



SUBPROYECTO:

ESTABLECIMIENTO, MANEJO Y CONSERVACIÓN DE FUENTES DE GERMOPLASMA DE ESPECIES FORESTALES COMERCIALES NATIVAS DE LA AMAZONÍA PERUANA, EN EL MARCO DE LA INICIATIVA AMAZÓNICA

INFORME FINAL

EFFECTO DE 2 AUXINAS, ACIDO INDOL ACETICO (AIA), Y ACIDO NAFTALEN ACETICO (ANA), EN LA PROPAGACION POR MICROESTACAS DE *Guazuma crinita*, Mart (BOLAINA BLANCA)

**PRESENTADO POR:
BACH. FRANK PETTER APONTE SHUPINGAHUA.**

PERU- 2009

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE CUADROS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN.....	iii
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	2
A. ANTECEDENTES.....	2
B. DE LA ESPECIE.....	3
1. Taxonomía.....	3
2. Características dendrológicas.....	3
3. Fenología.....	4
4. Hábitat y distribución.....	4
5. Nivel germinativo y propagativo.....	4
5.1 Propagación asexual.....	5
6. Estrategia de crecimiento.....	5
7. Silvicultura.....	5
8. Características de la madera.....	5
9. Usos.....	6
C. NATURALEZA E IMPORTANCIA DE LA PROPAGACION ASEXUAL.....	6
1. Ventajas de la propagación asexual.....	6
2. Etapas de la propagación In Vitro.....	7
D. LA MICROPROPAGACIÓN.....	8
E. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO IN VITRO.....	9
1. Factores externos del cultivo.....	12
1.1. Temperatura.....	12
1.2. El fotoperiodo.....	12
1.3. La intensidad de luz.....	12
F. HORMOMAS.....	13

1. Auxinas.....	14
1.1 Características principales de las auxinas.....	15
1.2. Biosíntesis de las auxinas.....	16
1.3. Transporte de las auxinas.....	17
1.4. El Acido Indol Acético (AIA).....	17
1.5. Ácido Naftalén Acético (ANA).....	19
III. MATERIALES Y METODOS.....	20
A. UBICACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	20
B. MATERIALES.....	20
1. De Laboratorio.....	20
2. Equipos de Laboratorio.....	20
3. Reactivos.....	20
4. Material genético en estudio.....	20
C. TRATAMIENTOS EN ESTUDIO.....	21
D. OBSERVACIONES A REGISTRAR.....	21
E. PROCEDIMIENTO.....	24
1. Recolección y preparación de las semillas a utilizar.....	26
2. El efecto de las auxinas (ANA y AIA) en el desarrollo de microestacas de Bolaina blanca.....	27
F. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	28
IV. RESULTADOS Y DISCUCIONES.....	29
A. RESULTADOS DEL ENSAYO CON AIA.....	32
B. RESULTADOS DE ENSAYO CON ANA.....	36
C. COMPARACIÓN DE RESULTADOS ENTRE AUXINAS Y EL TESTIGO.....	43
V. CONCLUSIONES.....	45
VI. RECOMENDACIONES.....	45
VII. BIBLIOGRAFIA.....	46
VIII. ANEXOS.....	49

LISTA DE CUADROS

EN EL TEXTO.	Pág.
Cuadro	
1. Soluciones fundamentales que componen el Medio MS.....	11
2. Comparación de medias para longitud de brote de bolaina tratada con AIA a 1, 15, 30, 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de <i>In Vitro</i> . Pucallpa, Perú, 2009.....	29
3. Comparación de medias para número de nudos de bolaina tratada con AIA a 1, 15, 30, 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de <i>In Vitro</i> . Pucallpa, Perú, 2009.....	30
4. Comparación de medias para número de hojas de bolaina tratada con AIA a 1, 15, 30, 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de <i>In Vitro</i> . Pucallpa, Perú, 2009.....	32
5. Comparación de medias para número de raíces de bolaina tratada con AIA a 15, 30, 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de <i>In Vitro</i> . Pucallpa, Perú, 2009.....	37
6. Comparación de medias para longitud de brote de bolaina tratada con ANA a 1, 15, 30, 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de <i>In Vitro</i> . Pucallpa, Perú, 2009.....	36
7. Comparación de medias para número de nudos de bolaina tratada con ANA a 1, 15, 30, 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de <i>In Vitro</i> . Pucallpa, Perú, 2009.....	38
8. Comparación de medias para número de hojas de bolaina tratada con ANA a 1, 15, 30, 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de <i>In Vitro</i> . Pucallpa, Perú, 2009.....	39
9. Comparación de medias para número de raíces de bolaina tratada con ANA a 1, 15, 30, 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de <i>In Vitro</i> . Pucallpa, Perú, 2009.....	41
10. Efecto de las concentraciones de auxinas y un tratamiento testigo en micro estacas obtenidas desde semillas de <i>Guazuma crinita Mart</i> germinadas asépticamente en medio MS. a 45 días de cultivo <i>in Vitro</i> . Pucallpa, Perú, 2009.....	43

EN EL ANEXO

Cuadro

Pág.

11. ANVA para la variable longitud de brote a 1 día de desarrollo.....	49
12. ANVA para la variable longitud de brote a los 15 días de desarrollo.....	49
13. ANVA para la variable longitud de brote a 30 días de desarrollo.....	49
14. ANVA para la variable longitud de brote a 45 días de desarrollo.....	49
15. ANVA para la variable longitud de brote a 60 días de desarrollo.....	50
16. ANVA para la variable número de nudos a 1 día de desarrollo.....	50
17. ANVA para la variable número de nudos a 15 días de desarrollo.....	50
18. ANVA para la variable número de nudos a 30 días de desarrollo.....	50
19. ANVA para la variable número de nudos a 45 días de desarrollo.....	50
20. ANVA para la variable número de nudos a 60 días de desarrollo.....	51
21. ANVA para la variable número de hojas a 1 día de desarrollo.....	51
22. ANVA para la variable número de hojas a 15 días de desarrollo.....	51
23. ANVA para la variable número de hojas a 30 días de desarrollo.....	51
24. ANVA para la variable número de hojas a 45 días de desarrollo.....	51
25. ANVA para la variable número de hojas a 60 días de desarrollo.....	52
26. ANVA para la variable número de raíces a 15 días de desarrollo.....	52
27. ANVA para la variable número de raíces a 30 días de desarrollo.....	52
28. ANVA para la variable número de raíces a 45 días de desarrollo.....	52
29. ANVA para la variable número de raíces a 60 días de desarrollo.....	52
30. ANVA para la variable longitud de brote a 1 día de desarrollo.....	53
31. ANVA para la variable longitud de brote a los 15 días de desarrollo.....	53
32. ANVA para la variable longitud de brote a 30 días de desarrollo.....	53
33. ANVA para la variable longitud de brote a 45 días de desarrollo.....	53
34. ANVA para la variable longitud de brote a 60 días de desarrollo.....	54
35. ANVA para la variable número de nudos a 1 día de desarrollo.....	54
36. ANVA para la variable número de nudos a 15 días de desarrollo.....	54
37. ANVA para la variable número de nudos a 30 días de desarrollo.....	54
38. ANVA para la variable número de nudos a 45 días de desarrollo.....	54
39. ANVA para la variable número de nudos a 60 días de desarrollo.....	55

40.	ANVA para la variable número de hojas a 1 día de desarrollo.....	55
41.	ANVA para la variable número de hojas a 15 días de desarrollo.....	55
42.	ANVA para la variable número de hojas a 30 días de desarrollo.....	55
43.	ANVA para la variable número de hojas a 45 días de desarrollo.....	55
44.	ANVA para la variable número de hojas a 60 días de desarrollo.....	56
45.	ANVA para la variable número de raíces a 15 días de desarrollo.....	56
46.	ANVA para la variable número de raíces a 30 días de desarrollo.....	56
47.	ANVA para la variable número de raíces a 45 días de desarrollo.....	56
48.	ANVA para la variable número de raíces a 60 días de desarrollo.....	56
49.	Preparación de medio de cultivo para semillas.....	58
50.	Preparación de medio de cultivo para el ensayo de concentración con Acido Indol Acético.....	58
51.	Preparación de medio de cultivo para el ensayo de concentración con Acido Naftalén Acético.....	59

LISTA DE FIGURAS

EN EL TEXTO

Figura	Pág.
01 Estructura del Ácido Indol Acético.....	18
02 Longitud de brote de bolaina a 1, 15, 30, 45 y 60 días de sembrado en condiciones de <i>In Vitro</i> . Pucallpa, Perú, 2009.....	30
03 Número de nudos de bolaina a 1, 15, 30, 45 y 60 días de sembrado en condiciones de <i>In Vitro</i> . Pucallpa, Perú, 2009.....	31
04 Número de hojas a los 1, 15, 30, 45 y 60 días de sembrado en condiciones de <i>In Vitro</i> . Pucallpa, Perú, 2009.....	32
05 Porcentaje de sobrevivencia de los explantes a los 60 días de sembrado en condiciones de <i>in vitro</i> . Pucallpa, Perú, 2009.....	35
06 Número de Raíces a los 15, 30, 45 y 60 días de sembrado en condiciones de <i>In Vitro</i> . Pucallpa, Perú, 2009.....	37
07 Longitud de brote de bolaina a 1, 15, 30, 45 y 60 días de sembrado en condiciones de <i>in vitro</i> . Pucallpa, Perú, 2009.....	39
08 Número de nudos de bolaina a 1, 15, 30, 45 y 60 días de sembrado en condiciones de <i>in vitro</i> . Pucallpa, Perú, 2009.....	40
09 Número de hojas a los 1, 15, 30, 45 y 60 días de sembrado en condiciones de <i>In Vitro</i> . Pucallpa, Perú, 2009.....	42
10 Comparación de las tasa de enraizamiento, formación de callos y sobrevivencia de los explantes sembrados en condiciones <i>In Vitro</i> . Pucallpa, Perú, 2009.....	44

EN LA ICONOGRAFÍA

Figura	Pág.
11. Fruto y semillas de bolaina.....	60
12 Germinación <i>in Vitro</i> de semillas de bolaina.....	60
13 Explante de bolaina sin auxinas.....	61
14 Explantes desarrollándose en condiciones <i>In Vitro</i> en diferentes concentraciones de Acido Indol Acético.....	61

15 Explantes desarrollándose en condiciones In Vitro en diferentes concentraciones de Acido Naftalén Acético.....	62
---	----

RESUMEN

Con el fin de Evaluar el efecto de Ácido Indol Acético, Ácido Naftalén Acético, y un tratamiento testigo (medio MS sin auxinas), en la propagación por micro estacas de *Guazuma crinita*, Mart (bolaina blanca), se cortaron segmentos nodales de plantas germinadas asépticamente en medio Murashige y Skoog (MS), las cuales fueron sembradas en medio MS suplementadas con ácido- α -naftalenacético (ANA), o ácido indol-3-acético (AIA).

Después de 60 días de cultivo, los explantes expuestos a concentraciones de AIA y ANA no mostraron diferencia significativa con respecto al tratamiento testigo, que logró un incremento promedio de 0.4025 cm de altura, 08 nudos, 2.0 raíces y 3,5 hojas. Todos los tratamientos con auxinas formaron tejido calloso, mientras que el porcentaje de sobre vivencia para los tratamientos con AIA fue de 100% para el tratamiento 01, 90% para el tratamiento 02 y 70% para el tratamiento 03, en los tratamientos con ANA fue de 100% para el tratamiento 01, 100% para el tratamiento 02 y 90% para el tratamiento 03 y para el tratamiento testigo fue de 90%. Para la variable número de raíces, se concluyó que no existe diferencia significativa entre los tratamientos con auxinas y el testigo, destacándose que el tratamiento 03 con AIA, formó 6.7 raíces en promedio a los 45 días, y el tratamiento 02 con ANA formó 9.0 raíces.

I.-INTRODUCCIÓN.

La Reforestación y el Manejo con especies heliófitas de rápido crecimiento como *Guazuma crinita*, Mart (bolaina blanca) sin duda es una opción de excelentes perspectivas a corto y mediano plazo para la recuperación de áreas degradadas y la producción de madera en volúmenes significativos, Toledo (1996), ha estimado alrededor de 400 árb/ ha. que podría representar 100 m³(r), en turnos de 8-15 años y en plantaciones, a un distanciamiento de 3 x 3m se tiene 1.111 árb./ ha.

El cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in Vitro* permite aumentar el potencial productivo y acelerar el proceso en un programa de mejora genética en las plantas leñosas, IPEF (2008), señaló que la productividad de un árbol clonado llega a ser hasta 60% superior a los árboles obtenidos bajo medios sexuales. La técnica consiste en la reproducción de plántulas en condiciones totalmente asépticas, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido es posible regenerar en poco tiempo miles de plantas genéticamente iguales a la planta madre, a este tejido se le estimula por medio de variables físicas y químicas controladas en un medio de cultivo especializado para cada especie.

Es indispensable determinar una concentración auxínica adecuada para la micropropagación de *G. crinita*, Mart, que permita establecer una metodología dentro de un programa de multiplicación In Vitro de la especie, además de la posibilidad de multiplicación de explantes de alto valor genético y libre de enfermedades durante todo el año, que promete ser una actividad rentable para todo aquél que se dedique a la producción de plántulas bajo esta metodología ya que el abastecimiento es continuo todo el año.

Bolaina blanca es conocida por ser una especie con alta capacidad de rebrote (COTESU.1989), lo cual la hace idónea para asegurar su permanencia dentro de los bosques, incluso después de su cosecha, por eso la importancia de evaluar el efecto de AIA, ANA y un tratamiento testigo en la propagación por microestacas de *Guazuma crinita* Mart, con lo cual

se evitará la dependencia de semillas provenientes de los bosques, y a la vez disminuirá el impacto causado sobre las poblaciones naturales.

II.-REVISION BIBLIOGRÁFICA.

A. ANTECEDENTES.

Villegas (2008), determino el efecto del tiempo de exposición del hipoclorito de sodio sobre la germinación de semillas de Bolaina blanca (*Guazuma crinita*, Mart.), en condiciones de *In Vitro*, donde determinó índices de contaminación de 0%, para tiempos de exposición de 10, 20 y 40 min. Y un porcentaje de germinación de 24, 26 y 22% respectivamente denotando que la asepsia de las semillas dependen de la procedencia y el trato que se les de antes de ser sometidas al proceso de siembra.

En estudios preliminares de enraizamiento de explantes de *Guazuma crinita* en medio líquido de WPM (Woody plant medium), sin reguladores de crecimiento realizados por Maruyama *et al* (1997), se obtuvo la mejor frecuencia de enraizamiento (100%), usando papel filtro como soporte físico, mientras que con la adición de auxinas (4.9 ppm de IBA, Y 0,27 ppm de ANA), tanto en medio liquido como sólido (WP), el enraizamiento decreció a 80 – 70% respectivamente. Aparentemente la suplementacion de auxinas no es esencial para la formación de brotes adventicios en *Guazuma crinita*, posiblemente porque los niveles endógenos de reguladores de crecimiento requeridos por la planta para el enraizamiento eran suficientes.

El mismo autor obtuvo un 70% de enraizamiento en explantes de *Guazuma crinita* con 1 cm de longitud obtenidos desde semillas germinadas asépticamente en medio MS, Utilizando WPM complementado con 0.49 o 4.9 ppm de IBA, en combinación con 0.27 ppm de ANA, obteniendose un porcentaje de sobrevivencia del 100% para todos los tratamientos.

