

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES



**“MICROPROPAGACIÓN DE *Amburana acreana* (ISHPINGO) A
PARTIR DE YEMAS APICALES PROVENIENTES DE LA
GERMINACIÓN *IN VITRO* DE SEMILLAS”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERA FORESTAL**

PAOLA LICET MONZÓN NARCISO

LIMA-PERÚ

2021

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES

**“MICROPROPAGACIÓN DE *Amburana acreana* (ISHPINGO) A PARTIR
DE YEMAS APICALES PROVENIENTES DE LA GERMINACIÓN *IN*
VITRO DE SEMILLAS”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO FORESTAL

PAOLA LICET MONZÓN NARCISO

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

*Dr. José Eloy Cuellar Bautista
Presidente del Jurado*

*Ing. Fernando Bulnes Soriano
Miembro del Jurado*

*M.Sc. Lourdes Tapia y Figueroa
Miembro del Jurado*

*Dr. Gilberto Domínguez Torrejón
Asesor de Tesis*

*Blga. Rosa María Cabrera Pintado
Co asesora*

DEDICATORIA

Agradezco ante todo a Dios por ayudarme en cada momento que lo necesité y permitirme seguir adelante.

A mi madre Rosario Narciso por apoyarme incondicionalmente en todas las etapas de mi vida.

A mis familiares y amigos por su constante apoyo y cariño.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos

A mi asesor el Dr. Gilberto Domínguez y, con un especial cariño, a la Blga. Rosa Cabrera Pintado por apoyarme constantemente durante la ejecución de la investigación.

A los miembros del jurado, por las recomendaciones brindadas para el mejoramiento de la investigación.

A mis amigos Rocío, Angel, Naty, Liliana, Melissa, Milca y Kiara del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales por su apoyo, ánimos y consejos para el desarrollo de la tesis.

A la Sra. Luz Guzmán por su infinita paciencia y tiempo durante la ejecución de la tesis.

A los profesores, Dr. Héctor González y Ing. Aldo Cárdenas y amigas Winnifer y Cinthia por su apoyo mientras realizaba mi tesis.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
	2.1. Clasificación taxonómica del ishpingo (<i>Amburana acreana</i>).....	2
	2.2. Descripción botánica	2
	2.2.1. Tallo y ramas	2
	2.2.2. Hojas.....	4
	2.2.3. Inflorescencias y flores.....	4
	2.2.4. Frutos.....	4
	2.3. Distribución geográfica del ishpingo.....	6
	2.3.1. Distribución mundial.....	6
	2.3.2. Distribución en el Perú.....	6
	2.4. Fenología y propagación	6
	2.5. Hábitat	7
	2.6. Características de la madera	8
	2.7. Usos e importancia	7
	2.8. Experiencias de propagación convencional de la especie	8
	2.9. Micropropagación o cultivo <i>in vitro</i>	8
	2.9.1. Generalidades	8
	2.9.2. Ventajas y desventajas de la micropropagación.....	9
	2.9.3. Tipos de micropropagación.....	10
	2.10. Factores que influyen en la micropropagación.....	11
	2.10.1. Planta donante	11
	2.10.2. El explante.....	11
	2.10.3. Temperatura.....	12
	2.10.4. Luz.....	12
	2.10.5. Medio de cultivo.....	12
	2.10.6. Agentes gelificantes.....	15
	2.10.7. pH del medio de cultivo	15
	2.11. Micropropagación a partir de yemas apicales y axilares.....	15
	2.12. Fases de la micropropagación.....	15
	2.12.1. Fase 0: Acondicionamiento de plantas madre	15
	2.12.2. Fase 1: Establecimiento de los cultivos.....	16

2.12.3. Fase 2: Multiplicación	17
2.12.4. Fase 3: Enraizamiento	17
2.12.5. Fase 4: Aclimatación	17
2.13. Micropropagación de especies forestales	17
III. METODOLOGÍA.....	19
3.1. Ubicación del ensayo experimental.....	19
3.2. Material vegetal	19
3.3. Fase 1: Preparación de vitroplantas a partir de semillas.....	20
3.3.1. Preparación del medio MS para la siembra de las semillas.....	20
3.3.2. Determinación del protocolo de desinfección superficial de semillas	20
3.3.3. Incubación de las semillas	22
3.3.4. Variables evaluadas	22
3.4. Fase 2: Multiplicación	23
3.4.1. Preparación del medio de cultivo para la siembra de yemas apicales	23
3.4.2. Siembra de yemas apicales.....	24
3.4.3. Subcultivo de yemas apicales	25
3.4.4. Variables evaluadas	26
3.5. Fase 3: Enraizamiento	29
3.5.1. Preparación del medio de cultivo para el enraizamiento.....	29
3.5.2. Introducción de microestacas en medio de cultivo de enraizamiento	29
3.5.3. Variables evaluadas	31
3.6. Diseño experimental.....	31
3.6.1. Preparación y desinfección de semillas de ishpingo	31
3.6.2. Multiplicación a partir de yemas apicales	32
3.6.3. Enraizamiento.....	32
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1. Fase 1: Preparación devitro plantas a partir de semillas.....	34
4.2. Fase 2: Multiplicación	37
4.3. Fase 3: Enraizamiento	43
V. CONCLUSIONES.....	45
VI. RECOMENDACIONES.....	47
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	48
VIII. ANEXOS.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Concentraciones usadas de auxinas y citoquininas	14
Tabla 2: Tratamientos de desinfección superficial para semillas de ishpingo	21
Tabla 3: Tratamientos para la inducción de brotes múltiples de ishpingo	24
Tabla 4: Clasificación de grado de formación de callo en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> del ishpingo.....	27
Tabla 5: Clasificación de grado de fenolización en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> del ishpingo	28
Tabla 6: Clasificación de grado de necrosis en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> del ishpingo	29
Tabla 7: Tratamientos de enraizamiento <i>in vitro</i> de ishpingo	30
Tabla 8: Tratamientos con la auxina IBA para el enraizamiento de microestacas de ishpingo	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Amburana acreana</i> . Flores y botones florales (Foto: V. F. Mansano).	4
Figura 2: <i>Amburana acreana</i> . A. Rama con hojas; B. inflorescencia; C. Foliolo (cara adaxial); D. Detalle de la vena media en C; E – F. Bracteola (cara abaxial y adaxial, respectivamente); G. capullo de flor; H. Flor en vista lateral; J. Flor (sin el pétalo) en vista lateral mostrando los estambres y el carpelo; K. Estandarte (cara adaxial); L. Sección longitudinal de la flor que muestra la inserción de hypanthium y estambre; M. frutos; N. Semilla alada (A de L. F. G. da Silva <i>et al.</i> 59, B – L de S. Romaniuc Neto <i>et al.</i> 687, M – N de T. D. Pennington <i>et al.</i> 16994). Dibujado por Ana L. Souza. Fuente: Seleme <i>et al.</i> 2015	5
Figura 3: Distribución geográfica de <i>Amburana acreana</i> (■), <i>A. cearensis</i> (●) and <i>A. erythrosperma</i> (▲). Map created using Diva. Fuente: Seleme <i>et al.</i> 2015	6
Figura 4: Vías de regeneración de plantas por cultivos de tejidos vegetales. Fuente: George <i>et al.</i> 2008	11
Figura 5: Medidas de la semilla de ishpingo. A. Largo B. Ancho C. Espesor	19
Figura 6: Desinfección de semillas. A. Lavado con detergente y agua potable B. Inmersión de semillas en benomyl.....	20
Figura 7: Preparación de medio de cultivo para siembra de semillas de ishpingo	21
Figura 8: Desinfección de semillas de ishpingo	21
Figura 9: Incubación de semillas de ishpingo	22
Figura 10: Preparación de medio de cultivo con citoquininas para siembra de yemas apicales de ishpingo.....	23
Figura 11: Disección de yemas apicales de ishpingo y siembra.....	25
Figura 12: Subcultivo de yemas apicales de ishpingo	26
Figura 13: Clasificación de grado de formación de callo en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> del ishpingo.....	27
Figura 14: Clasificación de grado de fenolización en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> del ishpingo	28
Figura 15: Clasificación de grado de necrosis en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> del ishpingo	29
Figura 16: Microestaca de ishpingo en medio de cultivo de enraizamiento <i>in vitro</i>	30
Figura 17: Porcentaje de germinación <i>in vitro</i> de semillas de ishpingo	34
Figura 18: Porcentaje de contaminación <i>in vitro</i> de semillas de ishpingo	35

Figura 19: A. Plántula de ishpingo libre de contaminantes B. Semilla de ishpingo contaminada.....	35
Figura 20: Promedio de brotes de tres subcultivos continuos por tratamiento durante la fase de multiplicación	37
Figura 21: A. Subcultivos de ishpingo en medio de cultivo MS + 1 mg/L BAP B. Subcultivos de ishpingo en medio de cultivo WPM + 1 mg/L BAP.....	38
Figura 22: Promedio de brotes por cada subcultivo para el tratamiento 2 y 3 durante la fase de multiplicación	40
Figura 23: Subcultivo de ishpingo en T2 (MS + 1 mg/L BAP.....	40
Figura 24: Promedio de necrosis en tres subcultivos continuos expresados en porcentaje (%) por tratamiento durante la fase de multiplicación	41
Figura 25: Promedio de fenolización en tres subcultivos continuos expresados en porcentaje (%) por tratamiento durante la fase de multiplicación	42
Figura 26: Promedio de callosidad en tres subcultivos continuos expresados en porcentaje (%) por tratamiento durante la fase de multiplicación	43
Figura 27: Número total de plántulas sobrevivientes expresados en porcentaje (%) por tratamiento durante la fase de enraizamiento	43

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Análisis de varianza protocolo de desinfección.....	54
ANEXO 2. Pruebas de los supuestos del Anova para la tasa de multiplicación.....	56
ANEXO 3. Prueba de Kruskal Wallis para la tasa de multiplicación.....	57
ANEXO 4. Promedio de brotes por subcultivo para la multiplicación del ishpingo.....	59
ANEXO 5. Promedio de grado de necrosis de plántulas de ishpingo.....	60
ANEXO 6. Promedio de grado de fenolización de plántulas de ishpingo.....	61
ANEXO 7. Promedio de grado de callos de plántulas de ishpingo.....	62

RESUMEN

Amburana acreana es una de las especies altamente demandadas en el mercado por su valiosa importancia comercial, teniendo en cuenta sus múltiples aplicaciones en la carpintería y sus semillas, en la perfumería. Actualmente, la extracción forestal se ha enfocado en unas cuantas especies líderes como el ishpingo, lo cual la ha colocado en riesgo de extinción. Sumado a ello, la situación de esta especie se intensifica debido a que la producción de semillas solo es una vez al año lo que imposibilita su regeneración continua como muchas otras especies forestales. Por lo expuesto anteriormente, el objetivo del presente estudio se centra en desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* para la producción masiva del ishpingo. Para ello, se trabajaron con semillas, las cuales provenían de árboles semilleros del bosque concesionado del distrito de Puerto Inca. Primero, se estableció el protocolo de desinfección superficial en diferentes concentraciones de NaClO, obteniéndose mejores resultados de germinación con 75% y de contaminación con 15% en el T2 (2,5% de NaClO durante 30 minutos). Para la fase de multiplicación, se evaluaron 16 tratamientos en los medios de cultivo de MS y WPM con diferentes concentraciones de las citocininas BAP y ZEA. Los tratamientos con el medio de cultivo WPM tuvieron poca efectividad en la brotación de las plántulas. Las más altas tasas de multiplicación se obtuvieron con el medio de cultivo MS con la hormona BAP, siendo el mejor el T2 (MS + 1 mg/L BAP) con un promedio de 2,01 de brotes. En la fase de enraizamiento, se evaluaron seis tratamientos en medio de cultivo MS con diferentes concentraciones de auxinas (AIA, ANA y AIB); sin embargo, las microestacas no mostraron los resultados esperados y solo se evaluó la tasa de sobrevivencia. Por esta razón, se evaluaron tres tratamientos adicionales en medio de cultivo MS con diferentes concentraciones de IBA, sin embargo, las microestacas no sobrevivieron.

Palabras claves: Micropropagación, multiplicación, *Amburana acreana*, citoquininas, auxinas

ABSTRACT

Amburana acreana is one of the highly demanded species in the market due to its valuable commercial importance, taking into account its multiple applications in carpentry and its seeds in perfumery. Currently, logging has focused on a few leading species such as the Ishpingo, which has put it at risk of extinction. Added to this, the situation of this species intensifies because the production of seeds is only once a year, which makes its continuous regeneration impossible like many other forest species. Due to the above, the objective of this study is to develop an *in vitro* propagation protocol for the mass production of ishpingo. For this, I worked with seeds, which came from seed trees of the concessioned forest of the Puerto Inca district. First, the surface disinfection protocol was established in different concentrations of NaClO, obtaining better germination results with 75% and contamination with 15% in T2 (2.5% NaClO for 30 minutes). For the multiplication phase, 16 treatments were evaluated in the MS and WPM culture media with different concentrations of the cytokinins BAP and ZEA. The treatments with the WPM culture medium had little effectiveness in the sprouting of the seedlings. The highest multiplication rates were obtained with the MS culture medium with the hormone BAP, the best being T2 (MS + 1 mg / L BAP) with an average of 2.01 shoots. In the rooting phase, six treatments were evaluated in MS culture medium with different concentrations of auxins (AIA, ANA and AIB); however, the microstakes did not show the expected results and only the survival rate was evaluated. For this reason, three additional treatments were evaluated in MS culture medium with different concentrations of IBA, however, the microstakes did not survive.

Keywords: Micropropagation, multiplication, *Amburana acreana*, cytokinins, auxins

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú existen aproximadamente 72 millones de hectáreas de bosques con una amplia biodiversidad, siendo los bosques amazónicos los que presentan la mayor superficie con 94 por ciento, lo que lo convierte en uno de los diez países del planeta con mayor extensión de masas arboladas predominantemente leñosas. Los bosques amazónicos tienen un rol clave por cumplir funciones ecológicas, económicas y culturales, así como producir servicios ecosistémicos, entre otros (Rautner *et al.*, 2013; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2016).

A pesar de los múltiples beneficios que los bosques tropicales y sobre todo los ecosistemas forestales representan para la sociedad, su conservación enfrenta dos amenazas principales, la deforestación y la degradación, no solo por la alta demanda de la madera que es un recurso básico en la población, sino que también para la conversión de sus tierras forestales en tierras para la agricultura y ganadería debido al aumento poblacional (FAO, 2016; Ministerio del Ambiente (MINAM), 2016).

Los bosques amazónicos presentan una gran variedad de especies leñosas y maderables de alto valor, siendo una de ellas *Amburana acreana* “ishpingo”. Esta especie caducifolia pertenece a la familia de las fabáceas y es altamente cotizada en el mercado nacional e internacional por la excelente calidad y durabilidad de su madera, siendo utilizada en la fabricación de puertas y ventanas, así como en la industria de la construcción (Reynel *et al.*, 2003; Dancé, 2006). Es por estas características que es altamente demandada lo que puede representar un peligro para su conservación sin las medidas necesarias.

El ishpingo tiene una distribución principalmente en las regiones de Huánuco, Loreto, San Martín y Ucayali (Brako y Zarucchi, 1993). En lo que respecta a su fenología, la diseminación de las semillas de esta especie es anual (Flores, 1997), lo que puede representar un problema a largo plazo si se mantiene el ritmo extractivo de especies maderables en los

bosques sin considerar árboles semilleros para su recuperación. Ante esta situación, surge la necesidad de crear alternativas de propagación y conservación, siendo una de ellas, la micropropagación. La micropropagación *in vitro* es uno de los múltiples métodos que han ayudado a incrementar el número de individuos de varias especies leñosas. Ello consiste en el cultivo y multiplicación a partir de una parte de la planta madre en un medio aséptico (Smith y Wood, 1998).

Por lo expuesto, la presente investigación tuvo como objetivo desarrollar una metodología alternativa de regeneración de la especie *Amburana acreana* utilizando la técnica de micropropagación *in vitro* a partir de yemas apicales provenientes de la germinación *in vitro* de semillas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Clasificación taxonómica del ishpingo (*Amburana acreana*)

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Fabales
- Familia: Fabaceae.
- Subfamilia: Faboideae
- Género: *Amburana*
- Tribu: Swartzieae
- Especie: *Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith.
- Nombre común: Ishpingo, roble criollo

2.2. Descripción botánica

La taxonomía de *Amburana* nunca se ha estudiado exhaustivamente por lo que para nuestra región existía la confusión entre las especies *Amburana cearensis* y *Amburana acreana*. Sin embargo, se han destacado características que las diferencian como el color del fuste, el número de folíolos por hoja, forma de los folíolos, forma de la base y el ápice y el tamaño de la inflorescencia (Seleme *et al.*, 2015). A continuación, se detallará las características de la *Amburana acreana*.

2.2.1. Tallo y ramas

El ishpingo es un árbol heliófito y caduco de 20 a 35 metros de altura, con un diámetro entre 80 y 150 centímetros. Su fuste es cilíndrico, recto o levemente tortuoso, liso y de color óxido. La corteza interna es granular, color amarillo blanquecino, con olor fuerte y aromático característico sin presencia de exudaciones. Sus ramas están provistas de ritidoma fino con presencia de numerosas lenticelas (Carvalho, 2007; Seleme *et al.*, 2015)

2.2.2. Hojas

Las hojas son compuestas imparipinnadas y tienen un tamaño entre 15 y 35 cm de largo, el pecíolo está entre 14 y 17 mm de largo y es piloso. Cada hoja presenta entre 17 y 25 folíolos, alternas, de forma ovadas-lanceoladas, ápice acuminado, base redondeada y el nervio central elevado en la superficie abaxial (Seleme *et al.*, 2015; Reynel *et al.*, 2016).

2.2.3. Inflorescencias y flores

La inflorescencia es laxa (pedicelos largos), axilar o terminal de 4 a 10 cm de largo, el pedúnculo es de 1.5 a 3 cm de largo y las bractéolas son ovadas y pilosas. Las flores son hermafroditas, especie monoica, presentan entre 10 a 18 mm de largo, el estandarte (pétalo posterior) es blanco con una longitud entre 10 a 15 mm y piloso adaxialmente. El cáliz es campanulado, glabrescente, con 10 estambres y filamentos curvados hacia arriba (Seleme *et al.*, 2015).



Figura 1: *Amburana acreana*. Flores y botones florales (Foto: V. F. Mansano).

Fuente: Seleme *et al.* 2015

2.2.4. Frutos

Su fruto es una vaina o legumbre lineal-oblongo de 5 a 7 cm de largo y 0,6 a 1,5 cm de ancho, con endocarpio membranoso que rodea la semilla alada con un peso de 9,30 g y 107 fruto/kilo. Cada fruto tiene una semilla negra en la madurez, localizada en la porción distal del fruto, de forma elipsoide, de 12 a 14 mm de largo, de 7 a 9 mm de ancho, de 2 a 3 mm de espesor y con un peso de 0,70 g encontrándose 1429 semillas por kilogramo (Seleme *et al.*, 2015; Angulo, 2016).

