de las plantas obtenidas en cada uno de los tratamientos realizados de un tamaño mínimo de 5mm, las que fueron subcultivadas sobre 30 ml de los medios de cultivos correspondientes a cada tratamiento, en frascos de vidrio de 7 x 9 cm, con el fin de mantener o aumentar la cantidad de yemas apicales (brotes) en los ciclos de multiplicación sucesivos (subcultivos).

Una vez rotulados los envases las microestacas se colocaron en una sala de incubación a una temperatura de 21±2°C con 70% de humedad relativa y fotoperiodo de 16 horas luz 8 horas oscuridad a una intensidad lumínica de 3180 lux, por un periodo de 5 semanas.

Los subcultivos fueron efectuados por 5 veces consecutivas a fin de determinar la tasa de multiplicación de la especie.



(A) Yemas recién subcultivadas correspondientes al cuarto subcultivo en T5 (MS+0,5 mg/L ZEA); (B) Brotes desarrollados correspondientes al cuarto subcultivo en T5 (MS+0,5 mg/L ZEA) a las 5 semanas; (C) Brotes disectados para quinto subcultivo.

Figura 6: **Multiplicación *in vitro* de *Cedrela lilloi***

FUENTE: *Elaboración propia*

### 3.2.4. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA FASE DE MULTIPLICACIÓN

Se efectuó un diseño completamente al azar (DCA), con tres repeticiones y diez sub unidades por repetición (Tabla 5). La comparación entre las medias de los números de brotes desarrollados se realizó mediante la prueba no paramétrica Kruskall Wallis al 95% de confianza.

Tabla 5: **Diseño experimental para la fase de multiplicación**

Unidad experimental	10
Número de tratamientos	16
Número de repeticiones	3
Número total de frascos por tratamiento	30
Número total de explantes	480
Número de subcultivos	5

FUENTE: *Elaboración propia*

### 3.2.5. EVALUACIÓN DE LA FASE DE MULTIPLICACIÓN

La evaluación se realizó por observación directa a la quinta semana de haber subcultivado las yemas apicales de *Cedrela lilloi* por un número de 5 subcultivos consecutivos.

#### a. Tasa de multiplicación por tratamiento (Tm)

La tasa de multiplicación es el promedio del número de brotes desarrollados por explante respecto a los brotes sembrados en un periodo de 5 semanas por subcultivo.

Para ello, se contó el número de brotes obtenidos por explantes, a fin de promediar los resultados obtenidos para cada tratamiento.

#### b. Formación de callo FC (%)

Se refiere al número de explantes que formaron callo (masa de tejido no diferenciado que se desarrolla en la base del explante) respecto al total de brotes sembrados expresado en porcentaje, se evaluó la formación de callo de cada explante por tratamiento de acuerdo a la clasificación de la Tabla 6.

$$FC (\%) = (Ec/Et) \times 100$$

Donde:

Número de explantes totales: Et

Número de explantes con formación de callos: Ec

**Tabla 6: Clasificación de grado de formación de callo en la fase de multiplicación *in vitro* de *Cedrela lilloi* C. DC.**

<b>Grado de clasificación</b>	<b>Descripción</b>
0	Sin formación de callo.
1	Escasa formación de callo, generalmente alrededor de la base del explante.
2	Formación de callo considerable, compromete más del 50% del explante.
3	Abundante formación de callo, compromete la totalidad del explante.

FUENTE: *Elaboración propia*

Se evaluó la formación de callo teniendo presente la clasificación visual de la Figura 7.

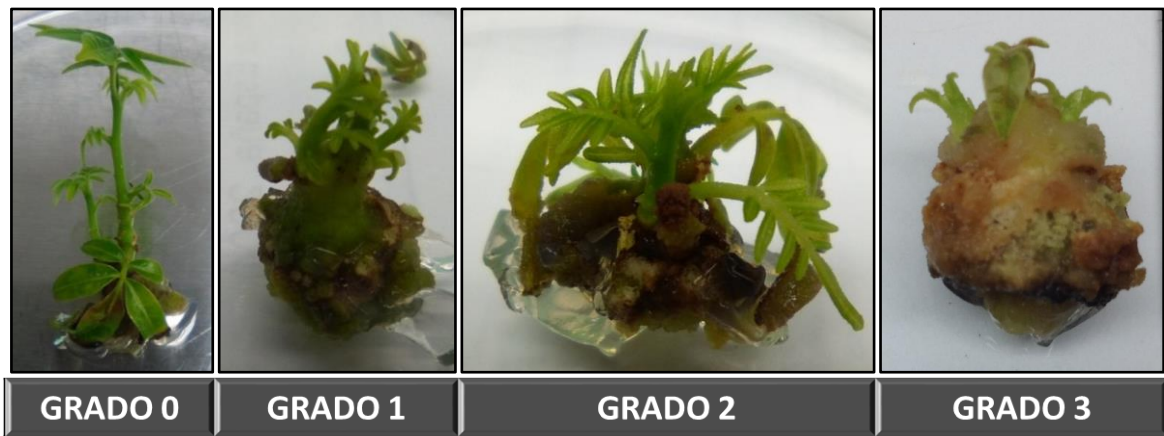


Figura 7: **Clasificación de grado de formación de callo en la fase de multiplicación *in vitro* de *Cedrela lilloi* C. DC.**

FUENTE: *Elaboración propia*

**c. Necrosis N (%)**

Se refiere al número de explantes con parte de tejido muerto (necrosados) respecto al total de explantes sembrados expresado en porcentaje, se evaluó la necrosis de cada explante por tratamiento de acuerdo a la clasificación de la Tabla 7.

$$N (\%) = (En/Et) \times 100$$

Donde:

Número de explantes totales: Et

Número de explantes con presencia de necrosis: En

**Tabla 7: Clasificación de grado de necrosis en la fase de multiplicación *in vitro* de *Cedrela lilloi* C. DC.**

<b>Grado de clasificación</b>	<b>Descripción</b>
0	Sin presencia de tejido muerto.
1	Escaso tejido muerto, presente en la base del explante.
2	Tejido muerto considerable, compromete más del 50% del explante; sin embargo, parte del tejido puede ser subcultivado.
3	Necrosis total, muerte del explante.

FUENTE: *Elaboración propia*

Se evaluó la presencia de necrosis teniendo presente la clasificación visual de la Figura 8.

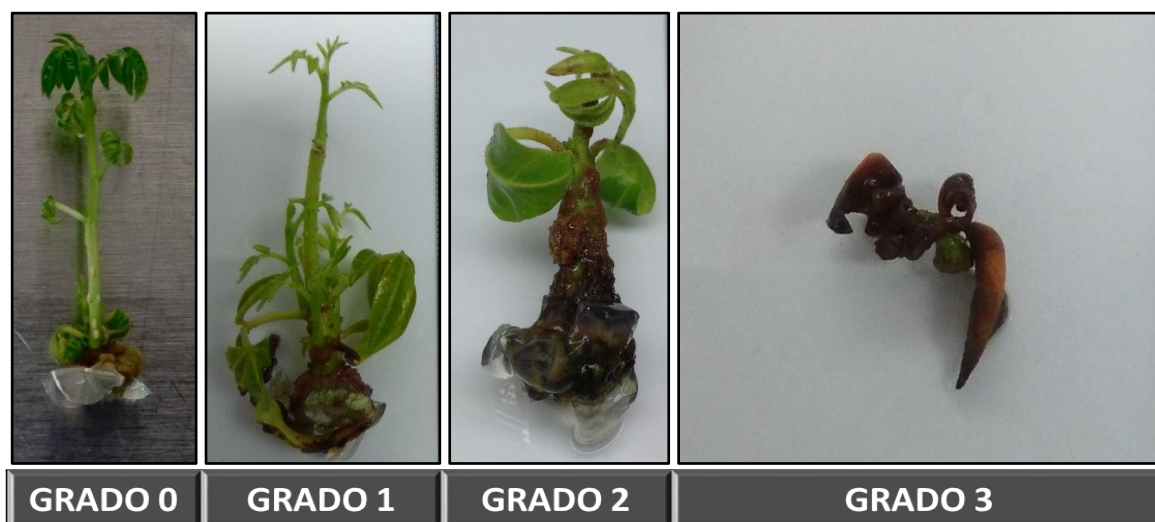


Figura 8: Clasificación de grado de necrosis en la fase de multiplicación *in vitro* de *Cedrela lilloi* C. DC.

Fuente: Elaboración propia

### 3.3. ENRAIZAMIENTO

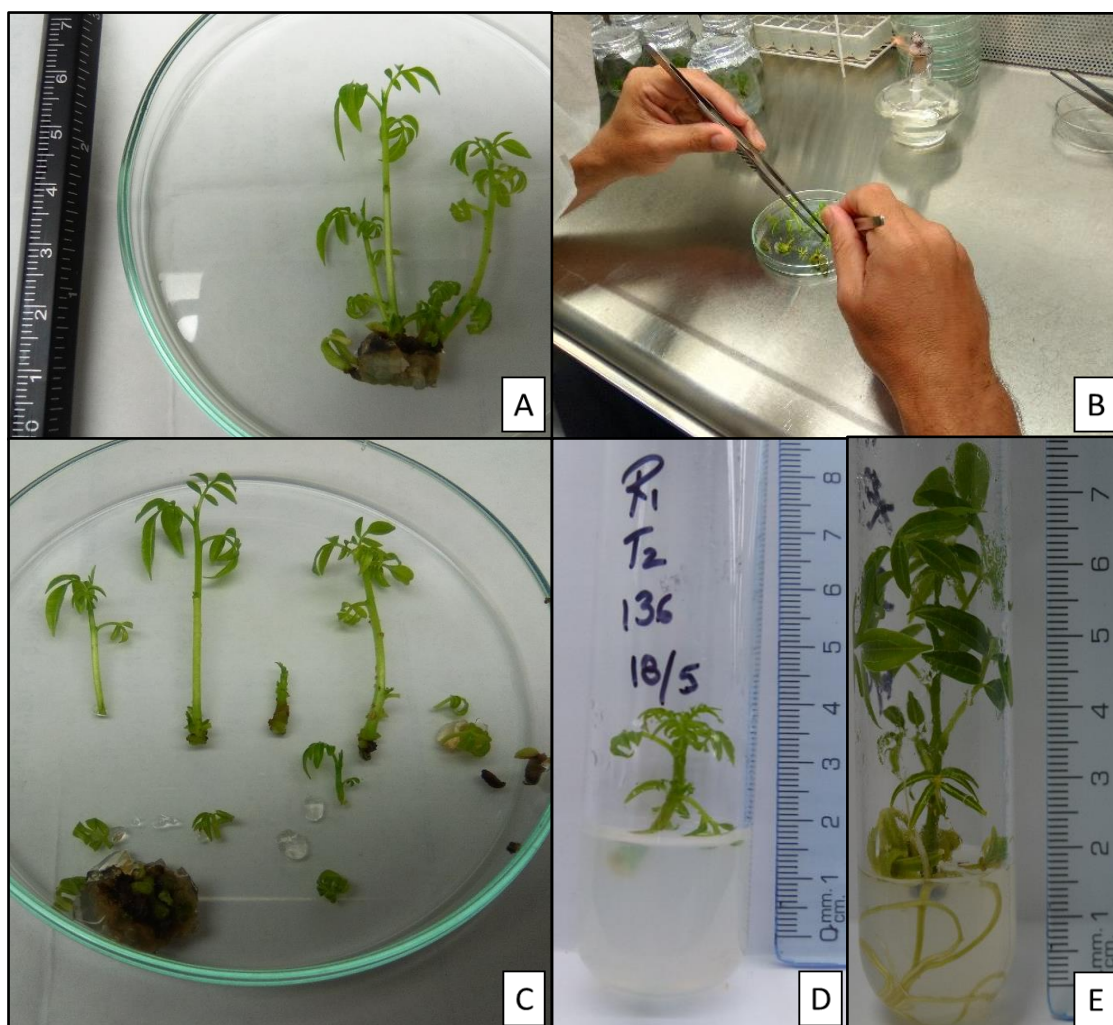
Esta fase se efectuó en condiciones *in vitro*, para ello se empleó los brotes producidos durante la fase de multiplicación, es decir aquellas yemas apicales con una medida inicial mínima 15 mm de longitud, los que fueron transferidos a 10 ml medio de cultivo sólido MS (1962) en tubos de ensayo de 25 x 150 mm y de acuerdo a los tratamientos descritos en la tabla 8, a fin de evaluar el efecto de la interacción de las diferentes auxinas (AIB-ácido indolbutírico; ANA-ácido naftalenacético; AIA-ácido indolacético) a diferentes concentraciones (0 mg/L; 0,5 mg/L; 1,0 mg/L) en la formación de raíces adventicias.

Tabla 8: Tratamientos evaluados en la fase de enraizamiento *in vitro* de *Cedrela lilloi* C. DC.

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
1	MS sin auxinas (testigo)
2	MS+0,5 mg/L AIB
3	MS+1,0 mg/L AIB
4	MS+0,5 mg/L ANA
5	MS+1,0 mg/L ANA
6	MS+0,5 mg/L AIA
7	MS+1,0 mg/L AIA

FUENTE: Elaboración propia

En la Figura 9 se puede observar la secuencia del desarrollo de la fase de enraizamiento para *Cedrela lilloi* C. DC. en condiciones *in vitro*.



(A) Obtención de brotes provenientes del quinto subcultivo; (B) Disección para la obtención de microestacas; (C) Microestacas disponibles para cultivar en tratamientos de enraizamiento; (D) Microestaca en medio de enraizamiento día uno; (E) Microestaca con formación de raíz a la quinta semana de sembrada.

Figura 9: **Desarrollo de la fase de enraizamiento *in vitro* de *Cedrela lilloi***

FUENTE: *Elaboración propia*

### 3.3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA FASE DE ENRAIZAMIENTO

Se efectuó un diseño completamente al azar (DCA), con tres repeticiones y diez sub unidades cada uno por tratamiento, conforme a la Tabla 9.

**Tabla 9: Diseño experimental para la fase de enraizamiento de *Cedrela lilloi* C. DC.**

Unidad experimental	10
Número de tratamientos	7
Número de repeticiones	3
Número total de frascos por tratamiento	30
Número total de explantes	210

FUENTE: *Elaboración propia*

### **3.3.2. EVALUACIÓN DE LA FASE DE ENRAIZAMIENTO**

Después de haber transcurrido 5 semanas del subcultivo de las microestacas en los tratamientos aplicados para la fase de enraizamiento, se evaluó el porcentaje de microestacas que presentaron formación radicular, además de las siguientes variables:

#### **a. Presencia de raíces PR (%)**

Se refiere al número de microestacas que formaron raíces respecto al total de microestacas sembradas expresado en porcentaje

$$PR (\%) = (Mr/Mt) \times 100$$

Donde:

Número total de microestacas sembradas: Mt

Número total de microestacas con raíces desarrolladas: Mr

#### **b. Número de raíces por microestaca (NR)**

Se describe como el número de raíces desarrolladas por microestaca en un periodo de 5 semanas.

#### **c. Longitud de raíces LG (mm)**

Se refiere a la longitud de raíz medida desde el cuello de la raíz hasta la cofia de la misma, para su medición se empleó una regla milimétrica.

#### **d. Formación de callo FC (%)**

Se refiere al número de microestacas que presentaron formación de callo (masa de tejido no diferenciado formado en el cuello de la planta) en el periodo de 5 semanas expresado en porcentaje. La medición fue realizada de manera visual de acuerdo a la clasificación que se aprecia en la Figura 10.



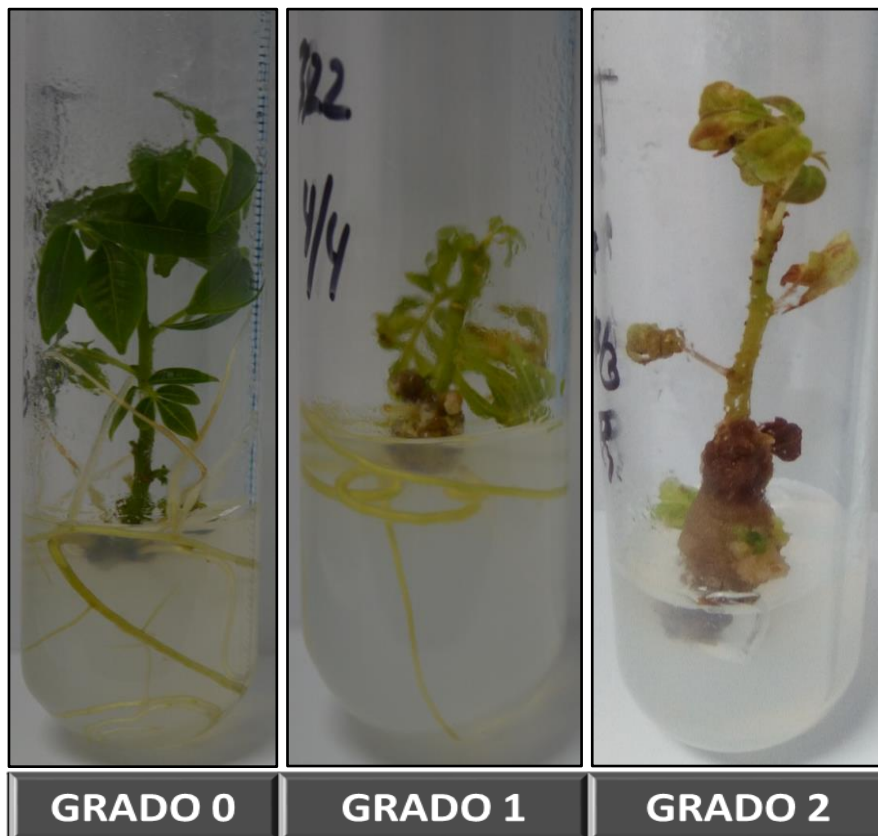


Figura 10: Clasificación visual de grado de formación de callo en la fase de enraizamiento *in vitro* de *Cedrela lilloi* C. DC.

FUENTE: Elaboración propia

$$FC (\%) = (Mc/Mt) \times 100$$

Donde:

Número total de microestacas sembradas: Mt

Número de microestacas con formación de callo: Mc

### 3.4. ACLIMATACIÓN

Posterior a la fase de enraizamiento aquellas plántulas que presentaron tamaño superior a los 50 mm de longitud y desarrollo radicular (mínimo 1 raíz) fueron trasladadas de condiciones *in vitro* a *ex vitro*. Para ello, se eliminó completamente el agar colocando las vitroplantas en una bandeja con agua destilada y con la ayuda de una pinza proceder a retirar los excesos de agar entre raíces, a fin de evitar la aparición de hongos, seguidamente impidiendo la deshidratación, se sembraron en los sustratos que se describen la tabla 10. Finalmente, se colocaron en una cámara de crecimiento vegetal, a una temperatura de

20±2°C con 70% de humedad relativa y fotoperiodo de 16 horas luz 8 horas oscuridad a una intensidad lumínica de 5440 lux, por un periodo de 8 semanas.

**Tabla 10: Tratamientos de la fase de aclimatación *ex vitro* de *Cedrela lilloi* C. DC.**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
1	Jiffy 50F (Pastillas de musgo de turba comprimida)
2	PREMIX #8 (Sustrato de musgo de turba + vermiculita/perlita)

FUENTE: Elaboración propia



(A) Eliminación del agar en raíces; (B) Siembra de plántulas en sustrato Premix #8; (C) Siembra de plántulas en sustrato Jiffy.

**Figura 11: Desarrollo de la fase de aclimatación *ex vitro* de *Cedrela lilloi***

FUENTE: Elaboración propia



Figura 12: **Plántulas de *Cedrela lilloi* en cámara de crecimiento vegetal en la fase de aclimatación.**

FUENTE: *Elaboración propia*

### 3.4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA FASE DE ACLIMATACIÓN

Se efectuó un diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones y veinte subunidades por tratamiento, conforme a la Tabla 11.

Tabla 11: **Diseño experimental para la fase de aclimatación de *Cedrela lilloi* C. DC.**

Unidad experimental	20
Número de tratamientos	2
Número de repeticiones	3
Número total de plántulas por tratamiento	60
Número total de plántulas	120

FUENTE: *Elaboración propia*

### 3.4.2. EVALUACIÓN DE LA FASE DE ACLIMATACIÓN

A las 8 semanas de haberse iniciado la fase de aclimatación, se evaluó el porcentaje de plántulas que sobrevivieron a condiciones *ex vitro*.

En esta fase se evaluó las siguientes variables:

**a. Porcentaje de plántulas aclimatadas PA (%)**

Se refiere al número de plántulas aclimatadas, es decir aquellas sobrevivientes, respecto al total de plántulas expresado en porcentaje.

$$PA (\%) = (Pa/Pt) \times 100$$

Donde:

Número total de plántulas: Pt

Número de plántulas aclimatadas: Pa

**b. Incremento en altura ( $\Delta h$ )**

Es la magnitud del crecimiento, matemáticamente se define como la diferencia de la altura final (posterior a las 8 semanas) respecto la altura inicial de la plántula (antes de la aclimatación). Las mediciones se realizaron empleando una regla milimétrica, desde el cuello de la base hasta el extremo apical, se repitió el procedimiento en ambos tratamientos. Finalmente se obtuvo el promedio de incremento en altura en *Cedrela lilloi* por tratamiento.

**c. Incremento del número de hojas ( $\Delta \#h$ )**

Se define como la diferencia del número de hojas presentes en las plántulas al final de la fase de aclimatación y las presentes en un inicio de la fase, para ello, se realizó el conteo inicial de hojas de las plántulas antes de que ingresen a la cámara de crecimiento, transcurridas 8 semanas, se repitió el procedimiento para la medida final en ambos tratamientos. Finalmente se obtuvo obtener el incremento promedio del número de hojas de las plántulas *Cedrela lilloi* por tratamiento.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO O INICIACIÓN

#### 1.1. PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN EN SIEMBRA CS (%)

La acción del hipoclorito de sodio al 0,9 % por 20 minutos para *Cedrela lilloi* desarrollado por Cabrera (2016) y aplicado en la presente investigación, permitió obtener en la fase de iniciación un resultado del porcentaje de contaminación de 9,32 % para un total de 880 embriones cigóticos sembrados; de los cuales el 7,73 % corresponde a contaminación por bacterias, el 1,36 % a aquellas causadas por hongos y 0,23 % a contaminación por bacterias y hongos, tal como se muestra en la Figura 13. Los resultados son ligeramente mejores a los obtenidos por Pérez *et al.* (2002) en su investigación realizada en *Cedrela odorata*, obteniendo un porcentaje de contaminación del 10% en semilla con cuatro o más meses de almacenada.

De acuerdo con Pérez (1998), las bacterias son consideradas por muchos autores como los contaminantes más comunes. Castro, citado por Pérez *et al.* (2002) argumenta que la asociación de las semillas de especies forestales tropicales con muchos microorganismos de manera natural ayudan a los procesos de germinación, sin embargo, esto representa un factor limitante para los trabajos *in vitro*.

