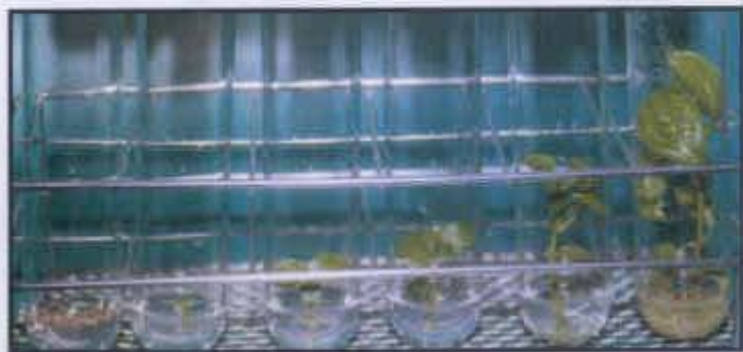




Instituto Nacional de Investigación Agraria

Propagación y Conservación in vitro de la Uña de Gato *Uncaria spp.*



Estación Experimental San Roque

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION AGRARIA

ESTACION EXPERIMENTAL SAN ROQUE

PROPAGACION Y CONSERVACION
***in vitro* DE LA UÑA DE GATO**
Uncaria spp.

Ing. Sergio F. Pinedo Freyre

Serie
Manual N° 02-00

Lima - Perú
Febrero, 2000

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGRARIA - INIA
DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION AGRARIA
DIRECCION GENERAL DE TRANSFERENCIA DE TECNOLOGIA AGRARIA

Coordinador - Editor:

Carlos Córdova Tafur
Ana Saldaña Sánchez

Revisión:

Jefe Programa-Comité Central de Edición y Publicaciones

Colaborador:

Francis Martínez Borbor

Diagramación e Impresión:

Proyecto de Producción de Medios de Comunicación y Transferencia

Primera Edición:

Febrero, 2000
Tiraje: 1 000 ejemplares

Se prohíbe la reproducción total o parcial del contenido

CONTENIDO

INTRODUCCION	6
GENERALIDADES: CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	8
Aplicaciones del cultivo de tejidos	9
Características principales de la micropropagación	9
Ventajas de la propagación <i>in vitro</i>	10
Desventajas de la propagación <i>in vitro</i>	10
Fases de la propagación <i>in vitro</i>	11
Medios de cultivo.....	14
Propagación <i>in vitro</i>	15
Propagación convencional	16
ASPECTOS GENERALES SOBRE LAS ESPECIES	17
Clasificación taxonómica.....	17
Sinónimo botánico	17
Nombres comunes o vernaculares	17
Distribución	18
Descripción botánica del género <i>uncaria</i>	19
Características ecológicas	20
Características silviculturales	21

Situación poblacional.....	21
Investigación fitoterapéutica, química y farmacológica	22
Diferencias botánicas <i>U. guianensis</i> y <i>U. tomentosa</i>	24
Estudios fitoquímicos <i>U. guianensis</i> y <i>U. tomentosa</i>	24
MATERIALES Y METODOS	26
Localización del estudio	26
Materiales, equipos, reactivos y desinfectantes	26
Metodología	28
Preparación de solución stock de M&S 1962	28
Medio de cultivo	29
Procedimiento para preparar medio de cultivo	30
Material vegetal de propagación	31
Manejo y desinfección del material vegetal	31
Siembra de semillas.....	31
Obtención de yemas.....	31
Siembra de yemas.....	32
Condiciones de crecimiento	32
Conservación <i>in vitro</i>	33
Manejo de plantas (Invernadero: cámara húmeda)	34
Cuidados posteriores	36
BIBLIOGRAFIA	38
ANEXO	43

INTRODUCCIÓN

El Perú, posee casi todos los pisos ecológicos de la tierra; en cada microclima encontramos una gran variedad de especies de flora y fauna, es considerado, entre los cinco países más ricos del mundo en formas de vida, cuenta con especies aprovechables con fines diversos: productoras de alimentos, aceites esenciales, estimulantes, medicamentos, tóxicos y venenosos.