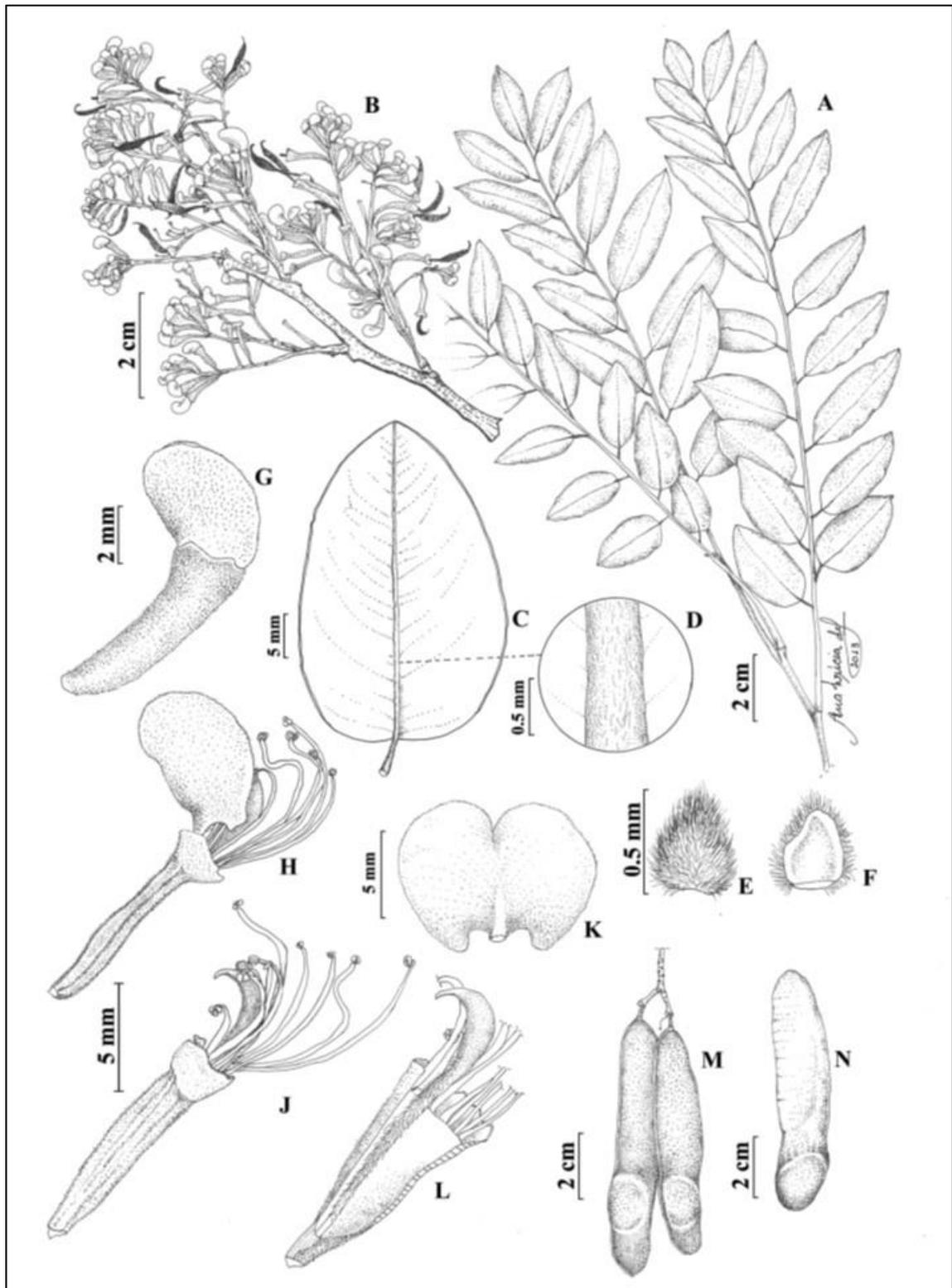


Figura 2: *Amburana acreana*. A. Rama con hojas; B. inflorescencia; C. Foliolo (cara adaxial); D. Detalle de la vena media en C; E – F. Bracteola (cara abaxial y adaxial, respectivamente); G. capullo de flor; H. Flor en vista lateral; J. Flor (sin el pétalo) en vista lateral mostrando los estambres y el carpelo; K. Estandarte (cara adaxial); L. Sección longitudinal de la flor que muestra la inserción de hypanthium y estambre; M. frutos; N. Semilla alada (A de L. F. G. da Silva *et al.* 59, B – L de S. Romaniuc Neto *et al.* 687, M – N de T. D. Pennington *et al.* 16994). Dibujado por Ana L. Souza.

Fuente: Seleme *et al.* 2015

2.3. Distribución geográfica del ishpingo

2.3.1. Distribución mundial

Amburana acreana se encuentra en las cercanías de las riberas de los ríos de la cuenca amazónica del norte de Brasil (estados de Acre y Rondonia), Bolivia y Perú, por lo general en bosque de tierra firme, pero puede también encontrarse en áreas periódicamente inundadas (Carvalho, 2007).

2.3.2. Distribución en el Perú

En el Perú, se le encuentra en estado natural en las regiones de Huánuco, Loreto, San Martín y Ucayali. En el departamento de Huánuco se ubica en la zona del río Pachitea, sobretodo en formaciones de bosque seco tropical, suelo franco y residual arcilloso-arenoso, profundo y bien drenado (Angulo, 2016). En la figura 3, se observa la distribución de la *Amburana acreana*, la cual es totalmente distinta a la *Amburana cearensis* (propia de Brasil).

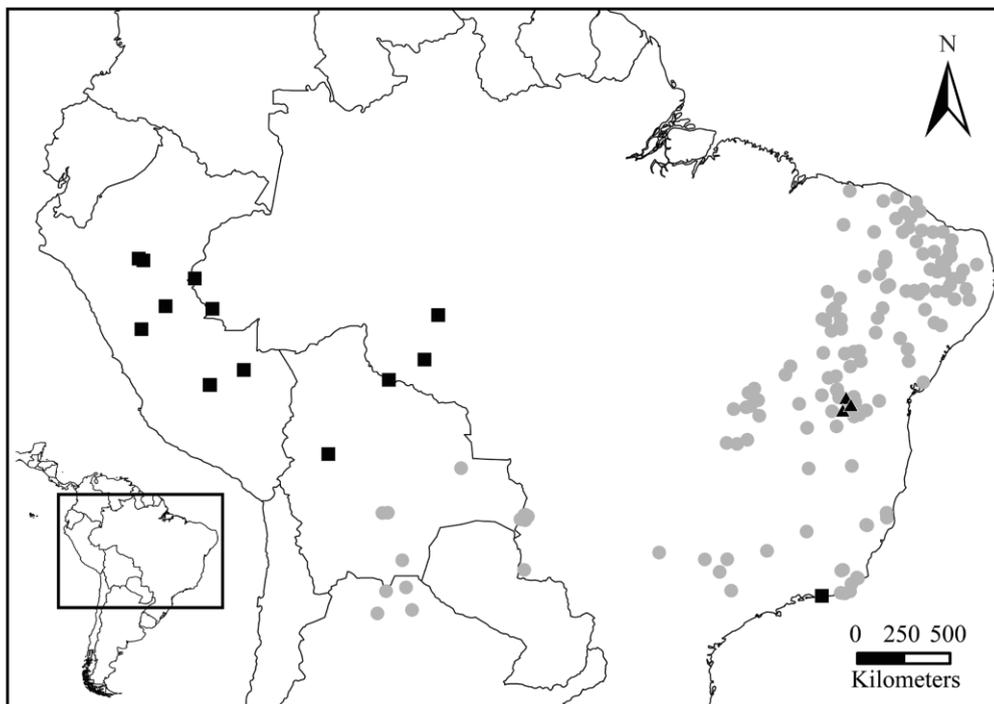


Figura 3: Distribución geográfica de *Amburana acreana* (■), *A. cearensis* (●) and *A. erythrosperma* (▲). Map created using Diva.

Fuente: Seleme *et al.* 2015

2.4. Fenología y propagación

Según Flores (1997) en su estudio de comportamiento fenológico de 88 especies forestales, señala que la floración del ishpingo ocurre en una etapa de transición entre la época lluviosa

y la época seca, durante los meses de marzo a mayo. Durante la floración y fructificación, los árboles quedan totalmente defoliados, sin embargo, se puede llegar a observar abundantes flores. Los frutos maduran en 3 a 4 meses y su diseminación ocurre entre julio y setiembre, alcanzando su máxima intensidad en agosto, en plena época seca por lo que la producción de semillas solo es una vez al año.

Su fruto contiene una semilla que tiene ala membranosa, la cual le permite transportarse por el viento. En lo que se refiere a su conservación se toma en cuenta que “las semillas se comportan como ortodoxas ya que toleran la desecación a contenidos de humedad del 6 % y mantienen su poder germinativo en 96 %, por lo que pueden ser almacenadas a -18°C durante 3 a 12 meses” (Galindez, Malagrina, Ledesma, Lindow-López y Ortega-Baes, 2015).

2.5. Hábitat

Es una especie de crecimiento inicialmente lento y, a medida que crece se vuelve moderado. Se le encuentra en la región Amazónica, mayormente debajo de los 700 m.s.n.m. El ishpingo crece asociado con algunas especies forestales como el huayruro, tornillo, cumala, shihuahuaco y pumaquiro (Brako y Zarucchi, 1993). Así mismo, se le encuentra en terrenos planos ondulados de colina baja y colina alta en áreas clasificadas ecológicamente como bosque húmedo tropical (bh-t) y bosque muy húmedo Pre-Montano (bmh-PM) que presentan lluvias amazónicas, suelos Chromic cambisol (BC) y pendientes de 5 y 50 % (Trucios y Quintana, 1987; Reynel *et al.*, 2003).

Por otro lado, Carvalho (2007) explica que también se encuentran en suelos argissoles, la cual según la clasificación de la FAO equivale al suelo acrisol y se caracteriza por ser ácido. Prefiere a luz indirecta para su desarrollo y es medianamente tolerante a las bajas temperaturas.

2.6. Características de la madera

Acevedo y Kikata (1994), mencionan que la madera seca al aire de esta especie es de color crema y el duramen generalmente amarillo oscuro a castaño. Grano entrecruzado y que presenta diferenciación por bandas oscuras regulares en sus anillos de crecimiento, textura media y brillo alto. Con veteado, arcos superpuestos. Madera de olor característico por la presencia de cumarinas que se asemeja al aroma de vainilla. La albura es susceptible al ataque de hongos e insectos. International Tropical Timber Organization (s.f.) agrega que la

madera es moderadamente resistente a la impregnación de tratamientos de preservado, con una densidad básica de 0,53 g/cm³, con una contracción volumétrica de 7,6 por ciento.

2.7. Usos e importancia

Es una madera de alta calidad y valor comercial muy durable, trabajable, apreciada en carpintería, ebanistería y fabricación de chapas decorativas (Reynel *et al.*, 2003). De acuerdo a las propiedades tecnológicas es muy usada en la construcción, fabricación de muebles, laminas decorativas, revestimientos para interiores y exteriores, esculturas y en otros usos que requiera dimensiones estables (Kukachka, 1961). Flores (2004) agrega que también se usa en la perfumería por la presencia de cumarinas y en la medicina popular para tratar problemas respiratorios. También se utilizan las semillas como aromatizantes y repelentes de insectos para ropa y estanterías.

2.8. Experiencias de propagación convencional de la especie

La germinación en condiciones convencionales, es decir en sustrato, presenta un mayor tiempo de germinación, Carvalho (2007) menciona que, la germinación de la *Amburana acreana* es hipogea y que después de la siembra, la plántula comienza a emerger entre los 15 y 33 días presentando un porcentaje de germinación entre los 76 y 81%.

Por otro lado, existen diversos estudios experimentales de crecimiento del ishpingo (*Amburana cearensis*) en diferentes países como Perú, Brasil y Paraguay. Angulo *et al.* (1995) en el estudio de “Experiencias silviculturales en la Estación Experimental Alexander von Humboldt, Amazonia Peruana” reportan que en el Perú se han realizado ensayos silviculturales en forma de plantaciones a campo abierto y en fajas de enriquecimiento realizados entre los años 1984 a 1988. Además, explican que el ishpingo presenta una mejor respuesta en fajas de crecimiento de 5 y 10 m de ancho. Flores (2010) realizó un análisis del crecimiento del ishpingo bajo estas dos modalidades obteniendo como resultado que es una especie de lento a mediano crecimiento.

2.9. Micropropagación o cultivo *in vitro*

2.9.1. Generalidades

Todas las células de las plantas son totipotentes, es decir, que son capaces de dar origen a una planta completa por lo que el cultivo *in vitro* se basa en este principio. En un medio de

cultivo adecuado puede inducirse la división y desdiferenciación de las células de un tejido (explantos) (Pierik, 1990; Krikorian, 1991).

El cultivo de tejidos consiste en cultivar en un medio aséptico diferentes partes de una planta madre, la micropropagación es la propagación clonal de plantas, es decir, es la multiplicación masiva bajo condiciones artificiales controladas *in vitro* a partir de una parte de la planta madre. Esto conlleva a la producción de poblaciones homogéneas de plántulas, las cuales podrían ser modificadas genéticamente según las características que se requieran. Esta forma de propagación presenta una mayor tasa de multiplicación comparada con las técnicas convencionales que, debido a múltiples factores no son lo suficientemente viables (Roca y Mroginski, 1991; Collin y Edwards, 1998).

2.9.2. Ventajas y desventajas de la micropropagación

Villalobos y Thorpe (1991) y Seemann (1993) mencionan que entre las ventajas están:

- Propagación vegetativa rápida, a gran escala y en tiempos económicamente rentables en variedades difíciles de multiplicar
- Uniformidad seleccionada del material clonado
- Control de condiciones ambientales por lo que se evita el riesgo de pérdidas por factores climáticos (presencia de heladas, sequías prolongadas, granizadas o temperaturas elevadas)
- Eliminación de labores de campo frente al proceso de propagación tradicional
- Mayor control sobre la sanidad del material propagado
- Introducción rápida de nuevos cultivares
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos.
- Conservación de germoplasma en laboratorios, lo que implica menos costos de mantenimiento comparado con las condiciones de campo
- Facilidades para el intercambio internacional del material *in vitro*
- La propagación puede realizarse todo el año

Por otro lado, Pérez *et al.* (1999), George *et al.* (2008) resumen las desventajas que presenta la micropropagación:

- Alto costo inicial para la instalación del laboratorio, así como para la adquisición de material de trabajo
- Capacitación y especialización técnica del personal
- La contaminación o infestación puede causar altas pérdidas en corto tiempo.
- Las plantas inicialmente obtenidas pueden presentar características no deseadas
- Se suelen necesitar largos periodos para el enraizamiento y aclimatación de las plantas.
- La aclimatación de las plántulas es considerada un proceso difícil y con mayores probabilidades de pérdidas.
- En caso de introducir nuevas especies, se necesitan largos periodos de investigación y desarrollo para establecer las condiciones de cultivo.
- Alta dependencia de energía eléctrica.

2.9.3. Tipos de micropropagación

Villarreal (2015) menciona que “los cambios en la morfología resultado de cambios estructurales y/u organización durante el desarrollo de un organismo son denominados morfogénesis”. En este sentido, la morfogénesis *in vitro* consiste en la obtención de órganos o embriones a partir de un explante basándose en la totipotencia de las células vegetales que inducen a su formación. Según Radice (2010) los procesos morfogénicos son:

- La organogénesis “es la formación de nuevos órganos (tallos, raíces o flores). Estos órganos son inducidos a partir de una célula o de un grupo de células que, según las condiciones de cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división” (p. 26).
- La embriogénesis somática “es la formación de embriones a partir de células somáticas, similar a un embrión cigótico sin que ocurra la fertilización de los gametos” (p. 26).

Ambos procesos se pueden producir directa o indirectamente a partir de células somáticas. El método directo consiste en la multiplicación de plantas mediante brotes axilares o adventicios o la formación de embriones somáticos directamente desde los tejidos del explante lo que asegura la estabilidad genética del material obtenido (George *et al.*, 2008). Por otro lado, el método indirecto consiste en la siembra de un explante en un medio de cultivo, seguido de la proliferación celular desordenada y la formación de un callo o del

cultivo en suspensión. A partir de ello, se inicia la formación de brotes adventicios o proembriones somáticos (George *et al.* 2008, Radice, 2010).

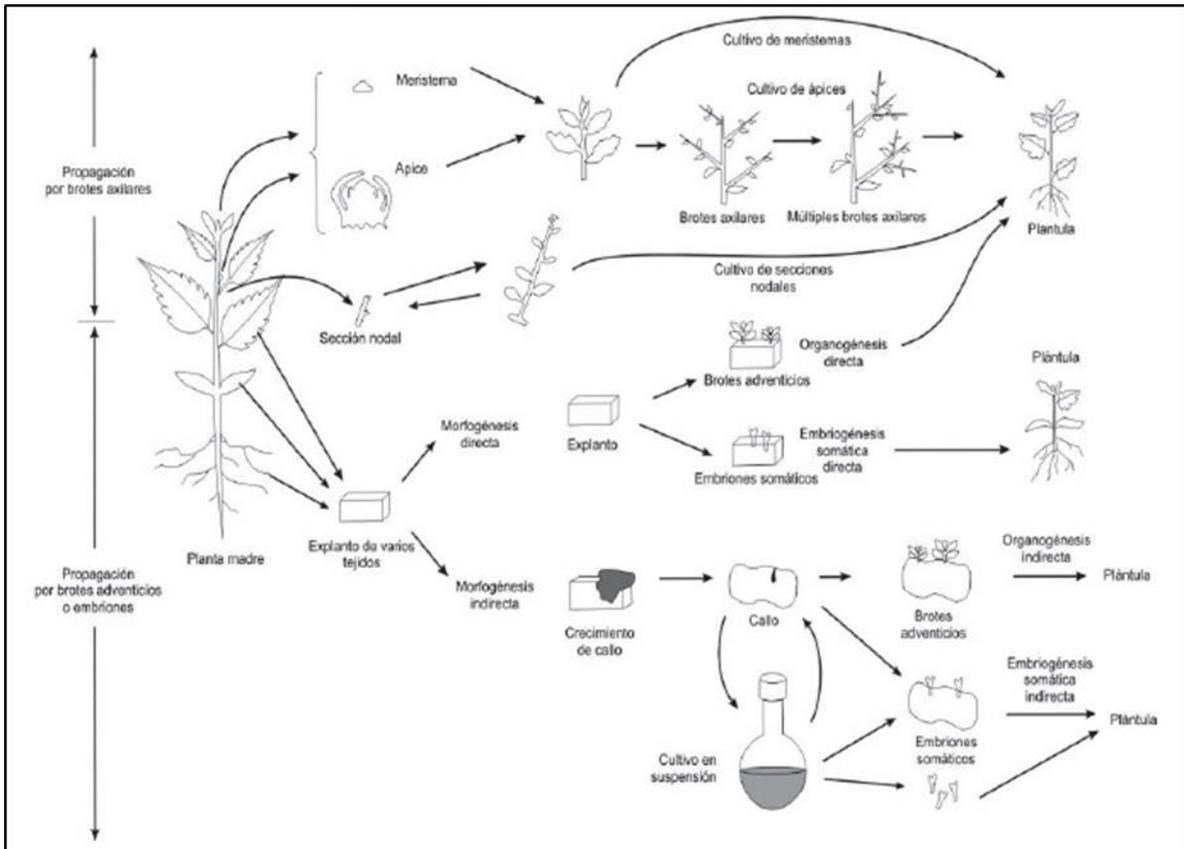


Figura 4: Vías de regeneración de plantas por cultivos de tejidos vegetales.