Por otro lado, Valverde *et al.* (2008) comentan que es frecuente observar la presencia de una bacteria en el cultivo *in vitro* de *Cedrela odorata*, con un comportamiento similar al encontrado en *Cedrela salvadorensis*.

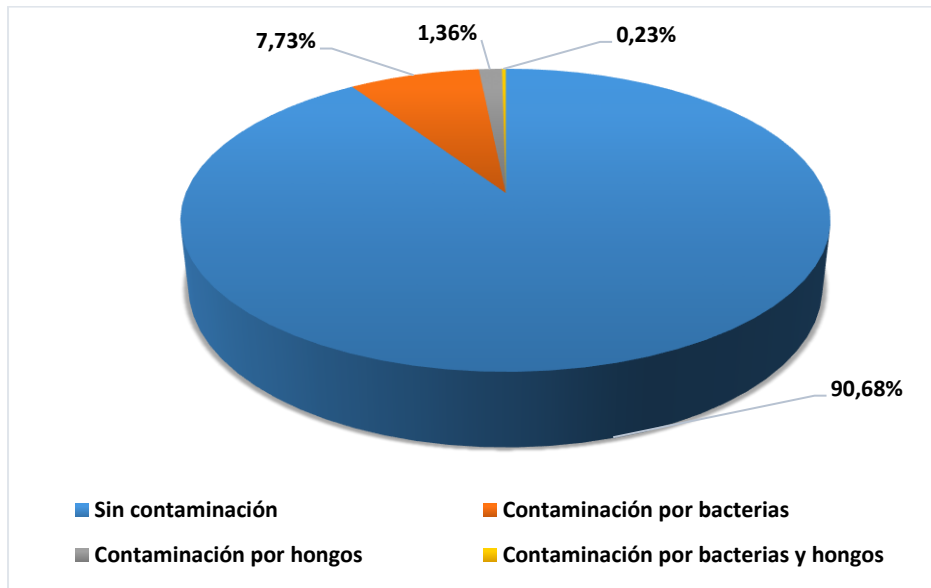
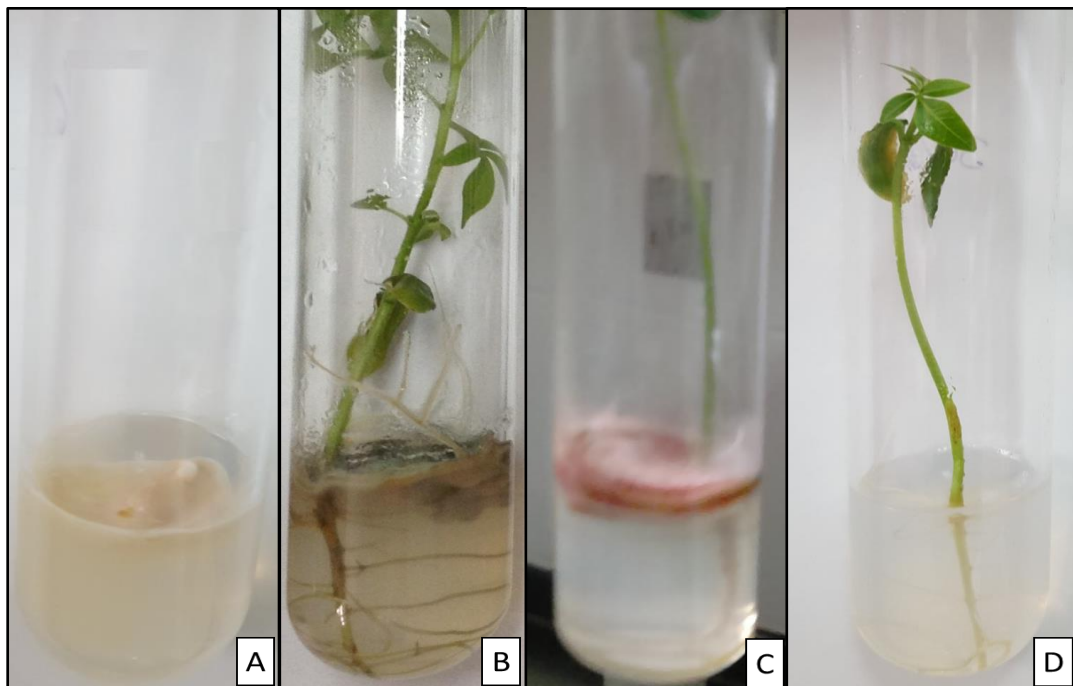


Figura 13: **Contaminación de embriones cigóticos en el establecimiento *in vitro***

En la Figura 14 se muestran los diferentes agentes contaminantes obtenidos en el establecimiento *in vitro* de *Cedrela lilloi*.



(A) Contaminación por bacteria; (B) Contaminación por hongo; (C) Contaminación por hongo y bacteria; (D) Vitroplanta sin contaminación.

Figura 14: **Agentes contaminantes presentes en la fase de iniciación *in vitro* de *Cedrela lilloi***

Aponte (2008) determinó un procedimiento para la desinfección de semillas de *Cedrela odorata* para su germinación *in vitro*, con hipoclorito de sodio al 2% durante 40 minutos

obteniendo 0% contaminación, del mismo estudio se aprecia que una reducción de 10 minutos en el tiempo de inmersión incrementó el porcentaje de contaminación a 60%. Es posible que al aumentar el tiempo de inmersión en *Cedrela lilloi* permita reducir el porcentaje de contaminación, sin embargo habrá que evaluar el efecto del hipoclorito de sodio sobre los embriones, ya que esto puede disminuir el porcentaje de germinación *in vitro*.

Por otro lado, Soto *et al.* (2010) obtuvieron 14% de contaminación en sus trabajos en el establecimiento *in vitro* de *Cedrela salvadorensis* sumergiendo los frutos en hipoclorito de sodio al 3% por 40 minutos. En contraste, los resultados obtenidos en la presente investigación se muestran superiores al haber obtenido 9,32% utilizando semillas y empleando 0,9 % NaOCl durante 20 minutos.

Santamaría (2012) obtuvo 2,3% de contaminación en la desinfección de embriones cigóticos de *Cedrela montana* para su germinación *in vitro* empleando hipoclorito de sodio al 0,5% v/v también logró buenos resultados empleando peróxido de hidrogeno al 3% v/v presentando un porcentaje de contaminación del 3,9%, sin embargo, nuestros resultados difieren a los obtenido por el autor en mención, debido a que posiblemente la carga de patógenos en su muestra fue menor.

## **1.2. PORCENTAJE DE GERMINACIÓN (%)**

El porcentaje de germinación obtenido a las 4 semanas de la introducción *in vitro* de los embriones cigóticos de *Cedrela lilloi*, fue de 72,50 % de un total de 880 embriones cigóticos, de los cuales el 56,48 % corresponde a embriones germinados y con yemas potenciales, es decir, aquellas que desarrollaron brotes con yemas apicales adecuadas para la siguiente fase y el 16,02 % correspondiente a embriones germinados pero no desarrollados, tal como se muestra en la Figura 15. Para la presente investigación los embriones germinados pero no desarrollados se representan a individuos con desarrollo amorfo, tallo enroscado, raíz superficial o con solo cotiledones, como se detalla en la Figura 16.

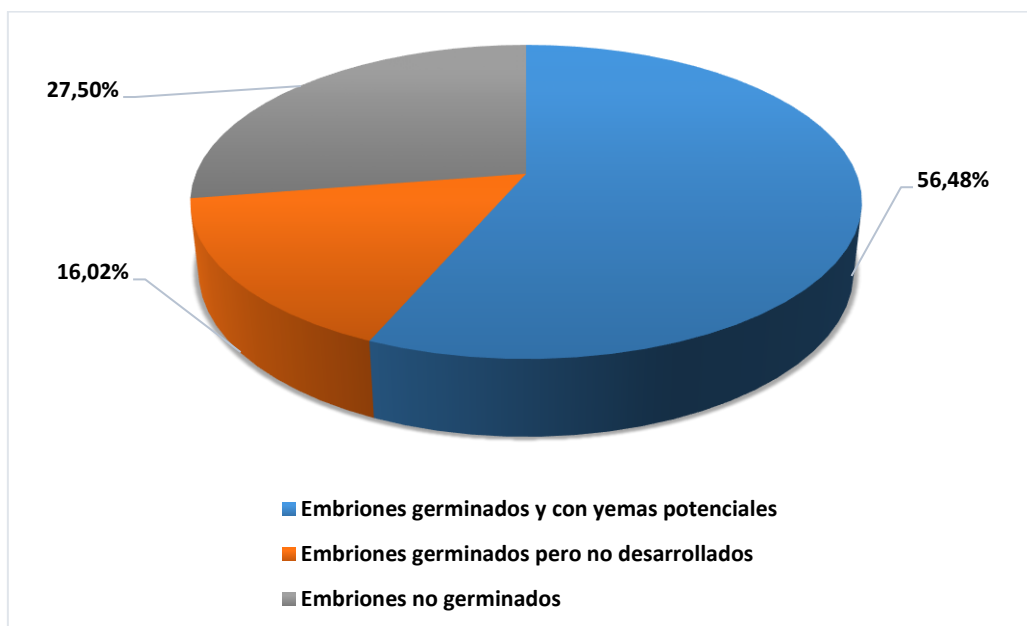


Figura 15: **Porcentaje de germinación de embriones cigóticos sembrados en la fase de establecimiento del cultivo**

*FUENTE: Elaboración propia*

En la investigación realizada por Santamaría (2012), la utilización de brasinolida y ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) como biorreguladores en presencia del medio MS (1962) en la etapa de germinación *in vitro* de *Cedrela montana*, permitió obtener un porcentaje de germinación del 67 y 77%, lo cual favoreció en la obtención de plantas completamente desarrolladas, en ese mismo sentido, Díaz (2012) al adicionar 2 mg/L de AG<sub>3</sub> al medio MS, registró resultados de porcentaje de germinación para *Cedrela montana* con 72%. Estos resultados coinciden con los obtenidos en la presente investigación a pesar de no haber utilizado AG<sub>3</sub> como agente inductor de germinación.

Los resultados obtenidos por Soto *et al.* (2010) sobre los porcentajes de germinación de los embriones cigóticos de sus ensayos *in vitro* de *Cedrela salvadorensis* sobre un medio MS (1962) fueron del 82%; sin embargo, estos resultados no pueden ser comparables con la presente investigación, puesto que ellos utilizan frutos cerrados y esta condición favorecería la menor contaminación por agentes externos. Por otro lado, Perik (1990) sostiene que estas diferencias podrían deberse al genotipo.





Figura 16: Visualización de la respuesta a la germinación *in vitro* de embriones cigóticos de *Cedrela lilloi* en la fase de establecimiento del cultivo

FUENTE: Elaboración propia

## 2. MULTIPLICACIÓN DE BROTES APICALES

De acuerdo a lo descrito en la metodología se efectuaron 5 subcultivos de *Cedrela lilloi* (cedro de altura), correspondiendo al primer subcultivo al sembrado de la yema apical obtenida en la fase de iniciación.

### 2.1. VARIABLE: TASA DE MULTIPLICACIÓN

La tasa de multiplicación se ha determinado a nivel de subcultivo; para el número de brotes obtenidos, al tratarse de una variable cuantitativa discreta, se efectuó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con el empleo del software estadístico InfoStat, en donde se obtuvo como respuesta que existen diferencias significativas en la obtención de número de brotes dependiendo el tipo de tratamiento empleado (Anexo 5).

#### 2.1.1. TASA DE MULTIPLICACIÓN SUBCULTIVO 1 – SIEMBRA DE YEMAS APICALES

Los resultados obtenidos en el sub cultivo 1 muestran que existen diferencias significativas para el número de brotes a un nivel del 95% de confianza, como se muestra en la Tabla 12.

**Tabla 12: Comparación de medias para la tasa de multiplicación en el subcultivo 1**

<i>Tratamiento</i>	<i>Medias</i>					
WPM+2,0mg/L BAP	1,20	A				
WPM+1,0mg/L BAP	1,23	A				
WPM+1,5mg/L BAP	1,37	A	B			
WPM+2,0mg/L ZEA	1,60	A	B	C		
MS+2,0mg/L ZEA	1,77	A	B	C	D	
WPM+1,5mg/L ZEA	1,80	A	B	C	D	
MS+2,0mg/LBAP	1,70	A	B	C	D	
WPM+1,0mg/L ZEA	1,90		B	C	D	E
MS+1,5mg/L BAP	1,93		B	C	D	E
WPM+0,5mg/L BAP	1,97		B	C	D	E
WPM+0,5mg/L ZEA	2,03			C	D	E
MS+0,5mg/L BAP	2,37				D	E F
MS+1,0mg/L BAP	2,47					E F
MS+1,5mg/L ZEA	2,53					E F
MS+1,0mg/L ZEA	2,67					E F
MS+0,5mg/L ZEA	3,13					F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

*FUENTE: Elaboración propia*

Por otro lado, como se puede apreciar no existe una marcada diferencia significativa entre los tratamientos T1, T2, T7, T6 y T5 siendo estos aquellos sembrados en un medio de cultivo MS (1962). El tratamiento T5 correspondiente a un medio de cultivo MS (1962) con una concentración de 0,5 mg/L de ZEA obtuvo una media de 3,13 brotes siendo este el de mejores resultados.

### 2.1.2. TASA DE MULTIPLICACIÓN SUBCULTIVO 2

Los resultados obtenidos en el subcultivo 2 muestran que existen diferencias significativas para el número de brotes a un nivel del 95% de confianza, tal como se muestra en la Tabla 13.

**Tabla 13: Comparación de medias para la tasa de multiplicación en el subcultivo 2**

<i>Tratamiento</i>	<i>Medias</i>								
WPM+2,0mg/L BAP	0,57	A							
WPM+1,0mg/L BAP	0,80	A	B						
WPM+2,0mg/L ZEA	0,90	A	B	C					
WPM+1,5mg/L BAP	0,90	A	B	C					
MS+2,0mg/LBAP	0,93	A	B	C	D				
MS+2,0mg/L ZEA	1,07		B	C	D	E			
MS+1,5mg/L BAP	1,13		B	C	D	E	F		
WPM+1,5mg/L ZEA	1,17		B	C	D	E	F		
WPM+1,0mg/L ZEA	1,27			C	D	E	F	G	
MS+1,0mg/L BAP	1,33				D	E	F	G	
WPM+0,5mg/L BAP	1,43					E	F	G	
MS+1,5mg/L ZEA	1,53						F	G	
WPM+0,5mg/L ZEA	1,57						F	G	
MS+0,5mg/L BAP	1,77							G	
MS+1,0mg/L ZEA	1,80							G	
MS+0,5mg/L ZEA	2,43								H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

*FUENTE: Elaboración propia*

Como se puede apreciar en el segundo subcultivo se muestra un marcada diferencia significativa entre el tratamiento T5 con el resto de tratamientos, obteniendo una media de 2,43 brotes.

### 2.1.3. TASA DE MULTIPLICACIÓN SUBCULTIVO 3

Los resultados obtenidos en el subcultivo 3 muestran que existen diferencias significativas para el número de brotes a un nivel del 95% de confianza, como se muestra en la Tabla 14.

**Tabla 14: Comparación de medias para la tasa de multiplicación en el subcultivo 3**

<i>Tratamiento</i>	<i>Medias</i>						
WPM+2,0mg/L ZEA	0,03	A					
WPM+1,5mg/L ZEA	0,07	A					
WPM+1,0mg/L ZEA	0,17	A	B				
WPM+2,0mg/L BAP	0,27	A	B	C			
MS+2,0mg/L ZEA	0,37	A	B	C			
WPM+1,0mg/L BAP	0,50		B	C	D		
WPM+1,5mg/L BAP	0,50		B	C	D		
WPM+0,5mg/L ZEA	0,60			C	D	E	
MS +2,0mg/L BAP	0,60			C	D	E	
MS+1,5mg/L ZEA	0,87				D	E	F
MS+1,0mg/L BAP	0,97					E	F G
WPM+0,5mg/L BAP	1,00					E	F G
MS+1,5mg/L BAP	1,00					E	F G
MS+1,0mg/L ZEA	1,10						F G
MS+0,5mg/L BAP	1,40						F G
MS+0,5mg/L ZEA	1,50						G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

*FUENTE: Elaboración propia*

Se puede apreciar que en el tercer subcultivo no existe una marcada diferencia significativa entre los tratamientos T9, T6, T2, T3, T5 y T1 siendo estos aquellos que corresponden a los sembrados en un medio de cultivo MS, sin embargo en el tratamiento T5 correspondiente a un medio de cultivo MS (1962) con una concentración de 0,5 mg/L de ZEA se obtuvo una media de 1,50 brotes.

#### 2.1.4. TASA DE MULTIPLICACIÓN SUBCULTIVO 4

Los resultados obtenidos en el subcultivo 4 muestran que existen diferencias significativas para el número de brotes a un nivel del 95% de confianza, como se muestra en la Tabla 15.

**Tabla 15: Comparación de medias para la tasa de multiplicación en el subcultivo 4**

<i>Tratamiento</i>	<i>Medias</i>				
WPM+2,0mg/L BAP	0,00	A			
WPM+1,5mg/L ZEA	0,00	A			
WPM+2,0mg/L ZEA	0,00	A			
WPM+1,5mg/L BAP	0,10	A	B		
MS+2,0mg/LBAP	0,10	A	B		
WPM+1,0mg/L BAP	0,13	A	B		
WPM+1,0mg/L ZEA	0,13	A	B		
MS+2,0mg/L ZEA	0,27	A	B	C	
MS+1,5mg/L BAP	0,37		B	C	
WPM+0,5mg/L ZEA	0,57			C	D
MS+1,0mg/L BAP	0,57			C	D
WPM+0,5mg/L BAP	0,57			C	D
MS+1,5mg/L ZEA	0,77			C	D
MS+0,5mg/L ZEA	1,23				D E
MS+1,0mg/L ZEA	1,27				D E
MS+0,5mg/L BAP	1,33				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

*FUENTE: Elaboración propia*

Como se puede apreciar en el cuarto subcultivo no existe una marcada diferencia significativa entre los tratamientos T6, T5 y T1 sembrados en un medio de cultivo MS, a pesar de ello, el tratamiento T1 presenta una ligera media superior, correspondiente a un medio de cultivo MS (1962) con una concentración de 0,5 mg/L de BAP representado por una media de 1,33 brotes.

### 2.1.5. TASA DE MULTIPLICACIÓN SUBCULTIVO 5

Los resultados obtenidos en el subcultivo 5 muestran que existen diferencias significativas para el número de brotes a un nivel del 95% de confianza, como se muestra en la Tabla 16.

**Tabla 16: Comparación de medias para la tasa de multiplicación en el subcultivo 5**

<i>Tratamiento</i>	<i>Medias</i>				
WPM+2,0mg/L BAP	0,00	A			
WPM+1,5mg/L BAP	0,00	A			
WPM+1,0mg/L BAP	0,00	A			
MS+2,0mg/LBAP	0,00	A			
WPM+2,0mg/L ZEA	0,00	A			
WPM+1,5mg/L ZEA	0,00	A			
MS+1,5mg/L BAP	0,03	A	B		
WPM+1,0mg/L ZEA	0,03	A	B		
MS+2,0mg/L ZEA	0,07	A	B		
WPM+0,5mg/L ZEA	0,17	A	B	C	
MS+1,0mg/L BAP	0,27	A	B	C	
MS+1,5mg/L ZEA	0,43		B	C	D
WPM+0,5mg/L BAP	0,50			C	D
MS+1,0mg/L ZEA	0,90				D E
MS+0,5mg/L BAP	1,20				E
MS+0,5mg/L ZEA	1,27				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

*FUENTE: Elaboración propia*

Como se puede apreciar en el quinto subcultivo no existe una marcada diferencia significativa entre los tratamientos T6, T1 y T5 siendo estos a los que pertenecen a los explantes sembrados en medio de cultivo MS (1962), dentro de ellos resalta el tratamiento T5 correspondiente a una concentración de 0,5 mg/L de ZEA donde se obtuvo una media de 1,27 brotes.

### 2.1.6. DETERMINACIÓN DE LA TASA DE MULTIPLICACIÓN EN CINCO SUBCULTIVOS

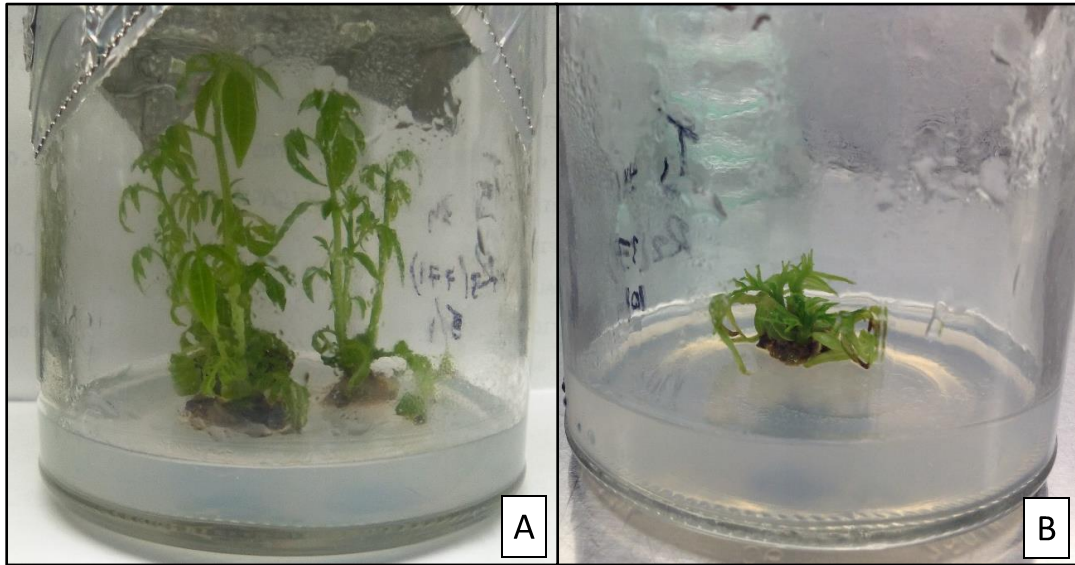
Se encontró diferencias significativas con la prueba Kruskal-Wallis al 95% de confianza para el número de brotes obtenidos. La mejor tasa de multiplicación se obtuvo en el tratamiento T5. En la siguiente tabla se observa los valores promedios del número de brotes obtenidos en cada tratamiento en los 5 subcultivos sucesivos desarrollados.