La Familia Rubiaceae, incluye una gran diversidad de especies, tanto herbáceas, arbóreas y lianas. En la actualidad ha surgido un considerable interés en la «Uña de Gato», valioso recurso fitogenético, por sus bondades curativas. Se estima que en estos momentos existen pocos rodales naturales en la Selva de nuestro país, debido al auge de este recurso y a la extracción desproporcionada de la corteza, al respecto; el poder ejecutivo se pronunció y dictó disposiciones, que según D.S. 009-98-AG prohíbe la exportación de uña de gato sin valor agregado.

La Uña de Gato, es una especie promisoría por su alta concentración de alcaloides que le confiere propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y fortalecedoras del sistema inmunológico humano.

Su distribución ecológica en rodales naturales permite plantear o diseñar un manejo y repoblamiento masivo con fines industriales, mediante técnicas de propagación con altas tasas. Su hábito de crecimiento y ciclo vegetativo induce a buscar técnicas apropiadas de reproducción. Dada su irregularidad fenológica, condición de trepadora y el abastecimiento de semillas o estacas a escala comercial, presenta grandes limitaciones. Generalmente se propaga por semillas y estacas, estos métodos de reproducción son sencillos pero requieren de un mayor tiempo y buen manejo.

Una alternativa viable es la utilización de la metodología del cultivo de tejidos. Las plántulas de uña de gato propagadas in vitro se mantienen en un ambiente controlado estéril, crecen y se desarrollan en un medio de cultivo sintético.

El propósito de este trabajo es, establecer una metodología para la propagación y conservación in vitro de la Uña de Gato *Uncaria spp.* mediante microestacas, obteniendo plantas de alta calidad a nivel de estabilidad genética y producción (corteza) en el campo.

GENERALIDADES: CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El inicio del cultivo de tejidos vegetales se remonta a principios del siglo. Haberlandt, fue el primero que intentó regenerar plantas a partir de células. A pesar de no tener éxito, estableció las bases teóricas al asegurar que cada célula vegetal, cualquiera que fuera su especialización, si estaba viva y poseía núcleo, tenía la capacidad de producir una planta entera. **Krikorian, et al. (1969)**.

Winton y Huhtinen; definen el concepto de cultivo de tejidos, “cultivo aséptico de células, tejidos y órganos vegetales intactos en condiciones de laboratorio, con el fin primordial de inducir la formación de los órganos o partes faltantes para completar el individuo normal”. La técnica se basa en el principio de “Totipotencialidad”.

Ingrand, et al. (1983); reportan que el término cultivo de tejidos, es usado en el sentido más amplio para describir el crecimiento de órganos aislados de la planta (raíces, brote apical, embriones, hojas, yemas axilares, anteras y polen); en un medio de cultivo artificial exento de microorganismos.

Mejía (1988); menciona que el término cultivo de tejidos vegetales o de plantas, se refiere al cultivo *in vitro* de cualquier estructura orgánica de una planta bajo condiciones asépticas. También se le conoce como micropropagación.

Se denomina “explante” o “propágulo”, al fragmento o tejido excisado del material parental para iniciar un cultivo *in vitro*. **Muller y Krikorian (1985)**.

Beelen; refiere, el papel principal del medio nutritivo es proveer las condiciones adecuadas para el crecimiento del explante, tales condiciones se determinan por factores físicos: concentración de nutrientes, reguladores de crecimiento, pH, estado del medio y la temperatura. **Beelen y Locy (1984)**; hacen referencia a que no existe un medio de cultivo universal, cada género, especie o cultivar e inclusive cada explante proveniente de diferentes partes de la misma planta, tienen diferentes requerimientos para alcanzar un buen crecimiento y desarrollo.