Fuente: George *et al.* 2008

2.10. Factores que influyen en la micropropagación

La micropropagación se puede ver afectada por múltiples factores, las cuales se resumen a continuación.

2.10.1. Planta donante

La planta donante o madre pueden ser obtenidos a partir de un banco de plántulas *ex vitro* o mediante la germinación *in vitro* de semillas seleccionadas, los cuales deben cumplir con los protocolos de asepsia (Marquínez, 1998).

2.10.2. El explante

Explante es el órgano, tejido o segmento que ha sido extraído de la planta madre y que contiene células vivas. Se debe considerar el tamaño, la fuente, la edad fisiológica y las condiciones de esterilidad del explante para su cultivo *in vitro* sobre todo en especies

maderables (Villalobos, 1980; George *et al.* 2008). El tamaño del explante es un aspecto que debe tomarse en cuenta ya que, si son muy pequeños, sean brotes, meristemas, fragmentos de tejidos de plantas o piezas de callos, no sobreviven adecuadamente en cultivos, y si los explantes son muy grandes puede ser más difícil de manipular (George *et al.* 2008).

2.10.3. Temperatura

La temperatura de incubación es uno de los factores más importantes y puede variar según los requerimientos de cada especie, sin embargo, en gran parte de las familias que se usan en la propagación *in vitro*, este factor varía entre 24 y 28 °C. Además, durante el período iluminado, la temperatura en el interior de los frascos de cultivo puede elevarse 1-2°C comparado al de la cámara, debido al efecto invernadero que se genera (Chee *et al.*, 1982 citado en Villalobos y Thorpe, 1991).

2.10.4. Luz

La importancia de la luz en la propagación y desarrollo de los cultivos *in vitro* involucra varios componentes como son la intensidad, el fotoperíodo y la calidad (Roca y Mroginski, 1991). El fotoperíodo normalmente utilizado es 16 horas de luz, pero puede presentar variaciones según el cultivo y el lugar donde se desarrolle la investigación.

2.10.5. Medio de cultivo

Los medios de cultivo son soluciones que contienen mezclas de nutrientes en diferentes concentraciones donde se desarrollarán los explantes vegetales. El desarrollo de los explantes dependerá de la composición del medio de cultivo, el cual es muy parecido a las condiciones nutricionales que ofrece el suelo a las plantas en su estado natural (Boeri, 2015).

Estos requerimientos nutritivos variarán con la especie, el explante que se este cultivando y la respuesta que se desee obtener. Es por ello que se han desarrollado múltiples formulaciones para los medios de cultivo. Así mismo, no existe hasta el presente un diseño racional que contenga la composición precisa de requerimientos nutricionales de la célula vegetal y el conjunto de condiciones que controlan su crecimiento y la diferenciación. Los componentes principales del medio de cultivo son: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agentes gelificantes y hormonas o reguladores de crecimiento (Krikorian, 1991; Perea y Tirado, 2011).

Los medios de cultivo más utilizados para la regeneración *in vitro* de plantas son el MS (Murashige y Skoog, 1962) el cual tiene resultados satisfactorios en especies leñosas, el LS (Linsmaier y Skoog, 1965) y el medio B5 (Gamborg, 1968). Para cultivo de especies leñosas se usa el WPM (Woody Plant Medium, 1980) y DKW (Driver y Kuniyuki, 1984) (Pérez *et al.*, 1999).

A. Macronutrientes y micronutrientes

Los macronutrientes son compuestos esenciales requeridos en g/litro para el desarrollo de la planta, entre ellos están: C, H, N, O, S, Mg, Ca, K, P. Los micronutrientes son requeridos por las plantas en pequeñas cantidades (mg/litro), entre ellos están: Fe, Mo, Ni, Cu, Zn, Mn, B. Son importantes para el funcionamiento de varias enzimas (Boeri, 2015).

B. Vitaminas y aminoácidos

Las vitaminas son sintetizadas por las plantas en forma natural ya que son importantes para su crecimiento y diferenciación, y cumplen un rol catalítico en el metabolismo celular. Sin embargo, en las plantas *in vitro* constituye un factor limitante del crecimiento por lo que según la especie son adicionadas en los medios de cultivo. Entre las vitaminas están: tiamina, HCl, ácido nicotínico, piridoxina, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, riboflavina (Boeri, 2015). Roca y Mroginski (1991) agregan que, generalmente solo es esencial agregar la tiamina ya que los medios de cultivo contienen las otras vitaminas. Además, se incorporan aminoácidos, siendo la glicina la más usada en los medios de cultivo.

C. Fuente de carbono

Los cultivos *in vitro* no pueden fabricar su propio azúcar, siendo necesario agregar al medio una fuente de carbono. El azúcar más utilizado es la sacarosa (2% a 5%) y puede ser reemplazado por glucosa y en menor medida por fructuosa (Roca y Mroginski, 1991).

D. Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento vegetal y hormonas son compuestos que influyen en los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, los cuales se incluyen en el medio de cultivo. Se dividen en cinco grupos principales dependiendo de su estructura química y su efecto fisiológico que son: auxinas, citocininas y giberelinas como inductoras de crecimiento; ácido abscísico y etileno como inhibidores del crecimiento. Se clasifican como hormonas a las que son naturales y reguladores de crecimiento a las que son sintéticas. El tipo y la dosis del regulador de crecimiento dependerán del propósito de la micropropagación (George *et al.*, 2008; Boeri, 2015).

- Auxinas

Roca y Mroginski (1991) y Jordán y Casaretto (2006) señalan que se encuentran en todos los tejidos de la planta principalmente en las regiones en crecimiento activo y que son sustancias químicas que en cultivos *in vitro* tienen la capacidad de producir un crecimiento y alargamiento celular, que promueven la división celular y el enraizamiento.

Las auxinas más utilizadas en cultivos vegetales son el ácido indol-3-acético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido indol-3-butírico (AIB) y el ácido p-clorofenoxiacético (pCPA) (Pérez *et al.*, 1999).

- Citocininas

Jordán y Casaretto (2006) explican que estos reguladores al tener una alta actividad en el ritmo de la mitosis celular, promueven la división celular, retarda el envejecimiento o senescencia de los órganos, generan una dominancia apical reducida o anulada promoviendo la brotación y crecimiento de yemas axilares. En altas dosis son inhibidoras de la rizogénesis. Las más utilizadas son: Bencilaminopurina (6-BAP), 2- isopentiladenina (2-ip), kinetina (KIN) y zeatina (ZEA).

- Giberelinas

Inhiben la formación de tallos y raíces adventicias e inducen la ruptura de dormancia de embriones aislados o semillas. El ácido giberélico (AG3) es la más utilizada en cultivos vegetales para estimular la elongación de los tallos o la conversión de brotes a tallos (Boeri, 2015).

Tabla 1: Concentraciones más usadas de auxinas y citoquininas

	Nombre	Abreviatura	Rango de concentración (mg/L)
Auxinas	Ácido indolacético	AIA	0.01-3
	Ácido naftalenacético	ANA	0.1-10
	Ácido indolbutírico	AIB	0.1-10
Citoquininas	Benzilaminopurina	BAP O BA	0.1-10
	Cinetina o kinetina	CIN O KIN	0.1-10
	Isopentil-adenina	2-IP	1.0-30

Fuente: Adaptado de Pérez *et al.* 1999.

2.10.6. Agentes gelificantes

Son incluidos en la preparación del medio de cultivo para evitar que el explante se sumerja, entre los más comunes están: el agar-agar en concentraciones de 6-8 g/L y Gelrite en concentraciones de 1,5-3 g/L (Seemann, 1993).

2.10.7. pH del medio de cultivo

El pH debe regularse a valores entre 5 - 6,5, ya que a valores menores o mayores pueden detener el crecimiento. Además, debe ser regulado antes de adicionarse el agente gelificante al medio (Seemann, 1993).

2.11. Micropropagación a partir de yemas apicales y axilares

Domínguez (1997) explica que la micropropagación *in vitro* puede ser a partir de cultivo de órganos (yemas axilares y apicales), cultivo de tejidos (hojas, peciolo, meristemos) y cultivo de células (células y protoplastos), utilizando reguladores de crecimiento. En todos los casos se obtendrán plantas enraizadas que serán aclimatadas para luego ser trasladadas a viveros convencionales, en donde lograrán el crecimiento necesario para su instalación final en el campo.

George *et al.* (2008) indican que las yemas apicales y axilares contienen al meristemo, varios primordios foliares y tejido vascular diferenciado, y están en continuo crecimiento por lo que le confiere mejores características para su multiplicación y mayor estabilidad genética. Olmos, Luciani y Galdeano (2010) agregan que “los materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, ya sean yemas axilares o adventicias” (p. 354).

2.12. Fases de la micropropagación

Para el desarrollo de la micropropagación *in vitro* existen cinco etapas básicas y todas son importantes para el éxito del sistema, las cuales son:

2.12.1. Fase 0: Acondicionamiento de plantas madre

Consiste en seleccionar y preparar a la planta madre a partir del cual se extraerán los individuos con características iguales y en grandes cantidades. Para la mayoría de las plantas propagadas *in vitro* a partir de semillas, el material inicial debe provenir de árboles élite y semilleros con características fenotípicas deseadas (Olmos *et al.*, 2010). Roca y Mroginski (1991), agregan que se puede realizar la germinación *in vitro* de las semillas seleccionadas

para utilizarlas posteriormente como la fuente de explantes para la micropropagación *in vitro* ya que la mayoría de las plantas leñosas requiere de la utilización de explantes provenientes de materiales juveniles.

2.12.2. Fase 1: Establecimiento de los cultivos

En esta etapa es importante introducir explantes, libres de microorganismos, en un medio de cultivo. Así mismo, el éxito está determinado por la calidad del material vegetal (semillas, hojas, tallos, polen) a utilizar. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización del material vegetal (Olmos *et al.*, 2010).

A. Desinfección de semillas

Existen distintos métodos de desinfección de semillas, las cuales dependerán de la especie, del tiempo de maduración luego que la semilla es colectada, de las condiciones climáticas a momento de la colección y de los métodos de secado y almacenamiento (George *et al.*, 2008).

De manera general la desinfección superficial de las semillas incluye lavar con detergente, agua corriente y antioxidantes. Así mismo, uno de los principales problemas que pueden presentar es la presencia de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus), por lo que pueden ser sumergidas en sustancias antibióticas y /o fungicidas (gentamicina, sulfato de estreptomycin, ampicilina, tetraciclina, carbenicilina, sulfato de gentamicina, pentacloronitrobenzeno, rifampicina, anfotericina B, benomil y carbendazim).

Luego se realiza la desinfección superficial propiamente dicha, mediante la inmersión de los explantes y/o semillas en etanol (70 por ciento v/v) durante 20 a 60 segundos seguido de hipoclorito de sodio 1 a 3 por ciento contenido, durante 3 a 30 minutos junto con la adición de agentes tensoactivos como el Tween-20 (0,01– 0.1 por ciento) o unas gotas de Triton. Finalmente, es necesario eliminar los restos de estos productos mediante varios lavados con agua destilada estéril, y en algunos casos con antioxidantes como ácido cítrico y ácido ascórbico (50 mg/L) (Roca y Mroginski, 1991; Olmos *et al.*, 2010; Pariani, 2015).

Baskin y Baskin (2014) explican que la familia de las fabáceas presenta comúnmente dormición física asociada a la estructura anatómica de la cubierta seminal (o del fruto). Finalmente, las semillas se colocan en un medio de cultivo suplementado con sacarosa para su germinación *in vitro*.

2.12.3. Fase 2: Multiplicación

En esta etapa se busca mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos (subcultivos) por medio de las diferentes vías de regeneración, organogénesis o embriogénesis. Así mismo, los subcultivos son sembrados individualmente en medios de cultivo en combinación con reguladores de crecimiento como auxinas y citoquininas. Los tipos y concentraciones de reguladores, así como sus combinaciones deben ser optimizados para cada especie, genotipo y etapa de multiplicación determinada (Olmos *et al.*, 2010).

2.12.4. Fase 3: Enraizamiento

En esta etapa se busca la formación de raíces, las cuales aumentarán su tamaño para hacer más probable su adaptación al ambiente externo. La formación de raíces o enraizamiento es muy variable puesto que, depende de la especie vegetal. La mayoría de especies leñosas, por su limitada capacidad rizogénica, requieren reguladores de crecimiento como auxinas. (George *et al.*, 2008; Olmos *et al.*, 2010).

2.12.5. Fase 4: Aclimatación

Etapa crítica en la que las plantas obtenidas *in vitro* son transferidas a las condiciones ambientales *ex vitro* (invernadero) y se produce la mayor pérdida de ellas. A las plantas micropropagadas se les retira totalmente el medio de cultivo de las raíces y se las colocan en el sustrato, los cuales pueden estar solos o en mezclas, que abarcan la vermiculita, perlita, arena o turba teniendo la precaución de realizar una esterilización previa. La aparición de hojas nuevas después de que la planta se transfirió al sustrato es un indicador de que la adaptación es exitosa (Pérez *et al.*, 1999; George *et al.*, 2008).

2.13. Micropropagación de especies forestales

Las especies forestales presentan problemas en su propagación debido a que dependen más de las características fisiológicas de las semillas que a su propia variabilidad genética, por lo que los métodos de propagación convencional (por semillas y estacas) pueden resultar limitados, especialmente, cuando se desea establecer plantas a gran escala en sistemas integrales de producción industrial (Barbón, 2011 citado en Jiménez-Terry y Agramonte, 2013).

La micropropagación *in vitro* de especies forestales es una forma de propagación, en la cual se obtienen resultados satisfactorios con altos índices de multiplicación, con características morfológicas y fisiológicas de buena calidad en las plantas y con una alta tasa de éxito en las plantaciones forestales en campo (Pérez *et al.*, 1999).

La micropropagación de especies de interés forestal inició hace varias décadas, sin embargo, los resultados presentan limitaciones a pesar del gran número de especies estudiadas en diferentes países (Rodríguez, 1993). Se han encontrado ejemplos exitosos en diferentes proyectos de investigación, producción y mejoramiento genético, por su alto interés en la producción de madera, muebles, postes, entre otros, especialmente, en especies de los géneros *Populus*, *Eucalyptus*, *Pinus* y *Cedrela*. Así mismo, en el sector forestal, la selección rápida de genotipos interesantes se realiza comúnmente mediante la multiplicación de material juvenil y manipulación de yemas y meristemos (Jiménez-Terry y Agramonte, 2013).

Olmos *et al.* (2010) mencionan que, la micropropagación de especies forestales puede presentar la ventaja de potenciar y desarrollar protocolos de multiplicación de árboles adultos que han demostrado ser fenotípicamente superiores. Diversos autores han realizado investigación de la etapa de multiplicación tanto en la *Amburana acreana* como en la *Amburana cearensis* obteniendo resultados favorables en medio MS y con la hormona BAP (Fermino *et al.*, 2007) y en medio de cultivo WPM con la misma hormona (Alecrim *et al.*, 2013). Sin embargo, Silva, Dias y Vieira (2015) no lograron ningún resultado aplicando la hormona 2ip en medio de cultivo MS.

III. METODOLOGÍA

3.1. Ubicación del ensayo experimental

La investigación fue realizada en el laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales de la Subdirección de Biotecnología del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), con las coordenadas geográficas latitud Sur 12°04'36", longitud Oeste 76°56'43" y a una altura de 241 msnm, en el distrito de La Molina, departamento Lima.

3.2. Material vegetal

Las semillas fueron obtenidas de árboles semilleros, provenientes del bosque concesionado para extracción de madera ubicado en el distrito de Puerto Inca entre los departamentos de Huánuco y Junín en el mes de agosto. Los árboles semilleros presentaron un DAP de 80 a 100 centímetros y una altura promedio de 28 metros. Asimismo, las semillas utilizadas para la presente investigación tenían características homogéneas de tamaño y sanidad, y presentaron las medidas que se muestran en la figura 5.

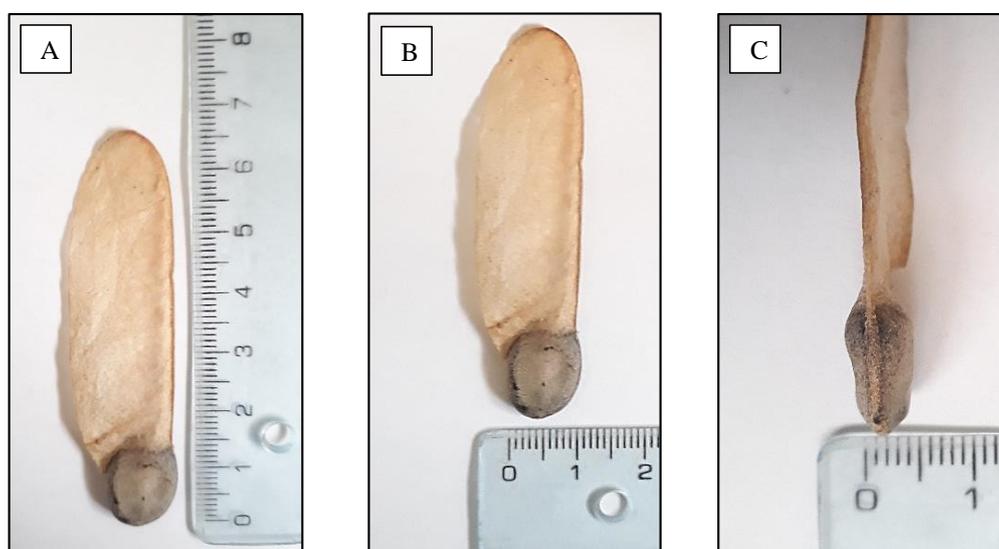


Figura 5: Medidas de la semilla de ishpingo. A. Largo B. Ancho C. Espesor

3.3. Fase 1: Establecimiento *in vitro* a partir de semillas

Después de un mes de su recolección, las semillas se limpiaron y lavaron con detergente comercial y agua potable. Luego, fueron sumergidas en una solución de benomyl (2g/L) con agua destilada durante 120 minutos. Posteriormente, se enjuagó 3 veces con agua destilada (Figura 6).