**Tabla 17: Tasa promedio de multiplicación por subcultivo y por tratamiento**

Tratamiento		Número de Subcultivo					Tasa Promedio
		1	2	3	4	5	
T1	MS+0,5mg/L BAP	2,37	1,77	1,40	1,33	1,20	<b>1,61</b>
T2	MS+1,0mg/L BAP	2,47	1,33	0,97	0,57	0,27	1,12
T3	MS+1,5mg/L BAP	1,93	1,13	1,00	0,37	0,03	0,89
T4	MS+2,0mg/LBAP	1,70	0,93	0,60	0,10	0,00	0,67
T5	MS+0,5mg/L ZEA	3,13	2,43	1,50	1,23	1,27	<b>1,91</b>
T6	MS+1,0mg/L ZEA	2,67	1,80	1,10	1,27	0,90	1,55
T7	MS+1,5mg/L ZEA	2,53	1,53	0,87	0,77	0,43	1,23
T8	MS+2,0mg/L ZEA	1,77	1,07	0,37	0,27	0,07	0,71
T9	WPM+0,5mg/L BAP	1,97	1,43	1,00	0,57	0,50	1,09
T10	WPM+1,5mg/L BAP	1,37	0,90	0,50	0,10	0,00	0,57
T11	WPM+1,0mg/L BAP	1,23	0,80	0,50	0,13	0,00	0,53
T12	WPM+2,0mg/L BAP	1,20	0,57	0,27	0,00	0,00	0,41
T13	WPM+0,5mg/L ZEA	2,03	1,57	0,60	0,57	0,17	0,99
T14	WPM+1,0mg/L ZEA	1,90	1,27	0,17	0,13	0,03	0,70
T15	WPM+1,5mg/L ZEA	1,80	1,17	0,07	0,00	0,00	0,61
T16	WPM+2,0mg/L ZEA	1,60	0,90	0,03	0,00	0,00	0,51

FUENTE: Elaboración propia

Se puede observar que la tasa de multiplicación *in vitro* de *Cedrela lilloi* responde mejor en los tratamientos con concentraciones bajas de citoquininas (0,5 mg/L o 1,0 mg/L) obteniéndose, en el análisis estadístico, una ligera variación en el resultado con el medio enriquecido con ZEA al 0,5 mg/L respecto al tratamiento adicionado con BAP al 0,5 mg/L. Visualmente las vitroplantas desarrolladas en el T5 muestran mayor vigor, tal como se puede apreciar en las Figuras 17, 18 y 19.



(A) Tratamiento T5 (MS + 0,5 mg/L ZEA); (B) Tratamiento T1 (MS + 0,5 mg/L BAP)

Figura 17: **Fase de multiplicación – tercer subcultivo**

*FUENTE: Elaboración propia*

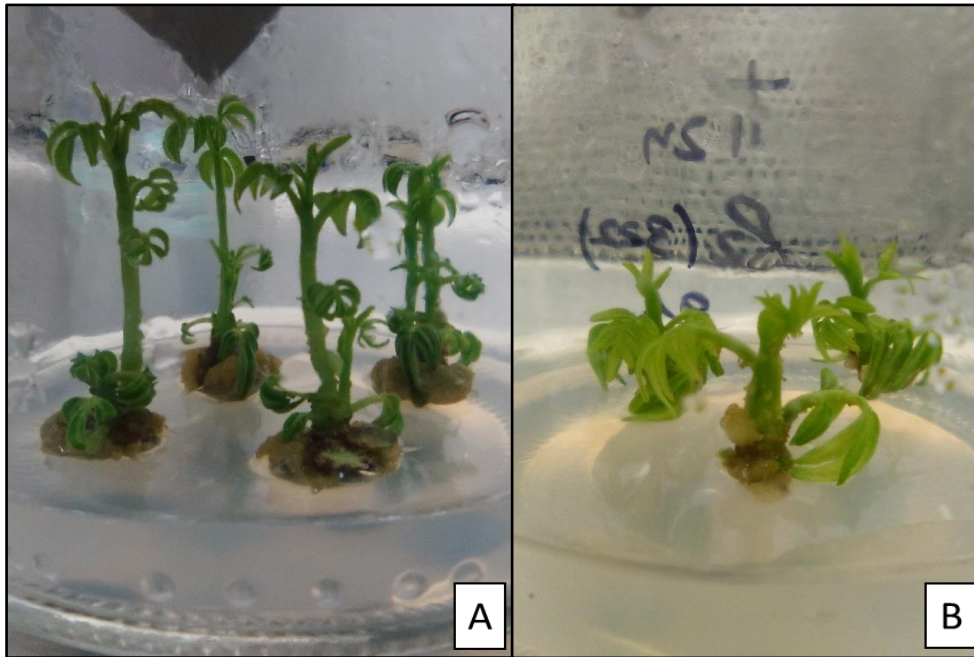


(A) Tratamiento T5 (MS + 0,5 mg/L ZEA); (B) Tratamiento T1 (MS + 0,5 mg/L BAP)

Figura 18: **Fase de multiplicación – cuarto subcultivo**

*FUENTE: Elaboración propia*





(A) Tratamiento T5 (MS + 0,5 mg/L ZEA); (B) Tratamiento T1 (MS + 0,5 mg/L BAP)

Figura 19: **Fase de multiplicación – quinto subcultivo**

FUENTE: *Elaboración propia*

Según el análisis estadístico, usando medio MS adicionado de 0,5 mg/L BAP respecto al mismo medio con 0,5 mg/L ZEA no muestran diferencias significativas.

La tasa de multiplicación obtenida en la presente investigación es superior respecto a lo reportado para *Cedrela odorata* por Pérez *et al.* (2002) quienes obtuvieron una tasa de multiplicación de 1,0 usando un medio MS (1962) adicionado de 0,5 mg/L BAP. El mismo autor informa que Guevara *et al.* (1992) obtuvieron un resultado similar en *Cedrela tonduzzi* a la misma concentración de BAP (0,5 mg/L).

En ese mismo sentido, Remache (2011) en su investigación en *Cedrela montana* obtuvo la misma tasa de multiplicación empleando una combinación de MS adicionado de 4 mg/L kinetina y 3 g/L de carbón activado.

Por otro lado, en la investigación *in vitro* con *Cedrela salvadorensis* desarrollada por Soto *et al.* (2010) en medio MS (1962) adicionada de benciladenina (BA) a concentraciones de 0; 0,5; 1,5; 2,5 y 3, 5 mg/L no obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos, logrando una tasa de multiplicación de 2,0.

Como referencia los resultados obtenidos de la tasa de multiplicación por Díaz (2012) en *Cedrela montana* empleando como medio de cultivo MS adicionado con 1,0 mg/L BAP fue de 2,7 y difieren de la presente investigación, ya que los resultados obtenidos muestran una tasa de multiplicación menor conforme aumenta la concentración del regulador de crecimiento.

### 2.1.7. EVALUACIÓN DEL SEXTO SUBCULTIVO EN EL TRATAMIENTO T5

A partir de los 5 subcultivos sucesivos realizados en la fase de multiplicación de la presente investigación obtenidos en el tratamiento T5 (0,5 mg/L ZEA) se ha evaluado un sexto subcultivo con la finalidad de observar su comportamiento.

En la Figura 20 se muestran los resultados obtenidos del número de brotes promedio para la especie *Cedrela lilloi* en el tratamiento T5 (0,5 mg/L ZEA) en cada uno de los 6 subcultivos, en un inicio se obtuvo una tasa de multiplicación de 3,13, la cual fue decayendo hasta el 4to subcultivo presentando una media de 1,23; sin embargo, esta fue en aumento a partir del 5to subcultivo y en el 6to subcultivo se obtuvo una tasa de multiplicación de 2,90. Es probable que ello se deba a que los individuos sobrevivientes de cada subcultivo son los que presentan un mejor genotipo.

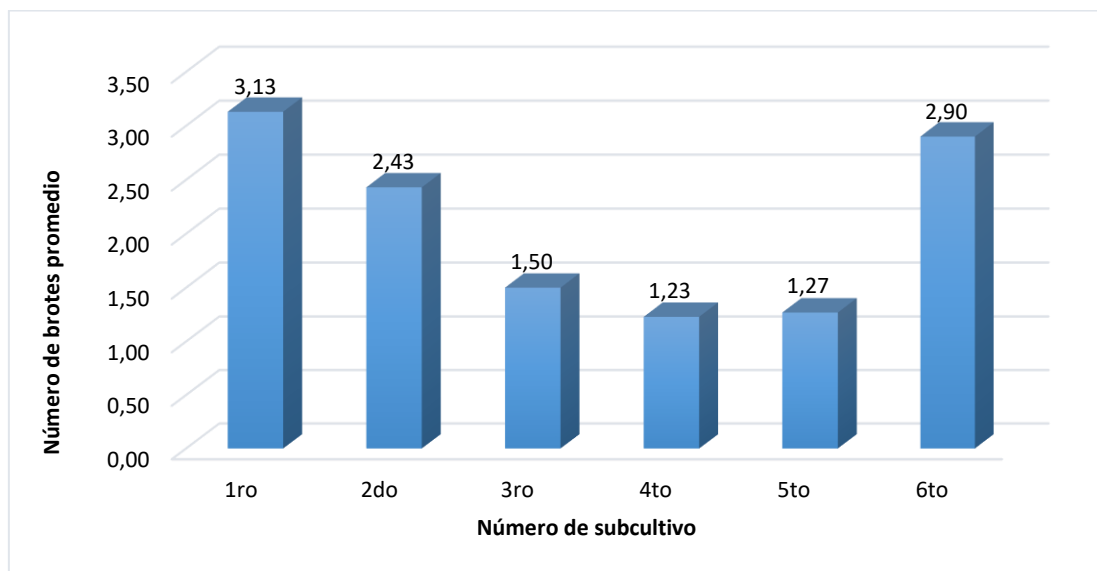


Figura 20: **Número de brotes promedio por subcultivo obtenidos en el tratamiento T5.**

FUENTE: *Elaboración propia*

## 2.2. VARIABLE: FORMACIÓN DE CALLO

Respecto a la frecuencia sobre la variable formación de callo para los 5 subcultivos realizados en la fase de multiplicación los resultados obtenidos muestran que todos los tratamientos tienen una mayor frecuencia de callo con el grado cero (0), es decir, no hay formación de callo en el explante y las frecuencias en los grados 2 y 3 son bajas (Figura 21).

Por otro lado, comparando la formación de callo respecto al medio de cultivo empleado se encuentra una ligera presencia en la formación de callo en los explantes cultivados en el medio de cultivo MS (1962) y una casi nula formación en los explantes desarrollados en medio de cultivo WPM (1981).

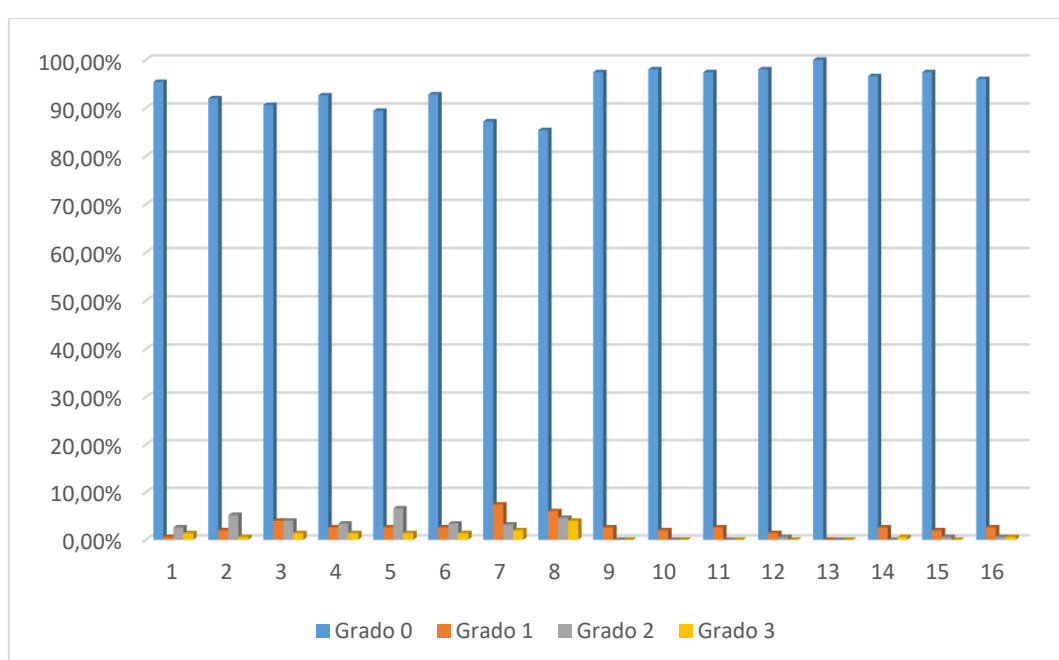


Figura 21: **Formación promedio de callo en cinco subcultivos consecutivos expresado en porcentaje (%) por tratamiento en la fase de multiplicación**

FUENTE: *Elaboración propia*

## 2.3. VARIABLE: NECROSIS

En relación a la variable necrosis, los tratamientos muestran una mayor frecuencia en el grado uno (1), es decir que la presencia de tejido necrosado es leve. La necrosis tiende a ser mayor en los explantes cultivados en los tratamientos conteniendo WPM (1981) respecto a los tratamientos con MS (1962).

Asimismo, se observó mayor frecuencia de necrosis conforme aumenta la concentración de las citoquininas, tal es el caso, de los tratamientos T12 y T16 (concentraciones de 2,0 mg/L

de BAP y ZEA respectivamente) muestran las mayores frecuencias de individuos necrosados (grado 3) con porcentajes de 54,80 % y 60,60 % correspondientemente (Figura 22).

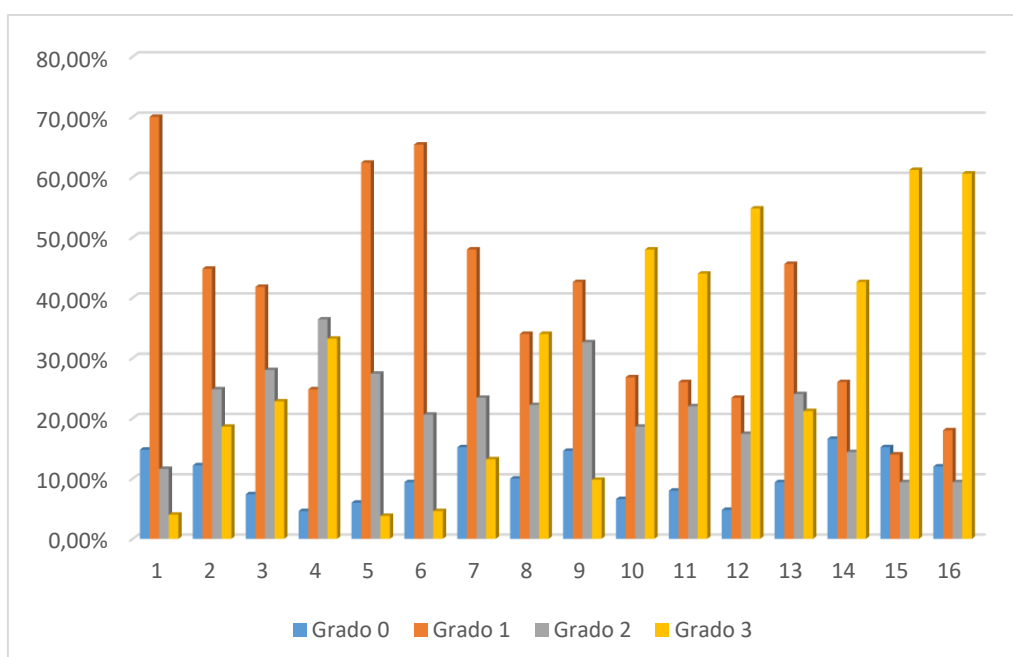


Figura 22: Promedio de necrosis en cinco subcultivos consecutivos expresados en porcentaje (%) por tratamiento en la fase de multiplicación

FUENTE: Elaboración propia

### 3. ENRAIZAMIENTO

#### 3.1. PORCENTAJE DE ENRAIZAMIENTO (%)

El porcentaje de enraizamiento para los diferentes tratamientos evaluados muestra un mayor valor en aquellas microestacas cultivadas en los tratamientos T1 (sin auxinas) y T6 (0,5 mg/L AIA).

Como se observa en la Figura 22, el T1 y T6 tienen un porcentaje de enraizamiento de 70%, valor diferente a lo reportado por Pérez *et al.* (2006) en *Cedrela odorata*, donde obtuvo 31,82% con una combinación 0,5 mg/L ANA + 1,0 mg/L AIB con mayor efecto sobre el porcentaje de enraizamiento, valor inferior al obtenido en la presente investigación.

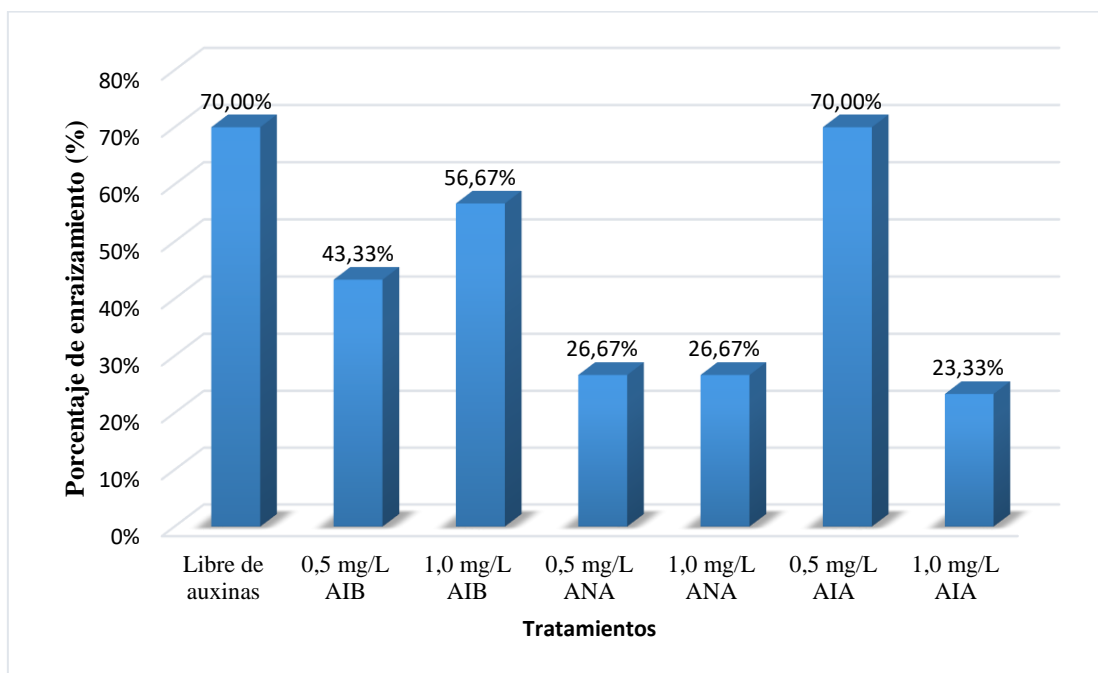


Figura 23: **Porcentaje de enraizamiento por tratamiento evaluado**

FUENTE: Elaboración propia

### 3.2. NÚMERO DE RAÍCES POR EXPLANTE

Se efectuó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con el empleo del software InfoStat, en donde se obtuvo como respuesta que existen diferencias significativas para el número de raíces a un nivel del 95% de confianza entre los tratamientos efectuados (Anexo 9)

Como se observa en la Tabla 20, no existe una marcada diferencia significativa entre los tratamientos T3, T1 y T6, siendo este último (0,5 mg/L de AIA), el tratamiento con una mayor promedio de raíces por microestaca (2,03). Los resultados difieren con los obtenidos por García-González *et al.* (2011) en *Cedrela odorata* en donde los tratamientos suplementados con 3 mg/L AIA y aquellos con 3 mg/L ANA indujeron a la mejor formación de raíz, inclusive ANA fue más eficiente obteniendo 3,9 raíces en promedio y concluyendo que existe una relación directa entre el enraizamiento y el aumento de la concentración de las mencionadas auxinas. Por otro lado, en comparación con el presente estudio los ensayos de enraizamiento con ANA resultaron con una mínima formación de raíz e inclusive los explantes fueron susceptibles a formar callo.

Por otro lado, Pérez *et al.* (2006) en *Cedrela odorata* obtuvieron que la interacción ANA 0,5 mg/L + AIB 1 mg/L en medio WPM fue estadísticamente superior obteniendo 1,02 raíces y señalan que la poca respuesta de los explantes a la inducción de raíz puede deberse a la

formación excesiva de callo observada de manera general en los tratamientos con auxinas presentes en el medio.

Esto coincide parcialmente con lo obtenido en la presente investigación debido a que ANA sobre un medio MS (1962) tuvo un efecto desfavorable en la formación de raíces en comparación a los tratamientos adicionados con AIB o en aquel sin auxinas, donde la respuesta a la formación de raíces fue más favorable como se puede observar en la Tabla 18.

**Tabla 18: Comparación de medias para el número de raíces de la fase de enraizamiento**

Tratamientos	Medias			
1,0 mg/L AIA	0,43	A		
1,0 mg/L ANA	0,50	A		
0,5 mg/L ANA	0,73	A		
0,5 mg/L AIB	0,93	A	B	
Libre de auxinas	1,47		B	C
1,0 mg/L AIB	1,77		B	C
0,5 mg/L AIA	2,03			C

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

FUENTE: Elaboración propia

No existe una marcada diferencia significativa entre los tratamientos T6 (0,5 mg/L AIA), T3 (1,0 mg/L AIB) y T1 (MS libre de auxinas), siendo este último tratamiento la opción más económica.

### 3.3. LONGITUD DE RAÍZ

La variable longitud de raíz no presentó las propiedades de normalidad ni de homogeneidad a pesar de haber realizado transformaciones logarítmicas y cuadráticas, por lo que se desarrolló la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con el empleo del software InfoStat, en donde se obtuvo como respuesta que existen diferencias significativas para el número de raíces a un nivel del 95% de confianza entre los tratamientos efectuados (Anexo 10)

Los tratamientos T6 (0,5 mg/L AIA), T3 (1,0 mg/L AIB) y T1 (MS libre de auxinas) no son significativamente diferentes entre sí; sin embargo, el T6 presenta una longitud de raíz promedio mayor que todos los tratamientos efectuados (Tabla 19).