Torres *et al.* (1998), utilizó concentraciones de auxinas (2,4-D y ANA), a razón de 2mg/lit ensayados en cedro rojo para determinar su efecto, de los cuales obtuvieron un

promedio de tres brotes por explante. Tanto el AIB como el ANA suministrados individualmente a una concentración de 0.25 mg L^{-1} producen un alto porcentaje (90%) de plantas. Se logró la exitosa aclimatación de las plantas enraizadas con un porcentaje de supervivencia mayor a 80%.

En 1996, Maruyama *et al.* reportaron que para *Jacaranda mimosaeifolia* el cultivo con una sola citoquinina (Kinetina) a una muy alta concentración (100uM) produjo un alto porcentaje de brotes, mientras que para Cedro el enraizamiento fue producido con la incorporación de Kinetina a muy baja concentración unida a las auxinas ANA e IBA. Para el caso de *Guazuma crinita*, la formación de brotes se llevó a cabo también en el medio WP pero suplementado con 10 uM. de Zeatina, lográndose la elongación de los mismos con 1 uM. de Kinetina, Sin embargo, para Eucaliptus un medio suplementado con BAP produjo múltiples brotes, siendo la Kinetina y Zeatina citoquininas que produjeron una tasa muy pobre de formación de brotes (Sita, 1981)

B. DE LA ESPECIE.

1. Taxonomía.

Según Font Quer (1978), la especie *Guazuma crinita* Mart, se clasifica dentro del Orden: Malvales; Familia: Sterculiaceae; Género: *Guazuma*.

2. Características dendrológicas.

Encarnación (1983), lo describe como una especie de tronco recto, cilíndrico con pequeñas aletas basales y forma de copa globosa irregular, corteza externa color pardo con manchas blancas lenticular y fisurada, corteza interna de textura laminar fibrosa. Hojas simples alternas, bordes aserrados, ramita terminal circular con pubescencia en el has y envés; pecioladas, ápice acuminado. Trucios (1986), señaló que el fruto es tipo capsular, forma globosa, dehiscente de 5 valvas, cubierto de pelos largos de 2 – 4 mm de longitud, el tamaño es de 5 – 6 mm de diámetro, mientras que las semillas son ovoides. Entre 30 a 40 semillas por fruto, con un tamaño de 1mm. Con flores pequeñas de color rosado en panículas.

3. Fenología

Trucios (1986), indica que la bolaina blanca se encuentra en floración a mediados de mayo, hasta mediados de julio, su fructificación es desde julio hasta mediados de agosto, su maduración desde agosto a setiembre y la diseminación se realiza desde setiembre hasta noviembre.

4. Hábitat y distribución.

Se encuentra en toda la amazonia peruana entre 0 y 1000 msnm. Según el manual de silvicultura de bolaina blanca, COTESU (1989), indica que al estado natural crece formando manchales a orillas de las quebradas o sitios húmedos, es una especie de rápido crecimiento, en plantaciones crece a un ritmo de 3.5 m de altura y 3.4 cm. de grosor en promedio por año, alcanzando en el octavo y noveno año dimensiones aprovechables; la bolaina blanca requiere de abundante luz y posee la capacidad de rebrote a partir de los tocones de los árboles talados.

Según Vidaure (1992), bolaina blanca en general es una especie de clima tropical, donde el promedio de temperatura es de 26°C, con una amplitud de precipitación entre 1500 a 3500 mm. no es muy exigente en suelos, si bien se le encuentra naturalmente en suelos cambisols (francos), con buen drenaje, también lo encontramos en suelos gleysados con mal drenaje, arcillosos y compactables.

5. Nivel germinativo y propagativo

Según Díaz, (2000) en 1 kilogramo hay aproximadamente 750,000 semillas, el Porcentaje de germinación es de 65 % para semillas frescas en condiciones ambientales con temperatura promedio de 25 °C. Las semillas se pueden almacenar en condiciones ambientales hasta un tiempo máximo de 280 días con un porcentaje de germinación esperada de 40 %. En la propagación por semilla directamente a nivel de investigación se obtuvo 19.75 % de germinación en campo definitivo en suelo mineral con una cobertura de hojas pequeñas secas y 14.75 % en suelo mineral con una cobertura de plantación de arroz.

5.1. Propagación asexual.

La obtención y manejo de las semillas a utilizar deben provenir de individuos sanos (libres de plagas y enfermedades), vigorosos y con buena producción de frutos. Con esto se pretende asegurar que las plantas obtenidas de esas semillas hereden las características de los parentales (COTESU. 1989)

6. Estrategia de crecimiento.

Bolaina blanca, se encuentra dentro del grupo de especies con temperamento ecológico conocido como Heliófita Efímera, ya que desarrolla en sitios con abundante luz, donde se observa un rápido crecimiento, llegando a ser codominante en el estrato dosel Intermedio (Rodríguez y Sibille 1996), Fundamentalmente el viento y el agua actúan como vectores de dispersión de semillas. La textura del suelo donde mejor se desarrolla es de Media a Fina (de Franco Arenoso a Arcilloso), con un pH de extremada a ligeramente ácido (pH 4 a 6.5), con un Drenaje del suelo Moderado a Bueno. Se le encuentra entre los 0 – 1,200 m.n.s.m. (Díaz. 2000)

7. Silvicultura.

Toledo (1996), menciona que bolaina blanca es una especie promisoría en bosques secundarios, posee abundante regeneración en sucesiones secundarias de origen antrópico y natural, donde forma masas coetáneas. Aunque no hay registros cuantitativos sobre su abundancia se puede estimar alrededor de 400 árb/ha. Lo que podría representar 100 m³ (r) de madera comercial, agrega también que en cuanto a turnos se puede pensar en cosechar cada 8 – 15 años dependiendo del producto esperado y del sitio.

8. Características de la madera.

Taquire (1987), manifiesta que bolaina blanca es una madera susceptible a la pudrición, tiene una densidad básica media (0.41), de secado natural rápido, presentando defectos de nudos, fácil de preservar por los sistemas de baño caliente-frío, y vacío-presión. Su resistencia mecánica es de muy baja a baja, de muy fácil aserrío, excelente al cepillado y de buen comportamiento a la trabajabilidad.

El mismo autor manifiesta que la madera de esta especie seca con facilidad al sol, es de color claro, sus anillos son muy visibles a simple vista, tiene grano recto, textura media, brillo medio sin moteado (liso), los poros son visibles a simple vista, solitarios y múltiples radiales, con inclusiones. El parénquima es del tipo apotraqueal reticulado, de radios finos. De buen comportamiento al secado (contracción tangencial de 5,5% y radial de 3,5%), su resistencia mecánica es media, de acuerdo a su densidad.

9. Usos.

Lao (1972), indica que la bolaina blanca es una madera liviana usada en obras de carpintería, cajonería, palo de fósforo, así como pulpa para papel. Así mismo Taquire (1987), afirma que su madera es comercial en la región, se utiliza principalmente para viviendas rurales por su bajo costo, además de ser requerida para cajonería, carpintería, laminado, juguetería, palos de fósforo, palitos de chupete, paletas de consumo médico, etc.

C. NATURALEZA E IMPORTANCIA DE LA PROPAGACION ASEXUAL

Hartman (1995), indica que la propagación asexual consiste en la reproducción de individuos a partir de porciones vegetativas de las plantas y es posible, porque en muchas de éstas, los órganos vegetativos tienen capacidad de regeneración. Las porciones de tallos tienen la capacidad de formar nuevas raíces y nuevos brotes, al parecer, cualquier célula viva de la planta tiene toda la información genética necesaria para regenerar un organismo completo al cual se le llama clon que es un material genéticamente uniforme, derivado de un solo individuo y que se propaga de modo exclusivo por medio vegetativo, como estacas, divisiones e injertos, por lo general de una planta que no procede de semilla.

1. Ventajas de la propagación asexual

Calzada, (1980), afirma que en las especies que se propagan por estacas, se obtienen las siguientes ventajas: Plantaciones uniformes genéticamente, conservación de la variedad de plantas que se propaga, precocidad para las cosechas, el mejoramiento genético rápido y eficaz, multiplicación de plantas en un espacio y tiempo limitado, menor costo, mayor rapidez y sencillez en la obtención de plantas.

En trabajos realizados con pinos (*Pinus sp.*), IPEF (2008), menciona que esta tecnología permite obtener clones con resultados cada vez mejores, principalmente en relación con el grado de producción de madera por ha. ya que se ha demostrado que la productividad de un árbol clonado llega a ser hasta 60% superior a los árboles obtenidos por propagación sexual.

2. Etapas de la propagación In Vitro

FASE 0: Preparación de la planta madre. Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se obtienen explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Esta fase tiene como objetivo asegurar mediante un buen control fitosanitario, las plantas sanas en crecimiento activo y vigoroso para la obtención de explantes sanos a iniciar. (Closas *et al.* 1999).

FASE I: El mismo autor incluye en esta fase la selección y aplicación de un esquema de desinfección y la inoculación de los explantes en un medio de iniciación con el objetivo de lograr una elevada tasa de supervivencia y la respuesta deseada. Antes de extraer los explantes se hace una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia.

FASE II: Multiplicación de brotes. Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron de la FASE I originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varios entrenudos. Periódicamente estos nuevos brotes se deben sub cultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar. (Álvarez. 2006)

FASE III: Enraizamiento. Se transfieren los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga auxinas. Esta operación se realiza en la cámara de flujo laminar. Este método permite ser mas flexible a la hora de escoger los brotes, ya que éstos obtienen del medio la fuente de energía para enraizar, y por tanto no es necesario que tengan las hojas bien desarrolladas para realizar la fotosíntesis. (FFC. 2008).

FASE IV: Aclimatación. Los explantes recién enraizados son sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación (Closas *et al.* 1999). Las plántulas están poco adaptadas a crecer en un invernadero, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa elevada y generalmente tienen estomas perezosos para responder al descenso de la humedad relativa, demasiado lentos para evitar la desecación del explante.

D. LA MICROPROPAGACIÓN.

La Micropropagación consiste en multiplicar plantas In Vitro a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, con esto se obtiene una descendencia uniforme en condiciones de asepsia, consiste en la propagación de un genotipo a gran escala a través del empleo de técnicas de cultivo de tejidos en laboratorios (WIKIPEDIA. 2008). El cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. (Pierik. 1991)

Se realiza en frascos que contienen las plantas y se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23°C, además de controlar la cantidad de horas de luz. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas y reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar. La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación. (WIKIPEDIA. 2008).

La Micropropagación es una biotecnología que se aplica a especies vegetales con el fin de obtener una población en el menor período de tiempo posible. Sica (1998), la define como una biotecnología de «respuesta rápida», puesto que se logran resultados en períodos de 3 a 6

meses, en contraposición con otras biotecnologías en las que el tiempo de investigación es mayor, (Ingeniería genética). Se puede decir, que es además versátil puesto que se adapta a los requerimientos de cada especie en estudio, al aprovechar al máximo la totipotencia celular, para canalizarla hacia la propagación.

Las principales ventajas de la micropropagación mencionados por Calzada (1980), son: Plantaciones uniformes genéticamente, conservación de la variedad de plantas que se propaga, el mejoramiento genético rápido y eficaz, multiplicación de plantas en un espacio y tiempo limitado, mayor rapidez y sencillez en la obtención de plantas.

En la actualidad, la micropropagación se practica con éxito en especies hortícolas (Murashige, y Skoog. 1978), ornamentales y más recientemente, en especies leñosas. Según Hartman (1995), En algunas especies esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación; las más importantes son:

- Incremento acelerado del número de plantas derivados del genotipo.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en un espacio reducido, a bajos costos y en tiempos económicamente costeables.
- Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga.
- Facilidad para transportar el material In Vitro a otros lugares, con menos restricciones aduaneras.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente a una variedad de la cual existen pocos individuos.

E. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO IN VITRO

Rosell (1990), indica que las plantas, siendo organismos foto autotróficos, son capaces de utilizar la energía luminosa para asimilar y convertir el CO₂, el agua y nutrientes inorgánicos en compuestos orgánicos necesarios para el crecimiento celular. Para el cultivo de material vegetal separado de la planta sería necesario adicionar al medio sintético todos aquellos

nutrientes, vitaminas y reguladores del crecimiento que las células, tejidos u órganos recibirán a través de las raíces o de los órganos fotosintetizadores de la planta.

Pierik (1991), define cultivo **in vitro** de plantas superiores como el ***cultivo en medio nutritivo, bajo condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos***, asimismo el autor menciona que, los cultivos *in vitro* pueden iniciarse prácticamente a partir de cualquier parte de la planta. Sin embargo, la fuente inicial de material vegetal puede ser determinante para el éxito en el establecimiento de los cultivos.

Generalmente se aconseja utilizar plantas sanas y vigorosas como fuente del explante; comúnmente se seleccionan aquellas partes de la planta que se encuentran en división activa, como las regiones meristemáticas. El éxito en el cultivo de órganos, tejidos o células disminuye con el aumento de la edad de la planta, por lo que es recomendable utilizar plantas jóvenes como fuente de explantes (Rosell .1990).

El medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua. Esta solución que cuenta con los nutrientes necesarios para recuperar, multiplicar y aislar (bajo condiciones favorables de temperatura y pH), material genético. Usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina Medio Basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y ocasionalmente con otras sustancias varias. El medio de cultivo mas conocido es el MS o de Murashige, y Skoog (1978), que se detalla en el cuadro siguiente:

Cuadro 01.-Soluciones fundamentales que componen el Medio MS.

solución	Componentes	mg/Lt
100 ml /L	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
	CaCl ₂	440
10 ml /L	H ₃ BO ₃	620
	MnSO ₄ . 4H ₂ O(H ₂ O)	2230 (1690)
	ZnSO ₄ . 4H ₂ O (7H ₂ O)	860 (1060)
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	2.5
	CoCl ₂ . 6H ₂ O	2.5
	KI	83
	Na ₂ MoO ₄ . 4H ₂ O	25
5 ml /L	Na ₂ EDTA. H ₂ O	744
	FeSO ₄ . 7H ₂ O	556
10 ml /L	Ácido nicotínico	50
	Piridoxina(B ₆)	50
	Tiamina (B ₁)	10
	glycina	200
	Myo-inositol	100

Sica (1998). A a este medio de le añade 30 g de sacarosa y agitar hasta que se disuelva completamente. Devolver la solución preparada al erlenmeyer, agitar y ajustar el pH para que se encuentre entre 5,7-5,8, añadiendo NaOH 0.1 N o HCl 0.1N al medio, finalmente añadir 4 g de fitagel, agitar y calentar la solución hasta que el fitagel quede disuelto

1. Factores externos del cultivo

1.1. Temperatura.

Según Closas *et al.* (1999), Determinar la temperatura óptima de crecimiento para cada cultivo *In Vitro* puede ser un proceso muy laborioso que, además, exige gran cantidad de cámaras de cultivo reguladas de forma diferente. Afortunadamente, y para la mayoría de situaciones, se pueden obtener resultados satisfactorios con temperaturas de incubación que oscilan entre los 20 y 28⁰C.