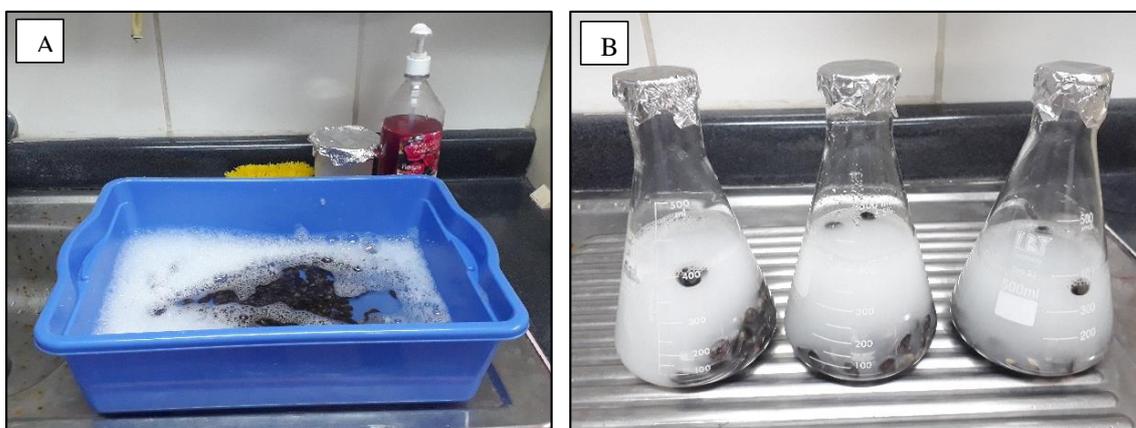


Figura 6: Desinfección superficial de semillas de ishpingo. A. Lavado con detergente y agua potable B. Inmersión de semillas en benomyl

3.3.1. Preparación del medio MS para la siembra de las semillas

Para el establecimiento de las semillas, previo a la desinfección, se preparó un medio de cultivo básico MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 30 g/L de sacarosa y enrazado con agua destilada en un vaso precipitado. Mientras estaba en agitación a baja velocidad, se reguló el pH con NaOH o HCl en $5,7 \pm 0,01$. Luego, se adicionó el agar 7,4 g/L como agente gelificante y diluyó calentándolo en el horno microondas. Finalmente, se dispensó 10 mL del medio de cultivo a los tubos de ensayo de 25 x 150 mm y sellaron con tapas de plástico. Luego se procedió a esterilizar el medio de cultivo en la autoclave a 121 °C y 1 atm de presión (Figura 7).

3.3.2. Determinación del protocolo de desinfección superficial de semillas

La desinfección superficial se realizó en condiciones asépticas de la cámara flujo laminar, para lo cual, se sumergieron las semillas en etanol al 70 por ciento durante un minuto. Después, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio más dos gotas de Tween 20, según los tratamientos definidos en la tabla 2. Finalizado el tiempo, se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril. Se evaluaron 4 tratamientos constituidos por 20 semillas por tratamiento, siendo un total de 80 semillas (Figura 8).



Figura 7: Preparación de medio de cultivo para siembra de semillas de ishpingo

Tabla 2: Tratamientos de desinfección superficial para semillas de ishpingo

Tratamiento	Concentración NaClO	Tiempo (minutos)
T1	2,5 %	25
T2	2,5 %	30
T3	3 %	25
T4	3 %	30



Figura 8: Desinfección superficial de semillas de ishpingo

3.3.3. Incubación de las semillas

Luego de sembradas las semillas en su respectivo tratamiento y rotuladas, se incubaron a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo de 16 horas luz, humedad relativa de 70 por ciento e intensidad luminosa de 5440 lux (Figura 9). Se evaluó durante un período de 25 días.

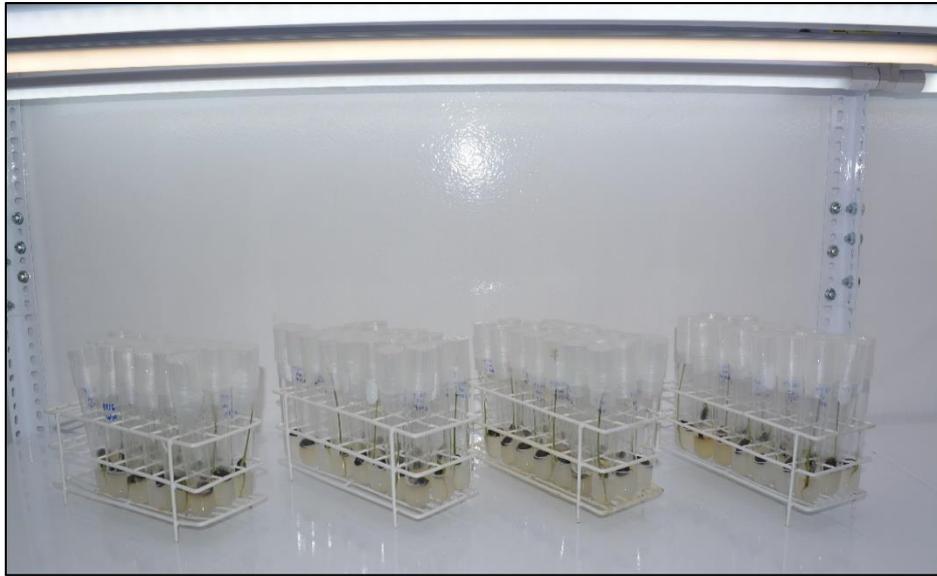


Figura 9: Incubación de semillas de ishpingo

3.3.4. Variables evaluadas

A. Porcentaje de germinación

El porcentaje de germinación se obtuvo como resultado del cociente del conteo total de semillas germinadas entre el total de semillas sembradas expresado en porcentaje, conforme a la siguiente fórmula

$$\text{PG (\%)} = (\text{sg/st}) \times 100$$

Donde:

Número total de semillas sembradas: st

Número de semillas germinadas: sg

B. Porcentaje de contaminación

El porcentaje de contaminación se obtuvo como resultado del cociente del conteo total de plántulas contaminadas con hongos y/o bacterias entre el total de semillas sembradas expresado en porcentaje, conforme a la siguiente fórmula:

$$\text{PC (\%)} = (\text{pc/st}) \times 100$$

Donde:

Número total de semillas sembradas: st

Número de plántulas contaminadas: pc

3.4. Fase 2: Multiplicación

Establecido el protocolo de desinfección, se realizó la germinación *in vitro* de 480 semillas de *Amburana acreana*, obteniéndose vitro plantas que se utilizarán durante la fase de multiplicación. El total de las semillas viables presentaron radícula en los primeros 15 días y las hojas primordiales a los 23 días.

3.4.1. Preparación del medio de cultivo para la siembra de yemas apicales

Se prepararon 2 medios de cultivo, MS (4,43g/L) y WPM (2,47g/L), ambos suplementados con 30 g/L de sacarosa y enrazados con agua destilada en vasos precipitados. En total se prepararon 16 tratamientos, 8 tratamientos por cada medio de cultivo. A cada tratamiento se le agregó citoquininas según las concentraciones indicadas en la tabla 3. Mientras estaba en agitación a baja velocidad, se reguló el pH a un valor de $5,7 \pm 0,01$ empleando NaOH o HCl. Luego, se adicionó el agar 7,4 g/L como agente gelificante y se diluyó calentándolo en el horno microondas. Finalmente, en tubos de ensayo de 25 x 150 mm se dispensaron 10 mL del medio de cultivo, se sellaron con tapas de plástico y se esterilizaron mediante el uso de la autoclave a una temperatura de 120 °C a 1 atm de presión durante 15 minutos (Figura 10).

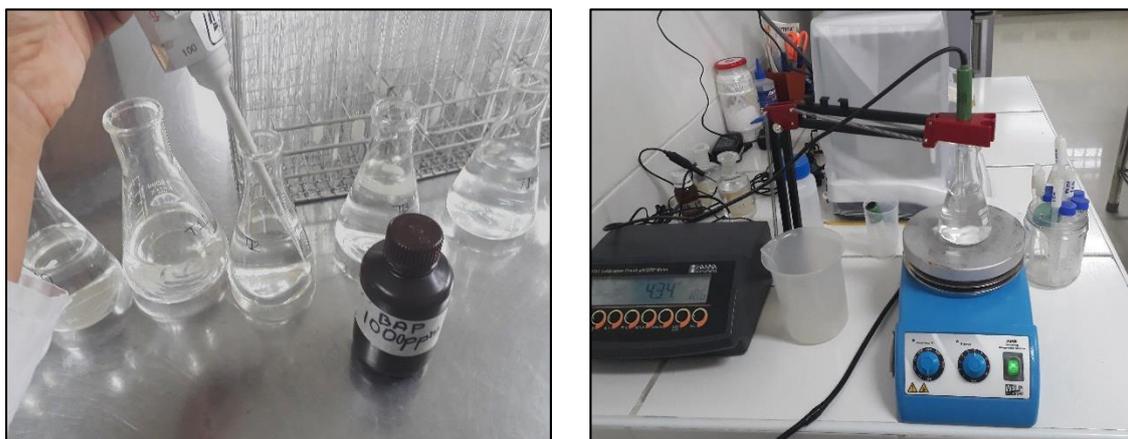


Figura 10: Preparación de medio de cultivo con citoquininas para siembra de yemas apicales de ishpingo

3.4.2. Siembra de yemas apicales

Una vez germinadas las semillas, en condiciones estériles de cámara de flujo laminar, las plántulas que se obtuvieron fueron extraídas de los tubos de ensayo y colocadas en placas Petri, en donde se seccionaron las yemas apicales con longitud entre 2-2,5 cm, con ayuda de los bisturís y las pinzas. Estos explantes, fueron cultivados en tubos de ensayos de 25 x 150 mm según cada tratamiento, rotulados, sellados e incubados a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo de 16 horas luz durante 10 semanas. Se aplicaron 8 tratamientos por cada medio de cultivo de base (MS y WPM) con 4 concentraciones de citoquininas en cada caso (tabla 3). En total se cultivaron 480 yemas apicales (Figura 11).

Tabla 3: Tratamientos ensayados para la inducción de brotes múltiples de ishpingo

Tratamiento	Medio de cultivo	Citoquininas	Concentración (mg/L)
T1	MS	BAP	0,5
T2	MS	BAP	1,0
T3	MS	BAP	1,5
T4	MS	BAP	2
T5	MS	ZEA	0,5
T6	MS	ZEA	1,0
T7	MS	ZEA	1,5
T8	MS	ZEA	2
T9	WPM	BAP	0,5
T10	WPM	BAP	1,0
T11	WPM	BAP	1,5
T12	WPM	BAP	2
T13	WPM	ZEA	0,5
T14	WPM	ZEA	1,0
T15	WPM	ZEA	1,5
T16	WPM	ZEA	2

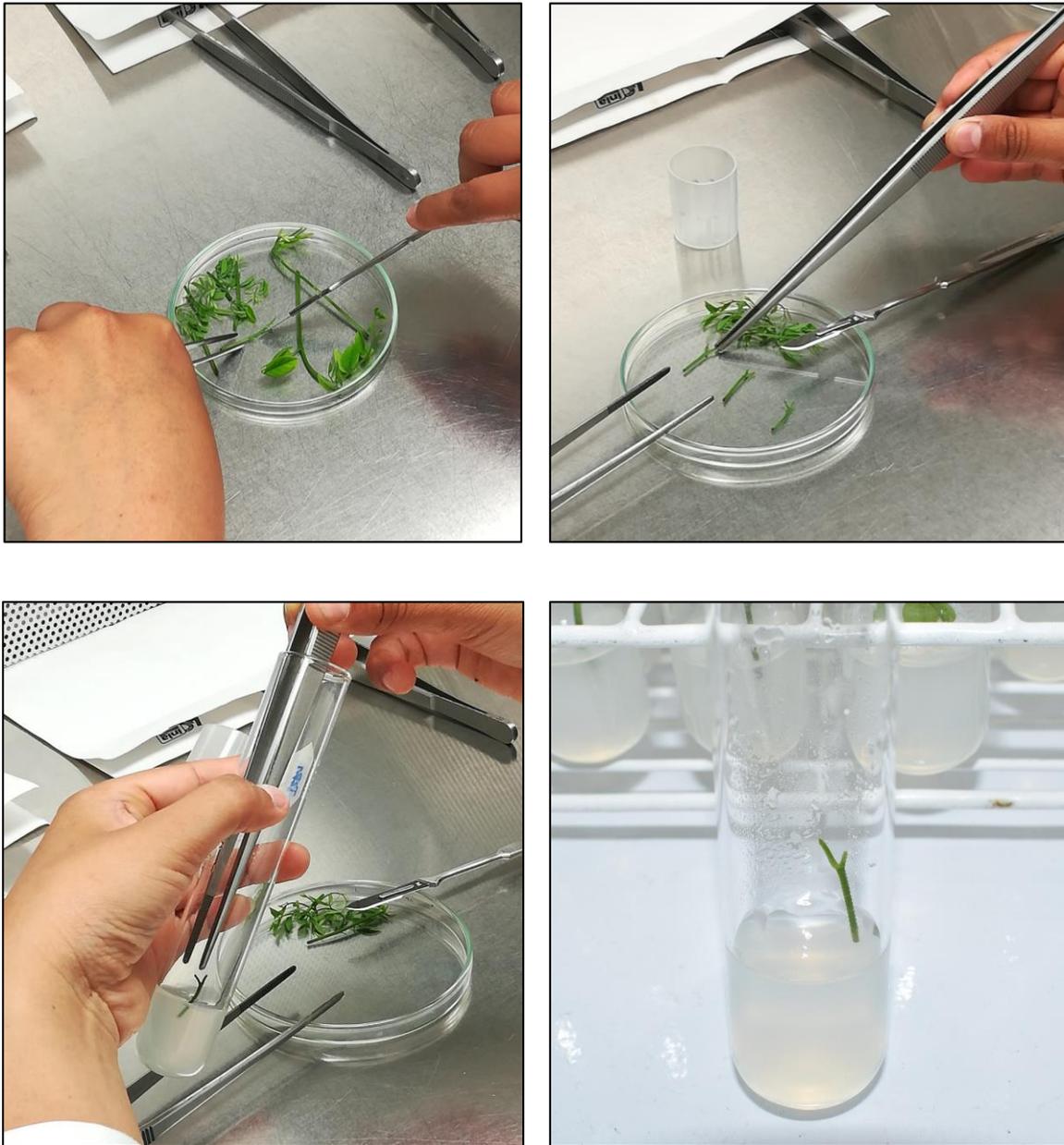


Figura 11: Disección de yemas apicales de ishpingo y siembra

3.4.3. Subcultivo de yemas apicales

Después de 8 semanas, se seccionaron las yemas apicales, axilares y adventicias obtenidas de las vitro plantas, las cuales tenían una longitud entre 1-1,5 cm. Estas yemas fueron subcultivadas en frascos de vidrio de 7x9 cm que contenían 30 mL de medio de cultivo manteniendo el tratamiento en el que se encontraba, así como el código asignado inicialmente. Finalmente, los frascos fueron sellados y colocados en la sala de incubación a una temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo de 16 horas luz. El periodo de incubación se

disminuyó a 6 semanas debido a que se observó que a mayor tiempo empezaba a presentarse la fenolización en los tejidos. Se realizaron 3 subcultivos continuos con el fin de determinar la tasa de multiplicación de la especie. Los 16 tratamientos están constituidos por 3 repeticiones y diez unidades por cada repetición (Figura 12).

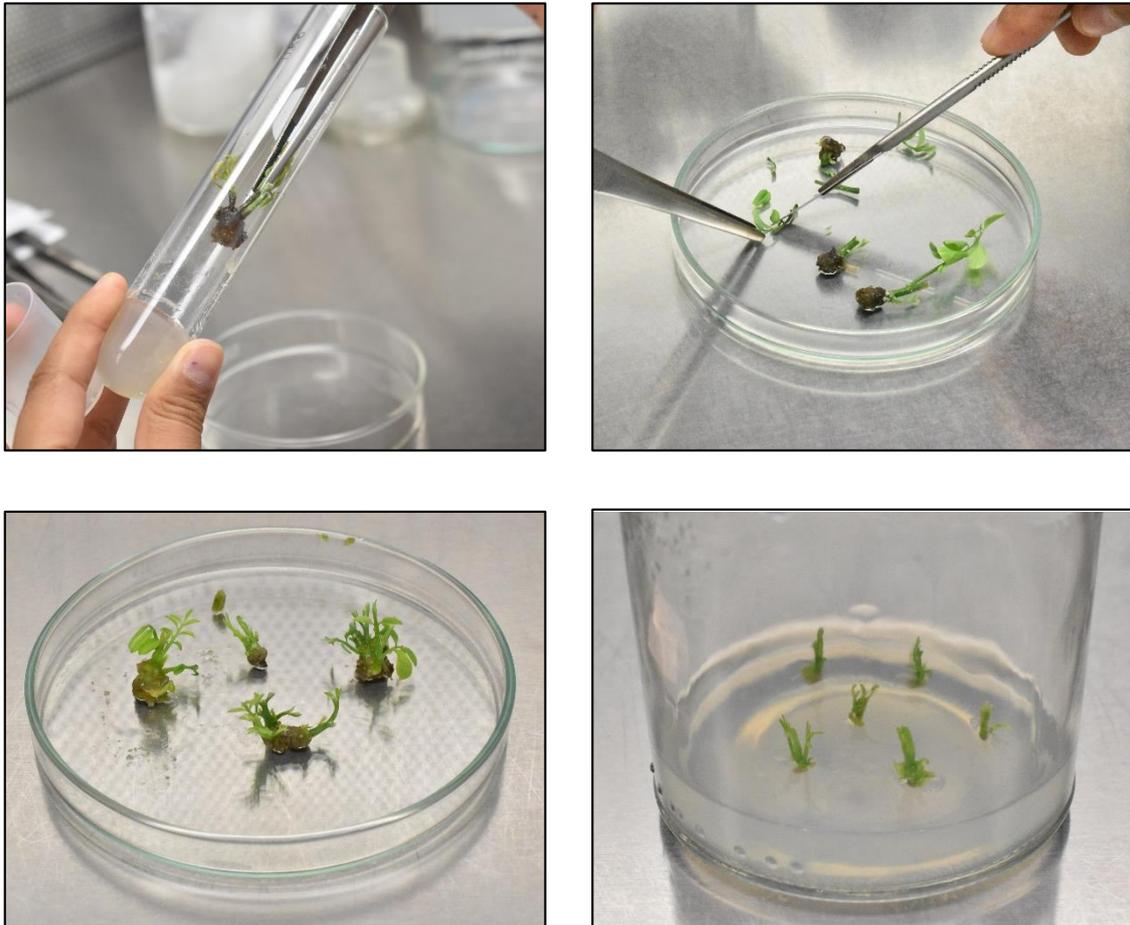


Figura 12: Subcultivo de yemas apicales de ishpingo

3.4.4. Variables evaluadas

A. Tasa de multiplicación por tratamiento (Tm)

La tasa de multiplicación se obtuvo a partir del promedio de tres subcultivos, el cual consistió del número final de microestacas desarrolladas por explante entre el número de microestacas sembradas inicialmente en un periodo de 6 semanas por subcultivo. Para ello, se contó el número de brotes obtenidos por microestaca, a fin de promediar los resultados obtenidos de las 3 repeticiones de cada tratamiento. Finalmente, los promedios por subcultivo se promediaron nuevamente para obtener la tasa de multiplicación para cada tratamiento.

B. Porcentaje de callosidad (C)

El porcentaje de callosidad se obtuvo a partir del total de explantes que formaron callo (masa de tejido no diferenciado que se desarrolla en la base del explante) según la escala de formación de callo (tabla 4) entre el total de explantes sembrados por tratamiento, el cual es expresado en porcentaje.