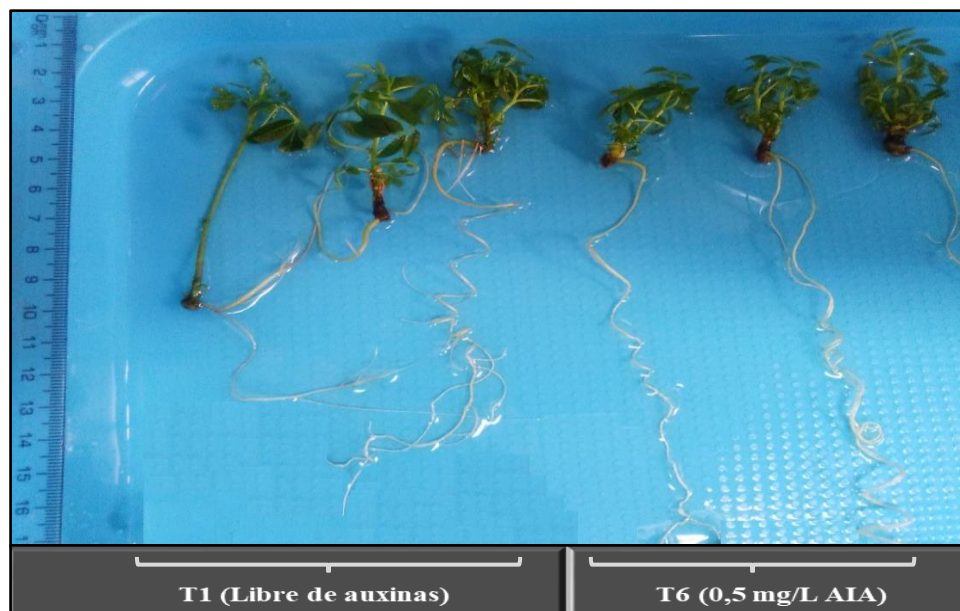
**Tabla 19: Comparación de medias para la longitud de raíz (mm) en la fase de enraizamiento**

Tratamientos	Medias (mm)		
1,0 mg/L ANA	5,40	A	
1,0 mg/L AIA	18,67	A	
0,5 mg/L ANA	21,03	A	
0,5 mg/L AIB	57,23	A	B
1,0 mg/L AIB	67,70		B
Libre de auxinas	88,63		B
0,5 mg/L AIA	98,27		B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

FUENTE: Elaboración propia

El uso de ANA en medio de enraizamiento generó el menor desarrollo de longitud de raíces en *Cedrela lilloi*. Por otro lado, Pérez *et al.* (2006) en *Cedrela odorata* obtuvieron longitudes inferiores (65,2 y 59,5 mm) en combinaciones de ANA (0,5 y 1,0 mg/L) y AIB (1,0 y 1,5 mg/L). En la presente investigación los resultados fueron mejores con AIB sin necesidad de adicionar ANA (Tabla 19). Sin embargo, la mayor media para la longitud de raíz se obtuvo en el tratamiento T6 sobre MS (1962) adicionado de 0,5 mg/L AIA (Figura 24).



**Figura 24: Fase de enraizamiento: Plántulas enraizadas a la octava semana en T1 y T6.**

FUENTE: Elaboración propia

### 3.4. FORMACIÓN DE CALLO

Los resultados obtenidos sobre la variable formación de callo en la fase de enraizamiento muestran que los tratamientos enriquecidos con la auxina ácido naftalenacético (ANA), T4 (0,5 mg/L ANA) y T5 (1,0 mg/L ANA) presentan una mayor frecuencia en la formación de callo grado dos (2), manifestándose en un 60 % y 80 %, respectivamente (Figura 25).

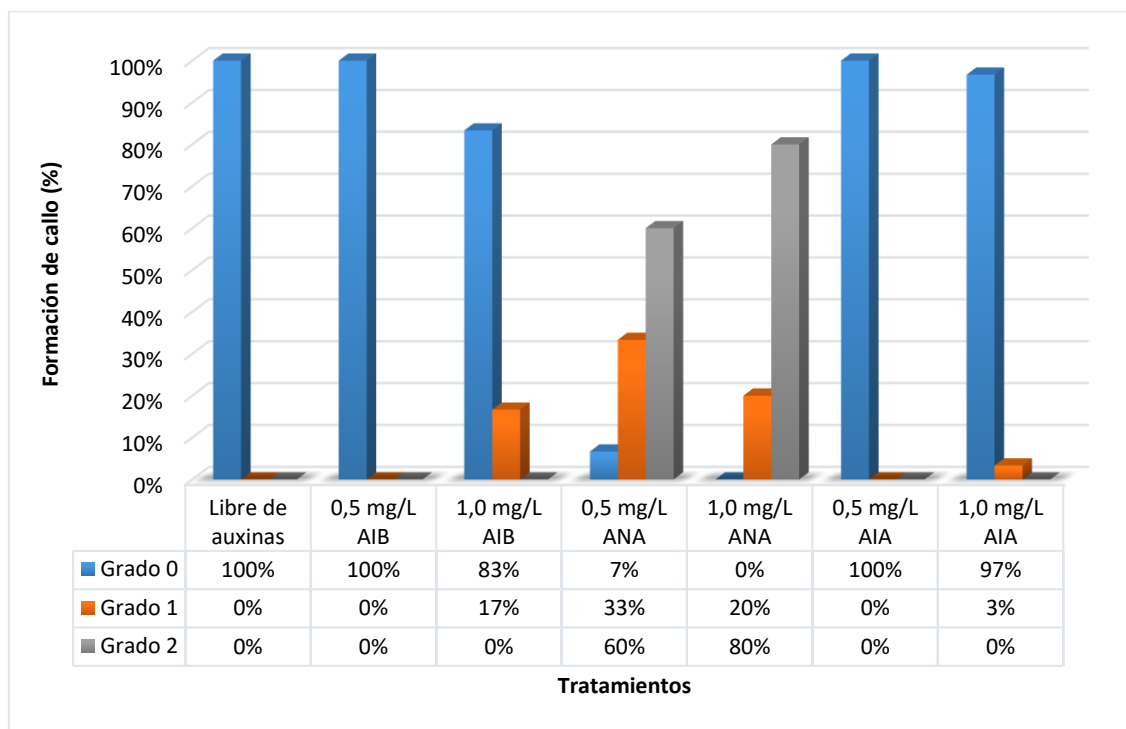
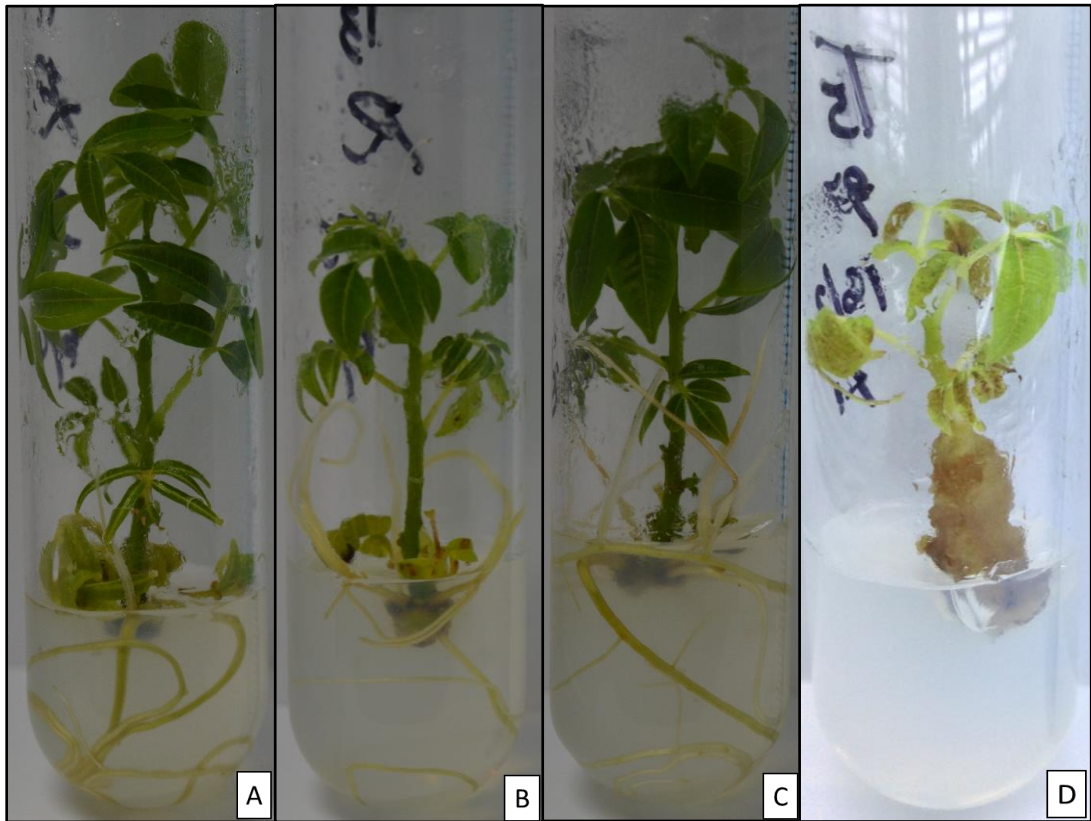


Figura 25: **Formación de callo (%) por grado en cada tratamiento desarrollado de la fase de enraizamiento**

FUENTE: *Elaboración propia*

Pérez *et al.* (2006) manifiestan que la poca respuesta a la inducción de raíz obtenida en su investigación en *Cedrela odorata* pueda deberse tanto al tamaño de brotes utilizados (10-20 mm) como a la formación excesiva de callo presente en los tratamientos empleados (combinaciones de 0,5; 1,0 y 1,5 mg/L de ANA y AIB).





(A) Plántulas enraizadas en tratamiento T1 (Libre de auxinas); (B) Plántulas enraizada en T3 (1,0 mg/L AIB); (C) Plántulas enraizada en T6 (0,5 mg/L AIA); (D) Plántulas sin enraizar en T5 (1,0 mg/L ANA) con formación de callo

Figura 26: **Fase de enraizamiento.**

*FUENTE: Elaboración propia*

## 4. ACLIMATACIÓN

### 4.1. PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA

El porcentaje de sobrevivencia para los dos sustratos empleados no muestran diferencias significativas, sin embargo, explantes cultivados en el sustrato Jiffy F50 muestra un mayor resultado con un 91,67%, respecto a los resultados obtenidos en el sustrato Premix #8 presentan un 81,67% de sobrevivencia en condiciones *ex vitro* (Figura 27).

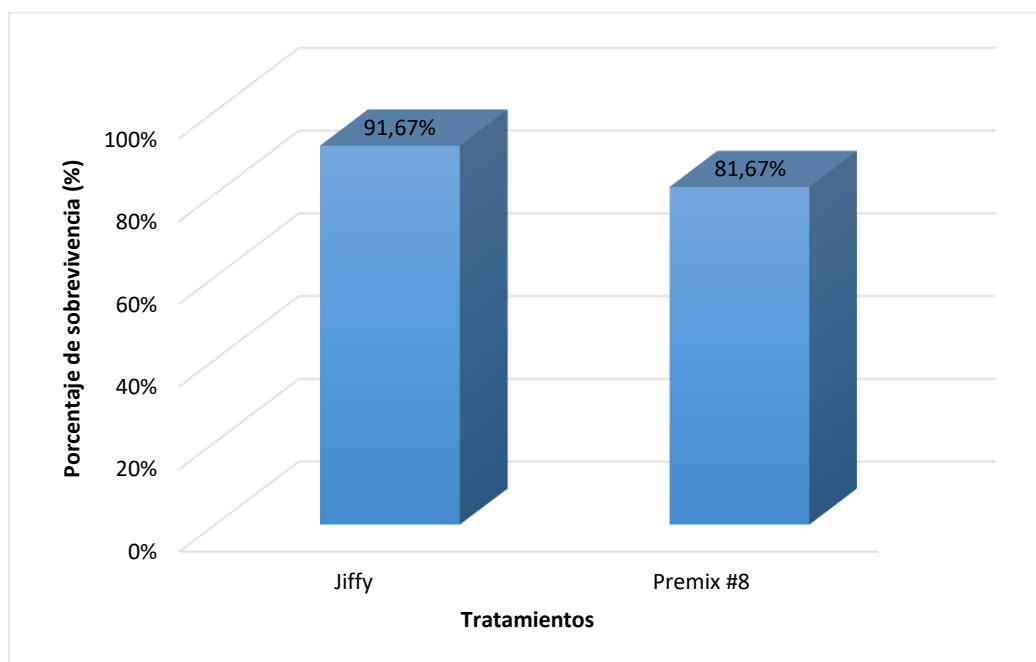
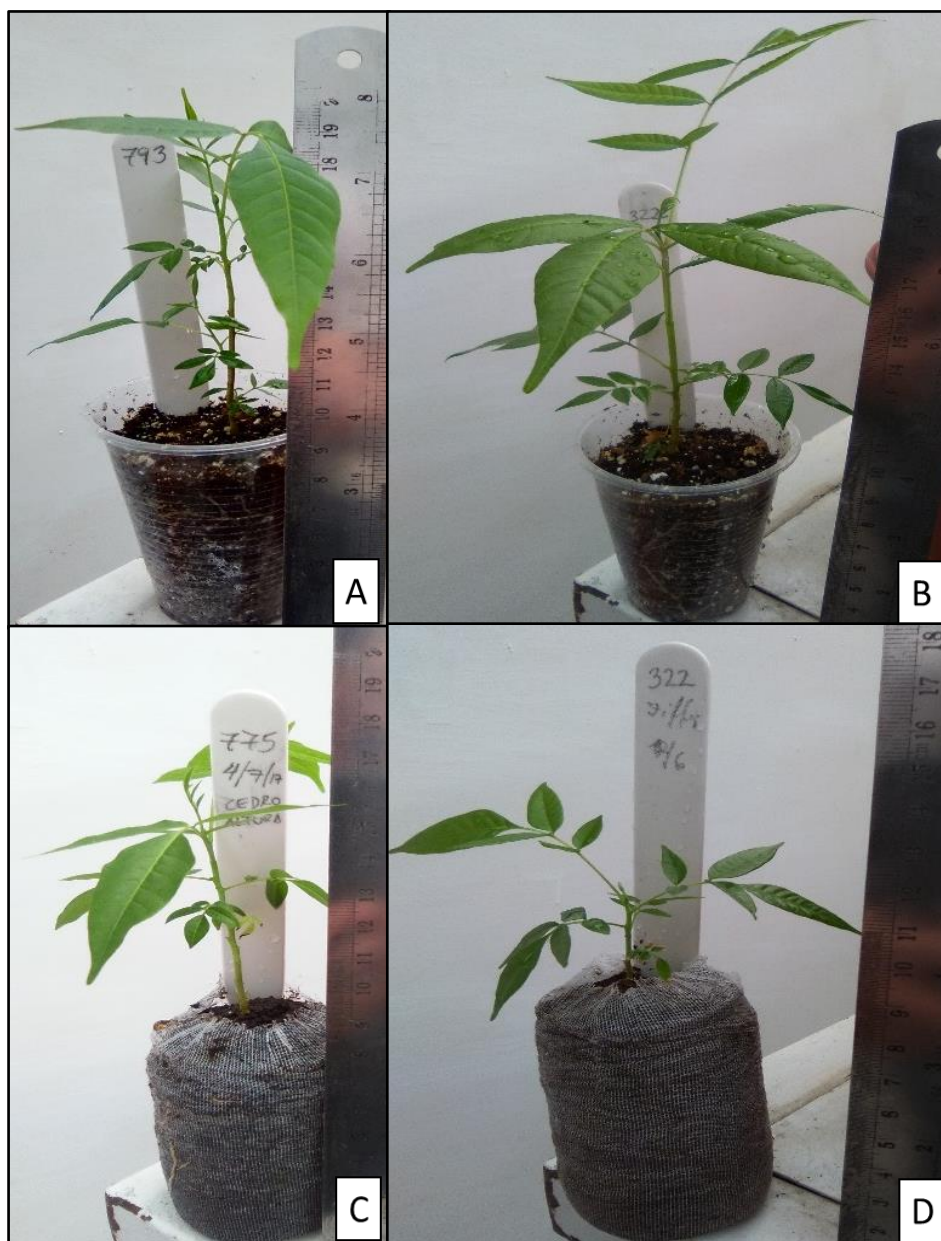


Figura 27: **Porcentaje de sobrevivencia (%) por tratamiento en la fase de aclimatación**

*FUENTE: Elaboración propia*

En los trabajos de cultivo *in vitro* realizados con diferentes especies del género *Cedrela* no se reporta resultados de aclimatación; sin embargo, en la presente investigación se obtuvo una mayor tasa de aclimatación de lo obtenido por Martínez *et al.*, (2005) quienes obtienen 75% de aclimatación de plantas provenientes de condiciones *in vitro* de *Eucalyptus grandis* en sustrato arcillo arenoso en vivero con sombra de 70%.

Indacochea *et al.* (2017) obtuvieron 65% de supervivencia en sustrato compuesto de 40% de arena de río, 40% de humus y 20% de aserrín para *Myroxylon balsamum*.



(A) y (B) Plántulas aclimatadas en sustrato Premix #8; (C) y (D) Plántulas aclimatadas en sustrato Jiffy 50F

Figura 28: **Fase de aclimatación**

*FUENTE: Elaboración propia*

#### 4.2. INCREMENTO EN ALTURA ( $\Delta H$ )

Se efectuó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con el empleo del software InfoStat, en donde se obtuvo como respuesta un p-valor de 0,82 es decir, explica que no existen diferencias significativas para el incremento de altura a un nivel del 95% de confianza entre los sustratos empleados (Tabla 20). Las medias obtenidas en ambos sustratos muestran un

incremento de altura muy similar, en promedio de 31,01 mm en un periodo de 8 semanas de aclimatación.

**Tabla 20: Comparación de medias para el incremento en altura de la fase de aclimatación**

<i>Sustrato</i>	<i>N</i>	<i>Medias</i> <i>(mm)</i>	<i>D.E.</i>	<i>p valor</i>
Jiffy	60	30,57	19,65	0,8290
Premix #8	60	31,45	24,90	

*FUENTE: Elaboración propia*

Las plántulas aclimatadas a las ocho semanas en sustratos Jiffy tuvieron una altura total promedio de 68,40 mm mientras que en el sustrato Premix #8 se obtuvo una altura de total de 74,35 mm.

#### **4.3. INCREMENTO EN EL NÚMERO DE HOJAS ( $\Delta$ #H)**

Se efectuó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con el empleo del software InfoStat, en donde se obtuvo como respuesta un p-valor de 0,20 es decir, explica que no existen diferencias significativas para el incremento en número de hojas a un nivel del 95% de confianza entre los sustratos empleados (Tabla 21). Los resultados indican que el incremento de hojas durante la aclimatación en ambos sustratos es limitado y en la mayoría de los casos no existen incrementos o no exceden a la unidad.

**Tabla 21: Comparación de medias del incremento del número de hojas de la fase de aclimatación**

<i>Sustrato</i>	<i>N</i>	<i>Medias</i>	<i>D.E.</i>	<i>p valor</i>
Jiffy	60	0,62	0,87	0,2079
Premix #8	60	0,53	1,03	

*FUENTE: Elaboración propia*

Las plántulas aclimatadas a las ocho semanas en sustratos Jiffy tuvieron un número de hojas promedio de 5 hojas compuestas mientras que en el sustrato Premix #8 se obtuvo 6 hojas compuestas.

## V. CONCLUSIONES

- 1) Se cumplió con el objetivo general propuesto: lograr la ejecución total de las fases de micropropagación de *Cedrela lilloi* a partir de yemas apicales provenientes de embriones germinados *in vitro*, lo que permite proponer el protocolo de micropropagación para la especie.
- 2) En la fase de establecimiento el porcentaje de asepsia obtenido fue de 90,68% y un porcentaje de contaminación de 9,32%. De un total de 880 embriones cigóticos sembrados se obtuvo un porcentaje de germinación de 72,5%, de los cuales el 56,48% corresponde a embriones germinados que desarrollaron yemas apicales adecuadas para la siguiente fase.
- 3) En la fase de multiplicación el número promedio de brotes por explante en el primer subcultivo fue de 3,13 y 2,67 para los tratamientos de la T5 (0,5 mg/L de ZEA) y T6 (0,5 mg/L de BAP) respectivamente; siendo estos los mejores valores obtenidos.
- 4) En la fase de multiplicación se observó que en todos los tratamientos el número de brotes por explante disminuye conforme se aumentan el número de subcultivos, a excepción del tratamiento T5 (0,5 mg/L de ZEA), donde la tasa de multiplicación se incrementa de un valor de 1,23 en el cuarto subcultivo a un valor de 1,27 en el quinto subcultivo y finalmente obteniendo un valor de 2,9 en el sexto subcultivo.
- 5) En la fase de multiplicación el grado de formación de callo promedio en los cinco subcultivos en la mayoría de tratamientos fue 0 y 1, es decir fue escasa. El máximo valor obtenido en grado 3 fue en el tratamiento T8 (MS+2,0 mg/L ZEA) con un 4 %.
- 6) En la fase de multiplicación se observó que conforme se incrementa la concentración de citoquininas se evidencia un mayor grado de necrosis. El tratamiento T16 (WPM+2,0 mg/L ZEA) presenta el mayor porcentaje de necrosis con 60,6 %.
- 7) En la fase de multiplicación al culminar la ejecución de cinco subcultivos consecutivos se obtuvo los mejores resultados en los tratamientos T5 (0,5 mg/L de ZEA) y T6 (0,5 mg/L de BAP) con una tasa de multiplicación promedio de 1,91 y 1,61 respectivamente.

- 8) En la fase de enraizamiento se obtuvo los mejores valores de número y longitud de raíz en los tratamientos T6 (0,5 mg/L AIA) y T1 (MS libre de auxinas) con valores de 2,03 raíces y 98,27 mm; y 1,47 raíces y 88,63 mm, respectivamente.
- 9) En la fase de enraizamiento se observó formación de callo en el cuello de la vitroplanta en los tratamientos adicionados con ANA (0,5 y 1,0 mg/L). En el tratamiento T5 (1,0 mg/L ANA) se obtuvo el 80% de formación de callo en grado 2.
- 10) En la fase de aclimatación el porcentaje de sobrevivencia obtenido es mayor en Jiffy (91,67 %) que en Premix #8 (81,67 %) sin embargo, estadísticamente no existen diferencias significativas al 95 % de confianza.
- 11) En la fase de aclimatación no hubo diferencias significativas al 95 % de confianza para los sustratos empleados en cuanto al incremento de altura y número de hojas de las plántulas.
- 12) El protocolo resumen para la “Micropropagación de *Cedrela lilloi* C. DC. (cedro de altura) a partir de yemas apicales provenientes de plantas germinadas *in vitro*” propuesto consiste en germinación de embrión cigótico en un medio MS (1962) libre de reguladores; seguido de subcultivos cada cinco semanas a medio MS+0,5 mg/L ZEA para su multiplicación; para inducir el enraizamiento emplear MS (1962) sin auxinas durante cinco semanas; aclimatar usando Premix #8 durante 8 semanas en cámara de crecimiento vegetal a una temperatura de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  con 70% de humedad relativa y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad a una intensidad lumínica de 5440 lux.

## VI. RECOMENDACIONES

- Continuar con los subcultivos sucesivos de *Cedrela lilloi* C. DC en condiciones *in vitro*, que permita observar el comportamiento de la tasa de multiplicación en los futuros subcultivos de la especie y evaluar la calidad de las plantas que se obtengan.
- Experimentar con una gradiente de concentraciones de zeatina (ZEA) en el rango menor a 0,5 mg/L en la fase de multiplicación *in vitro* de *Cedrela lilloi*, a fin de observar las posibilidades de disminuir volúmenes del regulador de crecimiento y reducir costos.
- Se recomienda no emplear ácido naftalenacético (ANA) como inductor de enraizamiento *in vitro* de *Cedrela lilloi* puesto que existe alta probabilidad de formación de callo y pérdida de vigor en las microestacas.
- Es recomendable tener un control permanente de la humedad en todas las fases de la micropropagación, especialmente en la fase de aclimatación, de manera que ni por exceso ni por defecto hídrico exista causa de pérdida de material.
- Se recomienda aplicar el protocolo propuesto para la propagación de individuos élite de *Cedrela lilloi* que cuenten con datos de procedencia y evaluar sus resultados para generar propuestas de mejora en las diferentes fases del proceso.
- En futuras investigaciones sobre propagación *in vitro* de especies forestales se sugiere realizar subcultivos sucesivos a fin de evaluar la variabilidad de la tasa de multiplicación y su correspondiente calidad de planta.
- Aplicar la micropropagación de especies forestales como una alternativa comercial para mantener características genotípicas de individuos seleccionados que permitan mejorar su productividad, en un contexto de plantación multiclonal.





## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRORURAL (Programa de Desarrollo Productivo Agrario Rural, PE). 2010. *Cedrela lilloi* (en línea). Lima, PE. Consultado 19 jun. 2017. Disponible en <http://www.agrorural.gob.pe>
- Aponte, F. 2008. Determinación del protocolo de desinfección de semillas de Bolaina blanca (*Guazuma crinita* Matr.) y Cedro (*Cedrela odorata* L.) para germinación *in vitro*. Pucallpa, PE, UNU. 15 p.
- Cabrera, R. 2016. Protocolo de desinfección de semillas de *Cedrela lilloi* (correspondencia personal). Lima, PE, INIA.
- Deshpande, S; Josekutty, P; Asenan, G. 1998. Plant regeneration from axillary buds of a mature tree of *Ficus religiosa*. *Plant Cell Reports* 17: 571-573.
- 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 Ing. Forestal. Loja, EC. Universidad Nacional de Loja. 141p.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria, BR). 2005. Agencia Embrapa de Información Tecnológica. *Árvore do conhecimento, Espécies Arbóreas Brasileiras* (en línea). Brasilia, BR. Consultado 20 jun. 2017. Disponible en <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>
- García-González, R; Delgado, M; González, Y; González, A; González, A; Garriga, M; Caligari, PDS; Carrasco, B; Quiroz, K. 2011. *In vitro* propagation of Cedar (*Cedrela odorata* L.) from juvenile shoots. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71 (3): 376-382.
- Guevara, E; Hidalgo, N; Murillo, O. 1992. Cultivo *in vitro* de cedro dulce (*Cedrela tonduzzi*). *Tecnología en Marcha* 11 (3): 10-16.
- Huamán, X. 2014. Propagación *in vitro* de cedro (*Cedrela odorata* L.) vía organogénesis. Tesis Ing. Agrónomo. Tarapoto, PE. UNSM. 100p.

- Indacochea, B; PARRALES, J; CATRO, C; VERA, M; GABRIEL, J. 2017. Aclimatación *in vitro* de especies forestales nativas del Sur de Manabí en peligro de extinción. Selva Andina Research Society. 8 (2): 124-134.
- IUCN (Unión Mundial para la Conservación, UK). 1998. Lista Roja de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre. Cambridge, UK. Consultado 19 jun. 2017. Disponible en <http://www.iucnredlist.org>
- Lloyd, G; McCOWN, B. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Proceedings of the International Plant Propagators' Society 30: 421-427.
- Lombardi, I. 2014. Las poblaciones del genero *Cedrela* en el Perú. UNALM, Lima, PE. 164 p.
- Martínez, R; Azpiroz, H; Rodríguez, J; Cetina, V. y Gutiérrez, M. 2005. Aclimatación de plantas obtenidas *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake y *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. Ra Ximhai Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable. Universidad Autónoma Indígena de México. 591-597.
- \_\_\_\_\_; Rojo, G; Rodríguez, J; Ramírez, B. 2010. Biotecnología aplicada a los recursos forestales. Libros Técnicos: Serie Forestal. Universidad Autónoma Indígena de México. MX. 292p.
- Mesén, F. 1998. Enraizamiento de estacas juveniles de especies forestales: uso de propagadores de subirrigación. Turrialba, CR. CATIE. 36p. (Manual Técnico no. 30).
- MINAM (Ministerio del Ambiente, PE). 2012. Catálogo de especies CITES Peruanas de Flora Silvestre (en línea). Lima, PE. Consultado 25 feb. 2017. Disponible en <http://www.minam.gob.pe>
- Mroginski, L; Roca, W. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. In Roca, W; Mroginski, L. eds. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali, CO. CIAT. 19-40.
- \_\_\_\_\_; Sansberro, P; Flaschland, E. 2010. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. In Levitus, G; Echenique, V; Rubinstein, C; Hopp, E; Mroginski, L. eds. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. AR. INTA. 17-25.

- Muruges, M.; Parthiban, K.; Surendran, C. y Buvaneswaran, C. 1999. Tissue culture a tool for the conservation of endangered tree species. *Advances in Horticulture and Forestry* 6: 187-191.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:53-58.
- Ocaña, D. 1996. Desarrollo forestal campesino en la región andina del Perú. Lima, PE, PRONAMACHS-FAO. 220 p.
- Olmos, S; Luciani, G; Galdeano, E. 2010. Micropropagación. In Levitus, G; Echenique, V; Rubinstein, C; Hopp, E; Mroginski, L. eds. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal* II. 2 ed. AR. p. 353-362.
- Pérez, J. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara, CU. Instituto de Biotecnología de las plantas. 390 p.
- \_\_\_\_\_; Mesén, F; Hilje, L; Aguilar, ME. 2002. Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L. Optimización de la fase de multiplicación. *Revista Forestal Centroamericana* 38:67-71.
- \_\_\_\_\_. 2006. Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L. Fase de desarrollo y enraizamiento. *Recursos Naturales y Ambiente* 46/47: 146-151.
- Perik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Madrid, ES, Ediciones Mundiprensa. 326 p.
- Prieto, H; Jordan, M; Barrueto, P; Cordeiro, M; Durzan, D. 2005. *Biología Vegetal*. Santiago, CL, INIA. 218 p. (Colección de Libros no. 15).
- Ramos, J. 2012. Avances de la micropropagación *in vitro* de plantas leñosas. Especialización en Biotecnología Agraria. Bogotá, CO, UNAD. 83 p.
- Remache, L. 2011. Desarrollo de una técnica de micropropagación *in vitro* de cedro (*Cedrela montana*) a partir de ápices, hojas y entrenudos. Tesis Ing. Forestal. Riobamba, Ecuador. Escuela Superior Técnica de Chimborazo. 69p.

- Reynel, C; Marcelo, J. 2009. Árboles de los ecosistemas forestales andinos. Manual de identificación de especies. Lima, PE, ECOBONA – INTERCOOPERATION. 159 p. (Serie Investigación y Sistematización no. 9).
- Roca, W; Ramírez, H. 2000. Introducción a la Biotecnología Vegetal. Vicente Zapata Ed. Cali, CO. 174 p.
- Rodríguez, L. 2011. La biotecnología aplicada al mejoramiento genético del cedro (*Cedrela odorata* L.). Instituto de Investigaciones del Tabaco 12 (2): 63-70.
- Rodríguez, R; Daquinta, M; Capota, I; Pina, D; Lezcana, Y; González-Olmedo, JL. 2003. Nuevos aportes a la micropropagación de *Swietenia macrophylla* x *Swietenia mahogani* (Caoba híbrida) y *Cedrela odorata* (Cedro). Cultivos Tropicales 24: 23-37.
- Sánchez, O. 2000. Micropropagación de algunas leñosas nativas. Concepción, CL, UDC. 322 p.
- Santamaría, A. 2012. Establecimiento de un protocolo para germinación *in vitro* e inducción a callo embriogénico de cedro (*Cedrela montana* Moritz ex Turcz.) a partir de embriones cigóticos. Tesis Ing. Biotecnología. Sangolguí, EC, Escuela Politécnica del Ejército. 115 p.
- Smith, C; Wood, E. 1998. Biología molecular y biotecnología. Sanginés MC. Ciudad de Mexico, MX, Addison Wesley Longman. 247 p.
- Soto, B; Valverde, L; Rojas, A; Hine, A. 2010. Establecimiento *in vitro* de *Cedrela salvadorensis* Standl. Tecnología en Marcha (23) 4: 66-73.
- Soudre, M. 2007. Protocolos para el enraizamiento de estacas juveniles de cinco especies maderables. Pucallpa, PE, IIAP. 2p.
- Toledo, M; Chevallier, B; Villarroel, D; Mostacedo, B. 2008. Ecología y silvicultura de especies menos conocidas Cedro, *Cedrela* spp. Santa Cruz, BO, BOLFOR II. 40 p.
- Tropicos, US. 2017. Missouri Botanical Garden. *Cedrela lilloi* (en línea). Missouri, US. Consultado 20 jun. 2017. Disponible en <http://www.tropicos.org>
- Valverde, L; Dufour, M; Villalobos, V. 1998. Organogénesis *in vitro* en *Albizia guachapele*, *Cedrela odorata* y *Swietenia macrophylla* (Fabaceae, Meliaceae). Revista de Biología Tropical 46: 225-228.

Villalobos, M; Thorpe, T. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados.  
In Roca, W; Mroginski, L. eds. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali, CO, CIAT. p. 127-142.



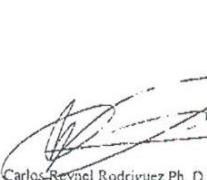
## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1

#### CONSTANCIA DE DETERMINACIÓN BOTÁNICA *CEDRELA LILLOI* C. DC.

SIGLA	NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN	FAMILIA
01 AQS	Buddleja incana R. et P.	Quishuar	Loganiaceae
02 AQS	Prunus serotina subsp. capuli (cavanilles) McVaugh	Capuli	Rosaceae
03 AQS	Cedrela lilloi C. DC.	Cedro de altura	Meliaceae
04 AQS	Alnus acuminata H.B.K.	Aliso	Betuliaceae
05 AQS	Polylepis racemosa R. et P.	Antapu, quenuaj	Rosaceae
06 AQS	Polylepis racemosa R. et P.	Quenuaj	Rosaceae
07 AQS	Eucalyptus globulus Labillardiere	Eucalipto	Myrtaceae
08 AQS	Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze	Tara	Fabaceae

Zona de colección: Ancash - Yungay, Huaráz  
Atención: Ing. Armando Quispe Santos

Determinador:   
Director del Herbario Forestal UNALM (MOL)

La Molina, 13 de Junio de 2002

\* ROGAMOS A LOS USUARIOS DE LOS SERVICIOS DEL HERBARIO MOL TENER ESPECIAL CUIDADO EN TRANSCRIBIR CORRECTAMENTE LOS NOMBRES PROPORCIONADOS

FUENTE: Arborizaciones E.I.R.L.

## ANEXO 2

### FICHA TÉCNICA SEMILLAS DE *CEDRELA LILLOI* C. DC.

Características de las semillas otorgadas por la empresa proveedora

“Arborizaciones E.I.R.L.”

- Especie: *Cedrela lilloi* “Cedro de altura”
- Procedencia: Ancash
- Altitud: 1 800 msnm
- Precipitación: 800 mm
- Temperatura Prom. Anual: 14°C
- Numero de Semillas / Kilo: 37 000
- Pureza: 90%
- Germinación: 90%
- Fecha de recolección: febrero 2016
- Peso de 100 semillas: 22.23 gr.

FUENTE: *Arborizaciones E.I.R.L.*



## ANEXO 3

### FICHA TÉCNICA SUSTRATO JIFFY 50F

<b>1.0 NOMBRE COMERCIAL DEL PRODUCTO:</b>			
Producto final: <b>JIFFY-7 FORESTRY PEAT PELLET - CERTIFICATE OF ANALYSIS</b>			
1.1. Identificación del fabricante:			
Nombre:	<b>JIFFY PRODUCTS (N. B.) LTD.</b>		
Dirección:	125 INDUSTRIAL PARK, PO BOX 2004 SHIPPAGAN, NB E8S 3H1 CANADA		
1.2. Identificación de la empresa importadora:			
Nombre:	<b>MARUPLAST INTERNACIONAL EIRL</b>		
Dirección:	Av. Primavera 120 Of. B - 404 Surco, Lima - Perú		
<b>2.0 INFORMACIÓN Y CARACTERÍSTICA DEL PRODUCTO</b>			
Raw Materials Used			
1.	Canadian Sphagnum Peat Moss	Approx.	97%
The Sphagnum peat moss is sun & wind dried on the field and vacuum harvested. The average humidity is about 50% at this point.			
All peat suppliers have their field inspected by the Canadian Food Inspection Agency. It is further processed in a flash drier at high temperature above 110 C at the factory immediately before making the pellets The process takes place in about 2 to 3 minutes depending on the conditions of the peat. The humidity at this point is dropped to about 18%.			
2.	Dolomite Lime pH	4.9 +/- 0.5	Up to 2 %
3.	Nutrient Charge From Fertilizer Conductivity (EC) 0.5 +/- 0.3 mhos		
	N:	0.12%	
	P:	0.06%	
	K:	0.06%	
	Plus trace of microelements		
Methodology for pH and Ec			
1. Expand pellets fully and allow total saturation.			
2. Let stand for 24 hours.			
3. Squeeze liquid (water) out			
4. Measure pH and Ec			
4.	Net (LDPE)	Approx.	1 %
Organic Content			94 to 98 %
Water Retention Capacity		500 – 700 % of dry weight	
Maximum Humidity Level		15 – 23%	
Bulk Density		Approx. 0.15 gram/cc (Compressed and dried based) Or 150 kg/m3	

FUENTE: Maruplast Internacional E.I.R.L.

## ANEXO 4

### FICHA TÉCNICA SUSTRATO PREMIX #8

<b>1.0 NOMBRE COMERCIAL DEL PRODUCTO:</b> Producto final: SUSTRATO PREMIX #8 1.1. Identificación del fabricante: Nombre: SUNGRO HORTICULTURE INC. Dirección: 15831 N.E. 8TH Street, Bellevue, WA 98008  1.2. Identificación de la empresa importadora: Nombre: MARUPLAST INTERNACIONAL EIRL Dirección: Av. Primavera 120 Of. B -404 Surco, Lima - Perú																																									
<b>2.0 INFORMACIÓN SOBRE EL PRINCIPAL COMPONENTE DEL PRODUCTO</b>																																									
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="background-color: #cccccc;">Ingredients:</th> </tr> <tr> <td>Fine Canadian Sphagnum peat moss Fine Vermiculite and Perlite Dolomite Gypsum Proprietary starter nutrient charge with major and minor nutrients Proprietary wetting agent</td> </tr> </table>	Ingredients:	Fine Canadian Sphagnum peat moss Fine Vermiculite and Perlite Dolomite Gypsum Proprietary starter nutrient charge with major and minor nutrients Proprietary wetting agent	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="background-color: #cccccc;">Uses:</th> </tr> <tr> <td>Bedding Plants Vegetables Tobacco</td> </tr> </table>	Uses:	Bedding Plants Vegetables Tobacco																																				
Ingredients:																																									
Fine Canadian Sphagnum peat moss Fine Vermiculite and Perlite Dolomite Gypsum Proprietary starter nutrient charge with major and minor nutrients Proprietary wetting agent																																									
Uses:																																									
Bedding Plants Vegetables Tobacco																																									
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="background-color: #cccccc;">Typical Extractable Nutrient Range *</th> <th></th> </tr> <tr> <td>pH</td> <td>5.0 - 5.5</td> </tr> <tr> <td>Ec (mmhos),cm</td> <td>0.3 - .75</td> </tr> <tr> <td>Nitrate Nitrogen, NO3-N (ppm)</td> <td>5 - 40</td> </tr> <tr> <td>Ammonium Nitrogen, NH4 - N (ppm)</td> <td>2 - 20</td> </tr> <tr> <td>Phosphorus, P (ppm)</td> <td>5 - 25</td> </tr> <tr> <td>Potassium, K (ppm)</td> <td>25 - 100</td> </tr> <tr> <td>Calcium, Ca (ppm)</td> <td>50 - 190</td> </tr> <tr> <td>Magnesium, Mg (ppm)</td> <td>30 - 100</td> </tr> <tr> <td>Sulfur, S (ppm)</td> <td>40 - 180</td> </tr> <tr> <td>Manganese, Mn (ppm)</td> <td>.3 - 1.5</td> </tr> <tr> <td>Iron, Fe (ppm)</td> <td>0.1 - 1.0</td> </tr> <tr> <td>Copper, Cu (ppm)</td> <td>.005 - .15</td> </tr> <tr> <td>Boron, B (ppm)</td> <td>.05 - 0.3</td> </tr> <tr> <td>Zinc, Zn (ppm)</td> <td>.03 - .5</td> </tr> <tr> <td>Molybdenum, Mo (ppm)</td> <td>.005 - .15</td> </tr> <tr> <td colspan="2">* Saturated extract procedure (two weeks after production)</td> </tr> </table>	Typical Extractable Nutrient Range *		pH	5.0 - 5.5	Ec (mmhos),cm	0.3 - .75	Nitrate Nitrogen, NO3-N (ppm)	5 - 40	Ammonium Nitrogen, NH4 - N (ppm)	2 - 20	Phosphorus, P (ppm)	5 - 25	Potassium, K (ppm)	25 - 100	Calcium, Ca (ppm)	50 - 190	Magnesium, Mg (ppm)	30 - 100	Sulfur, S (ppm)	40 - 180	Manganese, Mn (ppm)	.3 - 1.5	Iron, Fe (ppm)	0.1 - 1.0	Copper, Cu (ppm)	.005 - .15	Boron, B (ppm)	.05 - 0.3	Zinc, Zn (ppm)	.03 - .5	Molybdenum, Mo (ppm)	.005 - .15	* Saturated extract procedure (two weeks after production)		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="background-color: #cccccc;">Available:</th> </tr> <tr> <td>Loose Fill - 2.8 cu ft. bags, 51/pallet 60 cu ft. totes and bulk Compressed - 3.8 cu.ft. bales . 30/ pallet 55.5 cu ft. bales, 2 per pallet</td> </tr> <tr> <th style="background-color: #cccccc;">Average Yield:</th> </tr> <tr> <td>Loose fill - 2.8 cu ft. and 60 cu ft. respectively Compressed - 7.1 cu ft. and 110 cu ft. respectively</td> </tr> <tr> <th style="background-color: #cccccc;">Average Shipping Weight</th> </tr> <tr> <td>3.8 cu ft. - 48-80 lbs. 55.5 cu. Ft. = 800-1200 lbs 2.8 cu ft. = 25-40 lbs 60 cu ft. = 500-600 lbs</td> </tr> </table>	Available:	Loose Fill - 2.8 cu ft. bags, 51/pallet 60 cu ft. totes and bulk Compressed - 3.8 cu.ft. bales . 30/ pallet 55.5 cu ft. bales, 2 per pallet	Average Yield:	Loose fill - 2.8 cu ft. and 60 cu ft. respectively Compressed - 7.1 cu ft. and 110 cu ft. respectively	Average Shipping Weight	3.8 cu ft. - 48-80 lbs. 55.5 cu. Ft. = 800-1200 lbs 2.8 cu ft. = 25-40 lbs 60 cu ft. = 500-600 lbs
Typical Extractable Nutrient Range *																																									
pH	5.0 - 5.5																																								
Ec (mmhos),cm	0.3 - .75																																								
Nitrate Nitrogen, NO3-N (ppm)	5 - 40																																								
Ammonium Nitrogen, NH4 - N (ppm)	2 - 20																																								
Phosphorus, P (ppm)	5 - 25																																								
Potassium, K (ppm)	25 - 100																																								
Calcium, Ca (ppm)	50 - 190																																								
Magnesium, Mg (ppm)	30 - 100																																								
Sulfur, S (ppm)	40 - 180																																								
Manganese, Mn (ppm)	.3 - 1.5																																								
Iron, Fe (ppm)	0.1 - 1.0																																								
Copper, Cu (ppm)	.005 - .15																																								
Boron, B (ppm)	.05 - 0.3																																								
Zinc, Zn (ppm)	.03 - .5																																								
Molybdenum, Mo (ppm)	.005 - .15																																								
* Saturated extract procedure (two weeks after production)																																									
Available:																																									
Loose Fill - 2.8 cu ft. bags, 51/pallet 60 cu ft. totes and bulk Compressed - 3.8 cu.ft. bales . 30/ pallet 55.5 cu ft. bales, 2 per pallet																																									
Average Yield:																																									
Loose fill - 2.8 cu ft. and 60 cu ft. respectively Compressed - 7.1 cu ft. and 110 cu ft. respectively																																									
Average Shipping Weight																																									
3.8 cu ft. - 48-80 lbs. 55.5 cu. Ft. = 800-1200 lbs 2.8 cu ft. = 25-40 lbs 60 cu ft. = 500-600 lbs																																									
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th colspan="2" style="background-color: #cccccc;">Physical Properties</th> </tr> <tr> <th style="background-color: #cccccc;">Tests</th> <th style="background-color: #cccccc;">Standard</th> </tr> <tr> <td>Bulk Density</td> <td>7 - 10 lbs /ft3</td> </tr> <tr> <td>Moisture Percentage</td> <td>45 - 55 %</td> </tr> <tr> <td>Water-holding capacity</td> <td>50 - 70% by volume</td> </tr> <tr> <td>Air Capacity</td> <td>8 - 20% by volume</td> </tr> </table>	Physical Properties		Tests	Standard	Bulk Density	7 - 10 lbs /ft3	Moisture Percentage	45 - 55 %	Water-holding capacity	50 - 70% by volume	Air Capacity	8 - 20% by volume	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="background-color: #cccccc;">Testing Method</th> </tr> <tr> <td>A.S.T.M.D 2978-90 Percent based on weight to weight basis Values at container (6 1/2" azalea pot) capacity of media Values at container (6 1/2" azalea pot) capacity of media</td> </tr> </table>	Testing Method	A.S.T.M.D 2978-90 Percent based on weight to weight basis Values at container (6 1/2" azalea pot) capacity of media Values at container (6 1/2" azalea pot) capacity of media																										
Physical Properties																																									
Tests	Standard																																								
Bulk Density	7 - 10 lbs /ft3																																								
Moisture Percentage	45 - 55 %																																								
Water-holding capacity	50 - 70% by volume																																								
Air Capacity	8 - 20% by volume																																								
Testing Method																																									
A.S.T.M.D 2978-90 Percent based on weight to weight basis Values at container (6 1/2" azalea pot) capacity of media Values at container (6 1/2" azalea pot) capacity of media																																									

FUENTE: Maruplast Internacional E.I.R.L.