La temperatura actúa estimulando, hasta un cierto límite, tanto la respiración como el crecimiento y luego actúa como inhibidor. El papel del regulador de la temperatura sobre el crecimiento. Se realiza a través de la regulación de reacciones enzimáticas que, directa o indirectamente intervienen en el proceso. El óptimo de temperatura la mayoría de las veces está entre 28 y 32°C. y por encima de los 35°C. empieza a causar daño, ya que las diferentes reacciones poseen coeficientes de temperatura ligeramente distintos, un cambio de temperatura puede fomentar una reacción y por el contrario perjudicial a otra. (Dieter. 1980)

1.2. El fotoperiodo.

Algunos fenómenos propios del desarrollo de las plantas (germinación, floración, tuberización, etc.) pueden ser activados por el número de horas diarias de luz que recibe la planta. De forma análoga, el número de horas de luz que recibe el explante cultivado *In Vitro* puede afectar a su desarrollo. En general, el mejor fotoperiodo *Ex Vitro* será también el mejor fotoperiodo *In Vitro*. (Barcelo.2001).

1.3. La intensidad de luz.

La luz artificial puede emplearse para prolongar el fotoperiodo natural, se ha visto que el efecto estimulador no depende de la intensidad de luz, si no de la luz como tal, es decir basta con la luz de una linterna para estimular a una planta a la producción de flores. Para algunas

especies la luz de la luna llena basta para generar estimulación a la producción de brotes. (Erston. 1967)

F. HORMONAS.

Actualmente se reconoce cinco tipos de sistemas químicos de reguladores del crecimiento vegetal (Leopol y Kriedmann, 1975, citados por Hurtado. 1994) dividido en tres grupos principales:

- Promotores del crecimiento: auxinas, citocininas y giberelinas
- Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico
- Acelerador de la maduración: Etileno.

De los cinco sistemas químicos incluidos en este grupo, las auxinas y giberelinas estimulan principalmente la elongación celular; las citocininas estimulan la división celular (Hurtado, 1994)

Las hormonas son, por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo; actúan generalmente en un lugar diferente al que fueron producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades. A parte de este producto natural, se han desarrollado también otros de tipo sintético, junto con las hormonas, se les denomina “reguladores”, y son los responsables, en primer lugar, de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza. También determinan el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta (Pierik, 1991)

El mismo autor menciona que en el cultivo *in vitro* de plantas superiores, los reguladores, especialmente las auxina y citocininas, juegan un papel importante. Se puede decir que el cultivo *in vitro* es generalmente imposible sin reguladores. Que un medio nutritivo necesite una auxina o una citocinina para conseguir la extensión y/o la división celular, es algo que depende del tipo de explante y de la especie vegetal. Por ejemplo explantes que producen suficiente cantidad de citocininas, no precisan de ninguna adición exógena. Otros explantes que producen suficiente cantidad de auxinas, no necesitan una cantidad adicional para conseguir la extensión y/o división.

Pierik (1991), menciona que se puede hacer la siguiente división, en relación con el crecimiento de células, tejidos, órganos, etc.:

- Cultivos que no necesitan ni auxinas ni citocininas
- Cultivos que necesitan sólo auxinas
- Cultivos que necesitan sólo citocininas
- Cultivos que necesitan auxinas y citocininas

1. Auxinas.

Las Auxinas son sustancias naturales que se producen en las partes de las plantas en fase de crecimiento activo y regulan muchos aspectos del desarrollo vegetal. Afectan al crecimiento del tallo, las hojas, las raíces y al desarrollo de ramas laterales y frutos. La manera en que las auxinas hacen crecer a la planta es por medio del aumento del volumen celular provocado por absorción de agua. (Lucas. 2002)

El mismo autor indica que las Auxinas son un grupo de reguladores del desarrollo vegetal relacionado con la elongación celular, dominancia apical, iniciación de raíces, etc. Algunas de las auxinas usadas frecuentemente en cultivos *in vitro* son: Ácido Indol Acético (AIA), Ácido Naftalén acético (ANA), Ácido Indol Butírico (IBA) y Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

En la práctica, el uso de las auxinas es un arte. Ya que no es posible establecer una concentración particular de la auxina que se debe utilizar en un caso específico. Sin embargo, en general se utiliza el Ácido Indol Acético en concentraciones que varían de 0.001 a 10 mg/litro, con un punto óptimo alrededor de 0,1 a 1 ml/litro; el Ácido Naftalén Acético generalmente se utiliza en concentraciones levemente mayores (1 a 10 mg/litro), y un punto óptimo cerca a 2 mg/litro.

(<http://www.efn.uncor.edu/dep/biología/intrbiol/giberelinas.htm#crecimiento>)

Según Calderon (2005), Las auxinas son un grupo de sustancias fabricadas de forma natural en los meristemos (yemas y hojas), son basípetas (se desplazan hacia abajo) y sensibles a la luz, siendo fácilmente degradadas por una enzima (luminasa). Las principales son: AIA (Ácido

indolacético), sustancia natural, es muy activo. Tiene el inconveniente de ser poco estable y emigrar rápidamente de la planta.

Las dosis aconsejadas serán más elevadas que para las siguientes: AIB (Acido Indolbutirico), es más estable y menos soluble, emigra menos fácilmente en los tejidos, su acción es muy localizada, es por tanto muy eficaz y se emplea a dosis más bajas. ANA (Acido Naftalen Acético), posee aproximadamente las mismas características que el AIB, pero su empleo es más delicado. El margen de seguridad entre la dosis útil y la dosis fitotóxica es más estrecho. Su espectro de eficacia es un poco diferente y es más adecuado para ciertas especies.

1.1 Características principales de las auxinas

Una característica sorprendente de la auxina es la fuerte polaridad exhibida en su transporte a través de la planta. La auxina es transportada por medio de un mecanismo dependiente de energía, alejándose en forma basipétala desde el punto apical de la planta hacia su base. Este flujo de auxina reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo de esta forma la dominancia apical.

La auxina ha sido implicada en la regulación de un número de procesos fisiológicos.

- Promueve el crecimiento y diferenciación celular, y por lo tanto en el crecimiento longitudinal de la planta.
- Estimulan el crecimiento y maduración de frutas.
- Floración.
- Geotropismo.
- La auxina se dirige a la zona oscura de la planta, produciendo que las células de esa zona crezcan más que las correspondientes células que se encuentran en la zona clara de la planta. Esto produce una curvatura de la punta de la planta hacia la luz, movimiento que se conoce como fototropismo.
- Retardan la caída de hojas, flores y frutos jóvenes.
- Dominancia apical.

Existen varias auxinas llamadas “naturales”; que incluyen el Acido Indol Acético. También se utiliza ampliamente un buen número de sustancias que provocan un efecto fisiológico similar y que se han producido sintéticamente; son las llamadas “Auxinas sintéticas”; entre las cuales el 2, 4-diclorofenoxiacético, el ANA y el AIB se encuentran ampliamente disponibles y se utilizan comúnmente. También existen muchos compuestos que son derivados de los ácidos fenilacéticos o fenoxiacéticos.

(<http://www.efn.uncor.edu/dep/biología/intrbiol/giberelinas.htm#crecimiento>)

1.2. Biosíntesis de las auxinas

Lucas. (2002). indica que existe información suficiente para demostrar que el AIA se sintetiza a partir de triptófano. Esta transformación pueden llevarla a cabo microorganismos e incluso se puede producir una conversión oxidativa cuando el triptófano se encuentra en presencia de peroxidasas y de radicales libres. Las vías de síntesis del AIA se basan en la evidencia obtenida a partir de la presencia de intermediarios y su actividad biológica y el aislamiento de enzimas capaces de convertir *in vivo* estos intermediarios en AIA.

Queda por definir en que órgano o tejido se lleva a cabo la biosíntesis de las auxinas en condiciones naturales. Aunque se han realizado diversos estudios sobre la distribución de la auxina en la planta, hay que hacer notar que lo que se mide en un momento dado es el balance entre síntesis, metabolismo y transporte, tanto de entrada como de salida. El hecho de que un órgano sea capaz de sintetizar AIA a partir de triptófano sólo dice que ese sistema dispone de la maquinaria necesaria para realizarlas en las condiciones del experimento. Mediante distintas líneas de evidencia se ha podido llegar a sugerir cuáles son los órganos o tejidos más probables en llevar a cabo la síntesis de AIA en la planta.

1.3. Transporte de las auxinas.

Lucas (2002), indica que una hormona se caracteriza por moverse en el organismo vegetal desde un punto de síntesis hasta su lugar de acción. A pesar de algunas objeciones, está claro que existe un movimiento de las auxinas a través del organismo; este desplazamiento de un lugar a otro se denomina transporte de la auxina, aunque los mecanismos que participan en este proceso no sean totalmente conocidos.

Menciona también que la peculiaridad más notable del transporte auxínico es que se realiza de forma polar, es decir, en un segmento de tallo irá siempre en dirección basipétala, en un segmento de raíz irá en dirección aceopétala (se desplazaría hacia el ápice de la raíz). En plantas intactas, la dirección del movimiento depende de la zona de aplicación de la hormona, y se desplaza desde el lugar de aplicación (fuente) hasta el lugar de consumo (sumidero). Así, si se aplica una auxina en hojas adultas, irá a donde vayan los productos de la fotosíntesis que esa hoja exporta a través del floema. Existen trabajos que apoyan la presencia de auxinas en la corriente transpiratoria del xilema.

1.4. El Acido Indol Acético (AIA)

Según Parra (2002), la auxina AIA, ácido 3-indol-acético fue descubierta en 1934. Se trata de una hormona natural presente en mayor o menor grado en las plantas y producida en los meristemas de los brotes, desde donde viaja a otras partes de la planta. Se vio que ésta favorecía la formación de raíces. Al año siguiente se sintetizaron dos nuevas auxinas el AIB (ácido 3-indol-butírico) y el ANA (ácido 1-naftalén-acético) que tenían mayor actividad que la hormona natural, el AIA.

También menciona que todos los productos comerciales modernos para enraizamiento están basados en estas dos hormonas o sus derivados para buscar mejor efectividad en algunas aplicaciones, por ejemplo las sales potásicas o sódicas del AIA y del ANA son solubles en agua y tienen una menor probabilidad de dañar algunos tipos de esquejes que las disoluciones en alcohol. El AIB tiene una efectividad algo superior al ANA en algunas aplicaciones y la presencia de ambas hormonas en el mismo producto suele potenciar los resultados.

Estas mezclas suelen utilizarse para esquejes leñosos mientras que el AIA parece funcionar mejor con los esquejes tiernos. Las principales presentaciones comerciales de estas hormonas son polvo, disolución (con un disolvente) y tabletas (se disuelven en agua), el AIA es una hormona vegetal, y es la más activa de las auxinas, estimula el crecimiento del tallo principal (dominancia apical). También está relacionado con el enraizamiento. No es diluible en agua, por lo que se puede usar pequeñas concentraciones de alcohol para lograr su dilución. Entre las principales funciones de AIA se tiene: El crecimiento por alargamiento del tallo, divisiones

celulares en el cámbium, divisiones celulares y formación de raíces y dominancia apical (Dieter. 1980)

Salisbury (2000), indica que el AIA no suele trastocarse a través de los tubos cribosos del en el floema o a través del xilema, sino principalmente a través de células del parénquima en contacto con haces vasculares. El AIA se desplaza a través de los tubos cribosos si se aplica a la superficie de una hoja lo bastante madura para exportar azúcares, pero el transporte normal en tallos y pecíolos comienza en las hojas jóvenes y sigue hacia abajo, a lo largo de los haces vasculares. También las auxinas sintéticas aplicadas a las plantas se mueven de esta manera.

La siguiente figura muestra la estructura química del Ácido Indol Acético.

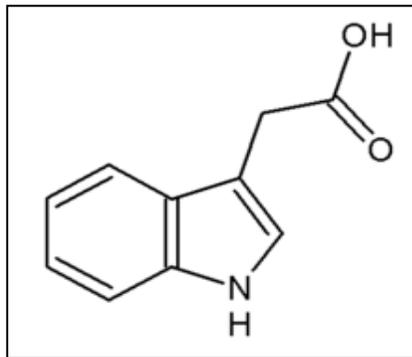


Figura 01. Estructura del Ácido Indol Acético

1.5. Ácido Naftalén Acético (ANA)

Considerado como un homólogo del AIA, algunos estudios han demostrado que la estimulación del crecimiento vegetativo, que es la principal característica de las auxinas, puede derivar en inhibición si se eleva la frecuencia de aplicación o se supera el nivel adecuado para cada caso (sobredosis). Actúan generando dominancia apical, desarrollo en elongación de ramas, produce división celular, activa el desarrollo de yemas, favorece la floración, retrasa la caída de hojas y frutos. (Dieter. 1980)

III. MATERIALES Y METODOS

A. UBICACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO

El experimento se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos y Meristemas de la Universidad Nacional de Ucayali, situado en el Km. 6 de la Carretera Federico Basadre, margen izquierdo, de la ciudad de Pucallpa, distrito de Manantay, provincia de Coronel Portillo, Región de Ucayali. El estudio se llevó a cabo en los meses de Enero a Abril del 2009.

Geográficamente el área esta situado a $08^{\circ} 23' 39.6''$ de latitud sur y $74^{\circ} 34' 39.8''$ de longitud oeste a 144 m.s.n.m.

B. MATERIALES

1. De Laboratorio

Matras Erlenmeyer de 250 y 500 ml, vasos de precipitado de 500 ml, placas petri, pipetas de 1 y 10 ml, probetas de 100 ml, mechero de alcohol, pinzas, tubos de ensayo, tubo de ensayo, papel aluminio, cintas selladoras, Cuchillas

2. Equipos de Laboratorio

Autoclave, estufa, balanza analítica, cámara de flujo laminar, aire acondicionado, cocina eléctrica, horno pasteurizador.

3. Reactivos

Sales de Murashige & Skoog (1978), reguladores de crecimiento: Acido Naftalenacético, Acido Indolacético, phytigel, sacarosa, hipoclorito de sodio al 2, alcohol de 96°, tween 80

4. Material genético en estudio

Segmentos nodales de la especie *Guazuma crinita* Mart. "Bolaina blanca." germinados asépticamente en medio de cultivo MS.

C. TRATAMIENTOS EN ESTUDIO

Testigo.

T₀: MS + 30g sacarosa + 4g Fitagel

Tratamiento de concentración de Acido Naftalenacético

T₁: MS + 30g sacarosa + 4g Fitagel + 1 ppm ANA

T₂: MS + 30g sacarosa + 4g Fitagel + 3 ppm ANA

T₃: MS + 30g sacarosa + 4g Fitagel + 6 ppm ANA

Tratamiento de concentración de Acido Indolacético

T₁: MS + 30g sacarosa + 4g Fitagel + 1 ppm AIA

T₂: MS + 30g sacarosa + 4g Fitagel + 3 ppm AIA

T₃: MS + 30g sacarosa + 4g Fitagel + 6 ppm AIA

D. OBSERVACIONES A REGISTRAR

1. En semillas botánicas.

- Momento de germinación y porcentaje de germinación. Se contó los días que tardo la germinación de las semillas y el porcentaje de germinación de las mismas.
- Porcentaje de semillas libres de contaminación (%). Se observó las semillas en los frascos con medio MS y se determino de manera visual la presencia de desarrollo micelial (hongos) o formación de colonias (bacterias), contando el total de plántulas con crecimiento microbiano.