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

Donde:

Número de explantes totales: Et

Número de explantes con formación de callos: Ec

Tabla 4: Escala de formación de callo durante la multiplicación *in vitro* del ishpingo

Grado	Descripción
1	Sin formación de callo.
2	Escasa formación de callo, entre el 25-50% del explante.
3	Formación de callo considerable, entre el 51-75% del explante
4	Abundante formación de callo, mayor al 75%.

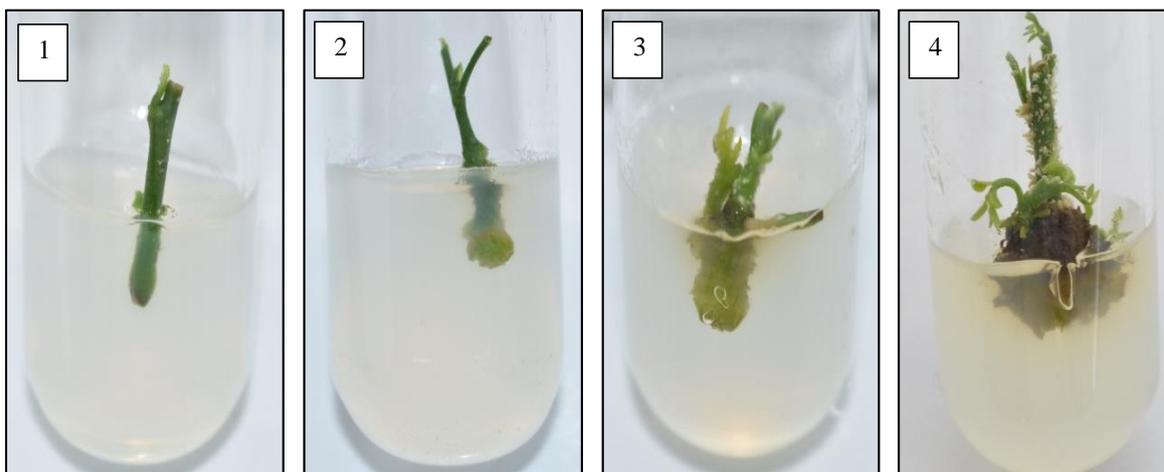


Figura 13: Clasificación de grado de formación de callo en la fase de multiplicación *in vitro* del ishpingo

C. Porcentaje de fenolización (F)

Se refiere al número de explantes con presencia de fenoles (oscurecimiento del medio de cultivo) según la escala elaborada (tabla 5) entre el total de explantes sembrados expresado en porcentaje.

$$F (\%) = (Ef/Et) \times 100$$

Donde:

Número de explantes totales: Et

Número de explantes con presencia de fenoles: Ef

Tabla 5: Clasificación de grado de fenolización en la fase de multiplicación *in vitro* del ishpingo

Grado	Descripción
1	Sin presencia de fenoles.
2	Escasa fenolización, entre el 25-50% del explante.
3	Fenolización considerable, entre el 51-75% del explante
4	Abundante fenolización, mayor al 75%.

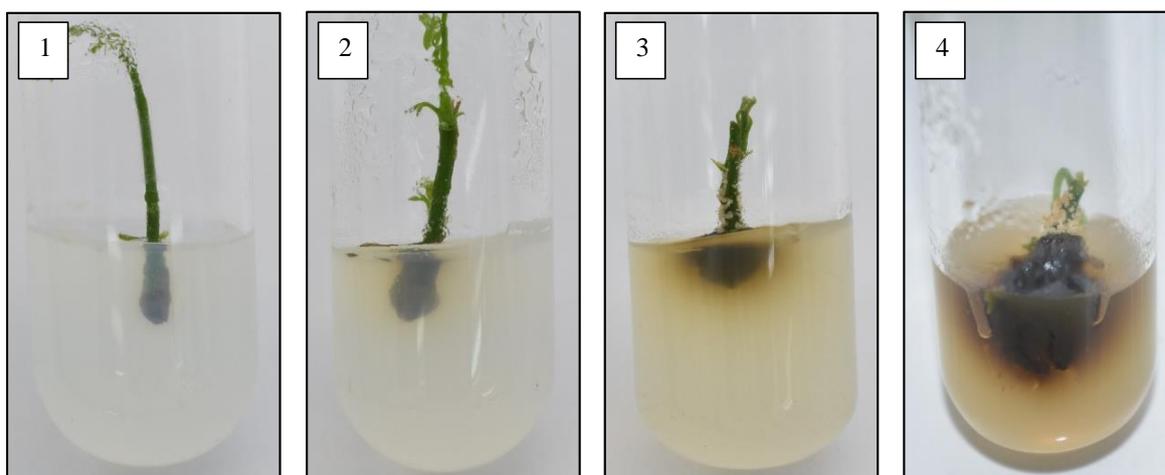


Figura 14: Clasificación de grado de fenolización en la fase de multiplicación *in vitro* del ishpingo

D. Porcentaje de necrosis (N)

Se refiere al número de explantes necrosados (con presencia de tejido muerto) según la escala (tabla 6) entre el total de explantes sembrados expresado en porcentaje.

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

Donde:

Número de explantes totales: Et

Número de explantes con presencia de necrosis: En

Tabla 6: Clasificación de grado de necrosis en la fase de multiplicación *in vitro* del ishpingo

Grado	Descripción
1	Sin formación de tejido muerto.
2	Escaso tejido necrosado, entre el 25-50% del explante.
3	Considerable tejido necrosado, entre el 51-75% del explante
4	Abundante tejido necrosado, mayor al 75%.

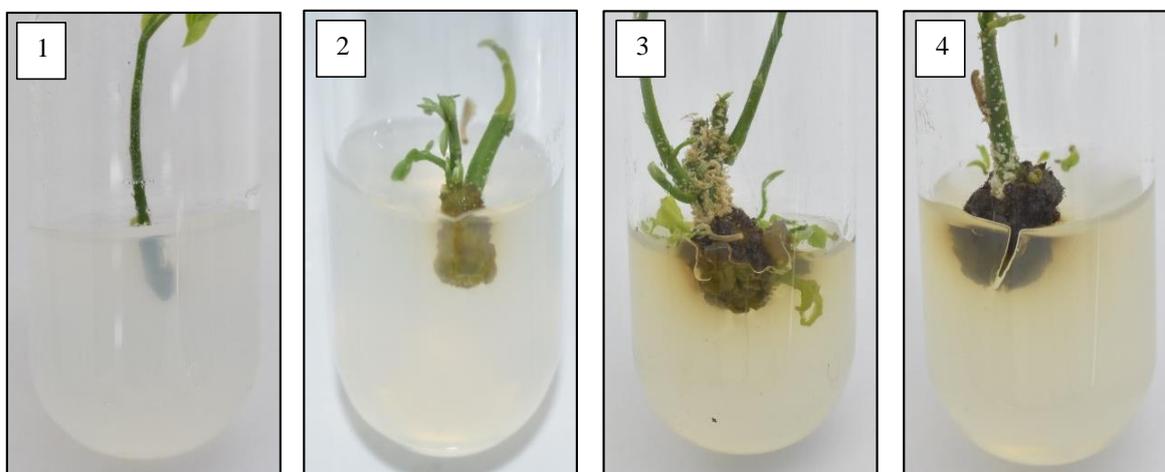


Figura 15: Clasificación de grado de necrosis en la fase de multiplicación *in vitro* del ishpingo

3.5. Fase 3: Enraizamiento

3.5.1. Preparación del medio de cultivo para el enraizamiento

Se preparó medio de cultivo MS (4,43g/L) suplementado con 30 g/L de sacarosa y enraizados con agua destilada en vasos precipitados. Se prepararon en total, 6 tratamientos y un testigo (libre de auxinas). A cada tratamiento se le agregó auxinas según las concentraciones indicadas en la tabla 7. Mientras estaba en agitación a baja velocidad, se reguló el pH a un valor de $5,7 \pm 0,01$ usando NaOH o HCl. Luego, se adicionó el agar 7,4 g/L como agente gelificante y diluyó calentándolo en el horno microondas. Finalmente, se dispensó 10 mL del medio de cultivo en tubos de ensayo de 25 x 150 mm, sellaron con tapas de plástico y esterilizaron en la autoclave a de 121 °C y 1 atm de presión durante 15 minutos.

3.5.2. Introducción de microestacas en medio de cultivo de enraizamiento

En condiciones asépticas de la cámara flujo laminar, se introdujeron los brotes obtenidos en la fase de multiplicación en el medio de cultivo de enraizamiento MS con diferentes concentraciones de auxinas (IBA, ANA y AIA) según la tabla 7. Los brotes tenían un tamaño

mínimo de 1,5 cm de longitud y se les cortó el callo, en caso los hubiese, asimismo, se mantuvo el código asignado a cada individuo. Finalmente, los tubos fueron sellados y colocados en la sala de incubación a una temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo de 16 horas luz durante un periodo de incubación de 10 semanas. Cada tratamiento, estuvo compuesta de treinta microestacas (Figura 16).

Tabla 7: Tratamientos de inducción de enraizamiento *in vitro* en ishpingo

Tratamiento	Auxinas	Concentración
TESTIGO	-	0,0
T1	AIA	1,0
T2	AIA	1,5
T3	ANA	1,0
T4	ANA	1,5
T5	AIB	1,0
T6	AIB	1,5



Figura 16. Microestaca de ishpingo en medio de cultivo para el enraizamiento *in vitro*

Debido a que no se obtuvieron los resultados esperados se realizó un segundo ensayo para el enraizamiento usando la auxina IBA en tres concentraciones (tabla 8) por un periodo de 6 semanas. Cada tratamiento, estuvo compuesta por 15 microestacas.

Tabla 8: Tratamientos con la auxina IBA para el enraizamiento de microestacas de ishpingo

Tratamiento	Concentración
T1	3,0 mg/L
T2	4,0 mg/L
T3	5,0 mg/L

3.5.3. Variables evaluadas

A. Porcentaje de sobrevivencia

Se evaluó el porcentaje de microestacas sobrevivientes en cada tratamiento.

B. Formación de raíces

Se evaluó el porcentaje de raíces formadas para cada tratamiento.

3.6. Diseño experimental

3.6.1. Preparación y desinfección de semillas de ishpingo

Para la investigación se realizó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2x2 (interacción entre las concentraciones de hipoclorito de sodio y los tiempos de inmersión). Se realizaron 4 tratamientos constituidos por 20 unidades experimentales.

La unidad experimental fue un tubo de ensayo de 25 x 150 mm que contenía 10 mL de medio de cultivo y en donde se sembró una semilla. Las unidades experimentales con sus respectivos tratamientos fueron distribuidas al azar. Las variables evaluadas fueron el porcentaje de germinación y contaminación.

El modelo matemático utilizado fue:

$$Y_{ij} = \mu + C_i + T_j + (CT)_{ij} + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = variable aleatoria

μ = media general

C_i = efecto del i-ésimo concentración de hipoclorito de sodio

T_j = efecto del j-ésimo tiempo de inmersión

ϵ_{ij} = error experimental

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para definir si existía alguna diferencia significativa en las variables respuestas de los tratamientos aplicados. Al encontrar diferencias significativas, se realizó el test de comparaciones múltiples de medias de LSD Fisher a un nivel de significancia de 0.05 (5%) con el fin de comparar las medias de cada uno de los tratamientos ensayados. Para el análisis estadístico se utilizó el software Infostat.

3.6.2. Multiplicación a partir de yemas apicales

Para la investigación se realizó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2x2x4 (interacción entre los medios de cultivo, tipo de citoquininas y las concentraciones de las citoquininas). Se realizaron 16 tratamientos con tres repeticiones de 10 unidades experimentales cada una.

La unidad experimental fue un tubo de ensayo de 25 x 150 mm que contenía 10 mL de medio de cultivo, donde se sembró la yema apical. Para las siguientes multiplicaciones, se utilizaron frascos de 7 x 9 cm. Las variables evaluadas fueron la tasa de multiplicación, porcentaje de callosidad, porcentaje de fenolización y porcentaje de necrosis.

El modelo matemático utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + M_i + T_j + C_k + (MT)_{ij} + (TC)_{jk} + (MC)_{ik} + (MTC)_{ijk} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = variable aleatoria

μ = media general

M_i = efecto del i-ésimo medio de cultivo

T_j = efecto del j-ésimo tipo de citoquinina

C_k = efecto del k-ésimo concentración de citoquinina

ϵ_{ijk} = error experimental

Al realizar el análisis estadístico mediante el test de Shapiro-Wilks, se comprobó que los datos no seguían una distribución normal; por lo que se aplicó la prueba estadística no paramétrica Kruskal Wallis para definir si existía alguna diferencia significativa en las variables respuesta de los tratamientos aplicados. Para el análisis estadístico se utilizó el software Infostat.

3.6.3. Enraizamiento

Para la investigación se realizó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 3x2 (tipo de auxina y las concentraciones de las auxinas). Se realizaron 6 tratamientos y un testigo libre de auxinas constituidos por 30 unidades experimentales. La unidad experimental fue un tubo de ensayo de 25 x 150 mm que contenía 10 mL de medio de cultivo y en donde se sembró la yema para su enraizamiento. Cómo no se obtuvieron los resultados esperados, se realizó un segundo ensayo con la auxina IBA en diferentes concentraciones, sin embargo,

tampoco tuvieron resultados. Para el análisis, solo se evaluó el porcentaje de sobrevivencia mediante un análisis de varianza (ANOVA).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Fase 1: Preparación de vitro plantas a partir de semillas

En el desarrollo de desinfección superficial de semillas, el análisis de varianza reveló que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los 4 tratamientos que evalúan la acción del hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones y tiempos de exposición, así como la interacción de las variables evaluadas (Anexo 1). La mayoría de semillas lograron germinar después de 7 días desde su instalación, sin embargo, la totalidad de semillas germinaron después de 25 días.

En la comparación de las medias del porcentaje de germinación de las semillas, mediante el test de LSD Fisher, indican que los tratamientos 1 y 2 fueron los más altos, seguido de los tratamientos 3 y 4, este último fue el más bajo (figura 17). Por otro lado, las medias para el porcentaje de contaminación indican que el tratamiento 3 fue el que obtuvo menos plántulas contaminadas seguido de los tratamientos 2 y 4 en comparación con el tratamiento 1 que tuvo una alta tasa de contaminación (figura 18).

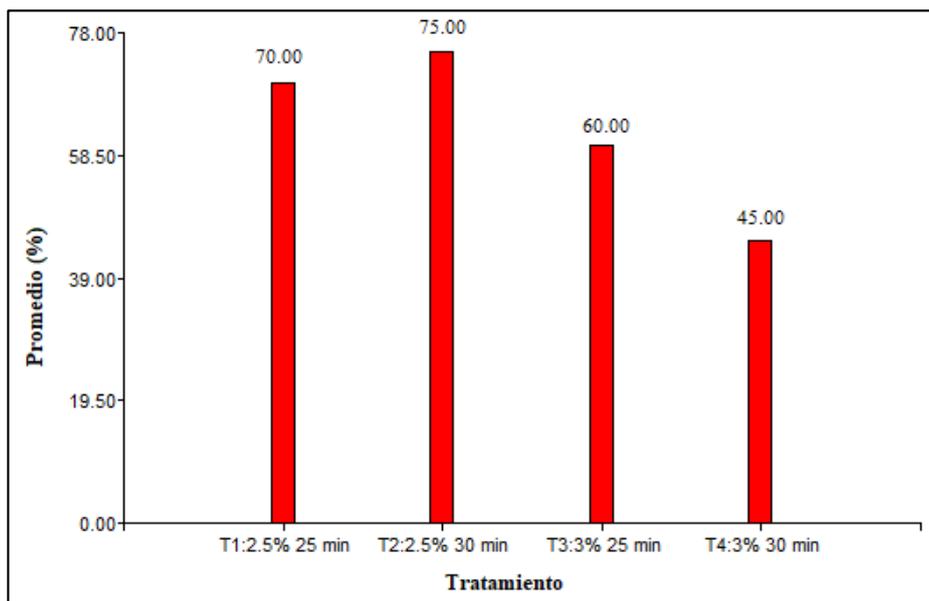


Figura 17: Porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de ishingito

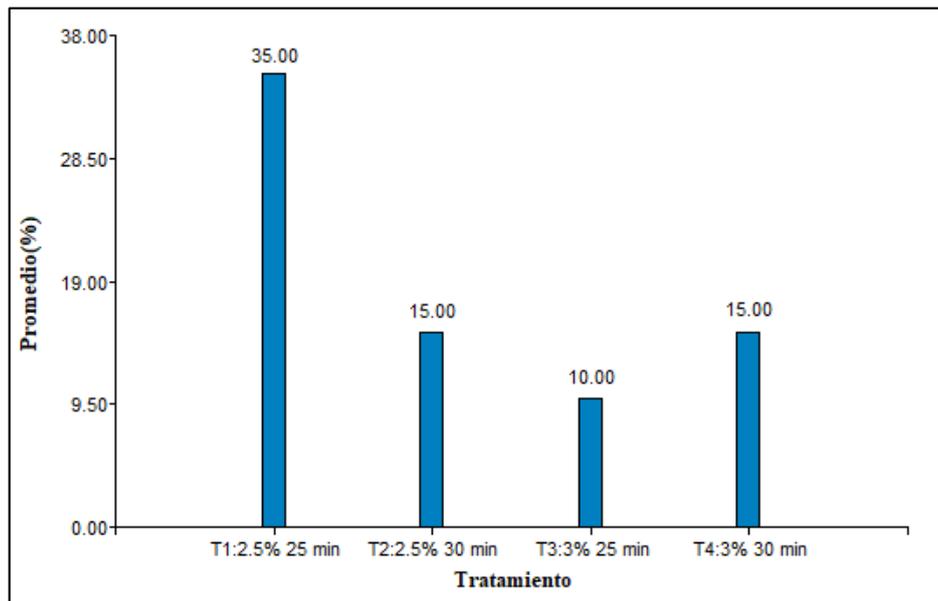


Figura 18: Porcentaje de contaminación *in vitro* de semillas de ishpingo

Para la selección del protocolo de desinfección, se realizó un contraste de los resultados de ambas variables, lo que indicaría que el tratamiento 2 (T2: 2,5 % de NaOCl y 30 minutos) permitió obtener el mayor porcentaje de semillas germinadas y una baja tasa de contaminación. A pesar que, el tratamiento 3 es el que presenta la más baja tasa de plántulas libres de microorganismos patógenos, el porcentaje de germinación es menor a la del tratamiento 2. En la figura 19, se observan las variables evaluadas.