## ANEXO 5

### RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE LA TASA DE MULTIPLICACIÓN

Prueba no paramétrica Kruskal Wallis ( $\alpha=0,05$ ) subcultivo 1

<i>Tratamiento</i>	<i>N</i>	<i>Medias</i>	<i>D,E,</i>	<i>H</i>	<i>p</i>
1	30	2,37	1,19	66,28	<0,0001
2	30	2,47	1,28		
3	30	1,93	0,94		
4	30	1,70	0,92		
5	30	3,13	1,61		
6	30	2,67	1,65		
7	30	2,53	1,46		
8	30	1,77	1,41		
9	30	1,97	1,16		
10	30	1,23	1,14		
11	30	1,37	0,81		
12	30	1,20	0,85		
13	30	2,03	1,27		
14	30	1,90	1,24		
15	30	1,80	1,42		
16	30	1,60	1,30		

Prueba no paramétrica Kruskal Wallis ( $\alpha=0,05$ ) subcultivo 2

<i>Tratamiento</i>	<i>N</i>	<i>Medias</i>	<i>D,E,</i>	<i>H</i>	<i>p</i>
1	30	1,77	1,04	100,06	<0,0001
2	30	1,33	0,55		
3	30	1,13	0,63		
4	30	0,93	0,45		
5	30	2,43	0,90		
6	30	1,80	1,03		
7	30	1,53	0,94		
8	30	1,07	0,94		
9	30	1,43	0,77		
10	30	0,80	0,81		
11	30	0,90	0,40		
12	30	0,57	0,50		
13	30	1,57	0,94		
14	30	1,27	0,74		
15	30	1,17	0,83		
16	30	0,90	0,88		

Prueba no paramétrica Kruskal Wallis ( $\alpha=0,05$ ) subcultivo 3

<i>Tratamiento</i>	<i>N</i>	<i>Medias</i>	<i>D,E,</i>	<i>H</i>	<i>p</i>
1	30	1,40	0,77	131,48	<0,0001
2	30	0,97	0,56		
3	30	1,00	0,45		
4	30	0,60	0,56		
5	30	1,50	1,17		
6	30	1,10	0,92		
7	30	0,87	0,82		
8	30	0,37	0,61		
9	30	1,00	0,74		
10	30	0,50	0,51		
11	30	0,50	0,51		
12	30	0,27	0,45		
13	30	0,60	1,00		
14	30	0,17	0,38		
15	30	0,07	0,25		
16	30	0,03	0,18		

Prueba no paramétrica Kruskal Wallis ( $\alpha=0,05$ ) subcultivo 4

<i>Tratamiento</i>	<i>N</i>	<i>Medias</i>	<i>D,E,</i>	<i>H</i>	<i>p</i>
1	30	1,33	1,15	96,61	<0,0001
2	30	0,57	0,73		
3	30	0,37	0,49		
4	30	0,10	0,31		
5	30	1,23	1,14		
6	30	1,27	1,26		
7	30	0,77	1,01		
8	30	0,27	0,52		
9	30	0,57	0,68		
10	30	0,13	0,35		
11	30	0,10	0,31		
12	30	0,00	0,00		
13	30	0,57	0,86		
14	30	0,13	0,35		
15	30	0,00	0,00		
16	30	0,00	0,00		

Prueba no paramétrica Kruskal Wallis ( $\alpha=0,05$ ) subcultivo 5

<i>Tratamiento</i>	<i>N</i>	<i>Medias</i>	<i>D,E,</i>	<i>H</i>	<i>p</i>
1	30	1,20	0,81	105,25	<0,0001
2	30	0,27	0,45		
3	30	0,03	0,18		
4	30	0,00	0,00		
5	30	1,27	1,11		
6	30	0,90	1,06		
7	30	0,43	0,77		
8	30	0,07	0,25		
9	30	0,50	0,68		
10	30	0,00	0,00		
11	30	0,00	0,00		
12	30	0,00	0,00		
13	30	0,17	0,46		
14	30	0,03	0,18		
15	30	0,00	0,00		
16	30	0,00	0,00		

## ANEXO 6

### TASA PROMEDIO DE MULTIPLICACIÓN POR SUBCULTIVO ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR

<i>Tratamiento</i>	<i>Número de subcultivo</i>				
	<i>1ro</i>	<i>2do</i>	<i>3ro</i>	<i>4to</i>	<i>5to</i>
1	2,37±1,19	1,77±1,04	1,4±0,77	1,33±1,15	1,20±0,81
2	2,47±1,28	1,33±0,55	0,97±0,56	0,57±0,73	0,27±0,45
3	1,93±0,94	1,13±0,63	1,00±0,45	0,37±0,49	0,03±0,18
4	1,70±0,92	0,93±0,45	0,60±0,56	0,10±0,31	0,00±0,00
5	3,13±1,61	2,43±0,90	1,50±1,17	1,23±1,14	1,27±1,11
6	2,67±1,65	1,80±1,03	1,10±0,92	1,27±1,26	0,90±1,06
7	2,53±1,46	1,53±0,94	0,87±0,82	0,77±1,01	0,43±0,77
8	1,77±1,41	1,07±0,94	0,37±0,61	0,27±0,52	0,07±0,25
9	1,97±1,16	1,43±0,77	1,00±0,74	0,57±0,68	0,50±0,68
10	1,23±1,14	0,80±0,81	0,50±0,51	0,13±0,35	0,00±0,00
11	1,37±0,81	0,90±0,40	0,50±0,51	0,10±0,31	0,00±0,00
12	1,20±0,85	0,57±0,50	0,27±0,45	0,00±0,00	0,00±0,00
13	2,03±1,27	1,57±0,94	0,60±1,00	0,57±0,86	0,17±0,46
14	1,90±1,24	1,27±0,74	0,17±0,38	0,13±0,35	0,03±0,18
15	1,80±1,42	1,17±0,83	0,07±0,25	0,00±0,00	0,00±0,00
16	1,60±1,30	0,90±0,88	0,03±0,18	0,00±0,00	0,00±0,00

## ANEXO 7

### GRADO DE FORMACIÓN DE CALLO PROMEDIO POR TRATAMIENTO EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR

<b>Subcultivo 1</b>				
Tratamiento	Grado de formación de callo (%)			
	0	1	2	3
1	0,8±0	0,03±0,06	0,1±0,1	0,07±0,12
2	0,63±0,12	0,1±0,1	0,23±0,12	0,03±0,06
3	0,63±0,25	0,1±0,17	0,2±0,26	0,07±0,06
4	0,63±0,12	0,13±0,06	0,17±0,06	0,07±0,06
5	0,47±0,25	0,13±0,06	0,33±0,32	0,07±0,06
6	0,67±0,15	0,1±0,1	0,17±0,15	0,07±0,12
7	0,53±0,35	0,23±0,15	0,13±0,15	0,1±0,17
8	0,4±0,26	0,17±0,06	0,23±0,32	0,2±0,26
9	0,87±0,23	0,13±0,23	0±0	0±0
10	0,9±0,1	0,1±0,1	0±0	0±0
11	0,87±0,23	0,13±0,23	0±0	0±0
12	0,9±0,17	0,07±0,12	0,03±0,06	0±0
13	1±0	0±0	0±0	0±0
14	0,83±0,12	0,13±0,15	0±0	0,03±0,06
15	0,87±0,12	0,1±0,1	0,03±0,06	0±0
16	0,8±0,17	0,13±0,15	0,03±0,06	0,03±0,06
<b>Subcultivo 2</b>				
Tratamiento	Grado de formación de callo (%)			
	0	1	2	3
1	1±0	0±0	0±0	0±0
2	1±0	0±0	0±0	0±0
3	1±0	0±0	0±0	0±0
4	1±0	0±0	0±0	0±0
5	1±0	0±0	0±0	0±0
6	1±0	0±0	0±0	0±0
7	1±0	0±0	0±0	0±0
8	1±0	0±0	0±0	0±0
9	1±0	0±0	0±0	0±0
10	1±0	0±0	0±0	0±0
11	1±0	0±0	0±0	0±0
12	1±0	0±0	0±0	0±0
13	1±0	0±0	0±0	0±0
14	1±0	0±0	0±0	0±0
15	1±0	0±0	0±0	0±0
16	1±0	0±0	0±0	0±0

<b>Subcultivo 3</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>Grado de formación de callo (%)</b>			
	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
1	1±0	0±0	0±0	0±0
2	1±0	0±0	0±0	0±0
3	1±0	0±0	0±0	0±0
4	1±0	0±0	0±0	0±0
5	1±0	0±0	0±0	0±0
6	1±0	0±0	0±0	0±0
7	1±0	0±0	0±0	0±0
8	0,97±0,06	0,03±0,06	0±0	0±0
9	1±0	0±0	0±0	0±0
10	1±0	0±0	0±0	0±0
11	1±0	0±0	0±0	0±0
12	1±0	0±0	0±0	0±0
13	1±0	0±0	0±0	0±0
14	1±0	0±0	0±0	0±0
15	1±0	0±0	0±0	0±0
16	1±0	0±0	0±0	0±0

<b>Subcultivo 4</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>Grado de formación de callo (%)</b>			
	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
1	0,97±0,06	0±0	0,03±0,06	0±0
2	0,97±0,06	0±0	0,03±0,06	0±0
3	0,9±0,17	0,1±0,17	0±0	0±0
4	1±0	0±0	0±0	0±0
5	1±0	0±0	0±0	0±0
6	0,97±0,06	0±0	0,03±0,06	0±0
7	0,9±0,17	0,07±0,12	0,03±0,06	0±0
8	0,9±0,17	0,1±0,17	0±0	0±0
9	1±0	0±0	0±0	0±0
10	1±0	0±0	0±0	0±0
11	1±0	0±0	0±0	0±0
12	1±0	0±0	0±0	0±0
13	1±0	0±0	0±0	0±0
14	1±0	0±0	0±0	0±0
15	1±0	0±0	0±0	0±0
16	1±0	0±0	0±0	0±0



<b>Subcultivo 5</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>Grado de formación de callo (%)</b>			
	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
1	1±0	0±0	0±0	0±0
2	1±0	0±0	0±0	0±0
3	1±0	0±0	0±0	0±0
4	1±0	0±0	0±0	0±0
5	1±0	0±0	0±0	0±0
6	1±0	0±0	0±0	0±0
7	0,93±0,12	0,07±0,12	0±0	0±0
8	1±0	0±0	0±0	0±0
9	1±0	0±0	0±0	0±0
10	1±0	0±0	0±0	0±0
11	1±0	0±0	0±0	0±0
12	1±0	0±0	0±0	0±0
13	1±0	0±0	0±0	0±0
14	1±0	0±0	0±0	0±0
15	1±0	0±0	0±0	0±0
16	1±0	0±0	0±0	0±0

## ANEXO 8

### GRADO DE NECROSIS PROMEDIO POR TRATAMIENTO EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR

<b>Subcultivo 1</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>Grado de necrosis (%)</b>			
	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
1	0,47±0,32	0,47±0,38	0,07±0,12	0±0
2	0,47±0,47	0,47±0,45	0,07±0,12	0±0
3	0,27±0,38	0,53±0,25	0,2±0,26	0±0
4	0,2±0,35	0,57±0,25	0,2±0,2	0,03±0,06
5	0,2±0,26	0,53±0,15	0,27±0,15	0±0
6	0,37±0,35	0,57±0,25	0,03±0,06	0,03±0,06
7	0,43±0,23	0,47±0,32	0,07±0,06	0,03±0,06
8	0,4±0,4	0,53±0,4	0,07±0,06	0±0
9	0,33±0,42	0,43±0,29	0,23±0,15	0±0
10	0,13±0,15	0,4±0,35	0,23±0,12	0,23±0,4
11	0±0	0,63±0,21	0,27±0,12	0,1±0,1
12	0,07±0,12	0,6±0,26	0,17±0,12	0,17±0,29
13	0,27±0,25	0,47±0,06	0,2±0,17	0,07±0,12
14	0,4±0,4	0,4±0,2	0,1±0,1	0,1±0,1
15	0,2±0,2	0,4±0,2	0,27±0,23	0,13±0,23
16	0,2±0,35	0,4±0,17	0,27±0,21	0,13±0,23
<b>Subcultivo 2</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>Grado de necrosis (%)</b>			
	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
1	0,1±0,1	0,83±0,15	0,07±0,06	0±0
2	0,07±0,12	0,83±0,21	0,07±0,06	0,03±0,06
3	0,1±0,17	0,9±0,17	0±0	0±0
4	0,03±0,06	0,47±0,23	0,43±0,15	0,03±0,06
5	0,1±0,17	0,5±0,17	0,37±0,31	0,03±0,06
6	0,1±0	0,7±0,1	0,17±0,12	0,03±0,06
7	0,33±0,15	0,5±0	0,13±0,15	0,03±0,06
8	0,1±0	0,73±0,21	0,07±0,12	0,1±0,1
9	0,37±0,46	0,5±0,35	0,1±0,1	0,03±0,06
10	0,2±0,17	0,77±0,15	0,03±0,06	0±0
11	0,4±0,36	0,6±0,36	0±0	0±0
12	0,17±0,15	0,57±0,15	0,2±0,2	0,07±0,12
13	0,2±0,2	0,57±0,06	0,2±0,1	0,03±0,06
14	0,4±0,36	0,47±0,21	0,13±0,15	0±0
15	0,53±0,23	0,3±0,17	0,13±0,15	0,03±0,06
16	0,4±0,52	0,5±0,46	0,1±0,17	0±0

<b>Subcultivo 3</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>Grado de necrosis (%)</b>			
	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
1	0,17±0,06	0,8±0,1	0±0	0,03±0,06
2	0,07±0,12	0,37±0,15	0,4±0,1	0,17±0,15
3	0±0	0,53±0,31	0,37±0,21	0,1±0,1
4	0±0	0,13±0,15	0,43±0,21	0,43±0,35
5	0±0	0,83±0,12	0,17±0,12	0±0
6	0±0	0,73±0,25	0,17±0,15	0,1±0,1
7	0±0	0,63±0,06	0,27±0,06	0,1±0,1
8	0±0	0,37±0,23	0,2±0,1	0,43±0,32
9	0,03±0,06	0,37±0,06	0,4±0,17	0,2±0,1
10	0±0	0,1±0,1	0,3±0,26	0,6±0,35
11	0±0	0,07±0,06	0,7±0,1	0,23±0,06
12	0±0	0±0	0,47±0,47	0,53±0,47
13	0±0	0,27±0,29	0,1±0,1	0,63±0,38
14	0±0	0,13±0,15	0,13±0,15	0,73±0,15
15	0±0	0±0	0,07±0,06	0,93±0,06
16	0±0	0±0	0,1±0,1	0,9±0,1

<b>Subcultivo 4</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>Grado de necrosis (%)</b>			
	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
1	0±0	0,63±0,06	0,27±0,06	0,1±0
2	0±0	0,2±0,26	0,5±0,1	0,3±0,2
3	0±0	0,13±0,23	0,2±0,17	0,67±0,21
4	0±0	0,07±0,06	0,43±0,31	0,5±0,3
5	0±0	0,63±0,35	0,23±0,25	0,13±0,12
6	0±0	0,7±0,26	0,23±0,25	0,07±0,06
7	0±0	0,5±0,3	0,33±0,42	0,17±0,29
8	0±0	0±0	0,5±0,5	0,5±0,5
9	0±0	0,43±0,32	0,33±0,29	0,23±0,06
10	0±0	0,07±0,06	0,37±0,35	0,57±0,4
11	0±0	0±0	0,1±0	0,9±0
12	0±0	0±0	0,03±0,06	0,97±0,06
13	0±0	0,3±0,35	0,37±0,47	0,33±0,49
14	0,03±0,06	0,3±0,52	0,03±0,06	0,63±0,55
15	0,03±0,06	0±0	0±0	0,97±0,06
16	0±0	0±0	0±0	1±0

<b>Subcultivo 5</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>Grado de necrosis (%)</b>			
	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
1	0±0	0,77±0,32	0,17±0,21	0,07±0,12
2	0±0	0,37±0,47	0,2±0,26	0,43±0,51
3	0±0	0±0	0,63±0,55	0,37±0,55
4	0±0	0±0	0,33±0,58	0,67±0,58
5	0±0	0,63±0,46	0,33±0,4	0,03±0,06
6	0±0	0,57±0,31	0,43±0,31	0±0
7	0±0	0,3±0,35	0,37±0,4	0,33±0,49
8	0±0	0,07±0,12	0,27±0,46	0,67±0,58
9	0±0	0,4±0,53	0,57±0,51	0,03±0,06
10	0±0	0±0	0±0	1±0
11	0±0	0±0	0,03±0,06	0,97±0,06
12	0±0	0±0	0±0	1±0
13	0±0	0,67±0,58	0,33±0,58	0±0
14	0±0	0±0	0,33±0,58	0,67±0,58
15	0±0	0±0	0±0	1±0
16	0±0	0±0	0±0	1±0

## ANEXO 9

### RESULTADOS ESTADÍSTICOS DEL NÚMERO DE RAÍCES EN LA FASE DE ENRAIZAMIENTO

Prueba no paramétrica Kruskal Wallis ( $\alpha=0,05$ )

<i>Tratamiento</i>	<i>N</i>	<i>Medias</i>	<i>D,E,</i>	<i>H</i>	<i>p</i>
1	30	1,47	1,38	26,61	<0,0001
2	30	0,93	1,44		
3	30	1,77	1,96		
4	30	0,73	1,53		
5	30	0,50	1,07		
6	30	2,03	2,08		
7	30	0,43	0,94		

## ANEXO 10

### RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE LONGITUD DE RAÍZ EN LA FASE DE ENRAIZAMIENTO

Prueba no paramétrica Kruskal Wallis ( $\alpha=0,05$ )

<i>Tratamiento</i>	<i>N</i>	<i>Medias</i>	<i>D,E,</i>	<i>H</i>	<i>p</i>
1	30	88,63	82,74	33,80	<0,0001
2	30	57,23	81,68		
3	30	67,70	90,77		
4	30	21,03	46,37		
5	30	5,40	13,41		
6	30	98,27	96,86		
7	30	18,67	45,95		

## ANEXO 11

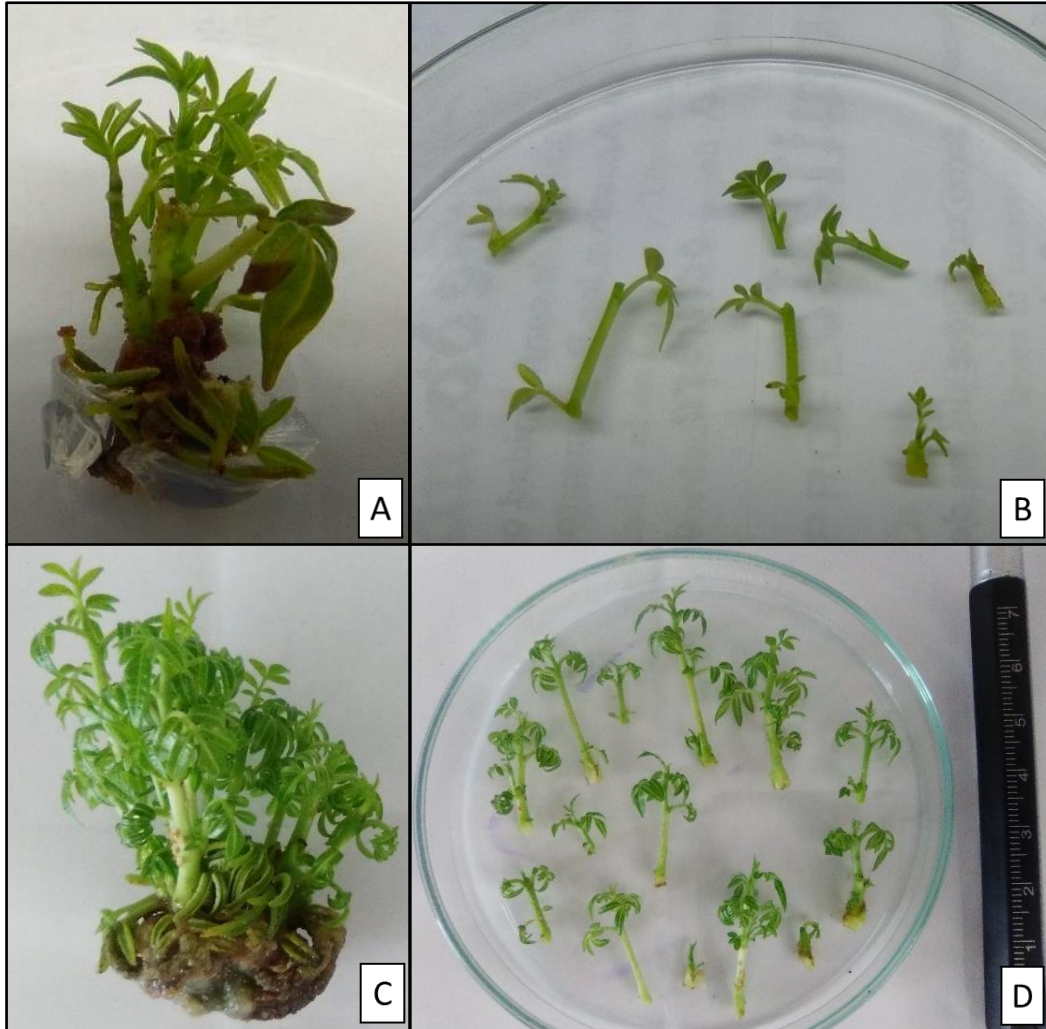
### PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO



Preparación de medios: (A) Calibración del pH a 5.7; (B) Medios de cultivo dispensados en tubos de ensayos, rotulados y sellados para autoclavar; (C) Autoclave de esterilización para los medios de cultivo.

## ANEXO 12

### FASE DE MULTIPLICACIÓN DE BROTES *IN VITRO* DE *CEDRELA LILLOI* C. DC.



Fase de Multiplicación: (A) Desarrollo de brotes en el primer subcultivo en T5 (MS+0,5 mg/L ZEA); (B) Obtención de brotes para el siguiente subcultivo; (C) Desarrollo de brotes en el sexto subcultivo en T5 (MS+0,5 mg/L ZEA); (D) Obtención de microestacas para ser empleadas en la fase de enraizamiento.



## ANEXO 13

### FASE DE ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE *CEDRELA LILLOI* C. DC.



Fase de Enraizamiento: Plántulas en tratamientos T1 (MS sin auxinas), T6 (MS+0,5 mg/L AIA) y T3 (MS+1,0 mg/L AIB)

## ANEXO 14

### FASE DE ACLIMATACIÓN *EX VITRO* DE *CEDRELA LILLOI* C. DC.



Fase de Aclimatación: (A) Plántulas en cámara de crecimiento vegetal a la 2da semana en sustrato Jiffy (izquierda) y en sustrato Premix #8 (derecha); (B) Plántulas en cámara de crecimiento vegetal a la 8va semana en sustrato Premix #8 (izquierda) y en sustrato Jiffy (derecha).

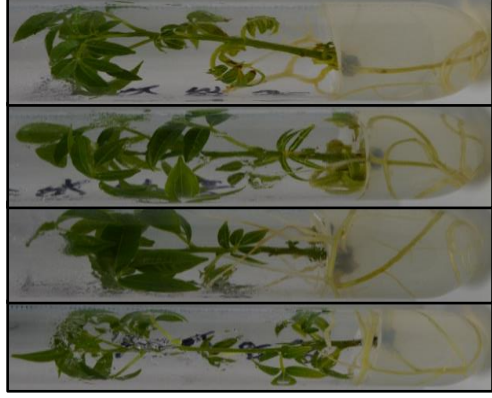
ANEXO 15

PROCESO DE MICROPROPAGACIÓN DE *CEDRELA LILLOI* C. DC.