2. En micro estacas.

- Longitud de brote cada 15 días. Se realizó la medición de las plántulas cada 15 días, y la diferencia entre la medida final e inicial fue el crecimiento.

$$C = Li - Lf$$

Donde: C : crecimiento.

Li : Longitud inicial.

Lf : Longitud final.

- Número de nudos. Por observación directa se contó el número de yemas axilares y apical que formaron las plantas en los periodos de evaluación y el resultado es el promedio de 10 micro estacas por tratamiento.
- Número de hojas. Se contó el número de hojas formadas por cada micro estaca durante el proceso de evaluación y los resultados son el promedio de 10 micro estacas por cada tratamiento.
- Número de raíces en micro estacas. Se realizo el conteo del número de raíces por micro estaca, y los resultados son el promedio de 10 individuos por cada tratamiento.
- Porcentaje de estacas con raíces (%). Se contó el número de raíces formadas por cada micro estaca y el resultado es el porcentaje de micro estacas con raíces.

$$\%ECR = \frac{NMCR}{NMS} \times 100$$

Donde: %MECR : Porcentaje de microestacas con raíces.

NMCR : Numero de microestacas con raíces.

NMS : Numero de microestacas sembradas.

- Porcentaje de estacas con callo (%). Se observó la presencia de tejido calloso en las plántulas y se determinó el porcentaje de formación de callos, siendo el resultado el porcentaje de estacas con callo.

$$\%C = \frac{NMC}{NMS} \times 100$$

Donde: %C : Porcentaje microestacas con callos.

NMS : Numero de microestacas sembradas.

NMC : Numero de microestacas con callos.

- Porcentaje de sobre vivencia de micro estacas (%).Se contó el número de microestacas sobrevivientes al final del experimento, y el resultado es el porcentaje microestacas sobrevivientes.

$$\%MS = \frac{NMM}{NMS} \times 100$$

Donde: %ME: Porcentaje de microestacas sobrevivientes.

NMM: numero de microestacas muertas.

NMS : numero de microestacas sembradas.

E. PROCEDIMIENTO.

1. Recolección y preparación de las semillas a utilizar.

1.1. Recolección de semillas

Las semillas fueron extraídas de árboles seleccionados con características fenotípicas superiores, provenientes de una plantación ubicada a 2 km. margen derecha de puerto Callao, en el distrito de Yarinacocha, provincia de Coronel Portillo, Región Ucayali, las cuales se cosecharon en el mes de octubre del año 2008, y se conservaron en una bolsa de papel dentro de un refrigerador para mantener su viabilidad hasta el día del trabajo en el laboratorio. Las semillas no fueron expuestas a ningún tipo de tratamiento pre germinativo.

1.2. Prueba de germinación.

Se escogieron las semillas al azar, y se colocaron en placas petri con algodón y agua. Se mantuvo humedecido durante una semana, y se contó el número de semillas germinadas en cada placa petri.

1.3. Desinfección de las semillas.

Para el procedimiento de desinfección se sumergieron las semillas en una concentración de alcohol de 96° por 60 segundos, y después se colocaron las semillas durante

40 min en hipoclorito de sodio al 2% con dos gotas de Tween 80 como detergente líquido, para mejorar la capacidad desinfectante del hipoclorito de sodio. Para ayudar a la homogenización del medio desinfectante se utilizó un agitador magnético. (Villegas. 2008)

Al finalizar el tiempo de inmersión de las semillas en el desinfectante, se enjuagó tres veces en agua estéril, con el fin de disolver los residuos del hipoclorito que puedan quedar en las semillas. Esto se realizó dentro de la cámara de flujo laminar justo antes de la siembra de las semillas en el medio de cultivo MS, para evitar en lo máximo la exposición de las semillas al medio ambiente.

1.4. Preparación del medio de cultivo para la germinación de las semillas.

La preparación del medio de cultivo se realizó en base a la constitución de sales de Murashige y Skoog (MS), más 1 gr. De Fitagel, también se agregó 7.5 gr. de sacarosa, las concentraciones se calcularon para un total de 250 ml de solución MS. Seguidamente el medio de cultivo se distribuyó equitativamente en 11 frascos de plástico (aproximadamente 22.73 ml por frasco), y se colocaron dentro del autoclave a 121°C, a 33Kg./cm², por 15 min., finalmente se dejó enfriar hasta que la solución se gelatinice y quede lista para la siembra de las semillas.

1.5. Siembra de las semillas asépticas en el medio MS.

Previa a la siembra se desinfectó las paredes de la cámara y los materiales a utilizar con alcohol 96°, la misma que se dejó encendida 30 min. Antes de empezar el proceso de siembra para eliminar los posibles vectores de contaminación existentes dentro de la cámara.

El proceso de siembra se realizó con la ayuda de una pinza previamente esterilizada, con la cual se colocaron 20 semillas para cada frasco, teniéndose al final del proceso 11 frascos con un total de 220 semillas. Una vez concluido este proceso se selló los frascos con cinta plástica y rotuló con lapicero de tinta indeleble de acuerdo al tratamiento correspondiente.

1.6. Acondicionamiento y evaluación de las semillas en la cámara de incubación.

Después de la siembra de las semillas dentro de la cámara de flujo laminar, los frascos fueron llevados a la cámara de incubación, donde se sometieron a condiciones de temperatura promedio de 25 °C e intensidad lumínica de 4000 lux (Villegas, 2008), durante dos meses, donde se evaluó los días a la germinación y el porcentaje de germinación de las semillas.

En condiciones *In Vitro* la germinación de semillas de bolaina se inició a los 6 días de sembradas, y finalizó luego de 12 días de iniciada, estos datos se aproximan a los obtenidos por Rojas (1991), quien afirma que bolaina blanca, inicia su proceso de germinación de 6 a 8 días con semillas frescas y finaliza a los 15 – 20 de iniciada. En la prueba de germinación en placas petri, el proceso de germinación se inició a los 3 días y finalizó a los 10 días, este menor tiempo requerido por las semillas para su germinación se debe a la mayor humedad existente en las placas petri en relación a los tubos de ensayo.

Con respecto al porcentaje de germinación, las semillas *In vitro* obtuvieron un 46.82%, mientras que en placas petri fue de 55%. En estos resultados se aprecia una disminución de 8.18% en el porcentaje de germinación de las semillas *In Vitro*, pudiéndose deber al efecto de la exposición al hipoclorito de sodio al 2% como sostiene Hartman (1995), quien señala que la desinfección requiere el empleo de materiales químicos que son tóxicos para los organismos pero relativamente inocuos para el material vegetal. Tanto la efectividad del tratamiento como el daño al tejido vivo aumentan como respuesta al tiempo-dosis, de manera que se debe buscar un equilibrio efectivo de esos factores.

De igual manera, Díaz (2000), afirma que el porcentaje de germinación en bolaina es de 65 % para semillas frescas, y con semillas almacenadas hasta 280 días es de 40 %, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la prueba de germinación.

1.7. Evaluación de contaminación y germinación.

Estas evaluaciones se realizaron a partir del tercer día de sembradas las semillas en los frascos con el medio MS, con la finalidad de determinar la presencia de estructuras fúngicas o crecimiento bacteriano y poder establecer el porcentaje de contaminación y germinación.

Al final del proceso de germinación se tuvo un total de 20 semillas con presencia de bacterias (estructuras acuosas), de un total de 220 sembradas, que equivale al 90.91 % de semillas libres de contaminación, este porcentaje se acerca a los obtenidos por Villegas (2008), con la misma especie, quien determinó que hacer actuar el hipoclorito de sodio al 2% durante 40 min genera 0% de contaminación. Se debe agregar que para autores como Maruyama *et al* (1996), el porcentaje obtenido es adecuado para el desarrollo de cultivos In Vitro quienes consiguieron entre 93 – 100 % de semillas asépticas con diferentes tipos de desinfectantes.

Las diferencias obtenidas en el porcentaje de semillas libres de contaminación deja en evidencia que la procedencia de las semillas y el trato que reciben al momento de ser cosechadas y transportadas juegan un papel importante en la asepsia de las mismas (Hartman. 1995), lo cual se refleja en la complejidad y efectividad para esterilizar el material genético.

2. El efecto de las auxinas (ANA y AIA) en el desarrollo de microestacas de Bolaina blanca.

2.1. Preparación del explante.

Una vez que las plántulas se desarrollaron hasta tener dos nudos o 2 cm de altura, se procedió a transplantarlas como micro estacas al nuevo medio de cultivo con las auxinas ANA y AIA, para esto se seleccionaron las 70 plántulas más vigorosas.

2.2. Preparación del medio de cultivo para la siembra de micro estacas.

Se preparó un litro de solución MS, más 4 gr. de fitage/litro, también se agregó 30 gr. de sacarosa y finalmente las auxinas ANA y AIA, en las concentraciones ya establecidas. Una vez terminada la preparación de los medios de cultivo se colocaron dentro del autoclave a 121°C, a 33Kg./cm², por 15 min, finalmente se dejó enfriar hasta que la solución se gelatinice y quede lista para usarse en la siembra de las micro estacas.

2.3. Obtención de micro estacas.

Para esto se colocó una por una las plántulas en una placa petri, y sujetándolas con la pinza se procedió a realizar el corte con el bisturí, de manera que se obtengan micro estacas con por lo

menos, 2 nudo o 2 cm. de longitud. Las mismas que se depositaron dentro de los tubos de ensayo que contienen el medio de cultivo con cada tratamiento. Los tubos de ensayo fueron rotulados de acuerdo al tratamiento correspondiente.

2.4. Acondicionamiento y evaluación de micro estacas en la cámara de incubación.

Se colocaron verticalmente los tubos de ensayo en recipientes de manera aleatoria, para que todos los tubos tuviesen iguales condiciones dentro de la cámara de incubación. Las evaluaciones del efecto de las auxinas ANA y AIA se realizó a partir de la segunda semana, y en adelante cada 15 días, por 2 meses.

F. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un Diseño Completo al Azar (DCR), con 4 tratamientos y 10 repeticiones, Cada unidad de observación estuvo conformado por una micro estaca. Esto se realizó para cada regulador de crecimiento en estudio (Acido Naftalén Acético, Acido Indol Acético), Se usó una prueba de promedio de Duncan a 0.05 de probabilidad. Los resultados fueron analizados por el programa de análisis estadístico conocido como SAS (stadistic analisis system), V 6.12.

Esquema del ANVA

Fuente de Variabilidad	Grados de libertad
Tratamiento	$(P - 1) = 3$
Error	$P (n - 1) = 36$
Total	$Pn - 1 = 39$

Donde: n = N° de repeticiones.

p = N° de tratamientos.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION.

A. RESULTADOS DEL ENSAYO CON ACIDO INDOL ACÉTICO EN CONCENTRACIONES DE 0, 1, 3 Y 6 PPM.

1. Longitud de brote

En el cuadro 02, se presentan los promedios para la variable longitud de brotes de bolaina a 1, 15, 30, 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de *In Vitro*, asimismo se presenta los resultados de la prueba de comparación de medias de Ducan

Cuadro 02. Comparación de medias para longitud de brote de bolaina tratada con AIA a 1, 15, 30, 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de *In Vitro*. Pucallpa, Perú, 2009.

Tratamiento	Longitud de Brote									
	1 día de desarrollo		15 días de desarrollo		30 días de desarrollo		45 días de desarrollo		60 días de desarrollo	
	Promedio (cm)	Significancia al 0,05%	Promedio (cm)	Significancia al 0,05%	Promedio (cm)	Significancia al 0,05%	Promedio (cm)	Significancia al 0,05%	Promedio (cm)	Significancia al 0,05%
Testigo	1,5170	a	1,7140	A	1,7960	a	1,7955	a	1,9195	a
1 ppm	1,2770	ba	1,4535	A	1,6890	a	1,7600	a	1,9922	a
3 ppm	1,3000	ba	1,5810	A	1,6825	a	1,7525	a	1,8035	a
6 ppm	1,1805	b	1,4750	A	1,4810	a	1,3580	a	1,3960	a

(*) Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

En el cuadro 02, se observa que en relación a la variable longitud de brotes de bolaina, no existe diferencia significativa entre las concentraciones de Ácido Indol Acético y el tratamiento testigo, obteniéndose un incremento de longitud de brote desde el día 1 hasta el 60 de 0.4025 cm para el testigo, 0.71 cm para el tratamiento 01, 0.5 cm para el tratamiento 02 y 0.22 cm para el tratamiento 03, siendo el tratamiento 01 el que muestra el mejor resultado, mientras que el tratamiento 03 es el que muestra el menor desarrollo, tal y como se evidencia en la figura 02, donde se observa que para todos los tratamientos no existió un incremento significativo en cuanto a la longitud de brotes de bolaina durante el periodo de evaluación. Esto indica que altas concentraciones de hormonas suprime el crecimiento longitudinal de las micro estacas.

Hurtado (1994), mencionó que un exceso de auxinas puede suprimir la división y/o el crecimiento celular. Por tanto, el balance auxina – citocinina es un factor importante en la regulación del crecimiento por alargamiento o por división, lo cual queda reflejado en este experimento ya que la longitud de brote decae al aumentar la cantidad de AIA.

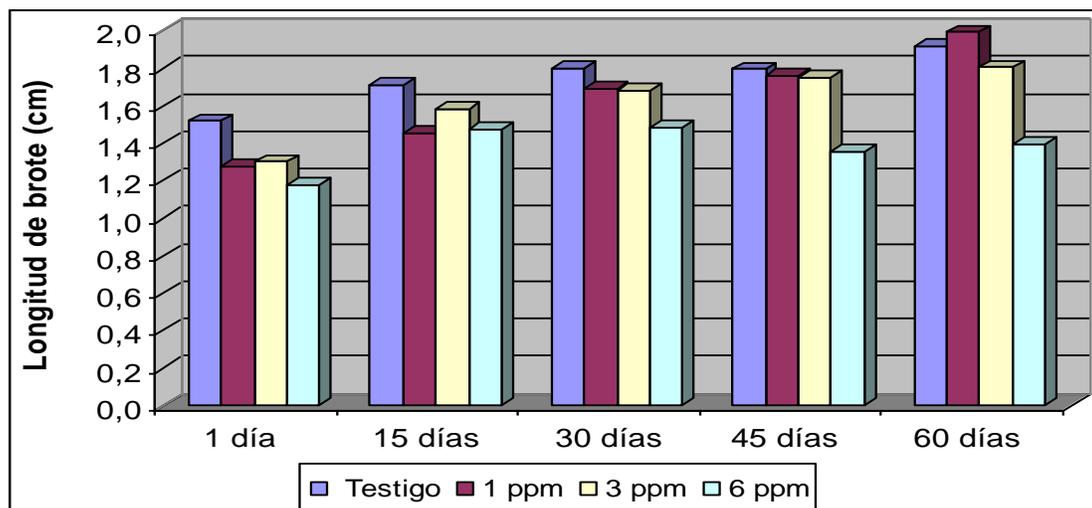


Figura 02. Longitud de brote de bolaina a 1, 15, 30, 45 y 60 días de sembrado en condiciones de *In Vitro*. Pucallpa, Perú, 2009.

2. Número de nudos

En el cuadro 03, se presentan los promedios y los resultados de la prueba de comparación de medias de Duncan para la variable número de nudos de bolaina a 1, 15, 30, 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de *In Vitro*.