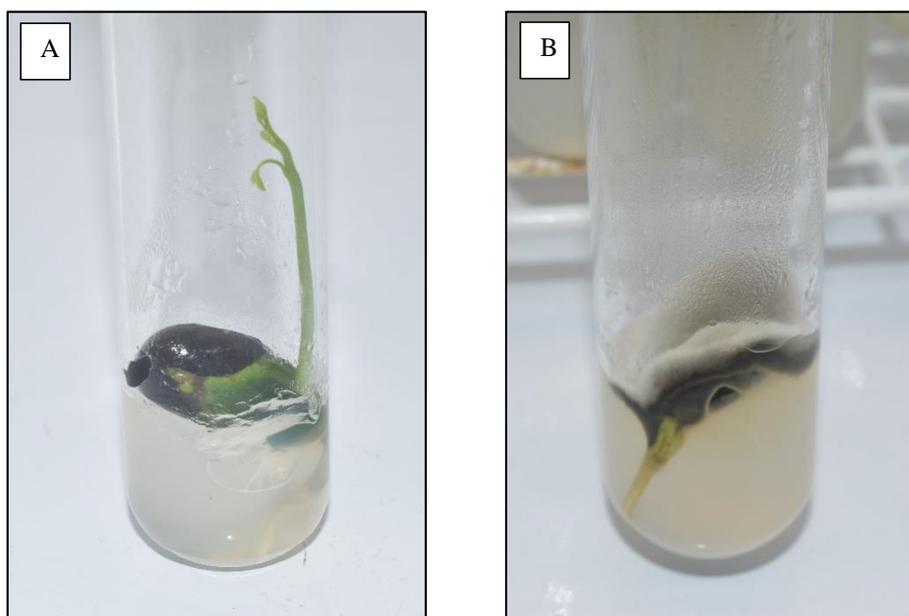


Figura 19: A. Plántula de ishpingo libre de contaminantes B. Semilla de ishpingo contaminada

Fermino, Scherwinski, Nagao y Da Silva (2007), registraron tratamientos de desinfección con la misma especie en Brasil, obteniendo una tasa de contaminación nula, y una tasa de germinación del 78% con 2,5 % de NaOCl y 30 minutos de inmersión de las semillas. Por otro lado, Alecrim *et al.* (2013), muestran resultados similares aplicando 2,5 % de NaOCl y 15 minutos de inmersión de semillas con la diferencia que utilizó la especie *Amburana cearensis* propia de Brasil. En ambos casos, la inoculación de las semillas fue en medio MS, las cuales germinaron en 30 días a diferencia de la presente investigación que fue en 25 días con una tasa de germinación de 75%.

Fermino y Scherwinski (2012), reportan en otra investigación que las semillas de *Amburana acreana* logran una tasa de desinfección efectiva con 2,5 % de NaOCl con 20 minutos de inmersión. Además, logran una tasa de germinación de 86,7 % inoculando las semillas en un medio cultivo MS reducido a la mitad comparado con el medio de cultivo al 100% que obtuvo una tasa de germinación del 23,3 %. Para este ensayo, la concentración de hipoclorito de sodio al 2,5% resultó efectiva con el medio de cultivo MS al 100% puesto que, se obtuvo un porcentaje de germinación alto y las plántulas tuvieron un desarrollo inicial completamente normal.

Rozo (2014), agrega que aplicando un pre-tratamiento de escarificación en la *Acacia mangium Willd* es posible contrarrestar la contaminación. Así mismo, menciona que es posible disminuir las concentraciones medias del hipoclorito y aumentar el tiempo de exposición de las semillas para obtener una mayor tasa de supervivencia y por ende, una mayor germinación de las semillas.

Galíndez *et al.* (2015) realizó pre-tratamientos mecánicos y químicos a las semillas de *Amburana cearensis* en agar con un fotoperíodo 12 horas luz, obteniendo las mayores tasas de germinación con el tratamiento mecánico, siendo entre 98 a 100% y menores tiempos de germinación estando entre 12 a 16 días. Sin embargo, aquellas semillas sin pre-tratamientos mostraron una baja tasa de germinación, siendo 38%.

No obstante, las semillas de *Amburana acreana* no presentaron una dormancia física significativa durante su siembra *in vitro*, por lo que no fue necesario aplicar ningún pre-tratamiento previo. Baskin *et al.* (2005) citado por Galíndez *et al.* (2015) señalan que, las diferencias de respuesta de dormición de semillas pueden estar sujetas a las condiciones

ambientales que estuvieron sometidas durante su desarrollo y maduración. Dichas diferencias se ven reflejadas en los altos valores de germinación de la *Amburana acreana*.

Así mismo, existen otros métodos para mejorar la capacidad de respuesta de los explantes en un medio de cultivo, Remache (2011) menciona que a partir de los embriones cigóticos, cotiledones o hipocótilos se pueden obtener mejores resultados para iniciar la clonación forestal.

La baja tasa de contaminación que presentaron los tratamientos ensayados puede deberse a diferentes factores como patógenos propios de las semillas, la manipulación del investigador o contaminantes suspendidos en el ambiente. Ross, Arriaga y Pechi (2017), mencionan que la mayoría de especies leñosas presentan agentes patógenos tanto externos como internos y que los tratamientos de desinfección empleados no los remueven en su totalidad, proliferando durante su cultivo.

4.2. Fase 2: Multiplicación

Para la determinación de la tasa de multiplicación, primero se comprobó los supuestos de normalidad (Anexo 2) y al no cumplir se realizó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal Wallis. Esta prueba determinó que existen diferencias significativas en el número de brotes promedio para los 16 tratamientos ensayados por lo que se realizó el contraste por pares para determinar que tratamiento resultaba más efectivo (Anexo 3).

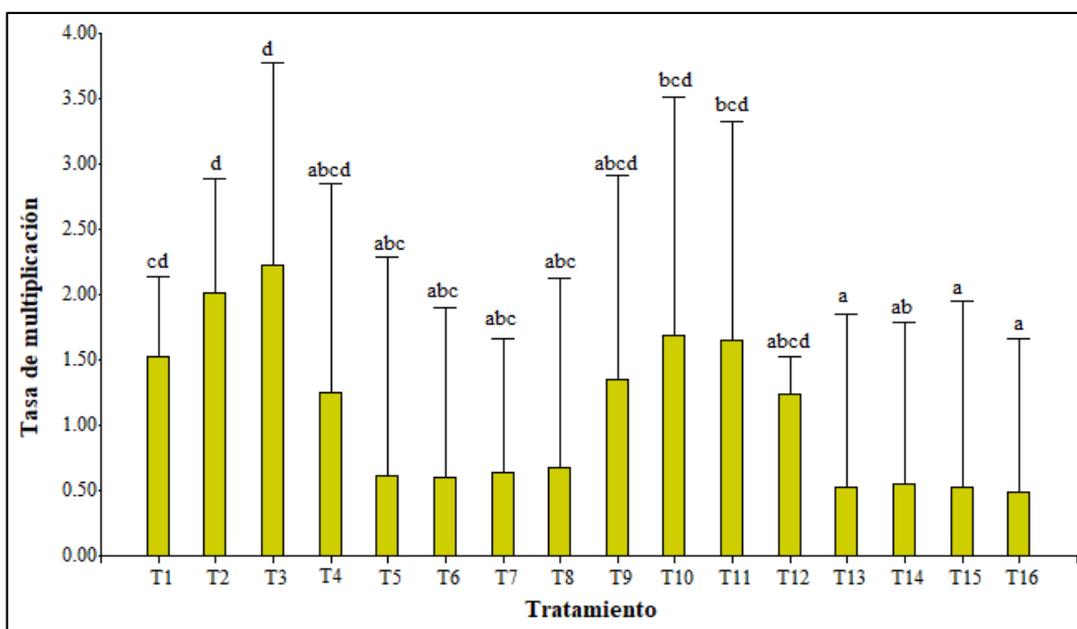


Figura 20: Promedio de brotes de tres subcultivos continuos por tratamiento durante la fase de multiplicación

La prueba reveló que no existe diferencia estadística entre el T3 (MS + 1,5 mg/L BAP) y el T2 (MS + 1 mg/L BAP), sin embargo, el T3 tuvo un promedio de 2,22 brotes a diferencia del T2 que tuvo 2,01 brotes y los otros tratamientos tuvieron promedios inferiores según la figura 20. Por otro lado, se observan las barras de error de intervalo de confianza al 95% y al comparar los T2 y T3, este último tratamiento muestra una mayor dispersión de los datos respecto a la media por lo que, la confiabilidad también disminuye. En el anexo 4 se muestra los promedios de brotes por tratamiento.

Durante el ensayo de multiplicación se observó que los tratamientos que presentan las mayores tasas de multiplicación son aquellos que contienen el medio de cultivo MS en comparación con los que contienen medio de cultivo WPM (figura 21). Quintero y Jaramillo (2012) explican que la diferencia se debe a que el medio de cultivo MS contiene una mayor concentración de sales en contraste con el medio de cultivo WPM que no contiene la suficiente concentración de nitrógeno para favorecer el crecimiento y desarrollo de las plántulas *in vitro*, por ello en su investigación con la especie forestal *Juglans neotropica* también se obtuvo mejores respuestas con el medio de cultivo MS.

Sin embargo, Alecrim *et al.* (2013) logró una alta tasa de brotes de multiplicación en medio de cultivo WPM suplementado con 1 mg/L BAP de *Amburana cearensis* siendo el máximo valor de 2,36 brotes comparado con lo obtenido en el T10, el cual fue 1,69. Cabe enfatizar que, las investigaciones en multiplicación *in vitro* de especies forestales tienen como medio de cultivo más usado el MS para la obtención de altas tasas de brotes.

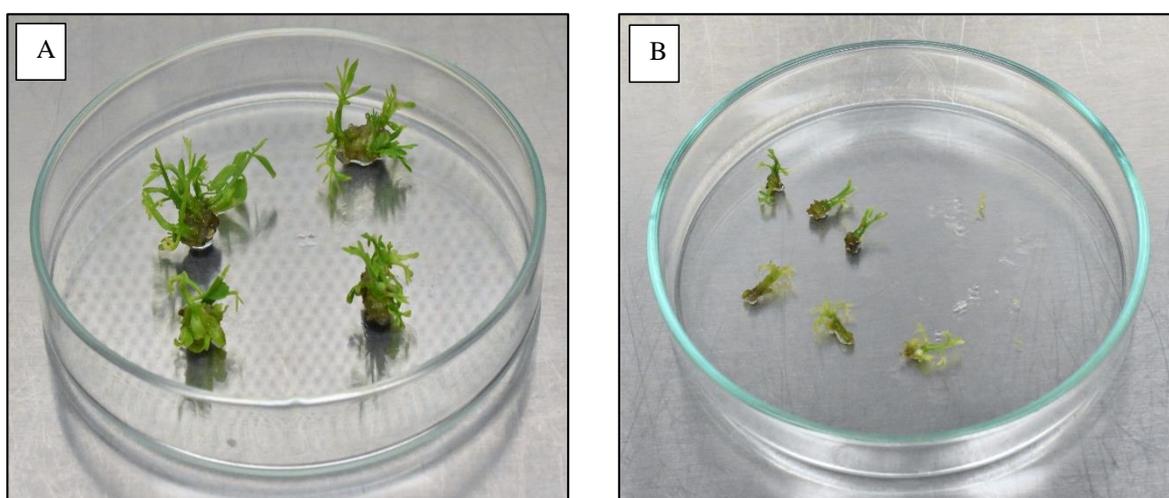


Figura 21: A. Subcultivos de ishpingo en medio de cultivo MS + 1 mg/L BAP B. Subcultivos de ishpingo en medio de cultivo WPM + 1 mg/L BAP

Fermino *et al.* (2007), evaluaron la tasa de multiplicación de yemas axilares de *Amburana acreana* en medio de cultivo MS con diferentes concentraciones de BAP que estaban entre 2 a 4 mg/L obteniendo una mejor respuesta con la concentración de 2 mg/L. Asimismo, detallan que a medida que se aumenta la concentración de la hormona BAP, aumenta el porcentaje de callosidad, lo cual se evidencia en los resultados obtenidos de esta variable en la investigación siendo 66, 67% para el T2 y 76, 67% para el T3 (figura 26).

Castillo *et al.* (2013) muestran resultados similares a los obtenidos en la presente investigación respecto a los protocolos de multiplicación para diferentes especies forestales como *Cedrela odorata*, *Swietenia macrophylla*, *Brosimum alicastrum* y *Tabebuia rosea*. Asimismo, la mayor cantidad de brotes de estas especies forestales se obtienen en medio de cultivo MS en combinación con BAP en concentraciones que varían de 1 a 1,5 mg/L con ANA en concentraciones de 0,5 a 0,8 mg/L.

En relación a lo anterior, Indacochea *et al.* (2018) señalaron en su investigación que la especie *Myroxylon balsamum* obtuvo una alta tasa de brotes en el 80 % de los explantes y un aumento en la longitud de 0,16 cm agregando 2 mg/L BAP + 1 mg/L ANA. Jordán y Casaretto (2006), añaden que las auxinas estimulan indirectamente el crecimiento del tallo ya que inducen la síntesis de giberelinas, las cuales son hormonas que promueven directamente esta función.

Por el contrario, Silva *et al.* (2015), obtuvieron resultados poco efectivos durante los ensayos de multiplicación *in vitro* con brotes de *Amburana cearensis* mediante la aplicación en diferentes concentraciones de la hormona Zip en el medio MS, siendo la mayor tasa de brotes de 1,24. Por esta razón, en la presente investigación no se realizaron ensayos con el fitorregulador en mención.

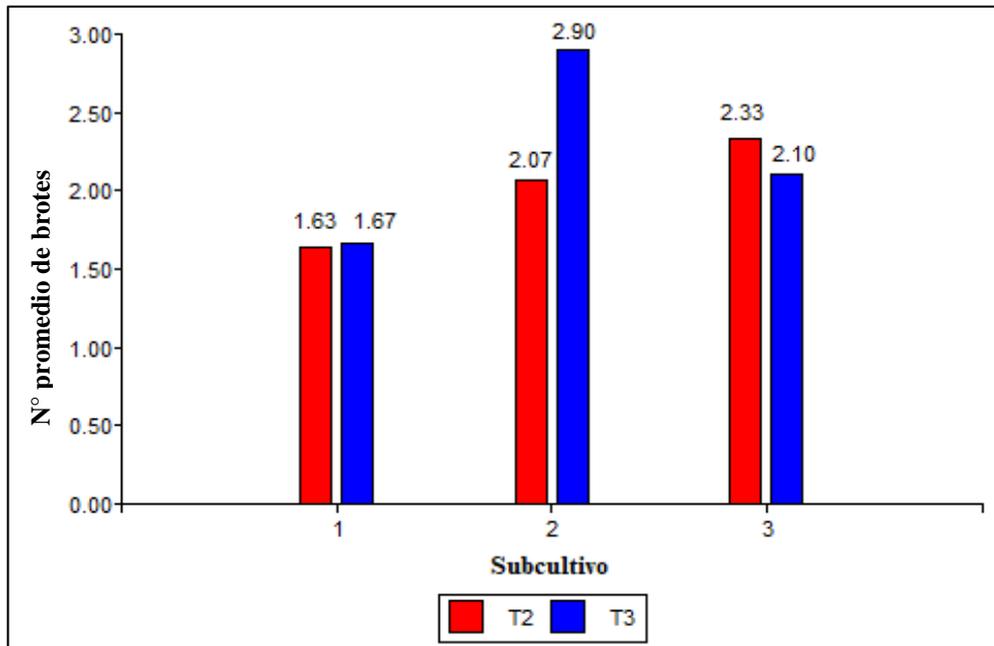


Figura 22: Número promedio de brotes por cada subcultivo para el tratamiento 2 y 3 durante la fase de multiplicación

En la figura 22, se muestra el número de brotes por cada subcultivo de los T2 (MS + 1 mg/L BAP) y T3 (MS + 1,5 mg/L BAP), ya que son los que muestran un mayor promedio de brotes sin diferencia significativa estadísticamente. Para el T3, se observa que la tasa de multiplicación en el subcultivo 2 fue el más alto, sin embargo, en el subcultivo 3 hubo un descenso. Por el contrario, el T2 presenta un aumento continuo en cada subcultivo.



Figura 23: Subcultivo de ishpingo en T2 (MS + 1 mg/L BAP)

Asimismo, los tratamientos que tuvieron una mayor tasa de multiplicación fueron aquellos que tenían BAP como fitorregulador adicionado en el medio de cultivo MS. Aquellas plántulas subcultivadas en medio de cultivo WPM, en su mayoría no prosperaron especialmente las que contenían ZEA.

En base a lo expuesto, el T2 (MS + 1 mg/L BAP) es el más óptimo no solo por la obtención de una alta tasa de multiplicación sino también por el menor uso de reactivos lo que implica un menor costo monetario.

Los tratamientos que contenían el fitorregulador BAP tanto en el medio de cultivo MS y WPM, presentaban una mayor frecuencia de individuos necrosados en grado 3 a medida que aumentaba la concentración de este fitorregulador siendo el valor más alto en el T4 con 90% y un ligero aumento de necrosis en grado 4. Por otro lado, a medida que aumentaba la concentración de la hormona ZEA, aumentaba la frecuencia de individuos necrosados en grado 2 y 4, siendo los valores más altos 24, 44% en el T7 y 20% en el T8 respectivamente, los cuales tenían como medio de cultivo MS (Figura 24). En el anexo 5, se muestran los promedios de grado de necrosis por tratamiento.

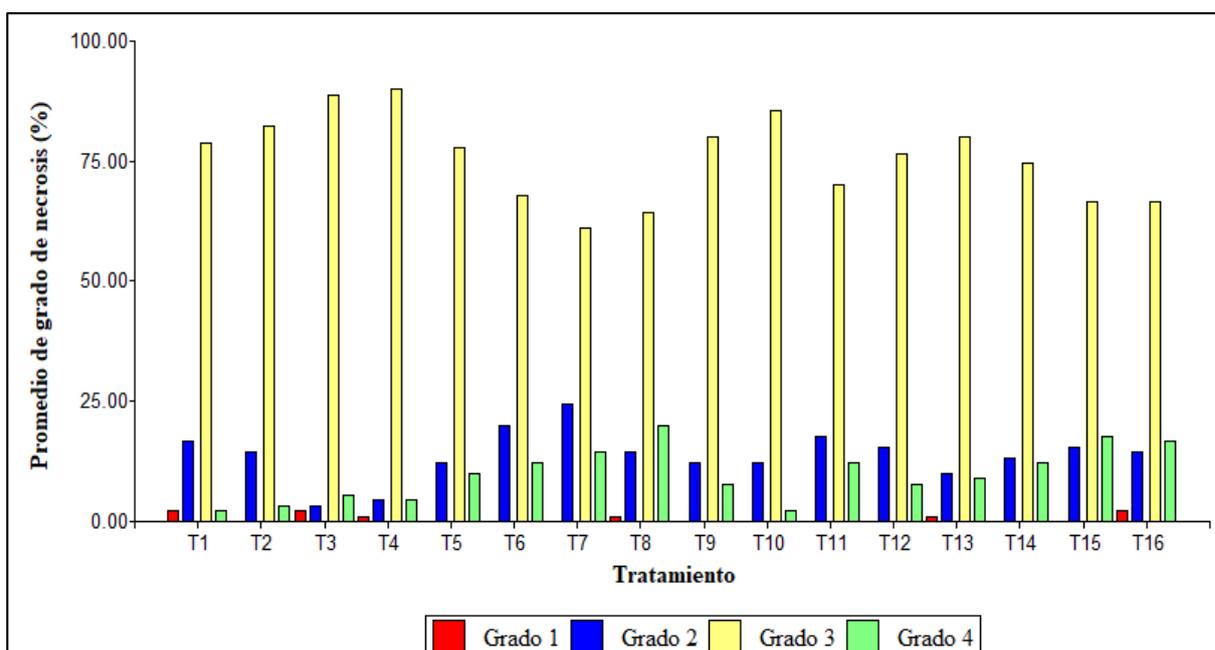


Figura 24: Necrosis en tres subcultivos continuos expresados en porcentaje (%) por tratamiento durante la fase de multiplicación

En lo que respecta a la evaluación del grado de fenolización, a medida que aumentaba la concentración del BAP en los tratamientos con medio de cultivo MS la frecuencia de fenoles en grado 1 se mantenía constante (entre 20 y 22%) al igual que en grado 2 (entre 75% y 79%) y una mínima frecuencia en grado 3 y 4. Sin embargo, en el medio de cultivo WPM a medida que aumentaba esta hormona, aumentaba la frecuencia de fenoles en grado 2, siendo el valor más alto de 85,56% en el T12, el cual contenía 2 mg/L BAP, a pesar que, la

frecuencia de fenoles en grado 1 también tenía una tendencia a aumentar, el valor más alto que era 16,67% no supera a los observados en el otro medio de cultivo.