APLICACIONES DEL CULTIVO DE TEJIDOS:

- Obtención de plantas libres de patógenos,
- Hibridación de especies: fusión de protoplastos,
- Conservación de germoplasma, inducción de mutantes,
- Multiplicación clonal rápida,
- Incremento de la variabilidad genética,
- Bioconversión y producción de compuestos útiles.

Introduction (1981), Locy (1984), Murashige (1977), Roca y Mroginski (1991).

CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LA MICROPROPAGACIÓN:

Marayanas (1977) y Pierik (1990), coinciden al afirmar que las características de esta técnica son:

- Empleo de “explantes” de dimensiones pequeñas.
- Asepsia: material vegetal, medios de cultivo e instrumental.
- Medios de cultivo más o menos complejos.
- Control de las condiciones ambientales de cultivo.

VENTAJAS DE LA PROPAGACIÓN *IN VITRO*:

1. Los cultivos son pequeños segmentos de órganos y tejidos, se necesita poco espacio para propagar muchas plantas. **George, et al. (1984) y Villalobos, et al. (1984).**
2. La propagación se hace en condiciones asépticas, las plantas obtenidas están libres de hongos y bacterias. **George, et al. (1984) y Locy (1984).**
3. Se puede regenerar y/o producir un mayor número de plantas en menor tiempo, muy importante en el fitomejoramiento, porque se reduce el período entre la obtención y la difusión de un nuevo cultivar. **Beelen (s/f), Locy (1984) y Villalobos, et al. (1984).**
4. El proceso puede hacerse durante todo el año, independientemente de cambios estacionales. **George, et al. (1984) y Locy (1984).**
5. Los cultivos requieren manejos especiales durante la transferencia o recultivo. **George, et al. (1984).**

DESVENTAJAS DE LA PROPAGACIÓN *IN VITRO*:

1. Personal especializado para que las operaciones tengan éxito. **George, et al. (1984) y Locy (1984).**
2. El procedimiento puede ser costoso, si comparamos con la propagación convencional. **Locy (1984).**
3. Pérdida de la capacidad morfogénica de los explantes, luego de muchos subcultivos o recultivos. **Hughes (1981).**

FASES DE LA PROPAGACIÓN *IN VITRO*:

Murashige, et al. (1977); estableció tres fases fundamentales para micropropagar una especie:

- Establecimiento o introducción aséptico del cultivo,
- Multiplicación o proliferación,
- Enraizamiento para su trasplante al suelo.

Debergh y Maene (1981); propusieron que el tratamiento y preparación de la planta madre deberían de incluirse en una fase aparte. Otra modificación hecha al procedimiento de Murashige consistió en separar la fase III en dos etapas: preparación para el crecimiento en el ambiente (enraizamiento) y transferencia de las plántulas a condiciones climáticas normales (aclimatación). **George, et al. (1984)**.

FASE 0: Selección y preparación de la planta madre.

El estado fisiológico de la planta donadora de los “explantes” influye fundamentalmente en su capacidad morfogénica. Debe considerarse: edad, genotipo, tipo de explante y tamaño, la época en que se obtuvo el explante. **Rao y Lee (1982)**, **Villalobos y Thorpe (1984)** y **Wetherell (1982)**.

Rao y Lee (1982); mencionaron que cuanto más joven sea el tejido de un árbol, mejor será su crecimiento al cultivarse *in vitro*, los tejidos u órganos de árboles adultos tienen un potencial morfogénico limitado.

Skirvin (1981) y **Zimmerman (1985)**; reconocieron que las plantas leñosas son difíciles de manipular *in vitro*. En general, los árboles se multiplican lentamente, tienen ciclos de latencia complicados y con frecuencia se dan formas adultas y juveniles al mismo tiempo. De mucha importancia es también su crecimiento y desarrollo en el campo por varios años.