Cuadro 03. Comparación de medias para número de nudos de bolaina tratada con AIA a 1, 15, 30, 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de *In Vitro*. Pucallpa, Perú, 2009

Tratamiento	NUMERO DE NUDOS									
	1 día de desarrollo		15 días de desarrollo		30 días de desarrollo		45 días de desarrollo		60 días de desarrollo	
	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%
Testigo	4,10	a	3,80	a	4,40	a	4,00	BA	4,90	a
1 ppm	3,80	a	3,90	a	4,20	a	4,80	A	5,50	a
3 ppm	4,40	a	3,50	a	2,80	ba	3,30	BA	3,30	a
6 ppm	3,70	a	3,20	a	2,40	b	1,90	B	3,20	a

(*) Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

De acuerdo a los resultados presentados en el cuadro precedente, no existe diferencia significativa con relación al número de nudos en las micro estacas de bolaina blanca sometidas a diferentes concentraciones de AIA. Se debe resaltar que existe un incremento promedio del

número de nudos en el periodo de tiempo de incubación de 1 a 60 días para el tratamiento testigo y el tratamiento 01 de 0.8 nudos y 1.7 nudos respectivamente, mientras que para el tratamiento 02 es de -1.1 nudos y para el tratamiento 03 de -0.5 nudos, siendo el tratamiento 01 el que mayor número de nudos formó, como se muestra en la figura 03.

En la figura 03, se observa que para todos los tratamientos no existió un incremento significativo en comparación al testigo para el número de nudos de bolaina durante el periodo de evaluación, se nota también que los tratamientos 02 y 03 muestran una disminución del promedio de número de nudos, lo cual se debe a que estos formaron mas callos y raíces que nudos.

Al respecto, Mejia (1992), indica que a concentraciones bajas de auxinas, los explantes tienden a formar tallos adventicios, y a medida que aumenta la concentración de auxinas tiende a formar raíces adventicias, lo cual es corroborado con los resultados del experimento, en donde las altas concentraciones de AIA (3 ppm y 6 ppm), genera altos porcentajes de callos y raíces adventicias que ocasiona la disminución del número de nudos.

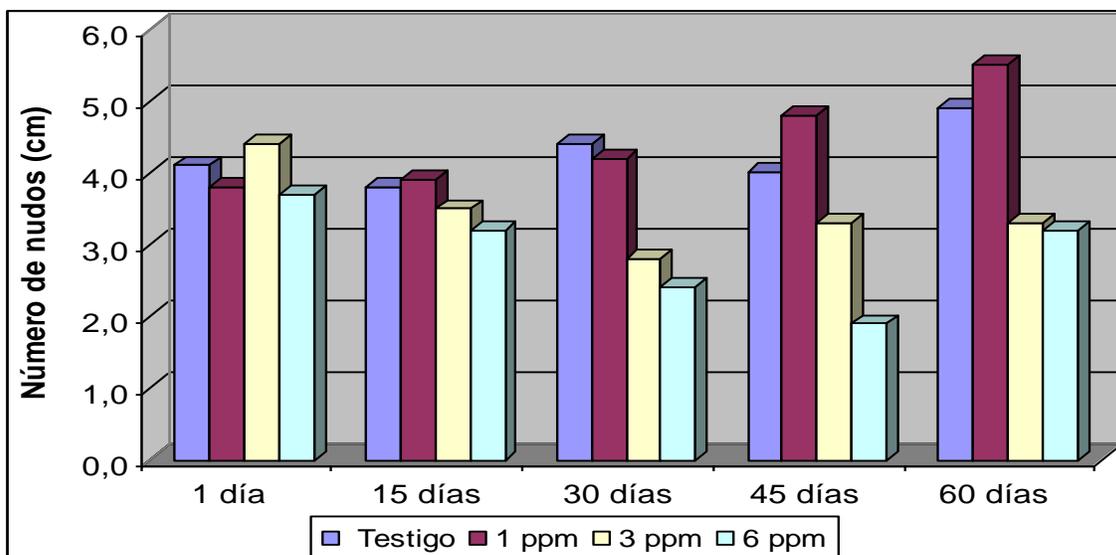


Figura 03. Número de nudos de bolaina a 1, 15, 30, 45 y 60 días de sembrado en condiciones de *In Vitro*. Pucallpa, Perú, 2009.

3. Número de hojas

El cuadro 04, contiene los promedios de número de hojas así como los resultados de la comparación de medias de Duncan de los explantes de bolaina blanca a 1, 15, 30, 45 y 60 días de sembrado en condiciones *In Vitro*.

Cuadro 4. Comparación de medias para número de hojas de bolaina tratada con AIA a 1, 15, 30, 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de *In Vitro*. Pucallpa, Perú, 2009

Tratamiento	NUMERO DE HOJAS									
	1 día de desarrollo		15 días de desarrollo		30 días de desarrollo		45 días de desarrollo		60 días de desarrollo	
	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%
Testigo	4,00	a	4,10	a	6,00	a	6,00	a	7,50	a
1 ppm	3,70	a	3,40	a	4,40	ba	5,50	a	6,30	ba
3 ppm	4,20	a	3,40	a	3,60	b	3,60	ba	4,00	ba
6 ppm	3,60	a	3,20	a	2,70	b	2,20	b	3,70	b

(*)Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

El cuadro 04, muestra el análisis de promedios para la variable número de hojas de bolaina, en el cual se determinó que el tratamiento 03 es el único tratamiento que difiere significativamente del testigo, donde el incremento del número de hojas es inversamente proporcional a la concentración de AIA. Obteniéndose el mayor incremento para el tratamiento testigo, que inicio con 4.0 hojas en promedio y concluyo con 7.5 hojas, el tratamiento 01 inicio con 3.7 hojas y concluyo con 6.3, el tratamiento 02 inicio con 4.2 hojas y termino con 4.0 y el tratamiento 03 inicio 3.6 hojas y concluyo con 3.7, denotándose que para algunas concentraciones en estudio se dio una perdida de hojas por defoliación de los explantes como se muestra en la figura 04, en esta figura se aprecia que el tratamiento testigo y el tratamiento 01 muestran un incremento positivo del número de hojas, mientras que el tratamiento 02 y 03 muestran una perdida de hojas por defoliación.

Hurtado (1994), menciona que el hecho que el cultivo requiera de auxinas exógenas no indica que los tejidos son incapaces de sintetizar sus propias auxinas, aunque se ha comprobado que en cultivos existe una habituación celular a la aplicación auxínica exógena, perdiéndose poder morfogénico por esta característica, lo que les permite acumularse y tener un periodo activo relativamente largo al aplicarlas exógenamente, pues tales auxinas quizá son mas estables debido a que existen pocos sistemas enzimáticos que los ataquen fácilmente, por lo que tienden a acumularse, al punto de llegar a ser tóxicos, esta afirmación se refleja en los

resultados obtenidos para la variable número de hojas, donde las altas concentraciones de AIA ocasiona la defoliación de los explantes.

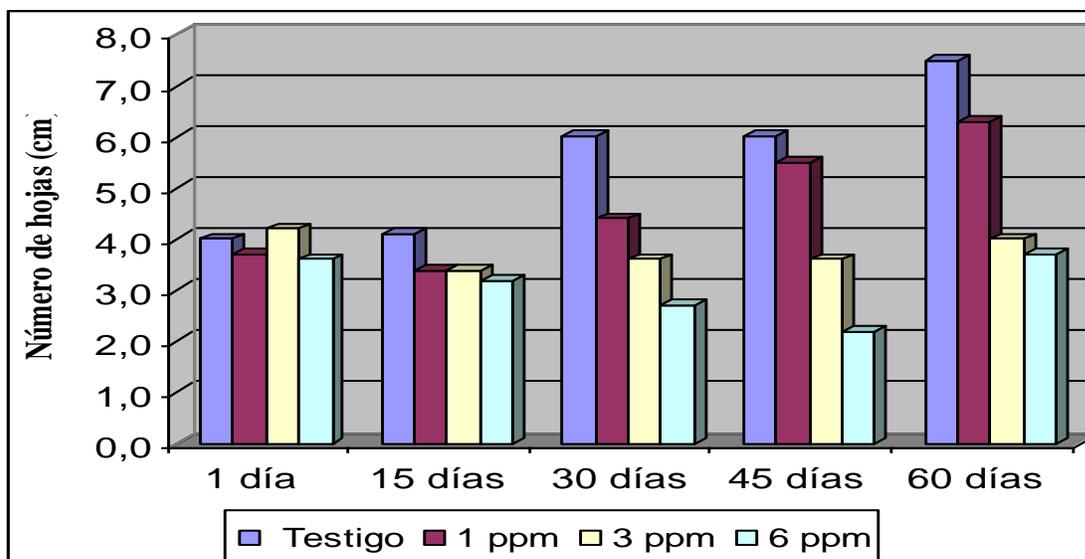


Figura 04. Número de hojas a los 1, 15, 30, 45 y 60 días de sembrado en condiciones de *In Vitro*. Pucallpa, Perú, 2009.

4. Número de raíces.

En el cuadro 05, se presentan los promedios de los tratamientos y resultados del análisis de promedios de Duncan correspondiente al número de raíces de bolaina a 15, 30, 45 y 60 días de sembrado en condiciones *In Vitro*.

Cuadro 05. Comparación de medias para número de raíces de bolaina tratada con AIA a 15, 30, 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de *In Vitro*. Pucallpa, Perú, 2009

Tratamientos	NUMERO DE RAICES							
	15 días de desarrollo		30 días de desarrollo		45 días de desarrollo		60 días de desarrollo	
	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%						
Testigo	0,70	a	1,60	a	1,60	a	2,00	a
1 ppm	0,00	b	1,40	a	2,80	a	3,50	a
3 ppm	0,10	b	1,70	a	3,80	a	4,30	a
6 ppm	0,10	b	3,80	a	6,70	a	4,40	a

(*)Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Se debe aclarar que como se trató de micro estacas los explantes no presentaron sistema radicular al inicio del cultivo, realizándose la primera evaluación de emisión de raíces a los 15 días y concluyéndose a los 60 días de desarrollo, encontrándose que no existe diferencia significativa entre las concentraciones de AIA y el testigo. El tratamiento testigo formó 2.0 raíces en promedio, el tratamiento 01 formó 3.5 raíces, el tratamiento 02 formó 4.3 raíces y el tratamiento 03 formó 4.4 raíces, siendo éste el tratamiento que formó mayor número de raíces, esto se observa en la figura 05 donde la mayor emisión de raíces se dio a los 45 días de desarrollo, a partir de allí el tratamiento 03 disminuye su promedio de formación de raíces, que podría relacionarse a la elevada acumulación de auxinas en las plántulas, ya que algunas plántulas se transformaron en callos, siendo los tratamientos con 3 y 6 ppm de AIA los que generaron mayor emisión de raíces a los 45 días y el tratamiento testigo el de menor, demostrando que hace falta una pequeña dosis de auxina para lograr un enraizamiento exitoso. En relación a esto, Pierik (1991), indica que con una baja concentración de auxinas predomina la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones de auxinas no se produce raíces, y tiene lugar, en cambio, a la formación de callos, que es justamente lo que ocasionó la disminución de raíces a partir del día 45 en el tratamiento 03, ya que la acumulación de auxinas produjo un aumento en el número de callos, reduciendo así el número de raíces.

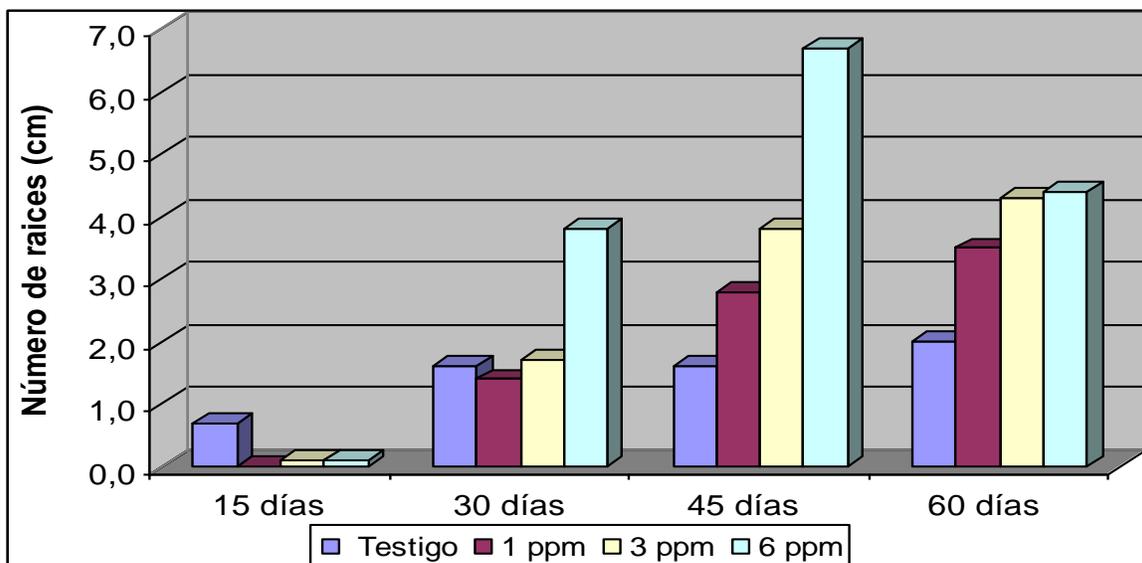


Figura 05. Número de Raíces a los 15, 30, 45 y 60 días de sembrado en condiciones de *In Vitro*. Pucallpa, Perú, 2009.

B. RESULTADOS DE ENSAYO CON CONCENTRACIONES DE ACIDO NAFTALEN ACÉTICO CON 0, 1, 3 Y 6 PPM.

1. Longitud de brote

En el cuadro 06, se presentan los promedios para la variable longitud de brotes de bolaina a 1, 15, 30, 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de *In Vitro*, asimismo se presenta los resultados de la prueba de comparación de medias de Ducan.

Cuadro 06. Comparación de medias para longitud de brote de bolaina tratada con ANA a 1, 15, 30, 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de *In Vitro*. Pucallpa, Perú, 2009.

Tratamiento	Longitud de Brote									
	1 día de desarrollo		15 días de desarrollo		30 días de desarrollo		45 días de desarrollo		60 días de desarrollo	
	Promedio (cm)	Significancia al 0,05%	Promedio (cm)	Significancia al 0,05%	Promedio (cm)	Significancia al 0,05%	Promedio (cm)	Significancia al 0,05%	Promedio (cm)	Significancia al 0,05%
Testigo	1,5170	a	1,7140	a	1,7960	a	1,7955	a	1,9195	a
1 ppm	1,0840	b	1,2400	b	1,5180	ba	1,3545	ba	1,2835	ba
3 ppm	1,0415	b	1,2230	b	1,3010	b	0,9645	b	0,7760	b
6 ppm	1,1075	b	1,2170	b	1,2430	b	1,1100	b	0,9760	b

(*) Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

En el cuadro 06, se observa que para la variable longitud de brotes de bolaina no existe diferencia significativa entre el tratamiento testigo y el tratamiento 01 (1ppm de ANA), mientras que los tratamientos 02 y 03 (3 y 6 ppm respectivamente) difieren negativamente con respecto al testigo, quedando demostrado que no es necesaria la aplicación de ANA para estimular la longitud de brote en esta especie. Como se tiene en el cuadro anterior el tratamiento testigo tuvo un incremento de 0.4025 cm, el tratamiento 01 tuvo un incremento de 0,1995 cm, mientras que el tratamiento 02 tuvo un decrecimiento de -0,2655 cm al igual que el tratamiento 03 con -0,1315 cm, como se muestra en la figura 06, donde el incremento en longitud de brote se da hasta el día 30 de desarrollo para todos los tratamientos, periodo a partir del cual los tratamientos con ANA empiezan a disminuir debido a que las plántulas empiezan a desarrollar callos, lo que no pasa con el testigo el cual continua su desarrollo.