En lo que se refiere a la ZEA, a medida que aumentaba su concentración también incrementaba la frecuencia de fenolización en grado 2, siendo el valor más alto de 83,33% en el T8 con medio de cultivo MS (Figura 25). En el anexo 6, se muestran los promedios de grado de fenolización por tratamiento.

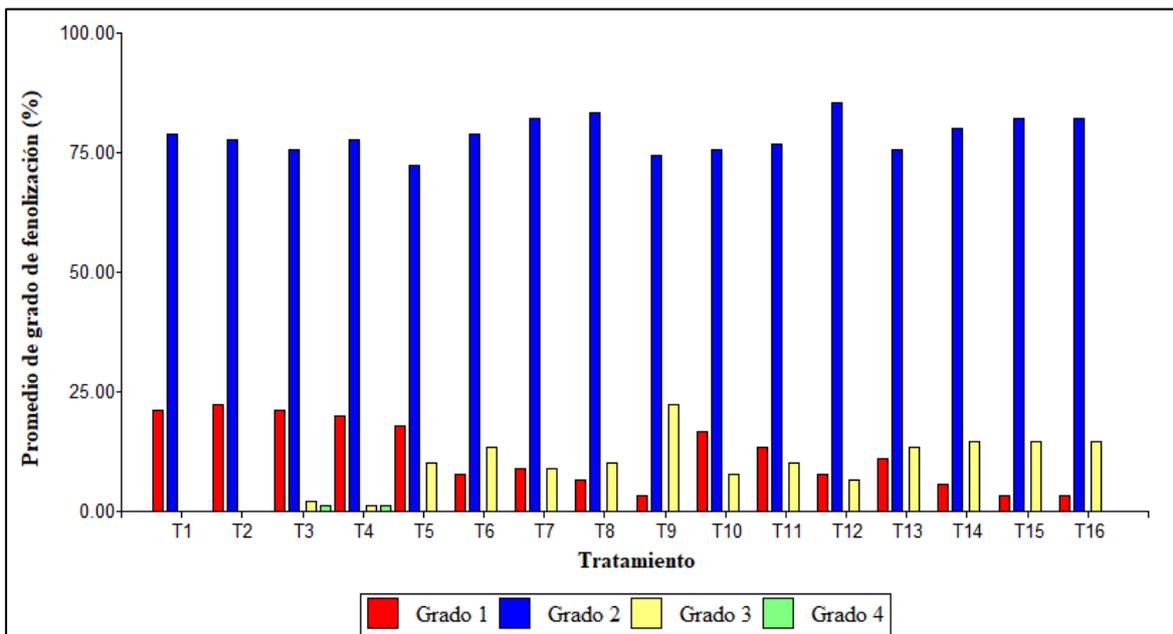


Figura 25: Promedio de fenolización en tres subcultivos continuos expresados en porcentaje (%) por tratamiento durante la fase de multiplicación

La evaluación del grado de callosidad resaltó que a medida que aumentaba la concentración del fitorregulador BAP en el medio de cultivo MS y WPM, aumentaban la frecuencia de callos en la base de las plántulas en grado 3 siendo los valores más altos de 76,67% en el T3 y 74,44% en el T12. De la misma manera a medida que aumentaba la concentración del fitorregulador ZEA en el medio de cultivo MS, aumentaba la frecuencia de callos en grado 3, siendo el valor más alto de 64,44% en el T8. Asimismo, se observó una mayor frecuencia de callo en grado 4 a diferencia del BAP, siendo el valor más alto de 21.11% en el T6.

Por otro lado, en el medio de cultivo WPM, disminuía la frecuencia de callo en grado 3 y aumentaba la frecuencia en grado 4, estando los valores más altos en los T15 y T16 con 15,56%, sin embargo, estos valores no superaban a los mostrados en el medio de cultivo MS (Figura 26).

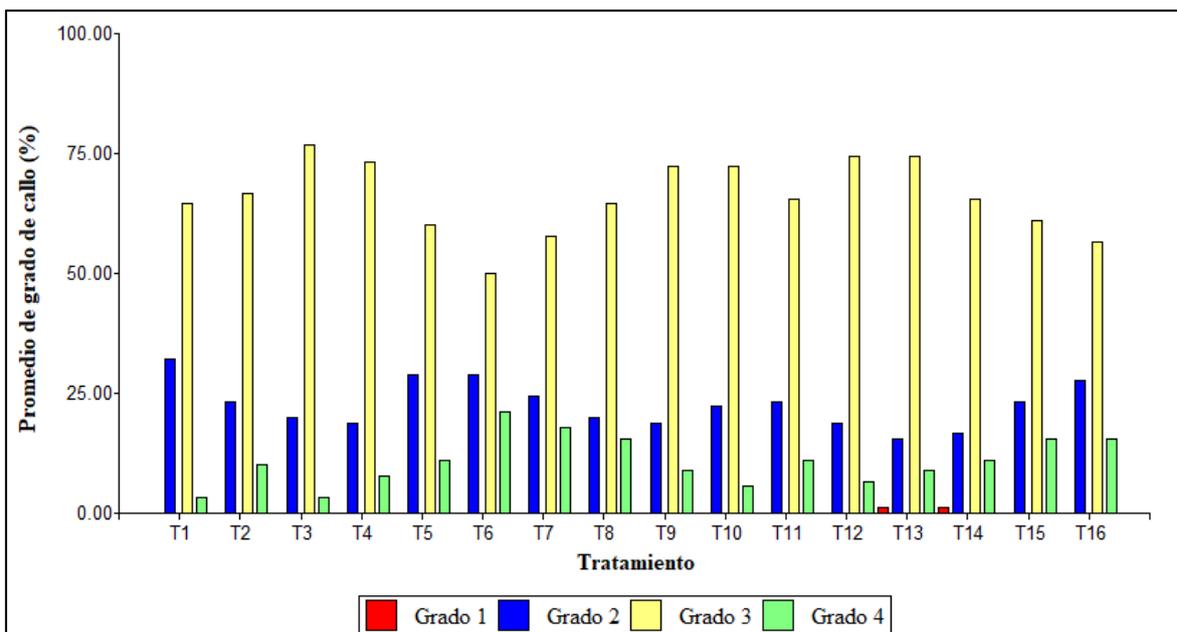


Figura 26: Promedio de callosidad en tres subcultivos continuos expresados en porcentaje (%) por tratamiento durante la fase de multiplicación

4.3. Fase 3: Enraizamiento

En base a los resultados obtenidos durante la fase de multiplicación, se continuó con los tratamientos de enraizamiento usando como medio de cultivo MS con diferentes concentraciones de auxinas; sin embargo, como no se obtuvieron los resultados esperados, se evaluó el porcentaje de sobrevivencia tal como se muestra en la figura 27.

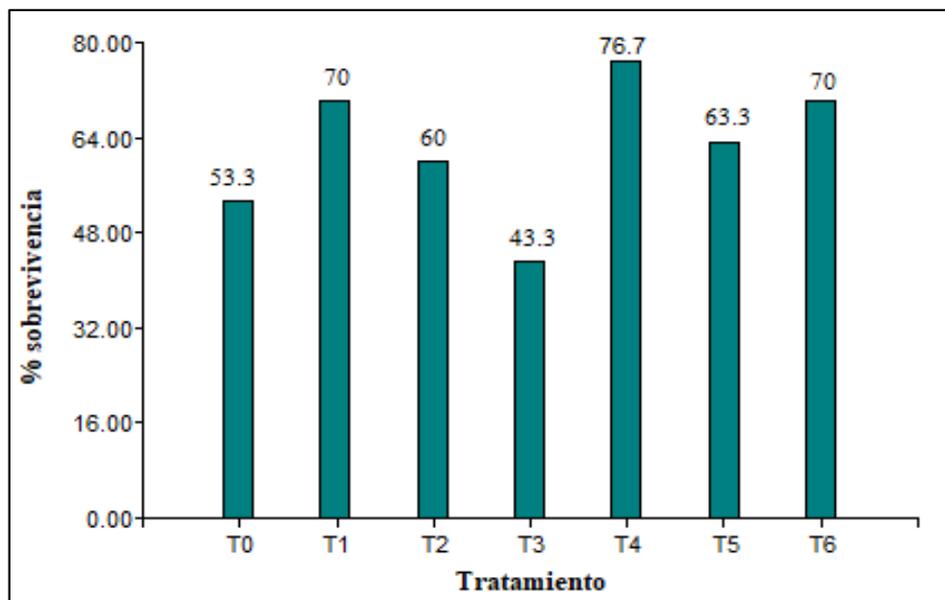


Figura 27: Porcentaje de sobrevivencia de plántulas por tratamiento durante la fase de enraizamiento

Después de 10 semanas de incubación, los tratamientos que mostraron un menor porcentaje de sobrevivencia fueron el T3 (MS + 1 mg/L ANA) con 43,3% y el tratamiento testigo (solo MS) con 53,3%; sin embargo, los otros tratamientos han presentado valores similares de porcentaje de sobrevivencia.

Sotolongo *et al.* (2011) y Latsague *et al.* (2009) reportan que, gran parte de las especies forestales tienen un mayor porcentaje de enraizamiento con el IBA y a veces en combinación con el ANA. Por otro lado, el AIA es muy fotosensible comparado con el IBA que es más estable y resistente a la oxidación por la luz. Además, Jordán y Casaretto (2006) explican que el IBA es un compuesto que también lo fabrica la propia planta, por lo que lo hace más eficiente que a las otras hormonas.

Por lo expuesto anteriormente, se realizaron otros tratamientos en medio de cultivo MS adicionando solo el IBA en diferentes concentraciones. Después de 4 semanas de incubación, los explantes comenzaron a morir debido a las altas concentraciones de auxinas y sin éxito de enraizamiento. Uribe *et al.* (2012) explican que el efecto de las auxinas sobre el enraizamiento es promover a bajas concentraciones e inhibir a altas concentraciones por lo que, puede generar la intoxicación de las plántulas, por ello no se observaron raíces y muy al contrario fue letal para las microestacas.

Vázquez y Torres (1995) citados en Indacochea *et al.* (2018) explican que, aún cuando se agreguen auxinas al medio de cultivo, algunas especies vegetales no logran enraizar por lo que son otros los factores que influyen en ello.

Fermino y Scherwinski (2012) realizaron la fase de enraizamiento de la *Amburana acreana* y después de 30 días obtuvieron los mejores resultados en medio de cultivo WPM/2 con 0,5 mg/L IBA. En cambio, para la especie *Amburana cearensis*, Alecrim *et al.* (2013) encontraron que, el mejor tratamiento de enraizamiento es en medio de cultivo WPM con 2 mg/L IBA. Sin embargo, los tratamientos realizados para la *Amburana acreana* en las concentraciones mencionadas por los autores no tuvieron éxito. Otras especies forestales como *Juglans neotropica* no requieren auxinas para su enraizamiento (Villegas, 2012).

V. CONCLUSIONES

Con base en los objetivos planteados y los resultados obtenidos sobre la micropropagación *in vitro* de la *Amburana acreana* utilizando yemas apicales de plantas provenientes de semillas, se concluye que el tratamiento aplicado para la multiplicación *in vitro* del ishpingo ha mostrado un aumento gradual en la tasa promedio de multiplicación durante los tres subcultivos siendo el último valor 2.33. Lo que sugiere que, es posible continuar con la multiplicación y obtener una mayor cantidad de microestacas. Asimismo, a continuación, se presentan las conclusiones a detalle de lo antes mencionado.

- El protocolo de desinfección de semillas de *Amburana acreana* muestra mejores resultados con el tratamiento 2 (2,5 % de NaOCl y 30 minutos), puesto que presenta un alto porcentaje de semillas germinadas y una baja tasa de contaminación, siendo 75% y 15% respectivamente.
- Las plántulas subcultivadas en medio de cultivo MS adicionado de BAP muestran mayores tasas de multiplicación a diferencia de las plántulas en medio de cultivo WPM con BAP.
- Para la multiplicación a partir de yemas apicales de *in vitro* plantas de *Amburana acreana*, se demuestra que estadísticamente no hay diferencias significativas entre el tratamiento 2 (MS + 1 mg/L BAP) y el tratamiento 3 (MS + 1,5 mg/L BAP).
- Las plántulas subcultivadas en el tratamiento 2 (MS + 1 mg/L BAP) presentan un aumento continuo promedio de brotes por subcultivo en comparación al tratamiento 3 (MS + 1,5 mg/L BAP). Por ello, se determina que el tratamiento 2, con 2.01 brotes en promedio, es el más adecuado para el protocolo de multiplicación. Sumado a ello, económicamente el tratamiento 2 es más rentable.
- Para el enraizamiento, las microestacas no lograron enraizar en el medio de cultivo MS con ANA, IBA y AIA en diferentes concentraciones. Sin embargo, la menor tasa de sobrevivencia fue con el tratamiento 3 que contenía 1 mg/L ANA con 43,3% y el tratamiento testigo con 53,3% , puesto que los otros tratamientos tenían porcentajes de sobrevivencia similares.

- Las microestacas subcultivadas a medio de cultivo MS con IBA en diferentes concentraciones, no lograron enraizar y, muy por el contrario, no sobrevivieron a los tratamientos propuestos.
- Es posible seleccionar plántulas de buena calidad basándose en la rapidez de la germinación y desarrollo de las plántulas, así como aquellas que presentan un alto valor de multiplicación de brotes para un futuro mejoramiento genético. Ello con el fin de poder establecerlas en campo.
- A partir de los resultados obtenidos, se considera que no está lejos de lograr un protocolo completo de micropropagación que mejore la producción convencional de plantas que cada vez se hace más difícil por la fuerte presión de explotación que disminuye el potencial del germoplasma todavía existente.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda profundizar e investigar el efecto de la interacción de un medio de cultivo con citoquininas y auxinas incluyendo los niveles de concentración a fin de favorecer la elongación durante la fase de multiplicación.
- Investigar otros tratamientos de enraizamiento utilizando citoquininas como auxinas en diferentes concentraciones.
- Identificar antioxidantes adecuados que puedan favorecer la supervivencia de las vitroplantas y poder considerarlos en futuras investigaciones para el cultivo *in vitro* de esta especie.
- Identificar los diferentes árboles semilleros con el fin de utilizar las semillas que muestren mejores resultados durante la germinación y multiplicación *in vitro*.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, M. & Kikata, Y. (1994). Atlas de maderas del Perú. Lima, Perú: Publifor.
- Alecrim, V. C.; Lima-Brito, A.; Mancía, I.E.; Ferreira, J. R. & Vieira, A. V. (2013). Micropropagación de umburana de cheiro. *Ciência Rural*, 43(4): 639-644. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=331/33125776015>
- Angulo, W. (2016). Ecología y Silvicultura de “Ishpingo”, *Amburana acreana* (Fr. Allem) A.C. Smith. Programa Presupuestal 130 “Aprovechamiento Eficiente de los Recursos Forestales y de Fauna Silvestre”. Lima, Perú: INIA
- Angulo, W.; Vidaurre, H.; Flores, Y.; Soudré, M. & Ricse, A. (1995). Experiencias silviculturales para el establecimiento de regeneración artificial en el Bosque del Campo Experimental Alexander Von Humboldt INIA-Estación Experimental Pucallpa. Recuperado de http://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/inia/843/1/Angulo-experiencias_silviculturales.pdf
- Baskin, C.C. & Baskin, JM. (2014). *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. San Diego: Academic Press.
- Boeri, P. (2015). Nutrientes para las plantas de probeta: medios de cultivo- reguladores de crecimiento. En Sharry, S.; Adema, M. & Abedini, W (eds.), *Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro* (p. 92-101). La Plata, Argentina.
- Braco, L & Zarucchi, J. L. (1993). *Catálogo de Angiospermas y Gimnospermas del Perú*. Lima, Perú.
- Carvalho, P. E. (2007). *Cerejeira da Amazônia: Amburana acreana*. Embrapa Florestas- Circular Técnica 134:6.