Fase 4: Aclimatación



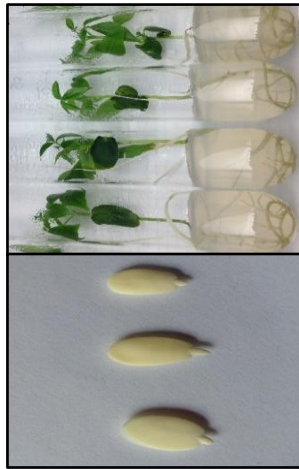
Fase 3: Enraizamiento



Fase 0: Preparación del explante



Fase 1: Establecimiento



Fase 2: Multiplicación



**ANEXO 16**  
**EVALUACIÓN DEL NÚMERO DE BROTES, FORMACIÓN DE CALLO Y**  
**NECROSIS DE LA FASE DE MULTIPLICACIÓN – PRIMER SUBCULTIVO.**

Tratamiento	Número de brotes			Formación de callo			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T1 (MS + 0,5 mg/L BAP)	3	3	5	0	0	0	0	0	1
	1	2	1	0	0	0	1	0	1
	4	2	4	0	0	0	0	0	1
	1	1	5	0	0	0	1	0	1
	2	3	2	0	2	0	0	0	1
	3	2	2	3	0	2	0	1	1
	1	2	2	3	2	0	0	0	0
	2	1	3	0	0	1	0	1	1
	4	3	2	0	0	0	0	2	1
	1	3	1	0	0	0	1	2	1
T2 (MS + 1,0 mg/L BAP)	4	1	5	1	0	2	0	2	1
	2	2	2	0	0	2	0	1	1
	3	2	2	0	0	0	0	0	1
	4	2	5	0	0	1	0	0	1
	4	2	3	2	2	0	0	1	1
	1	1	3	0	0	2	0	1	1
	4	3	4	0	0	1	0	0	1
	3	1	2	0	2	0	0	2	1
	2	2	1	3	2	0	0	1	0
	0	1	3	0	0	0	0	1	1
T3 (MS + 1,5 mg/L BAP)	2	1	1	3	0	0	0	2	1
	2	1	2	2	0	1	0	2	1
	3	3	1	0	0	0	0	1	2
	3	3	2	2	0	0	1	1	1
	1	3	1	2	0	0	0	1	1
	1	3	2	0	0	1	0	2	0
	1	3	1	2	0	0	1	1	1
	1	1	3	0	0	1	0	1	1
	1	1	4	2	3	0	1	2	1
	2	3	2	0	0	2	0	2	1
T4 (MS + 2,0 mg/L BAP)	3	2	2	0	2	2	0	1	1
	1	1	3	3	0	0	0	2	1
	1	1	3	0	0	3	1	1	1
	3	3	2	1	0	2	0	1	1
	1	3	3	0	0	0	1	1	1
	1	1	2	0	0	1	0	2	1
	1	1	2	0	2	1	0	2	1
	1	1	2	0	0	0	1	1	2
	1	1	1	2	0	0	0	2	1
	0	3	1	0	1	0	3	1	2

Continuación...

Tratamiento	Número de brotes			Formación de callo			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T5 (MS + 0,5 mg/L ZEA)	1	2	2	0	0	2	1	1	1
	2	5	2	3	1	0	1	1	1
	2	2	3	0	2	2	0	2	2
	2	4	3	1	0	0	2	1	1
	3	7	2	0	0	2	0	2	1
	2	3	6	0	2	2	1	1	1
	1	3	2	0	3	2	0	2	2
	4	5	3	0	1	2	0	2	2
	1	2	4	2	0	2	0	0	1
	6	5	5	0	0	1	1	1	1
T6 (MS + 1,0 mg/L ZEA)	3	6	0	2	0	0	0	1	3
	3	2	1	2	3	0	0	1	2
	5	2	2	0	3	0	0	0	1
	3	4	2	0	0	1	0	1	1
	2	3	2	0	1	1	1	1	1
	3	4	0	0	0	2	1	0	1
	1	4	1	0	0	2	0	0	1
	3	6	2	0	0	2	1	1	1
	3	2	0	0	0	0	0	0	1
	3	6	2	0	0	0	0	1	1
T7 (MS + 1,5 mg/L ZEA)	3	2	2	0	1	0	0	1	0
	0	5	1	0	0	0	3	0	0
	1	3	3	0	3	1	2	1	1
	4	5	1	0	3	0	0	1	1
	3	1	3	1	0	2	0	2	1
	1	3	2	0	2	0	0	1	0
	3	3	5	0	3	1	0	1	1
	2	5	1	0	1	2	0	0	1
	3	3	3	0	1	0	1	0	1
	1	4	0	0	1	2	0	1	1
T8 (MS + 2,0 mg/L ZEA)	1	1	1	0	0	0	0	1	1
	1	6	2	0	3	2	2	0	1
	2	3	1	0	3	2	0	0	1
	1	3	1	3	2	1	0	1	1
	3	2	2	0	1	2	0	1	1
	3	5	2	1	1	2	0	0	1
	2	1	2	0	0	0	0	1	1
	1	2	0	0	3	2	1	1	1
	0	2	0	0	3	2	0	1	1
	0	3	0	1	3	0	0	0	2

Continuación...

Tratamiento	Número de brotes			Formación de callo			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T9 (WPM + 0,5 mg/L BAP)	2	1	1	0	0	0	0	2	2
	2	2	1	0	0	0	0	1	1
	1	2	4	1	0	0	2	1	1
	1	3	3	0	0	0	1	1	1
	2	3	3	1	0	0	0	1	1
	1	3	4	0	0	0	0	2	1
	1	3	1	0	0	0	0	1	2
	4	3	1	1	0	0	0	0	1
	1	3	1	0	0	0	0	1	2
	0	0	2	1	0	0	0	0	2
T10 (WPM + 1,0 mg/L BAP)	2	2	1	1	0	0	0	0	2
	1	1	0	1	0	0	0	1	3
	2	1	0	0	0	0	1	1	3
	1	1	0	0	0	0	1	1	3
	3	1	0	0	0	0	2	1	3
	3	4	1	0	0	0	1	4	2
	2	1	0	0	0	0	0	1	3
	1	1	1	0	0	0	1	1	2
	1	2	0	0	1	0	1	2	3
	0	4	0	0	0	0	1	4	3
T11 (WPM + 1,5 mg/L BAP)	1	2	1	0	0	0	1	1	2
	3	2	0	0	0	0	1	1	3
	1	1	1	0	0	0	1	2	2
	1	1	1	0	0	0	1	3	2
	1	3	0	1	0	0	1	1	3
	1	1	2	1	0	0	2	1	1
	1	1	1	0	0	0	2	1	1
	2	1	2	1	0	0	1	2	1
	1	3	1	0	0	0	1	1	2
	3	1	1	1	0	0	1	1	1
T12 (WPM + 2,0 mg/L BAP)	3	1	0	0	0	0	0	1	3
	1	1	0	0	0	0	2	1	3
	1	1	0	0	0	0	2	1	3
	1	1	0	0	0	0	2	1	3
	1	1	1	2	0	0	1	1	2
	1	1	1	0	0	0	1	1	1
	1	2	4	1	0	0	1	1	1
	1	1	2	0	0	0	1	2	3
	2	1	2	0	0	0	0	1	1
	1	1	2	1	0	0	1	1	1

Continuación...

Tratamiento	Número de brotes			Formación de callo			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T13 (WPM + 0,5 mg/L ZEA)	1	4	0	0	0	0	0	0	3
	1	2	4	0	0	0	0	1	1
	3	1	2	0	0	0	0	2	2
	1	1	2	0	0	0	1	2	1
	1	3	2	0	0	0	0	0	2
	1	3	4	0	0	0	1	1	1
	3	2	3	0	0	0	1	1	1
	2	3	1	0	0	0	1	0	2
	1	1	5	0	0	0	1	2	1
	3	1	0	0	0	0	0	1	3
T14 (WPM + 1,0 mg/L ZEA)	1	2	4	0	0	1	0	1	1
	2	3	3	0	0	1	0	0	1
	1	3	1	0	0	0	1	0	2
	1	3	5	0	0	1	0	1	1
	1	4	2	0	0	0	0	0	2
	1	3	0	0	1	0	0	1	3
	1	3	1	3	0	0	0	1	1
	1	2	3	0	0	0	1	2	3
	1	1	1	0	0	0	0	0	1
	1	0	2	0	0	0	0	3	1
T15 (WPM + 1,5 mg/L ZEA)	3	2	0	0	0	0	1	1	3
	2	4	1	0	0	0	0	1	2
	1	5	3	0	0	0	0	0	1
	1	5	1	0	1	0	1	0	2
	1	4	0	0	0	0	1	1	3
	1	2	3	1	0	0	2	0	1
	1	1	0	2	0	0	2	0	3
	3	3	1	0	1	0	1	1	2
	1	1	1	0	0	0	2	1	2
	1	2	0	0	0	0	2	1	3
T16 (WPM + 2,0 mg/L ZEA)	1	2	1	0	0	0	1	0	2
	1	4	0	0	1	0	2	0	3
	1	1	3	0	0	0	1	0	1
	1	5	3	1	1	0	1	0	1
	1	2	3	0	0	0	1	1	1
	1	1	1	0	0	0	2	0	1
	1	3	0	0	0	0	2	1	3
	1	3	3	3	0	0	1	2	1
	1	0	0	2	0	0	2	2	3
	1	3	0	0	1	0	2	0	3

**ANEXO 17**  
**EVALUACIÓN DEL NÚMERO DE BROTES, FORMACIÓN DE CALLO Y**  
**NECROSIS DE LA FASE DE MULTIPLICACIÓN –SEGUNDO SUBCULTIVO.**

Tratamiento	Número de brotes			Formación de callo			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T1 (MS + 0,5 mg/L BAP)	2	3	2	0	0	0	0	1	1
	3	2	1	0	0	0	0	2	1
	2	2	2	0	0	0	1	1	1
	1	1	2	0	0	0	1	1	1
	2	2	1	0	0	0	1	1	1
	1	1	2	0	0	0	1	1	1
	4	1	1	0	0	0	2	1	1
	5	1	2	0	0	0	1	1	1
	1	3	1	0	0	0	1	0	1
	0	1	1	0	0	0	1	1	1
T2 (MS + 1,0 mg/L BAP)	1	2	1	0	0	0	1	2	1
	1	1	2	0	0	0	1	1	1
	1	1	1	0	0	0	2	1	1
	2	1	1	0	0	0	1	1	1
	2	1	1	0	0	0	1	1	1
	2	1	2	0	0	0	1	1	1
	2	1	1	0	0	0	3	1	1
	1	0	1	0	0	0	0	1	1
	2	1	2	0	0	0	1	1	1
	2	2	1	0	0	0	0	1	1
T3 (MS + 1,5 mg/L BAP)	1	1	1	0	0	0	1	1	1
	3	1	1	0	0	0	1	1	1
	1	1	1	0	0	0	0	1	1
	1	1	1	0	0	0	1	1	1
	1	2	1	0	0	0	1	1	1
	3	2	1	0	0	0	1	1	1
	0	1	1	0	0	0	0	1	1
	1	1	1	0	0	0	1	1	1
	0	1	1	0	0	0	1	1	1
	1	1	1	0	0	0	0	1	1
T4 (MS + 2,0 mg/L BAP)	1	2	1	0	0	0	0	1	1
	0	1	1	0	0	0	2	3	2
	1	1	1	0	0	0	2	2	2
	1	1	1	0	0	0	1	1	1
	1	2	1	0	0	0	2	1	1
	0	1	1	0	0	0	2	1	2
	1	1	1	0	0	0	2	2	1
	1	1	1	0	0	0	5	2	1
	0	1	1	0	0	0	2	1	1
	0	1	1	0	0	0	1	1	2



Continuación...

Tratamiento	Número de brotes			Formación de callo			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T5 (MS + 0,5 mg/L ZEA)	2	3	2	0	0	0	1	2	0
	3	3	3	0	0	0	2	2	2
	2	2	2	0	0	0	1	2	1
	3	1	2	0	0	0	2	2	1
	2	2	3	0	0	0	1	1	1
	3	3	3	0	0	0	2	2	1
	5	3	2	0	0	0	3	1	1
	3	3	2	0	0	0	1	1	1
	1	2	3	0	0	0	1	2	0
	2	3	0	0	0	0	1	2	0
T6 (MS + 1,0 mg/L ZEA)	3	3	2	0	0	0	1	0	0
	3	3	2	0	0	0	1	1	2
	3	2	1	0	0	0	0	1	1
	2	1	1	0	0	0	2	2	1
	2	2	1	0	0	0	1	2	1
	4	2	1	0	0	0	1	1	1
	1	2	1	0	0	0	1	1	1
	1	3	0	0	0	0	3	2	1
	1	3	0	0	0	0	1	1	1
	2	2	0	0	0	0	1	1	1
T7 (MS + 1,5 mg/L ZEA)	1	1	2	0	0	0	0	1	0
	0	1	1	0	0	0	1	2	1
	3	3	2	0	0	0	1	1	1
	1	3	1	0	0	0	2	2	1
	1	1	2	0	0	0	1	1	1
	1	2	2	0	0	0	1	1	1
	4	2	2	0	0	0	1	1	0
	1	2	1	0	0	0	3	0	0
	1	1	2	0	0	0	0	0	0
	0	2	0	0	0	0	0	2	0
T8 (MS + 2,0 mg/L ZEA)	1	2	1	0	0	0	0	1	0
	1	3	1	0	0	0	1	1	1
	2	3	1	0	0	0	1	0	1
	1	2	1	0	0	0	3	1	1
	1	1	1	0	0	0	1	1	1
	2	1	0	0	0	0	2	1	1
	3	0	0	0	0	0	1	1	1
	0	1	0	0	0	0	1	1	1
	0	2	0	0	0	0	2	1	3
	0	1	0	0	0	0	3	1	1

Continuación...

Tratamiento	Número de brotes			Formación de callo			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T9 (WPM + 0,5 mg/L BAP)	2	1	1	0	0	0	0	0	1
	1	1	1	0	0	0	1	1	0
	3	2	2	0	0	0	3	1	0
	1	2	2	0	0	0	1	2	0
	2	1	1	0	0	0	1	2	0
	1	2	1	0	0	0	1	1	0
	1	1	1	0	0	0	1	1	0
	2	1	3	0	0	0	1	1	0
	3	1	1	0	0	0	1	1	0
	0	0	2	0	0	0	2	1	0
T10 (WPM + 1,0 mg/L BAP)	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	3	1	0	0	0	0	1	1	1
	1	2	0	0	0	0	1	1	1
	1	2	0	0	0	0	2	1	0
	1	1	0	0	0	0	1	1	0
	1	1	0	0	0	0	1	1	1
	1	1	0	0	0	0	1	1	1
	1	2	0	0	0	0	1	1	1
	2	1	0	0	0	0	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	1	1	0
T11 (WPM + 1,5 mg/L BAP)	1	1	1	0	0	0	1	1	0
	1	1	1	0	0	0	1	1	1
	2	1	0	0	0	0	0	1	1
	1	1	0	0	0	0	0	1	0
	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	0	0	0	1	1	0
	1	1	1	0	0	0	1	1	0
	1	1	1	0	0	0	1	1	0
	1	1	0	0	0	0	1	1	0
	1	1	0	0	0	0	1	1	0
T12 (WPM + 2,0 mg/L BAP)	1	1	1	0	0	0	1	0	0
	0	1	1	0	0	0	1	1	1
	0	1	0	0	0	0	2	1	1
	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	1	1	0	0	0	0	3	2	1
	1	1	0	0	0	0	1	1	1
	1	1	0	0	0	0	2	1	1
	1	1	0	0	0	0	2	0	1
	1	1	0	0	0	0	2	1	0
	1	0	0	0	0	0	3	2	0

Continuación...

Tratamiento	Número de brotes			Formación de callo			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T13 (WPM + 0,5 mg/L ZEA)	1	2	2	0	0	0	1	0	0
	2	1	2	0	0	0	2	1	1
	2	1	1	0	0	0	1	1	1
	3	2	1	0	0	0	1	1	1
	1	1	2	0	0	0	3	1	1
	2	2	1	0	0	0	2	1	1
	3	1	2	0	0	0	1	2	0
	3	1	0	0	0	0	2	1	2
	3	2	0	0	0	0	1	2	0
T14 (WPM + 1,0 mg/L ZEA)	3	0	0	0	0	0	1	0	0
	2	1	2	0	0	0	1	0	0
	2	1	2	0	0	0	1	1	0
	1	1	1	0	0	0	2	1	0
	3	1	1	0	0	0	2	1	1
	2	2	1	0	0	0	2	0	1
	1	2	1	0	0	0	1	0	1
	2	1	2	0	0	0	1	2	0
	1	2	1	0	0	0	1	0	0
	1	0	0	0	0	0	1	1	0
T15 (WPM + 1,5 mg/L ZEA)	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	2	2	1	0	0	0	2	0	0
	3	2	1	0	0	0	3	0	0
	2	1	1	0	0	0	2	0	0
	2	1	1	0	0	0	1	1	0
	1	2	1	0	0	0	0	0	1
	1	3	0	0	0	0	0	1	0
	1	1	0	0	0	0	1	1	1
	1	1	0	0	0	0	2	1	0
	1	1	0	0	0	0	0	2	0
T16 (WPM + 2,0 mg/L ZEA)	2	0	0	0	0	0	0	1	0
	3	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	1	1	0	0	0	2	1	0
	1	1	1	0	0	0	1	1	0
	0	1	2	0	0	0	2	1	0
	0	1	1	0	0	0	1	1	0
	1	1	1	0	0	0	1	1	0
	2	1	0	0	0	0	1	1	0
	0	3	0	0	0	0	1	1	0
	0	2	0	0	0	0	1	1	0
0	0	0	0	0	0	2	1	0	

**ANEXO 18**  
**EVALUACIÓN DE NÚMERO DE BROTES, FORMACIÓN DE CALLO Y**  
**NECROSIS DE LA FASE DE MULTIPLICACIÓN –TERCER SUBCULTIVO.**

Tratamiento	Número de brotes			Formación de callo			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T1 (MS + 0,5 mg/L BAP)	1	3	2	0	0	0	1	1	1
	1	1	1	0	0	0	1	1	1
	1	1	3	0	0	0	0	1	1
	3	1	2	0	0	0	1	1	1
	1	1	2	0	0	0	1	1	0
	1	1	2	0	0	0	0	1	1
	2	1	1	0	0	0	1	1	0
	1	1	1	0	0	0	1	1	1
	1	3	0	0	0	0	1	0	3
	1	1	1	0	0	0	1	1	1
T2 (MS + 1,0 mg/L BAP)	0	1	0	0	0	0	3	2	3
	1	1	3	0	0	0	2	1	1
	1	1	1	0	0	0	2	2	2
	2	1	1	0	0	0	0	1	2
	1	0	1	0	0	0	3	2	1
	1	1	0	0	0	0	3	1	3
	1	1	1	0	0	0	2	2	2
	1	1	1	0	0	0	1	1	1
	1	1	1	0	0	0	0	2	1
	1	1	1	0	0	0	1	1	2
T3 (MS + 1,5 mg/L BAP)	1	1	1	0	0	0	3	1	2
	1	1	1	0	0	0	1	2	1
	1	2	0	0	0	0	2	1	3
	1	1	1	0	0	0	2	2	2
	1	1	1	0	0	0	1	1	2
	0	1	1	0	0	0	1	1	2
	1	2	1	0	0	0	2	1	2
	1	1	1	0	0	0	1	1	1
	1	1	0	0	0	0	1	1	3
	1	2	1	0	0	0	1	1	2
T4 (MS + 2,0 mg/L BAP)	0	1	1	0	0	0	3	1	3
	1	1	1	0	0	0	2	2	2
	1	1	1	0	0	0	2	2	2
	0	1	1	0	0	0	3	2	2
	0	2	0	0	0	0	3	1	3
	0	1	1	0	0	0	3	2	2
	0	1	0	0	0	0	3	1	3
	0	0	1	0	0	0	3	3	1
	0	1	0	0	0	0	3	2	3
	0	0	1	0	0	0	3	2	2

Continuación...

Tratamiento	Número de brotes			Formación de callo			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T5 (MS + 0,5 mg/L ZEA)	2	1	3	0	0	0	2	1	1
	3	1	2	0	0	0	1	1	1
	1	1	3	0	0	0	2	1	1
	2	1	4	0	0	0	2	1	1
	3	1	3	0	0	0	1	1	1
	1	2	0	0	0	0	1	1	1
	3	1	0	0	0	0	1	1	1
	1	0	0	0	0	0	1	1	1
	2	0	0	0	0	0	1	2	2
	2	2	0	0	0	0	1	1	1
T6 (MS + 1,0 mg/L ZEA)	1	2	2	0	0	0	2	1	1
	2	1	1	0	0	0	1	1	1
	1	3	2	0	0	0	1	1	1
	1	1	1	0	0	0	1	1	1
	3	2	2	0	0	0	1	1	1
	1	2	0	0	0	0	1	1	3
	0	2	0	0	0	0	3	1	3
	1	0	0	0	0	0	1	1	2
	1	0	0	0	0	0	2	1	2
	1	0	0	0	0	0	1	1	2
T7 (MS + 1,5 mg/L ZEA)	1	1	2	0	0	0	2	1	1
	2	1	2	0	0	0	1	2	1
	2	1	1	0	0	0	1	2	2
	1	1	2	0	0	0	1	1	2
	1	0	0	0	0	0	1	1	1
	0	0	2	0	0	0	2	1	1
	1	0	2	0	0	0	2	2	1
	1	0	0	0	0	0	1	1	3
	2	0	0	0	0	0	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	3	1	3
T8 (MS + 2,0 mg/L ZEA)	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	1	2	0	0	0	0	1	1	3
	1	0	0	1	0	0	2	1	3
	1	0	0	0	0	0	1	2	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	1
	1	0	0	0	0	0	2	3	2
	2	0	0	0	0	0	1	2	3
	1	0	0	0	0	0	1	1	3
	1	0	0	0	0	0	2	1	3
	1	0	0	0	0	0	1	1	3

Continuación...