Se puede decir que el cultivo *In Vitro* es generalmente imposible sin reguladores, pero esto depende del tipo de explante y de la especie vegetal. Por ejemplo, Otros explantes que producen suficiente cantidad de auxinas, no necesitan una cantidad adicional para conseguir la extensión y/o división (Pierek, 1991), por lo tanto se puede afirmar que la especie *Guazuma crinita* (bolaina), no necesita de auxinas para generar longitud de brote ya la especie produce suficientes auxinas para si misma, como se muestra en los resultados obtenidos en el cuadro 06, todas las concentraciones de ANA terminan desequilibrando la proporción auxínica de los explantes, quienes terminan reduciendo tu tamaño debido a la formación de tejido calloso.

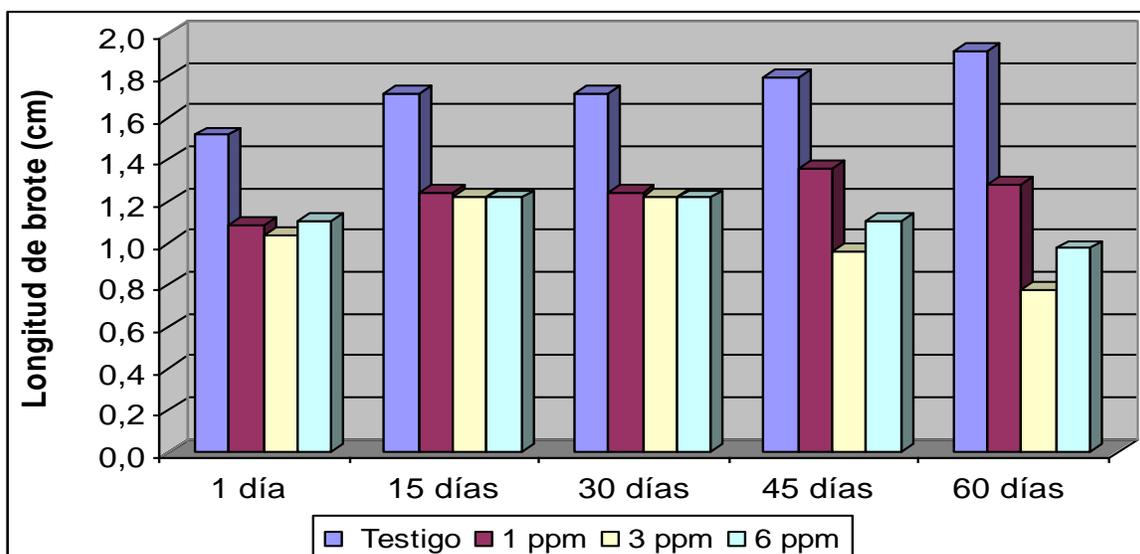


Figura 06. Longitud de brote de bolaina a 1, 15, 30, 45 y 60 días de sembrado en condiciones de *In Vitro*. Pucallpa, Perú, 2009.

2. Número de nudos

En el cuadro 07, se presentan los promedios y los resultados de la prueba de comparación de medias de Duncan para la variable número de nudos de bolaina a 1, 15, 30, 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de *In Vitro*.

Cuadro 07. Comparación de medias para número de nudos de bolaina tratada con ANA a 1, 15, 30, 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de *In Vitro*. Pucallpa, Perú, 2009.

Tratamiento	NUMERO DE NUDOS									
	1 día de desarrollo		15 días de desarrollo		30 días de desarrollo		45 días de desarrollo		60 días de desarrollo	
	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%
Testigo	4,10	a	3,80	a	4,40	a	4,00	a	4,90	a
1 ppm	3,20	b	3,10	ba	3,80	ba	2,80	ba	3,40	a
3 ppm	2,90	b	2,80	ba	2,40	b	1,80	b	1,20	b
6 ppm	3,00	b	2,60	b	2,00	b	1,20	b	1,20	b

(*)Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

En el cuadro 07 los tratamientos 02 y 03 son significativamente diferentes al testigo, mientras que el tratamiento 01, no lo es, observándose que a mayor concentración de ANA menor es la presencia de nudos, también se tuvo que en el periodo de 1 a 60 días para el tratamiento testigo y el tratamiento 01 el promedio de nudos fue de 0.8 y 0.2 respectivamente, mientras que para el tratamiento 02 fue de -1.7 nudos y para el tratamiento 03 de -1.8 nudos, siendo el tratamiento testigo el que mayor número de nudos formó, como se muestra en la figura 07.

Dieter (1980), asegura que el ANA es considerado como un homologo del AIA, Algunos estudios han demostrado que la estimulación del crecimiento vegetativo, que es la principal característica de las auxinas, puede derivar en inhibición si se eleva la frecuencia de aplicación o se supera el nivel adecuado para cada caso (sobredosis), que es justamente lo que pasa con los tratamientos 02 y 03, mientras que el tratamiento 01 mantiene su promedio.

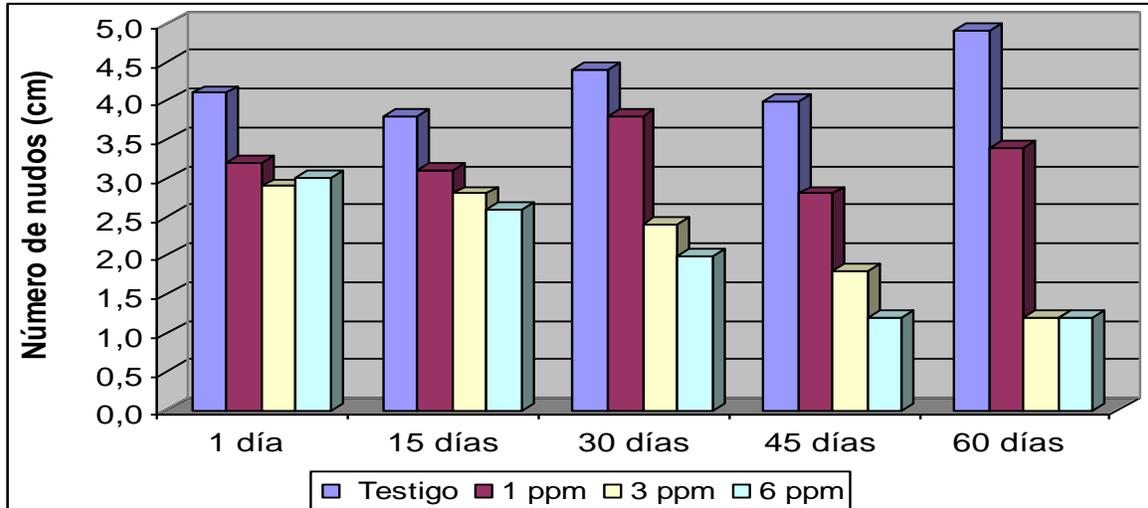


Figura 07. Número de nudos de bolaina a 1, 15, 30, 45 y 60 días de sembrado en condiciones de *in Vitro*. Pucallpa, Perú, 2009.

3. Número de hojas

El cuadro 08, contiene los promedios de número de hojas así como los resultados de la comparación de medias de Duncan de los explantes de bolaina blanca a 1, 15, 30, 45 y 60 días de sembrado en condiciones *In Vitro*.

Cuadro 08. Comparación de medias para número de hojas de bolaina tratada con ANA a 1, 15, 30, 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de *In Vitro*. Pucallpa, Perú, 2009.

Tratamientos	NUMERO DE HOJAS									
	1 día de desarrollo		15 días de desarrollo		30 días de desarrollo		45 días de desarrollo		60 días de desarrollo	
	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%
Testigo	4,00	a	4,10	a	6,00	a	6,00	a	7,50	a
1 ppm	2,70	b	3,00	b	4,10	ba	3,70	ba	3,90	b
3 ppm	2,70	b	2,40	b	2,40	b	2,70	b	1,30	c
6 ppm	2,70	b	2,40	b	2,00	b	1,40	b	1,30	c

(*)Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes

En el cuadro 08 se muestra el análisis de promedios para la variable número de hojas de bolaina, en el cual se determinó que todos los tratamientos difieren significativamente del testigo, ya que el incremento del número de hojas es inversamente proporcional a la concentración de ANA, como mencionó Pierik (1991), las altas concentraciones de auxinas tiene lugar a la formación de tejido calloso, lo cual disminuye el número de hojas por defoliación, notándose que la especie en estudio no necesita de ANA para formar nuevas hojas. En la figura 08, se aprecia claramente que el tratamiento testigo genera el mejor promedio para la variable número de hojas, mientras que los tratamientos 02 y 03 sufren pérdidas de hojas por defoliación debido a que algunas plántulas se volvieron estructuras callosas.

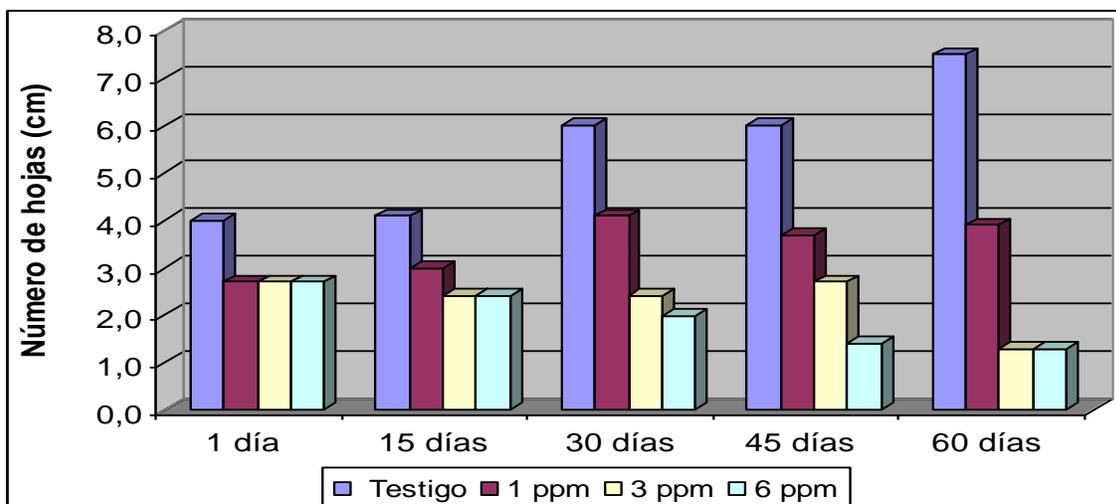


Figura 08. Número de hojas a los 1, 15, 30, 45 y 60 días de sembrado en condiciones de *In Vitro*. Pucallpa, Perú, 2009.

4. Número de raíces.

El cuadro 09, se presentan los promedios de los tratamientos y resultados del análisis de promedios de Duncan correspondiente al número de raíces bolaina a 15, 30, 45 y 60 días de sembrado en condiciones *In Vitro*.

Cuadro 09. Comparación de medias para número de raíces de bolaina tratada con ANA a 1, 15, 30, 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de *In Vitro*. Pucallpa, Perú, 2009

Tratamientos	NUMERO DE RAÍCES							
	15 días de desarrollo		30 días de desarrollo		45 días de desarrollo		60 días de desarrollo	
	Promedio (unidad)	Significancia al 0,05%						
Testigo	0,70	a	1,60	a	1,60	a	2,00	a
1 ppm	0,40	a	3,70	a	6,60	a	0,44	a
3 ppm	0,40	a	6,00	a	9,00	a	3,10	a
6 ppm	0,10	a	3,40	a	3,90	a	3,10	a

(*)Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

El cuadro 09 indica que la emisión de raíces inicia a los 15 días, y se incrementa hasta los 45 días de desarrollo, encontrándose que no existe diferencia significativa entre las concentraciones de ANA y el testigo, en donde se obtuvo al final del experimento que el tratamiento testigo formó 2.0 raíces en promedio, el tratamiento 01 formó 0.44 raíces, el tratamiento 02 y 03 formaron 3.1 raíces, siendo el tratamientos 02 el que formó mayor número de raíces en promedio, como se muestra en la figura 09, donde el punto óptimo para la emisión de raíces se dio a los 45 días de desarrollo, a partir de allí los tratamientos con ANA disminuyen su promedio debido a que algunas plántulas formaron tejido calloso en toda su estructura (toxicidad), siendo el tratamiento testigo el que mantiene una constante positiva en todo el proceso de incubación En este experimento queda demostrado que las concentraciones elevadas de ANA sobre la especie de *Guazuma crinita* (bolaina), genera actividad en la división celular, originando tejido calloso y la disminución del sistema radicular, tal y como lo describe Pierik (1991)

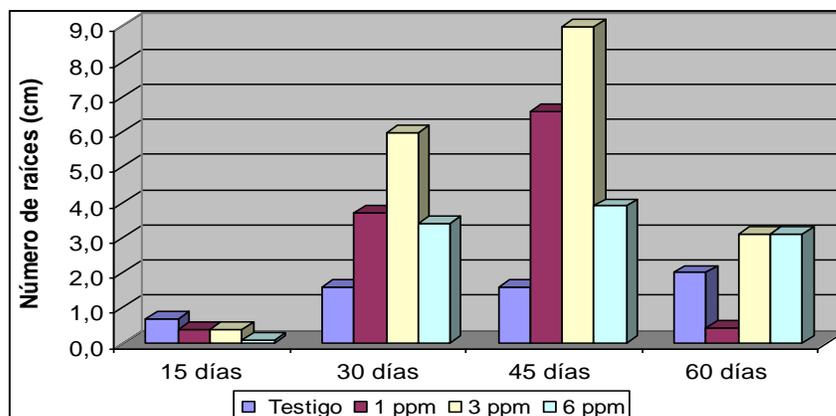


Figura 09. Porcentaje de explantes de bolaina que desarrollaron tejido radicular a 15 ,30. 45 Y 60 días de sembrado en condiciones de *In Vitro*. Pucallpa, Perú, 2009.

C. COMPARACIÓN DE RESULTADOS ENTRE AUXINAS Y EL TRATAMIENTO TESTIGO PARA EL PORCENTAJE DE ENRAIZAMIENTO, FORMACIÓN DE CALLOS Y SOBREVIVENCIA DE MICRO ESTACAS.

En el cuadro 10 se presenta la comparación de los resultados obtenidos al final del experimento para las variables de enraizamiento formación de cayos y sobrevivencia de los explantes.

Cuadro 10. Efecto de las concentraciones de auxinas y un tratamiento testigo en micro estacas obtenidas desde semillas de *Guazuma crinita Mart* germinadas asépticamente en medio MS. a 45 días de cultivo *in Vitro*. Pucallpa, Perú, 2009.