- Castillo, C.; Cruz, E.; Avendaño, C. & Rodríguez, B. (2013). Protocolo de multiplicación y conservación *in vitro* de cuatro especies forestales tropicales de semillas recalcitrantes. México, INIFAP-SEMARNAT-CONAFOR.
- Collin, H.A. & Edwards, S. (1998). Plant Cell Culture. United Kingdom: Springer.
- Dancé, J. (2006). Consultoría introducción de especies líderes en los mercados de exportación. Programa de desarrollo de políticas de comercio exterior. Lima, Perú: MINCETUR
- Domínguez, G. 1997. Uña de gato (*Uncaria tomentosa*) y producción sostenible. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. Perú. Recuperado de https://www.mincetur.gob.pe/wp-content/uploads/documentos/comercio_exterior/Sites/Bid/pdfs/Sexto%20informe%20bimensual.pdf
- Fermino, P. C. & Scherwinski, J. E. (2012). Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) AC Smith-Fabaceae). *Ciência Florestal*, 22(1): 1-9.
- Fermino, P. C.; Scherwinski, J. E.; Nagao, E. O. & da Silva, R. (2007). Calogênese e organogênese *in vitro* a partir de segmentos nodais de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) AC Sm.) da Amazônia Ocidental: Estabelecimento e regeneração de brotos. *Ornamental Horticulture*, (13): 900-904.
- Flores, Y. (1997). Comportamiento fenológico de 88 especies forestales de la Amazonia peruana. Estación experimental de Pucallpa. Perú: INIA e ICRAF.
- Flores, Y. (2004). Guía para el reconocimiento de regeneración natural de especies forestales de la Región Ucayali. Pucallpa, Perú: INIA.
- Flores, Y. (2010). Crecimiento y productividad de plantaciones forestales en la Amazonía peruana. Pucallpa, Perú: INIA.
- Galíndez, G.; Malagrina, G.; Ceccato, D.; Ledesma, T.; Lindow-López, L. & Ortega-Baes, P. (2015). Dormición física y conservación ex situ de semillas de *Amburana acreana* y *Myroxylon peruiferum* (Fabaceae). *Boletín de la sociedad argentina botánica* 50 (2): 153-161. Doi: <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v50.n2.11660>

- George, E.F.; Hall, M.A. & De Klerk, G.J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Volume 1. The Background (3^o Ed). Netherlands: Springer.
- Indacochea, B.; Parrales, J.; Hernández, A.; Castro, C.; Vera, M., Zhindón, A. & Gabriel, J. (2018). Evaluación de medios de cultivo *in vitro* para especies forestales nativas en peligro de extinción en Ecuador. *Agronomía Costarricense*, 42(1): 63-89.
- International Tropical Timber Organization (ITTO). (S.f). *Amburana acreana*. Recuperado de <http://www.tropicaltimber.info/es/specie/cerejeira-amburana-acreana/#lower-content>
- Jiménez-Terry, F. & Agramonte, D. (2013). Cultivo *in vitro* y macropropagación como vía de sostenibilidad de la propagación de especies forestales. *Biotecnología Vegetal* 13 (1): 3 – 21.
- Jordán, M. & Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En Squeo, F.A. & Cardemil, L. (eds.), *Fisiología vegetal* (p. 1-28). La Serena, Chile.
- Krikorian, A.D. (1991). Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En Roca, W.M. & Mrogrinski, L.A. (eds.), *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones prácticas* (p. 42-76). Cali, Colombia: CIAT. Recuperado de <https://books.google.com.co/books/p/pub-2347935248438357?id=EXijYNw55DUC&lpg=PP1&pg=PP1&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Kukachka, B. F. (1961). *Ishpingo: Amburana Acreana (Ducke) AC Smith, Leguminosae (Papilionaceae)* (No. 1915). Forest Products Laboratory.
- Latsague, M.; Sáez, P. & Yáñez, J. (2009). Efecto del ácido indolbutírico en la capacidad rizogénica de estacas de *Eucryphia glutinosa*. *Bosque (Valdivia)*, 30(2): 102-105. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002009000200006>
- Marquínez, J. (1998). *Aporte a la recuperación de especies vegetales en extinción por micropropagación: Raque (Vallea stipularis)*. Bogotá, Colombia: Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca (CAR).
- Ministerio del ambiente (MINAM). (2016). *La conservación de bosques en el Perú 2011-2016*. Lima, Perú. Recuperado de <http://www.minam.gob.pe/informesectoriales/wp->

content/uploads/sites/112/2016/02/11-La-conservaci%C3%B3n-de-bosques-en-el-Per%C3%BA.pdf

- Olmos, S; Luciani, G. & Galdeano, E. (2010). Micropropagacion. En Levitus, G; Echenique, V; Rubinstein, C; Hopp, E. & Mroginski, L (eds.). Biotecnología y mejoramiento vegetal II (p. 353-362). Argentina.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2016). Los bosques y el cambio climático en el Perú. Documento de trabajo 14. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i5184s.pdf>
- Pariani, S. (2015). La incubadora: condiciones ambientales de cultivo y asepsia. En Sharry, S; Adema, M. & Abedini, W (eds.). Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro* (p. 73-80). La Plata, Argentina.
- Perea, M. & Tirado, A. (2011). Cultivo de tejidos *in vitro*. Manual de prácticas de laboratorio. Facultad de Ciencias Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Pérez, E.M; Ramírez, R.; Núñez, H.G. & Ochoa, N. (1999). Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. México: Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Pierik, R.L. (1990). Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Madrid, España: Ed. Mundi-Prensa.
- Quintero, O. D. & Jaramillo, S. (2012). Rescate y germinación *in vitro* de embriones inmaduros de cedro negro (*Juglans neotropica Diels*). Acta Agronómica, 61(1): 52-60. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=1699/169924335007>
- Radice, S. (2010). Micropropagacion. En Levitus, G; Echenique, V; Rubinstein, C; Hopp, E. & Mroginski, L. (eds.). Biotecnología y mejoramiento vegetal II (p. 26-33). Argentina.
- Rautner, M; Leggett, M. & Davis, F. (2013). El Pequeño Libro de las Grandes Causas de la Deforestación. Oxford, Inglaterra.
- Remache, L. (2011). Desarrollo de una técnica de micropropagación *in vitro* de cedro (*Cedrela montana*) a partir de apices, Hojas y entrenudos (Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo).

- Rey, R. & Carmela, G. F. (2014). Multiplicación clonal masiva *in vitro* de *Acacia mangium willd.* como estrategia para la recuperación de suelos deprimidos.
- Reynel, C; Pennington, R. & Pennington, T. (2016). Árboles del Perú. Lima, Perú: Imprenta Bellido.
- Reynel, C; Pennington, R.; Pennington, T.; Flores, C. & Daza, A. (2003). Árboles útiles de la Amazonía peruana. Lima, Perú: Darwin Initiative, ICRAF.
- Roca, W.M. & Mroginski, L.A. (1991). Establecimiento de cultivos vegetales *in vitro*. En Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones prácticas. Cali, Colombia, CIAT (p 19-40). Recuperado de <https://books.google.com.co/books/p/pub-2347935248438357?id=EXijYNw55DUC&lpg=PP1&pg=PP1&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Rodríguez, R. (1993). Métodos tradicionales de propagación asexual y biotecnología ¿un mismo lenguaje? Ponencias y comunicaciones. Tomo II. Simposio llevado a cabo en el congreso forestal español, Lourizán, España.
- Ross, S.; Arriaga, M. E. & Pechi, E. (2017). Establecimiento *in vitro* de Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). Agrociencia Uruguay, 21(1): 15-23.
- Seemann, P. (1993). Utilización de técnicas de micropropagación. En Barriga, P. & Neira, M. (eds). Avances en Producción y Sanidad Vegetal (p. 87-109). Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile, Instituto de Producción y Sanidad Vegetal.
- Seleme, E. & Lewis, G.; Stirton, C.; Sartori, A & de Freitas M, V. (2015). A Taxonomic review and a new species of the south American woody genus *Amburana* (Leguminosae, Papilionoideae). Phytotaxa. 212(4): 249-263.
- Silva, E.; Dias, M. D. & Vieira, A. V. (2015). Indução de brotações *in vitro* em *Amburana cearenses* sob diferentes concentrações de citocinina e tipos de meios de cultura. En Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE). En: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO. Petrolina. Anais.
- Smith, C. & Wood, E. (1998). Biología molecular y biotecnología. España: Addison Welsley Longman

- Sotolongo, S.R.; Geada, L.G. & Cobas, L.M. (2011). Fomento forestal. Félix Varela (ed.). La Habana, Cuba. Fomento Forestal.
- Trucios, T. & Quintana, E. (agosto, 1987). Estudio conjunto sobre investigación y experimentación de bosques en la amazonia de Perú. Seminario taller 3 para infor. – JICA. Lima, Perú.
- Uribe, M; Ulloa, J; Delaveau, C; Saez, K. & Muñoz, F. (2012). Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento *in vitro* de microtallos de *Nothofagus glauca* (PHIL.) Krasser. Guyana - Botanica. 69(1):52-59. Recuperado de http://www.gayanabotanica.cl/pdfs/2012/1/10_Uribe_et_al_2012.pdf
- Villalobos, V.M. & Thorpe, T.A. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En Roca, W.M.& Mrogrinski, LA. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones prácticas (p. 127-141). Cali, Colombia, CIAT. Recuperado de <https://books.google.com.co/books/p/pub-2347935248438357?id=EXijYNw55DUC&lpg=PP1&pg=PP1&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Villalobos, V.M. (1980). Plantas libres de virus. México: Ciencia y desarrollo, CONACYT (33):35-49.
- Villareal, B. (2015). Morfogénesis. En Sharry, S; Adema, M. & Abedini, W (eds.). Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro* (p. 92-101). La Plata, Argentina.

VIII. ANEXO

ANEXO 1

ANÁLISIS DE VARIANZA PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN

Variable	N	R2	R2 Aj	CV
Germinación de plántulas	80	0.06	0.02	77.21

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1.05	3	0.35	1.5028	0.2206
% Concentración NaClO	0.80	1	0.80	3.4350	0.0677
Tiempo de inmersión (min)	0.05	1	0.05	0.2147	0.6444
% Concentración NaClO*Tiempo de inmersión (min)	0.20	1	0.20	0.8588	0.3570
Error	17.70	76	0.23		
Total	18.75	79			

H₀: La tasa germinación es igual en todos los tratamientos

H₁: Existe un tratamiento con una tasa de germinación distinto al resto

Valor de P > que α : 0.05, por lo tanto, no se rechaza H₀

TEST: LSD FISHER

% Concentración NaClO	Tiempo de inmersión (min)	Medias	n	E.E.	
3	30	0.45	20	0.1079	A
3	25	0.6	20	0.1079	A
2.5	25	0.7	20	0.1079	A
2.5	30	0.75	20	0.1079	A

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

Variable	N	R2	R2 Aj	CV
Contaminación de plántulas	80	0.06	0.02	47.77

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.74	3	0.25	1.6317	0.1890
% Concentración NaClO	0.31	1	0.31	2.0742	0.1539
Tiempo de inmersión (min)	0.11	1	0.11	0.7467	0.3902
% Concentración NaClO*Tiempo de inmersión (min)	0.31	1	0.31	2.0742	0.1539
Error	11.45	76	0.15		
Total	12.19	79			

H₀: La tasa contaminación es igual en todos los tratamientos

H₁: Existe un tratamiento con una tasa de contaminación distinto al resto

Valor de P > que α : 0.05, por lo tanto, no se rechaza H₀

TEST: LSD FISHER

% Concentración NaClO	Tiempo de inmersión (min)	Medias	n	E.E.		
3	30	0.1	20	0.09	A	
3	25	0.15	20	0.09	A	B
2.5	25	0.15	20	0.09	A	B
2.5	30	0.35	20	0.09		B

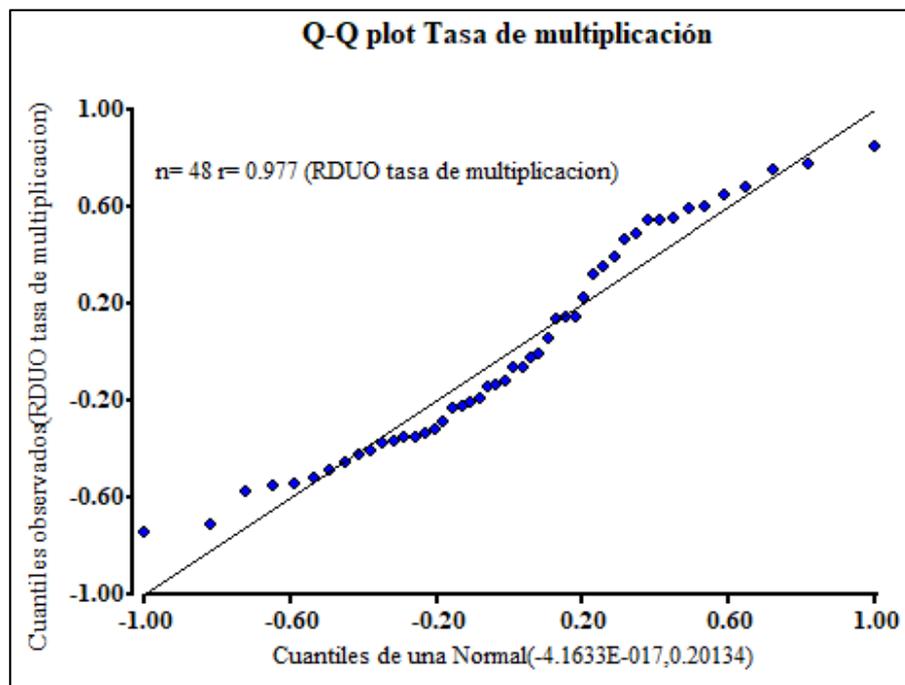
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

ANEXO 2

PRUEBAS DE LO SUPUESTOS DEL ANOVA PARA LA TASA DE MULTIPLICACIÓN

Prueba de normalidad (Shapiro - Wilks modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (unilateral D)
RDUO Tasa de multiplicación	48	0.00	0.45	0.91	0.0061



ANEXO 3

PRUEBA DE KRUSKAL WALLIS PARA LA TASA DE MULTIPLICACIÓN

Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
T1	3	1.5222	0.2502	1.6667	31.5026	0.0075
T10	3	1.6889	0.7343	1.3333		
T11	3	1.6556	0.6744	1.3000		
T12	3	1.2333	0.1155	1.1667		
T13	3	0.5222	0.5337	0.5000		
T14	3	0.5444	0.4993	0.4000		
T15	3	0.5222	0.5738	0.3333		
T16	3	0.4889	0.4741	0.2667		
T2	3	2.0111	0.3533	2.0667		
T3	3	2.2222	0.6257	2.1000		
T4	3	1.2444	0.6449	1.6000		
T5	3	0.6111	0.6752	0.4000		
T6	3	0.6000	0.5239	0.3667		
T7	3	0.6333	0.4163	0.5000		
T8	3	0.6778	0.5834	0.6667		
T9	3	1.3444	0.6301	1.5667		

Ho: La tasa de multiplicación es igual en todos los tratamientos

H1: Existe un tratamiento con una tasa de multiplicación distinto al resto

Valor de P < que α : 0.05, por lo tanto, se rechaza Ho

Tratamiento	Medias	Ranks				
T16: WPM+ 2mg/L ZEA	0.49	11	A			
T13: WPM+ 0.5mg/L ZEA	0.52	11.83	A			
T15: WPM+ 1.5mg/L ZEA	0.52	12.17	A			
T14: WPM+ 1mg/L ZEA	0.54	13	A	B		
T6: MS+1mg/L ZEA	0.6	14.83	A	B	C	
T7: MS+1.5mg/L ZEA	0.63	15	A	B	C	
T5: MS+0.5mg/L ZEA	0.61	16.17	A	B	C	
T8: MS+2mg/L ZEA	0.68	17.33	A	B	C	
T12: WPM+2mg/L BAP	1.23	27.17	A	B	C	D
T4: MS+2mg/L BAP	1.24	29.83	A	B	C	D
T9: WPM+0.5mg/L BAP	1.34	31.33	A	B	C	D
T10: WPM+1mg/L BAP	1.69	35.17		B	C	D
T11: WPM+1.5mg/L BAP	1.66	35.17		B	C	D
T1: MS+0.5mg/L BAP	1.52	36.17			C	D
T2: MS+1mg/L BAP	2.01	41.83				D
T3: MS+1.5mg/L BAP	2.22	44				D

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

Tratamiento	n	Media	D.E	C.V	min	máx
T16	3	0.49	0.47	96.98	0.17	1.03
T13	3	0.52	0.53	102.19	0	1.07
T15	3	0.52	0.57	109.88	0.07	1.17
T14	3	0.54	0.5	91.7	0.13	1.1
T6	3	0.6	0.52	87.31	0.23	1.2
T5	3	0.61	0.68	110.49	0.07	1.37
T7	3	0.63	0.42	65.74	0.3	1.1
T8	3	0.68	0.58	86.08	0.1	1.27
T12	3	1.23	0.12	9.36	1.17	1.37
T4	3	1.24	0.64	51.82	0.5	1.63
T9	3	1.34	0.63	46.87	0.63	1.83
T1	3	1.52	0.25	16.44	1.23	1.67
T11	3	1.66	0.67	40.74	1.23	2.43
T10	3	1.69	0.73	43.48	1.2	2.53
T2	3	2.01	0.35	17.57	1.63	2.33
T3	3	2.22	0.63	28.16	1.67	2.9

ANEXO 4

PROMEDIO DE BROTES POR SUBCULTIVO PARA LA MULTIPLICACIÓN DEL ISHPINGO

Tratamiento	1er subcultivo	2do subcultivo	3er subcultivo	X
T1	1.23	2.90	4.57	2.90
T2	1.63	3.70	6.03	3.79
T3	1.67	4.57	6.67	4.30
T4	1.60	3.23	3.73	2.86
T5	1.37	1.77	1.83	1.66
T6	1.20	1.57	1.80	1.52
T7	1.10	1.60	1.90	1.53
T8	1.27	1.37	2.03	1.56
T9	1.57	2.20	4.03	2.60
T10	1.33	2.53	5.07	2.98
T11	1.23	2.53	4.97	2.91
T12	1.17	2.53	3.70	2.47
T13	1.07	1.57	1.57	1.40
T14	1.10	1.50	1.63	1.41
T15	1.17	1.50	1.57	1.41
T16	1.03	1.30	1.47	1.27

ANEXO 5

PROMEDIO DE GRADO DE NECROSIS DE PLÁNTULAS DE ISHPINGO

Tratamiento	Promedio de grado de necrosis			
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
T1	2.22	16.67	78.89	2.22
T2	0.00	14.44	82.22	3.33
T3	2.22	3.33	88.89	5.56
T4	1.11	4.44	90.00	4.44
T5	0.00	12.22	77.78	10.00
T6	0.00	20.00	67.78	12.22
T7	0.00	24.44	61.11	14.44
T8	1.11	14.44	64.44	20.00
T9	0.00	12.22	80.00	7.78
T10	0.00	12.22	85.56	2.22
T11	0.00	17.78	70.00	12.22
T12	0.00	15.56	76.67	7.78
T13	1.11	10.00	80.00	8.89
T14	0.00	13.33	74.44	12.22
T15	0.00	15.56	66.67	17.78
T16	2.22	14.44	66.67	16.67

ANEXO 6

PROMEDIO DE GRADO DE FENOLIZACIÓN DE PLÁNTULAS DE ISHPINGO

Promedio de grado de fenolización				
Tratamiento	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
T1	21.11	78.89	0.00	0.00
T2	22.22	77.78	0.00	0.00
T3	21.11	75.56	2.22	1.11
T4	20.00	77.78	1.11	1.11
T5	17.78	72.22	10.00	0.00
T6	7.78	78.89	13.33	0.00
T7	8.89	82.22	8.89	0.00
T8	6.67	83.33	10.00	0.00
T9	3.33	74.44	22.22	0.00
T10	16.67	75.56	7.78	0.00
T11	13.33	76.67	10.00	0.00
T12	7.78	85.56	6.67	0.00
T13	11.11	75.56	13.33	0.00
T14	5.56	80.00	14.44	0.00
T15	3.33	82.22	14.44	0.00
T16	3.33	82.22	14.44	0.00

ANEXO 7

PROMEDIO DE GRADO DE CALLOS DE PLÁNTULAS DE ISHPINGO

Tratamiento	Promedio de grado de necrosis			
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
T1	0.00	32.22	64.44	3.33
T2	0.00	23.33	66.67	10.00
T3	0.00	20.00	76.67	3.33
T4	0.00	18.89	73.33	7.78
T5	0.00	28.89	60.00	11.11
T6	0.00	28.89	50.00	21.11
T7	0.00	24.44	57.78	17.78
T8	0.00	20.00	64.44	15.56
T9	0.00	18.89	72.22	8.89
T10	0.00	22.22	72.22	5.56
T11	0.00	23.33	65.56	11.11
T12	0.00	18.89	74.44	6.67
T13	1.11	15.56	74.44	8.89
T14	1.11	16.67	65.56	11.11
T15	0.00	23.33	61.11	15.56
T16	0.00	27.78	56.67	15.56