Tratamiento	Número de brotes			Formación de callo			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T10 (WPM + 1,0 mg/L BAP)	0	1	0	0	0	0	3	2	3
	1	1	0	0	0	0	1	3	3
	1	1	0	0	0	0	1	3	3
	0	1	0	0	0	0	3	1	3
	1	1	0	0	0	0	2	2	3
	0	1	0	0	0	0	2	3	3
	1	0	0	0	0	0	3	3	3
	1	1	0	0	0	0	2	2	3
	1	1	0	0	0	0	2	2	3
	0	1	0	0	0	0	3	2	3
T11 (WPM + 1,5 mg/L BAP)	1	1	1	0	0	0	2	2	2
	0	1	0	0	0	0	3	3	3
	1	1	1	0	0	0	2	1	2
	1	1	1	0	0	0	2	2	2
	1	0	1	0	0	0	2	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	2	3
	0	0	0	0	0	0	3	2	2
	1	0	0	0	0	0	1	2	2
	1	0	0	0	0	0	2	2	2
	1	0	0	0	0	0	2	2	2
T12 (WPM + 2,0 mg/L BAP)	0	0	1	0	0	0	3	3	2
	0	1	1	0	0	0	3	2	2
	1	1	0	0	0	0	2	2	2
	0	1	0	0	0	0	3	3	2
	0	1	0	0	0	0	3	2	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	1	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
T10 (WPM + 1,0 mg/L BAP)	0	1	0	0	0	0	3	2	3
	1	1	0	0	0	0	1	3	3
	1	1	0	0	0	0	1	3	3
	0	1	0	0	0	0	3	1	3
	1	1	0	0	0	0	2	2	3
	0	1	0	0	0	0	2	3	3
	1	0	0	0	0	0	3	3	3
	1	1	0	0	0	0	2	2	3
	1	1	0	0	0	0	2	2	3
	0	1	0	0	0	0	3	2	3

Continuación...

Tratamiento	Número de brotes			Formación de callo			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T13 (WPM + 0,5 mg/L ZEA)	2	1	3	0	0	0	1	2	1
	0	2	2	0	0	0	3	1	1
	0	0	2	0	0	0	3	3	1
	0	0	2	0	0	0	3	3	1
	0	0	3	0	0	0	3	3	1
	0	0	1	0	0	0	3	3	1
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
T14 (WPM + 1,0 mg/L ZEA)	0	1	0	0	0	0	3	1	2
	0	1	0	0	0	0	3	1	3
	0	1	0	0	0	0	3	1	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	2	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	1	0	0	0	3	3	1
	0	0	1	0	0	0	3	3	2
T15 (WPM + 1,5 mg/L ZEA)	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	1	0	0	0	0	3	2	3
	0	0	1	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
T16 (WPM + 2,0 mg/L ZEA)	0	0	1	0	0	0	2	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3

**ANEXO 19**  
**EVALUACIÓN DEL NÚMERO DE BROTES, FORMACIÓN DE CALLO Y**  
**NECROSIS DE LA FASE DE MULTIPLICACIÓN – CUARTO SUBCULTIVO.**

Tratamiento	Número de brotes			Formación de callo			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T1 (MS + 0,5 mg/L BAP)	0	3	3	0	0	0	1	1	1
	1	2	1	0	0	0	2	1	2
	1	2	2	0	0	0	1	2	1
	1	0	4	0	0	0	1	3	1
	0	0	4	2	0	0	2	2	1
	1	1	0	0	0	0	3	2	3
	2	2	1	0	0	0	1	1	1
	0	1	0	0	0	0	2	1	1
	1	3	1	0	0	0	1	1	2
	1	1	1	0	0	0	1	1	1
T2 (MS + 1,0 mg/L BAP)	1	0	1	0	0	0	2	3	1
	2	0	0	0	0	0	1	2	2
	3	1	0	0	0	0	1	2	3
	1	1	0	0	0	0	1	2	3
	1	0	0	0	0	0	1	3	3
	0	1	0	2	0	0	3	2	2
	0	0	0	0	0	0	2	3	2
	0	1	1	0	0	0	2	2	2
	0	0	1	0	0	0	2	3	2
	1	0	1	0	0	0	1	3	2
T3 (MS + 1,5 mg/L BAP)	1	0	0	0	0	0	3	3	3
	1	1	0	1	0	0	1	2	3
	0	1	1	1	0	0	3	2	2
	1	0	0	0	0	0	1	3	3
	0	1	0	0	0	0	3	2	3
	0	0	0	1	0	0	3	3	3
	1	0	0	0	0	0	1	3	3
	1	0	0	0	0	0	2	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	1	1	0	0	0	0	1	2	3
T4 (MS + 2,0 mg/L BAP)	1	0	1	0	0	0	1	2	1
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	2	3
	0	0	0	0	0	0	2	3	3
	0	0	0	0	0	0	2	2	2
	0	1	0	0	0	0	2	2	3
	0	0	0	0	0	0	2	2	3
	0	0	0	0	0	0	2	3	3
	0	0	0	0	0	0	2	3	3
	0	0	0	0	0	0	2	3	3



Continuación...

Tratamiento	Número de brotes			Formación de callo			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T5 (MS + 0,5 mg/L ZEA)	0	2	1	0	0	0	2	1	1
	2	0	2	0	0	0	1	3	1
	0	0	3	0	0	0	2	2	1
	0	0	2	0	0	0	3	2	1
	4	1	1	0	0	0	1	1	1
	3	0	2	0	0	0	1	3	1
	2	0	1	0	0	0	1	2	1
	1	1	3	0	0	0	1	1	1
	2	1	1	0	0	0	1	2	1
	0	0	2	0	0	0	3	2	1
T6 (MS + 1,0 mg/L ZEA)	1	1	3	0	0	0	2	1	1
	3	0	0	0	0	0	2	2	3
	0	2	1	0	0	0	2	1	1
	0	2	0	0	0	0	3	1	1
	3	1	2	0	0	0	1	1	1
	3	1	1	0	0	0	1	2	1
	1	0	0	0	0	0	2	1	1
	3	3	0	0	0	0	1	1	1
	0	4	0	1	0	0	2	1	1
	2	1	0	0	0	0	1	1	1
T7 (MS + 1,5 mg/L ZEA)	0	0	2	0	0	0	3	2	1
	1	1	1	1	0	0	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	3	2	1
	1	1	3	1	0	0	1	1	1
	1	0	2	2	0	0	1	2	2
	0	0	0	0	0	0	3	2	2
	0	0	3	0	0	0	3	2	1
	0	0	3	0	0	0	3	2	1
	1	0	2	0	0	0	1	2	1
	0	0	1	0	0	0	1	2	1
T8 (MS + 2,0 mg/L ZEA)	1	1	0	0	0	0	2	2	3
	1	0	0	0	0	0	2	2	3
	0	0	0	0	0	0	3	2	3
	0	0	0	0	0	0	3	2	3
	2	0	0	1	0	0	2	2	3
	1	0	0	1	0	0	2	2	3
	0	0	0	0	0	0	3	2	3
	1	0	0	1	0	0	3	2	3
	1	0	0	0	0	0	2	2	3
	0	0	0	0	0	0	3	2	3

Continuación...

Tratamiento	Número de brotes			Formación de callo			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T9 (WPM + 0,5 mg/L BAP)	0	1	2	0	0	0	2	1	1
	0	0	1	0	0	0	2	3	1
	1	0	0	0	0	0	1	3	3
	0	1	0	0	0	0	3	1	3
	1	0	1	0	0	0	2	1	1
	1	1	1	0	0	0	1	2	1
	0	0	2	0	0	0	3	2	1
	0	0	1	0	0	0	3	2	1
	0	0	2	0	0	0	2	2	1
	0	0	1	0	0	0	2	2	1
T10 (WPM + 1,0 mg/L BAP)	0	0	0	0	0	0	2	3	3
	0	0	0	0	0	0	2	3	3
	1	1	0	0	0	0	2	2	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	1	0	0	0	0	2	1	3
	0	0	0	0	0	0	2	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	1	0	0	0	0	0	1	2	3
	0	0	0	0	0	0	2	2	3
	0	0	0	0	0	0	2	2	3
T11 (WPM + 1,5 mg/L BAP)	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	1	1	0	0	0	3	2	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	1	0	0	0	0	0	2	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
T12 (WPM + 2,0 mg/L BAP)	0	0	0	0	0	0	3	2	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3

Continuación...

Tratamiento	Número de brotes			Formación de callo			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T13 (WPM + 0,5 mg/L ZEA)	3	1	1	0	0	0	1	1	1
	0	2	2	0	0	0	3	2	2
	0	0	1	0	0	0	3	2	1
	0	0	1	0	0	0	3	2	1
	0	0	0	0	0	0	3	2	3
	0	0	1	0	0	0	3	2	1
	0	0	2	0	0	0	3	2	1
	0	0	1	0	0	0	3	2	1
	0	0	0	0	0	0	3	2	2
	0	0	2	0	0	0	3	2	1
T14 (WPM + 1,0 mg/L ZEA)	0	1	1	0	0	0	3	1	2
	0	1	0	0	0	0	3	0	3
	0	1	0	0	0	0	3	1	3
	0	0	0	0	0	0	3	1	3
	0	0	0	0	0	0	3	1	3
	0	0	0	0	0	0	3	1	3
	0	0	0	0	0	0	3	1	3
	0	0	0	0	0	0	3	1	3
	0	0	0	0	0	0	3	1	3
	0	0	0	0	0	0	3	1	3
T15 (WPM + 1,5 mg/L ZEA)	0	0	0	0	0	0	3	0	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
T16 (WPM + 2,0 mg/L ZEA)	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3

**ANEXO 20**  
**EVALUACIÓN DEL NÚMERO DE BROTES, FORMACIÓN DE CALLO Y**  
**NECROSIS DE LA FASE DE MULTIPLICACIÓN –QUINTO SUBCULTIVO.**

Tratamiento	Número de brotes			Formación de callo			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T1 (MS + 0,5 mg/L BAP)	0	2	1	0	0	0	3	1	1
	0	2	1	0	0	0	3	1	1
	1	3	2	0	0	0	2	1	1
	1	3	1	0	0	0	1	1	1
	1	1	1	0	0	0	1	1	1
	1	0	1	0	0	0	2	2	1
	1	2	1	0	0	0	1	1	1
	0	2	1	0	0	0	2	1	1
	1	2	1	0	0	0	1	1	1
	0	2	1	0	0	0	2	1	1
T2 (MS + 1,0 mg/L BAP)	1	0	1	0	0	0	2	3	1
	1	0	1	0	0	0	2	3	1
	0	0	1	0	0	0	3	3	1
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	1	0	0	0	0	0	2	3	1
	0	0	0	0	0	0	3	3	1
	1	0	0	0	0	0	1	3	1
	0	0	0	0	0	0	2	3	1
	1	0	0	0	0	0	1	3	1
	0	0	0	0	0	0	2	3	1
T3 (MS + 1,5 mg/L BAP)	0	0	0	0	0	0	2	3	2
	0	0	0	0	0	0	2	3	2
	0	0	0	0	0	0	2	3	2
	1	0	0	0	0	0	2	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	2	3	2
	0	0	0	0	0	0	2	3	2
	0	0	0	0	0	0	2	3	2
	0	0	0	0	0	0	2	3	2
	0	0	0	0	0	0	2	3	2
T4 (MS + 2,0 mg/L BAP)	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2

Continuación...

Tratamiento	Número de brotes			Formación de callo			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T5 (MS + 0,5 mg/L ZEA)	2	0	2	0	0	0	1	2	1
	3	0	2	0	0	0	1	2	1
	1	0	1	0	0	0	1	3	1
	3	2	2	0	0	0	1	1	1
	2	0	1	0	0	0	1	2	1
	1	0	1	0	0	0	2	2	2
	4	0	1	0	0	0	1	2	1
	2	0	1	0	0	0	1	2	1
	2	0	1	0	0	0	1	2	1
	3	0	1	0	0	0	1	2	1
T6 (MS + 1,0 mg/L ZEA)	3	0	3	0	0	0	1	2	1
	2	1	0	0	0	0	1	1	2
	2	0	0	0	0	0	1	2	1
	3	0	1	0	0	0	1	2	1
	0	0	1	0	0	0	2	1	1
	1	1	3	0	0	0	1	2	1
	1	0	0	0	0	0	1	2	2
	2	1	0	0	0	0	1	2	2
	0	1	0	0	0	0	1	2	2
	0	1	0	0	0	0	1	1	2
T7 (MS + 1,5 mg/L ZEA)	0	0	0	0	0	0	3	3	1
	0	1	3	0	0	0	3	1	1
	1	0	2	0	0	0	1	2	1
	0	0	2	0	0	0	3	2	2
	0	0	1	0	0	0	3	2	1
	0	0	1	0	0	0	3	2	1
	0	0	1	0	0	1	3	2	2
	0	0	1	0	0	1	3	2	2
	0	0	0	0	0	0	3	2	1
	0	0	0	0	0	0	3	2	1
T8 (MS + 2,0 mg/L ZEA)	1	0	0	0	0	0	1	3	3
	0	0	0	0	0	0	2	3	3
	1	0	0	0	0	0	1	3	3
	0	0	0	0	0	0	2	3	3
	0	0	0	0	0	0	2	3	3
	0	0	0	0	0	0	2	3	3
	0	0	0	0	0	0	2	3	3
	0	0	0	0	0	0	2	3	3
	0	0	0	0	0	0	2	3	3
	0	0	0	0	0	0	2	3	3

Continuación...

Tratamiento	Número de brotes			Formación de callo			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T9 (WPM + 0,5 mg/L BAP)	0	0	1	0	0	0	2	2	1
	0	0	1	0	0	0	3	2	1
	1	0	2	0	0	0	1	2	1
	1	0	2	0	0	0	1	2	1
	0	0	1	0	0	0	2	2	1
	0	0	1	0	0	0	2	2	1
	0	0	2	0	0	0	2	2	1
	0	0	1	0	0	0	2	2	1
	0	0	1	0	0	0	2	2	1
	0	0	1	0	0	0	2	2	1
T10 (WPM + 1,0 mg/L BAP)	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
T11 (WPM + 1,5 mg/L BAP)	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
T12 (WPM + 2,0 mg/L BAP)	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3

Continuación...

Tratamiento	Número de brotes			Formación de callo			Necrosis		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T13 (WPM + 0,5 mg/L ZEA)	1	2	1	0	0	0	1	2	1
	0	0	1	0	0	0	1	2	1
	0	0	0	0	0	0	1	2	1
	0	0	0	0	0	0	1	2	1
	0	0	0	0	0	0	1	2	1
	0	0	0	0	0	0	1	2	1
	0	0	0	0	0	0	1	2	1
	0	0	0	0	0	0	1	2	1
	0	0	0	0	0	0	1	2	1
T14 (WPM + 1,0 mg/L ZEA)	0	0	1	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
	0	0	0	0	0	0	3	3	2
T15 (WPM + 1,5 mg/L ZEA)	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
T16 (WPM + 2,0 mg/L ZEA)	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	0	0	0	0	0	0	3	3	3

**ANEXO 21**  
**EVALUACIÓN DEL NÚMERO DE BROTES, FORMACIÓN DE CALLO Y**  
**NECROSIS DE LA FASE DE MULTIPLICACIÓN SEXTO SUBCULTIVO.**

<i>Tratamiento</i>	<i>Número de brotes</i>			<i>Formación de callo</i>			<i>Necrosis</i>		
	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>
T5 (MS + 0,5 mg/L ZEA)	2	4	3	0	1	0	0	0	0
	10	6	0	0	0	0	0	0	3
	0	3	4	0	0	0	1	0	0
	1	0	5	0	0	0	0	1	0
	6	1	6	0	0	0	0	0	0
	2	0	5	0	0	0	0	1	0
	5	2	7	0	0	0	0	0	0
	0	1	1	1	1	0	2	0	0
	1	1	3	0	0	0	0	0	1
	1	1	6	0	0	0	0	0	0



**ANEXO 22**  
**EVALUACIÓN DEL NÚMERO DE RAÍCES, LONGITUD DE RAÍZ Y**  
**FORMACIÓN DE CALLO DE LA FASE DE ENRAIZAMIENTO.**

Tratamiento	Número de raíces			Longitud de raíz (mm)			Formación de callo		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T1 (MS libre de auxinas)	1	1	4	203	81	69	0	0	0
	1	1	3	82	25	121	0	0	0
	2	1	4	140	14	148	0	0	0
	2	2	3	189	174	203	0	0	0
	2	1	1	105	66	110	0	0	0
	5	0	2	109	0	259	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	3	0	261	164	0	0	0	0
	0	2	1	0	74	62	0	0	0
T2 (MS + 0,5 mg/L AIB)	3	0	1	149	0	50	0	0	0
	4	0	0	189	0	0	0	0	0
	1	0	0	174	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	2	2	113	71	50	0	0	0
	1	6	0	196	242	0	0	0	0
	1	0	1	212	0	55	0	0	0
	0	0	2	0	0	29	0	0	0
	0	2	0	0	187	0	0	0	0
T3 (MS+1,0 mg/L AIB)	6	0	0	60	0	0	0	1	0
	2	0	1	270	0	14	0	1	0
	4	0	0	125	0	0	0	1	0
	1	3	0	288	60	0	0	0	0
	6	4	0	250	174	0	0	0	0
	5	1	3	203	41	26	0	0	0
	3	2	0	144	67	0	0	0	0
	3	0	0	169	0	0	0	0	0
	0	4	2	0	22	56	0	1	0
	3	0	0	62	0	0	0	1	0
T4 (MS+0,5 mg/L ANA)	0	0	1	0	0	5	1	2	2
	0	0	0	0	0	0	1	2	2
	0	0	0	0	0	0	1	1	2
	0	0	4	0	0	196	1	1	1
	6	0	0	62	0	0	2	1	2
	2	0	0	31	0	0	1	2	2
	4	3	0	108	98	0	2	0	0
	1	0	1	30	0	101	2	2	2
	0	0	0	0	0	0	2	1	2
	0	0	0	0	0	0	2	2	2

Continuación...

Tratamiento	Número de raíces			Longitud de raíz (mm)			Formación de callo		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T5 (MS+1,0 mg/L ANA)	0	1	0	0	49	0	1	2	2
	0	0	0	0	0	0	2	2	2
	0	1	0	0	4	0	2	2	2
	0	0	2	0	0	8	2	2	1
	0	0	5	0	0	14	2	2	1
	0	0	0	0	0	0	2	2	2
	0	0	2	0	0	9	2	2	1
	0	1	0	0	54	0	2	1	2
	0	1	0	0	20	0	2	2	2
	0	0	2	0	0	4	2	2	1
T6 (MS+0,5 mg/L AIA)	1	0	6	289	0	18	0	0	0
	1	0	5	8	0	189	0	0	0
	6	0	5	32	0	49	0	0	0
	1	0	2	247	0	12	0	0	0
	2	0	0	189	0	0	0	0	0
	2	0	1	242	0	171	0	0	0
	2	0	2	204	0	136	0	0	0
	3	2	6	176	191	161	0	0	0
	0	6	1	0	74	34	0	0	0
	2	2	3	196	188	142	0	0	0
T7 (MS+1,0 mg/L AIA)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	2	0	0	65	0	0	0	0
	4	0	0	9	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	160	0	0	0	0
	0	2	0	0	187	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	32	0	1	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	48	0	0	0	0
	0	2	0	0	59	0	0	0	0

**ANEXO 23**  
**EVALUACIÓN DE ALTURA Y NÚMERO DE HOJAS INICIAL Y FINAL DE LA**  
**FASE DE ACLIMATACIÓN.**

Tratamiento	Altura inicial (mm)			Altura final (mm)			Número de hojas inicial			Número de hojas final		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T1 (Jiffy)	52	41	26	56	99	50	10	6	3	4	7	4
	60	26	39	89	86	78	6	4	8	6	7	6
	44	16	26	82	70	52	6	3	5	4	5	6
	29	45	22	0	82	22	6	8	4	0	4	3
	47	71	41	0	114	98	5	8	5	0	5	6
	51	39	12	64	0	60	7	2	4	4	0	5
	64	21	20	118	21	84	8	4	3	8	3	6
	48	32	32	0	65	71	6	4	4	0	6	5
	22	40	31	39	112	58	3	6	5	5	6	6
	65	27	22	69	0	61	5	6	5	5	0	5
	42	33	24	58	57	49	5	8	4	4	5	4
	77	35	50	77	75	52	8	5	8	5	6	4
	52	33	19	85	70	55	6	8	4	4	5	5
	48	23	16	76	68	52	7	5	3	4	5	4
	40	22	21	42	51	47	6	7	5	3	5	5
	46	54	31	108	68	69	6	6	5	7	6	4
	21	20	27	60	50	70	4	2	5	6	4	6
	32	57	22	87	88	59	6	6	4	7	6	5
	40	31	15	92	71	37	6	5	3	8	5	4
19	42	15	31	90	68	4	5	4	3	6	7	
T2 (Premix #8)	45	43	31	112	109	79	8	7	7	6	7	6
	50	22	14	0	0	50	5	5	5	0	0	6
	95	63	42	98	100	82	7	8	2	6	5	6
	36	50	71	0	88	89	6	8	7	0	6	6
	35	49	24	102	86	61	6	8	6	7	6	6
	32	12	27	95	52	66	6	2	7	6	5	6
	42	22	28	128	0	64	6	4	6	5	0	5
	30	20	90	93	57	90	6	4	5	4	4	8
	28	32	21	78	68	64	6	5	5	5	6	6
	24	16	40	75	41	50	4	5	4	6	4	5
	33	23	24	0	88	57	3	6	6	0	7	4
	62	34	34	74	118	75	5	6	7	6	8	7
	38	36	54	0	84	67	5	8	7	0	8	5
	42	21	22	84	67	31	6	6	6	6	5	4
	36	25	37	79	0	37	5	6	8	6	0	4
	41	20	41	115	51	0	6	6	7	5	6	0
	28	34	42	78	39	53	4	6	8	4	5	5
	32	27	31	72	70	0	4	7	6	7	7	0
	43	14	38	105	14	0	8	2	7	5	3	0
36	24	22	0	37	71	7	4	4	0	6	8	

## ANEXO 24

### PROTOCOLO PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE *CEDRELA LILLOI* C. DC. (CEDRO DE ALTURA) A PARTIR DE YEMAS APICALES PROVENIENTES DE EMBRIONES CIGÓTICOS GERMINADOS *IN VITRO*

<i>Fase</i>	<i>Medio de cultivo y regulador de crecimiento</i>	<i>Condiciones</i>	<i>Tiempo</i>
<b><i>Establecimiento o iniciación</i></b>	Desinfección superficial: lavar las semillas con agua de caño y detergente, enjuagar con agua destilada 3 veces, reposar por 1 hora en una solución de Benomil al 0,2%. Lavar con agua destilada 3 veces, luego en condiciones asépticas sumergir semillas en alcohol al 70% por 1 minuto, luego NaOCl al 0,9% + 2 gotas Tween 20 por 20 minutos, finalmente enjuagar por 4 veces con agua destilada estéril y dejar hidratar por 24 horas. Germinación: Embrión cigótico en un medio MS (1962).	Sala de incubación: 21±2°C con 70% de humedad relativa; fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad e intensidad luminosa de 3180 lux.	4 semanas
<b><i>Multipliación</i></b>	MS (1962) + 0,5 mg/L Zeatina		5 semanas
<b><i>Enraizamiento</i></b>	MS (1962) sin auxinas		5 semanas
Aclimatación	Premix #8 (Turba + vermiculita/perlita)	Fitotrón: 20±2°C, 70% de humedad relativa; fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad e intensidad luminosa de 5440 lux.	8 semanas