TRATAMIENTOS		ENRAIZAMIENTO (%)	FORMACION DE CALLOS (%)	SOBREVIVENCIA (%)
TESTIGO	0PPM	50	0	90
AIA	1 PPM	50	100	100
	3PPM	50	100	90
	6PPM	60	100	70
ANA	1 PPM	30	100	100
	3PPM	60	100	100
	6PPM	20	100	90

En el cuadro 10 se puede apreciar que el tratamiento testigo es el único que no cesa su desarrollo por causa de la formación de tejido calloso, y aunque mantenga una tasa de enraizamiento de solo 50%, los otros tratamientos no exceden el 60%, lo cual no representa una diferencia significativa en el análisis estadístico, hay que tener en cuenta que bajo condiciones mas controladas y utilizando diferentes medios de cultivos mas específicos para el enraizamiento de plantas leñosas (WPM), el máximo porcentaje que enraizamiento que consiguió Maruyama (1996), fue de 70% en medio sólido. Con respecto a al tasa de sobrevivencia el testigo alcanza un 90% mientras que los tratamientos con AIA van de 100 a 70% y los de ANA de 100 a 90%, tal y como se muestra en la figura 10.

En el cuadro 10 queda en evidencia que tanto el ANA y el AIA en concentraciones elevadas pueden estimular la actividad de división celular (SITTE *et al.* 2004), ya que en los resultados del presente trabajo todos los tratamientos presentaron formación de cayos, Así mismo también se comprueba lo mencionado por Pierik (1991), quien indicó que con una baja concentración de auxinas predomina la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones de auxinas no se produce Raíces, y tiene lugar, en cambio, a la formación de callos.

Hurtado (1994), mencionó sobre la toxicidad ocasionada por la acumulación de las auxinas aplicadas en concentraciones superiores a las requeridas, que muchas veces puede llegar a matar a los explantes, como se aprecia en el presente experimento, donde a mayor concentración de AIA, mayor es el porcentaje de mortandad, además Calderon (2005), mencionó que el ANA es mas estable que el AIA y por lo tanto mas eficaz, lo cual explica por que la tasa de enraizamiento con ANA decae en 6 ppm, ya que la plántula lo asimila mejor y desequilibra con mas fuerza el balance auxínico.

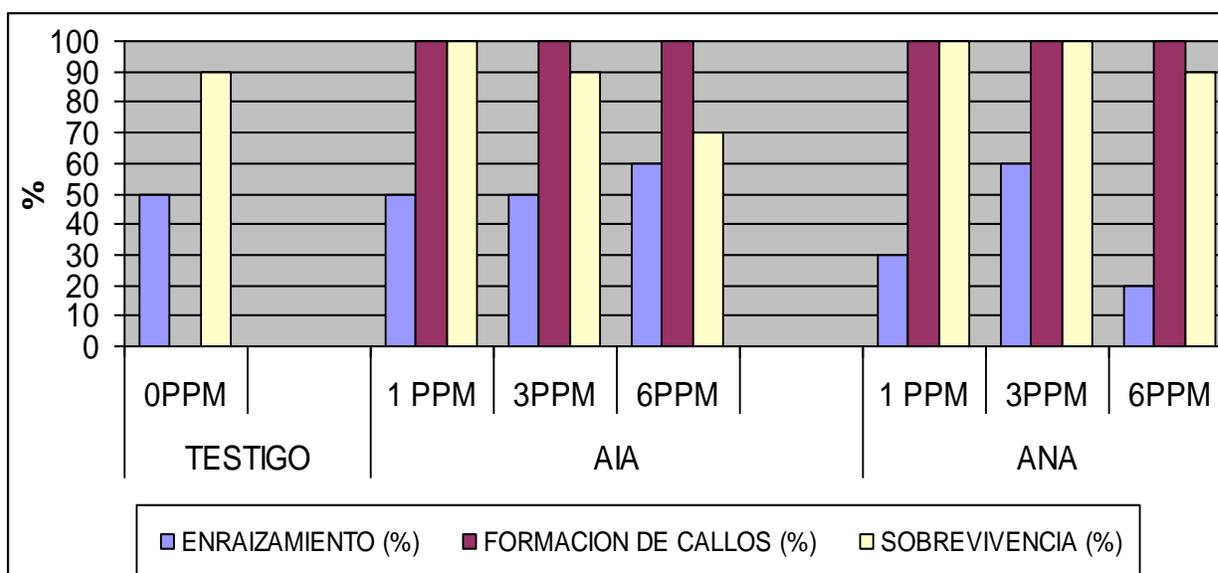


Figura 10. Comparación de las tasa de enraizamiento, formación de callos y sobre vivencia de los explantes sembrados en condiciones *In Vitro*. Pucallpa, Perú, 2009

V. CONCLUSIONES.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se tiene las siguientes conclusiones:

1. Para los tratamientos con Acido Indol Acético y Acido Naftalén Acético, en las variables longitud de brote, número de nudos y número de hojas, se concluye que no existe diferencia significativa con relación al tratamiento testigo, en la propagación por microestacas de *Guazuma crinita*, Mart. (bolaina blanca), el cual logró un incremento promedio de 0.4025 cm de altura, 08 nudos y 3,5 hojas a los 60 días de desarrollo.
2. Con relación al numero de raíces, las concentraciones de Acido Indol Acético y Acido Naftalén Acético, muestra diferencia significativa favorable con relación al tratamiento testigo a los 45 días de desarrollo en la propagación por micro estacas de *Guazuma crinita* Mart. Donde los tratamientos 03 con AIA y 02 con formaron 6.7 y 9.0 raíces en promedio respectivamente.

VI. RECOMENDACIONES

En relación a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación se recomienda lo siguiente:

1. Descartar el uso de AIA en la propagación por microestacas de *Guazuma crinita* Mart. y probar con concentraciones menores a 0.1 ppm de ANA y otras auxinas como Bencil Amino Purina (BAP).
2. Hacer experimentos utilizando woody plant medium (WPM), con y sin auxinas, ya que Murashige and Skoog (MS), no produjo influencias favorables en el cultivo por microestacas de *Guazuma crinita* Mart.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. **ÁLVAREZ, Y. 2006.** Aspectos generales del cultivo “in Vitro” en plantas. México. En línea: <http://fbio.uh.cu/webfv/docencia/mediocultivos.ppt>
2. **BARCELO C. 2001.** Fisiología Vegetal. Editorial Anaya S.A.C. Madrid – España. Pág. 298
3. **CALDERON, E. 2005.** II curso basico de multiplicación de plantas. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Andalucía-España. En línea: <http://www.juntadeandalucia.es/innovacioncienciayempresa/ifapa/servlet/FrontController?accion=DownloadS&table=555&element=20263&field=DOCUMENTO>.
4. **CALZADA, J. 1980.** 143 frutales nativos. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. Perú. 320 p.
5. **CLOSAS L; CUEVA R; LLOP J . 1999.** Cultivo In Vitro. Universidad de Lleida-España. En línea: <http://www.etsea2.udl.es/invitro/indice.htm>
6. **COTESU. 1989.** Silvicultura de la Bolaina blanca. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima – Perú. Pp. 37
7. **DIAZ. J. 2000.** Posibilidades para el manejo de la regeneración Natural de Bolaina y Capirona en cultivos agrícolas abandonados de la Amazonía peruana. En Memoria de VII Congreso Nacional Forestal, Colegio de Ingenieros del Perú (CIP) – Universidad Nacional de Ucayali (UNU) Pucallpa – Perú. p. 119 – 120
8. **DIETER H. 1980.** Fisiología Vegetal. Ediciones Omega. Barcelona España. Pág. 240
9. **ENCARNACION, F. 1983.** Nomenclatura de las especies forestales comunes en el Perú. Proyecto PNUD/FAO/PER/81/002. Documento de trabajo N° 07 Lima 150 p.
10. **ERSTON V. 1967.** Fisiología Vegetal. Editorial Hispano Americano. México. Pág. 240
11. **FLORES Y FOLLAJES DEL CARIBE S.A. (FFC). 2008.** LA MICROPROPAGACION. Costa Rica. En línea: <http://www.agrobiot.com/faq.php>
12. **FONT QUER. 1978.** Botánica Pintoresca. Editorial Ramón Sopena. Barcelona-España. Pág.717
13. **HARTMAN, Hudson. 1995.** Propagación de plantas. Compañía Editorial Continental S.A. Cuarta impresión. México. Pág. 85.

14. **HURTADO, Daniel.** 1994. Cultivo De Tejidos Vegetales. Editorial Trillas S.A. Tercera Reimpresión. México. Pág. 32.
15. **INRENA.** 2007. La deforestación en el Perú. Instituto nacional de recursos naturales. Pucallpa. Perú. En línea: www.inrena.gob.pe
16. **IPEF 2008.** Instituto De Pesquisas E Estudos, noticias. Publicación N° 195. En línea: [www. Ipef.br/publicacoes/](http://www.Ipef.br/publicacoes/)
17. **MARUYAMA E; KATSUAKI I; KINOSHITA I. (1996).** Micropropagation of Bolaina Blanca (*Guazuma crinita* Mart), a fast – growing tree in the Amazon Region. Artículo científico. University of tsukuba. Japan. 7 Pág.
18. **MARUYAMA E; KATSUAKI I; KINOSHITA I; KIHACHITO O. (1997).** Micropropagation of *Guazuma crinita* Mart. By root and petiole culture. Artículo científico. Facultad de Agricultura de Japon. 6 Pág.
19. **MEJIA R. 1992.** Alternativas de equipamiento de laboratorio in Vitro y técnicas de micro propagación de plantas. Serie didáctica. Manual técnico 0.2/3.1-N°7 -92. Lima-Perú.
20. **MURASHIGE, T. AND F. SKOOG. 1978.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. Phisiol. Plant. 15.p. 173-197
21. **LAO, M. 1972.** Manual de identificación de especies forestales. Jenaro Herrera - Iquitos - Perú. 202 p.
22. **LUCAS C. 2002.** Principio de Propagación de Plantas. Artículo Científico. Chosica-Perú. En Línea: <http://www.cannabiscave.net/foros/showthread.php?t=14307>
23. **PALOMINO, J.2003.** Especies forestales nativas con potencial Para Reforestación en La provincia de Oxapampa y fichas técnicas de las especies de mayor Prioridad. Pro Naturaleza - Oxapampa Pág. 59-66
24. **PARRA R. 2002.** Revista Biología Ciencias experimentales y de la salud. México, p: 1-11.en línea: <http://www.google.com.pe/search?hl=es&q=como+se+obtiene+el+AIA&start=10&sa=N>.
25. **PIERIK, R. 1991.** Cultivo In Vitro De Las Plantas Superiores. Editorial Mundi – Prensa. Madrid – España.

26. **RODRIGUEZ, R. M.; SIBILLE, M. A. 1996.** Manual de Identificación de Especies Forestales de la sub. Región Andina. Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) –Lima – Perú, 110 – 113 p.
27. **ROJAS C. (1991).** Germinación de 14 especies forestales en San Ramón. INIAA – GTZ. Documento N° 67. San Ramón, Chamchamayo. 41 p.
28. **ROSELL P. 1990:** Fundamento Teórico – Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales. FAO. Roma.
29. **SALISBURY F.B.; C.W. ROSS. 2000.** Fisiología de las plantas. Paranifo Thomson Learning. Madrid.
30. **SICA.1998.** La Micropropagación como Herramienta para la Producción Vegetal. En línea: <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/>
31. **SITA, L. 1981.** Tissue culture of Eucaliptus Species. COSTER Symp. On Tissue culture of Economically Important Plants. Ed A.N. Rao. Pág. 180-183 Singapore.
32. **SITTE P.; E. W. WEILER; J.W. KADEREIT; A. BRESINSKY. 2004.** STRASBURGUER: Tratado de Botánica. Ediciones Omega. 35. Barcelona.
33. **TAQUIRE. 1987.** Variación de las propiedades físicas y comportamiento al cepillado, moldurado, taladrado y lijado de *Guazuma crinita* Mart. (Bolaina blanca), en Pucallpa.
34. **TORRES A; LÓPEZ A; JIMENES J . (1998).** Micro propagación de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) Como herramienta para su manejo. Facultad de ciencias biológicas y agropecuarias de la universidad de Veracruz. En línea: http://www.colpos.mx/cveracruz/SubMenu_Publi/Avances2004/Micropropagaci%F3n_de_cedro_rojo.html#_ftnref1
35. **TRUCIOS, T. 1986.** Calendario Fonológico Para 55 Especies Forestales del Bosque Nacional Alexander Von Humbold. Infor-COTESU. Pucallpa-Perú. Pág. 26.
36. **VIDAURE, H. 1992.** Análisis de las características del sitio que prefiere la regeneración natural de *Cedrelinga catenaeformis* Duke".Tornillo". Tesis para optar el título de Ingeniero Forestal. Lima. Perú. CENFOR XII. Proyecto de capacitación y divulgación forestal. Doc. de trab. N° 4. Pucallpa. 34 p.
37. **VILLEGAS P. 2008.** Efecto del tiempo de exposición del hipoclorito de sodio sobre la germinación de semillas de bolaina (*Guazuma crinita*, Mart.). Informe científico. UNU-FCA. Pucallpa-Perú. 7 Pág.

PAGINAS WEB

- <http://www.efn.uncor.edu/dep/biología/intrbiol/giberelinas.htm#crecimie> nto. Consultado el 05/04/09
- <Http://Es.Wikipedia.Org/Wiki/Fitohormona>. Consultado el 07/04/09.

VIII. ANEXOS

ANEXO 01. ANVA DEL ENSAYO CON CONCENTRACIONES DE ACIDO INDOL ACETICO.

LONGITUD DE BROTE.

Cuadro 11. ANVA para la variable longitud de brote a 1 día de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	1,2799	0,1067	1,48	0,191
Error	27	1,9413	0,0719		
Total	39	3,2211			

C.V. = 20,33495

Cuadro 12. ANVA para la variable longitud de brote a 15 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	0,8568	0,0714	0,96	0,5073
Error	27	2,0079	0,0744		
Total	39	2,8646			

C.V. = 17,52720

Cuadro 13. ANVA para la variable longitud de brote a 30 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	1,7769	0,1481	1,13	0,3804
Error	27	3,5495	0,1315		
Total	39	5,3263			

C.V. = 21,81400

Cuadro 14. ANVA para la variable longitud de brote a 45 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	1,2795	0,4265	1,62	0,2026
Error	27	9,4991	0,2639		
Total	39	10,7787			

C.V. = 30.82377

Cuadro 15. ANVA para la variable longitud de brote a 60 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	6,2688	0,5224	1,33	0,2603
Error	27	10,6261	0,3936		
Total	39	16,8949			

C.V. = 35,28768

NUMERO DE NUDOS

Cuadro 16. ANVA para la variable número de Nudos a 1 día de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	5	0,41666667	0,26	0,9909
Error	27	43	1,59259259		
Total	39	48			

C.V. = 31,54949

Cuadro 17. ANVA para la variable número de Nudos a 15 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	22,6	1,88333333	0,96	0,5078
Error	27	53	1,96296296		
Total	39	75,6			

C.V. = 38,91827

Cuadro 18. ANVA para la variable número de Nudos a 30 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	60,8	5,06666667	1,73	0,1155
Error	27	79,1	2,92962963		
Total	39	139,9			

C.V. = 49,61206

Cuadro 19. ANVA para la variable número de Nudos a 45 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	90,9	7,575	1,39	0,23
Error	27	147,1	5,44814815		
Total	39	238			

C.V. = 66,68934

Cuadro 20. ANVA para la variable número de Nudos a 60 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	170,1	14,175	1,83	0,0933
Error	27	208,875	7,7361		
Total	39	378,975			

C.V. = 65,83163

NUMERO DE HOJAS

Cuadro 21. ANVA para la variable número de hojas a 1 día de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	4,9000	0,4083	0,25	0,9921
Error	27	43,4750	1,6102		
Total	39	48,3750			

C.V. = 32,74660

Cuadro 22. ANVA para la variable número de hojas a 15 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	22,4000	1,8667	0,98	0,4932
Error	27	51,5750	1,9102		
Total	39	73,9750			

C.V. = 39,20835

Cuadro 23. ANVA para la variable número de hojas a 30 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	115,9000	9,6583	1,76	0,1076
Error	27	147,8750	5,4769		
Total	39	263,7750			

C.V. = 56,05431

Cuadro 24. ANVA para la variable número de hojas a 45 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	178,3000	14,8583	1,71	0,12
Error	27	234,4750	8,6843		
Total	39	412,7750			

C.V. = 68,13657

Cuadro 25. ANVA para la variable número de hojas a 60 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	290,3000	24,1917	1,8	0,1
Error	27	363,0750	13,4472		
Total	39	653,3750			

C.V. = 68,22410

NÚMERO DE RAÍCES.

Cuadro 26. ANVA para la variable número de Raíces a 15 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	4,8000	0,4000	1,75	0,1109
Error	27	6,1750	0,2287		
Total	39	10,9750			

C.V. = 212,5466

Cuadro 27. ANVA para la variable número de Raíces a 30 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	272,0000	22,6667	1,24	0,3063
Error	27	492,3750	18,2361		
Total	39	764,3750			

C.V. = 200,9589

Cuadro 28. ANVA para la variable número de Raíces a 45 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	142,275	47,425	1,14	0,3466
Error	27	1499,7	41,658		
Total	39	1641,975			

C.V. =173.2705

Cuadro 29. ANVA para la variable número de Raíces a 60 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	406,3000	33,8583	0,51	0,89
Error	27	1.793,6000	66,4296		
Total	39	2.199,9000			

C.V. = 229,5898

**ANEXO 02. ANVA DEL ENSAYO CON CONCENTRACIONES DE ACIDO
NAFTALEN ACETICO.**

LONGITUD DE BROTE.

Cuadro 30. ANVA para la variable longitud de brote a 1 día de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	2,3479	0,1957	5,49	0,0001
Error	27	0,9626	0,0357		
Total	39	3,3106			

C.V. = 15,90060

Cuadro 31. ANVA para la variable longitud de brote a 15 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	2,7972	0,2331	6,57	0,0001
Error	27	0,9579	0,0355		
Total	39	3,7551			

C.V. = 13,96759

Cuadro 32. ANVA para la variable longitud de brote a 30 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	3,0251	0,2521	2,11	0,0524
Error	27	3,2260	0,1195		
Total	39	6,2511			

C.V. = 23,60260

Cuadro 33. ANVA para la variable longitud de brote a 45 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	7,4116	0,6176	1,63	0,1416
Error	27	10,2278	0,3788		
Total	39	17,6394			

C.V. = 47,12208

Cuadro 34. ANVA para la variable longitud de brote a 60 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	9,2734	0,7728	1,35	0,2514
Error	27	15,5093	0,5744		
Total	39	24,7828			

C.V. = 61,18305

NÚMERO DE NUDOS.

Cuadro 35. ANVA para la variable número de Nudos a 1 día de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	14,4000	1,2000	1,47	0,1952
Error	27	22,0000	0,8148		
Total	39	36,4000			

C.V. = 27,35366

Cuadro 36. ANVA para la variable número de Nudos a 15 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	30,8000	2,5667	1,93	0,077
Error	27	35,9750	1,3324		
Total	39	66,7750			

C.V. = 37,53820

Cuadro 37. ANVA para la variable número de Nudos a 30 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	82,3000	6,8583	1,84	0,092
Error	27	100,8000	3,7333		
Total	39	183,1000			

C.V. = 61,33916

Cuadro 38. ANVA para la variable número de Nudos a 45 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	68,0000	5,6667	1,56	0,163
Error	27	97,9000	3,6259		
Total	39	165,9000			

C.V. = 77,72189

Cuadro 39. ANVA para la variable número de Nudos a 60 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	134,8000	11,2333	2,86	0,011
Error	27	105,9750	3,9250		
Total	39	240,7750			

C.V. = 74,06210

NÚMERO DE HOJAS.

Cuadro 40. ANVA para la variable número de hojas a 1 día de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	16,9000	1,4083	1,26	0,294
Error	27	30,0750	1,1139		
Total	39	46,9750			

C.V. = 34,88957

Cuadro 41. ANVA para la variable número de hojas a 15 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	39,0000	3,2500	2,44	0,0266
Error	27	35,9750	1,3324		
Total	39	74,9750			

C.V. = 38,79998

Cuadro 42. ANVA para la variable número de hojas a 30 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	164,2000	13,6833	2,26	0,038
Error	27	163,1750	6,0435		
Total	39	327,3750			

C.V. = 67,81674

Cuadro 43. ANVA para la variable número de hojas a 45 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	195,2000	16,2667	2,51	0,023
Error	27	174,7000	6,4704		
Total	39	369,9000			

C.V. = 73,73021

Cuadro 44. ANVA para la variable número de hojas a 60 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	324,9000	27,0750	4,13	0,001
Error	27	177,1000	6,5593		
Total	39	502,0000			

C.V. = 73,17443

NÚMERO DE RAÍCES.

Cuadro 45. ANVA para la variable número de Raíces a 15 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	7,9000	0,6583	1,52	0,1777
Error	27	11,7000	0,4333		
Total	39	19,6000			

C.V. = 164,5701

Cuadro 46. ANVA para la variable número de Raíces a 30 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	489,9000	40,8250	1.12	0.3870
Error	27	986,8750	36,5509		
Total	39	1.476,7750			

C.V. = 164.5098

Cuadro 47. ANVA para la variable número de Raíces a 45 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	905,0000	75,4167	0,9	0,5593
Error	27	2.264,9750	83,8880		
Total	39	3.169,9750			

C.V. = 173,6310

Cuadro 48. ANVA para la variable número de Raíces a 60 días de desarrollo.

Fuente de variabilidad	G.L	S.C	C.M	Fc	Pr>F
Tratamiento	12	630,7791	52,5649	1,8	0,101
Error	27	757,5799	29,1377		
Total	39	1.388,3590			

C.V. = 244,7900

ANEXO 3. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES MADRES

La solución salina MS (Murashige & Skoog), se preparó de la siguiente manera:

MACRONUTRIENTES (10 x)

HNO ₃	19,00 g/L
NH ₄ NO ₃	16,50
CaCl ₂ . 2H ₂ O.....	4,40
MgSO ₄ . 7 H ₂ O.....	3,70
KH ₂ PO ₄	1,70

Refrigerar a 4 °C aproximadamente

Fe – EDTA (100 x)

Fe ₂ SO ₄ . 7 H ₂ O.....	2,78 g/L
EDTA.Na ₂	3,73

Refrigerar a 4 °C aproximadamente

MICRONUTRIENTES (1000 x)

KI.....	0,830 g/L
H ₃ BO ₃	6,20
MnSO ₄ . 4H ₂ O.....	22,30
ZnSO ₄ . 7H ₂ O.....	8,60
Na ₄ Mo. 2H ₂ O.....	0,250
CuSO ₄ . 5H ₂ O.....	0,025
CoCl ₂ . 6H ₂ O.....	0,025

Refrigerar a 4 °C aproximadamente

COMPUESTOS ORGÁNICOS (100 x)

Glicina.....	0,20 g/L
M – Inositol.....	10,00
Acido Nicotínico.....	0,50
Piridoxina.....	0,05
Tiamina.....	0,01

Refrigerar a 4 °C aproximadamente

ANEXO 4. PRERARACION DE MEDIO DE CULTIVO MS.

Cuadro 49. Preparación de medio de cultivo para semillas

Compuestos	Fase Introducción
Sol. Macronutrientes 10 x	100 ml
Sol. Micronutrientes 1000 x	1 ml
Sol. Fe – EDTA 100 x	10 ml
Sol Comp. Orgánicos 100 x	10 ml
Sacarosa	30 g
Fitagel	4 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Cuadro 50. Preparación de medio de cultivo para el ensayo de concentración con Acido Indol Acético.

Compuestos	Tratamiento	Tratamiento	Tratamiento
	01	02	03
Sol. Macronutrientes 10 x	100 ml	100 ml	100 ml
Sol. Micronutrientes 1000 x	1 ml	1 ml	1 ml
Sol. Fe – EDTA 100 x	10 ml	10 ml	10 ml
Sol Comp. Orgánicos 100 x	10 ml	10 ml	10 ml
Sacarosa	30 g	30 g	30 g
Fitagel	4 g	4 g	4 g
AIA a 1000 ppm	1 ml	3 ml	6 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml	1000 ml	1000 ml

Cuadro 51. Preparación de medio de cultivo para el ensayo de concentración con Acido Naftalén Acético

Compuestos	Tratamiento	Tratamiento	Tratamiento
	01	02	03
Sol. Macronutrientes 10 x	100 ml	100 ml	100 ml
Sol. Micronutrientes 1000 x	1 ml	1 ml	1 ml
Sol. Fe – EDTA 100 x	10 ml	10 ml	10 ml
Sol Comp. Orgánicos 100 x	10 ml	10 ml	10 ml
Sacarosa	30 g	30 g	30 g
Fitagel	4 g	4 g	4 g
ANA a 1000 ppm	1 ml	3 ml	6 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml	1000 ml	1000 ml

IX. ICONOGRAFIA



Figura 11. Fruto y semillas de bolaina.



Figura 12. Germinación *in Vitro* de semillas de bolaina



Figura 13. Explante de bolaina sin auxinas.

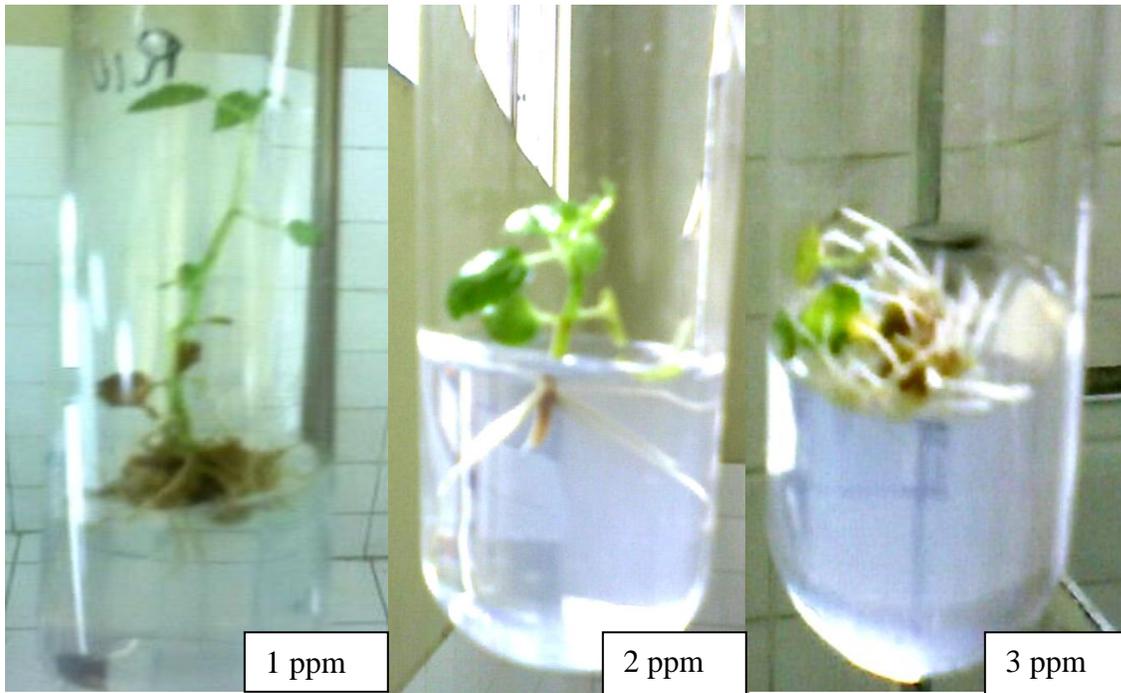


Figura 14. Explantes desarrollándose en condiciones In Vitro en diferentes concentraciones de Acido Indol Acético.

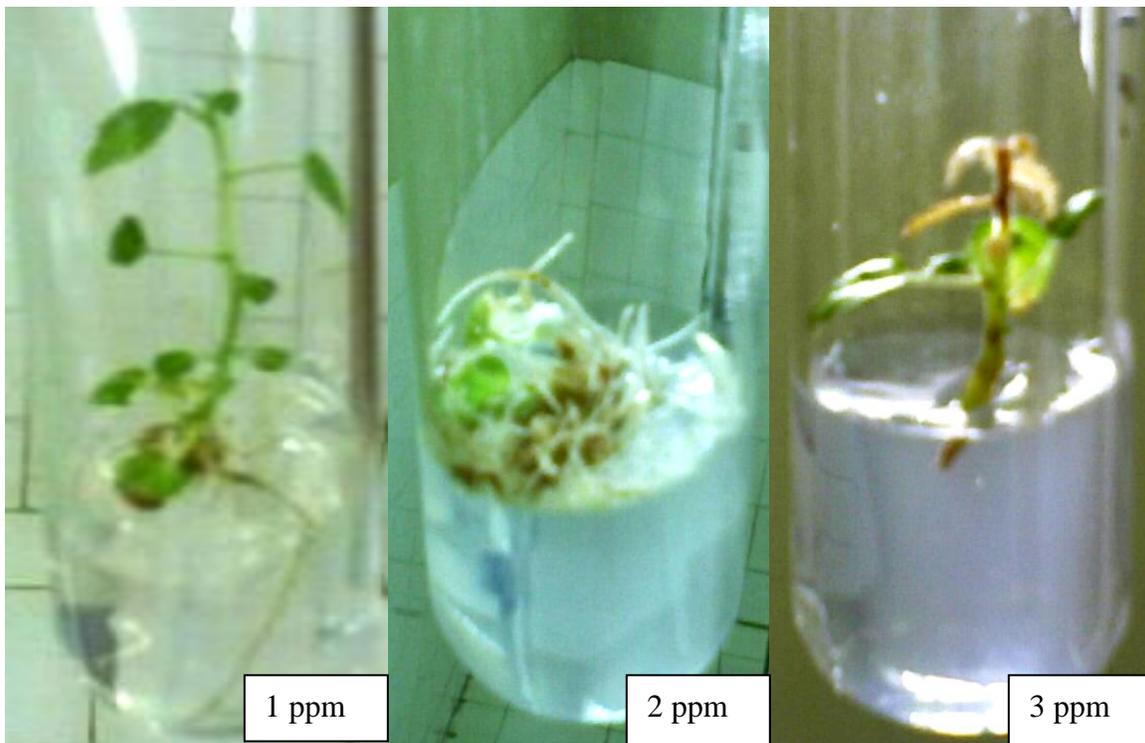


Figura 15. Explantes desarrollándose en condiciones In Vitro en diferentes concentraciones de Acido Naftalén Acético.