FASE I: Establecimiento del cultivo aséptico.

George, et al. (1984) y Wetherell (1982); mencionan, el objetivo es que el explante seleccionado se establezca en el medio de cultivo en forma aseptica e inicie su desarrollo; esta se completa, si se obtiene un número adecuado de explantes vivos sin contaminación e iniciar el proceso de crecimiento.

Villalobos y Thorpe (1984); afirman que es importante considerar que la excisión del tejido u órgano de la planta provoca un estado de tensión que altera su metabolismo celular y su balance de reguladores de crecimiento.

También se observa una coloración oscura en el fragmento de tejido vegetal y en el medio de cultivo, esto se debe a la oxidación de fenoles o polifenoles que se liberan cuando los tejidos sufren heridas (cortes), el explante deja de crecer y generalmente muere. Este problema se puede solucionar si los explantes aislados se enjuagan en solución antioxidante estéril y realizar subcultivos frecuentes. **Zimmerman (1985).**

FASE II: Multiplicación o proliferación.

En esta fase se pretende la reproducción de órganos y estructuras capaces de diferenciar nuevas plantas.

Wetherell (1982); menciona, el verdadero valor de la propagación *in vitro* consiste en la frecuencia con que pueda repetirse este proceso, razón por la cual se debe encontrar la mejor manera de dividir y subcultivar el propágulo o explante.

FASE III: Preparación para crecimiento en ambientes naturales.

George, et al. (1984) y Wetherell (1982); manifestaron que los propágulos provenientes de la fase anterior son pequeños y no toleran una transferencia inmediata al suelo. Es necesario que las plántulas se desarrollen y comiencen a fotosintetizar para sobrevivir sin ninguna fuente externa de carbohidratos. Al mismo tiempo se estimula el crecimiento en longitud de las yemas hasta vástagos bien diferenciados, luego enraizan *in vitro* o *in vivo*.

Villalobos y Thorpe (1984); mencionan que para favorecer el enraizamiento, se transfieren los vástagos a un medio de cultivo con menor concentración de sales. Sin embargo, en la micropropagación a gran escala la diferenciación del sistema radicular bajo condiciones asépticas no es rentable, por lo que se sustituye normalmente por el enraizamiento en cámaras húmedas.

FASE IV: Aclimatación o endurecimiento.

George, et al. (1984) y Wetherell (1982); afirman que la alta humedad y baja iluminancia que prevalecen durante el cultivo *in vitro* provocan que la cutícula de las hojas sean delgadas y que haya poco desarrollo de los tejidos vasculares. Esto hace que las plántulas producidas sean susceptibles a la desecación cuando se trasladan a condiciones externas (*ex vitro*).

MEDIOS DE CULTIVO

Pierik (1990); define, es una mezcla de sustancias, en las cuales pueden crecer células, tejidos u órganos, con o sin la adición de agar.

Roca y Mroginski (1991); manifiestan, en la actualidad existen innumerables formulaciones de medios de cultivo, cada una de las cuales contienen entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran: carbono, nutrientes minerales y vitaminas.

López, P. C. (s/f) y Hurtado et al. (1994); afirman, el éxito del cultivo de tejidos de plantas está muy influenciado por la composición química de los medios de cultivo utilizados y otros factores ambientales; un medio de cultivo está constituido por:

1. Sales inorgánicas: (mezcla de sales)
 - a. Macronutrientes: N, P, K, Ca, Mg y S.
 - b. Micronutrientes: Fe, Mn, Zn, Bo, Cu, Co, y Mo.
2. Vitaminas
3. Reguladores de crecimiento:
 - a. Auxinas
 - b. Citoquininas
 - c. Giberilinas
4. Aminoácidos
5. Carbohidratos: Sacarosa
6. Agua: destilada
7. Gelificantes: Agar, Agargel, Phytigel, Gelrite,
8. Suplementos no definidos

PROPAGACIÓN *IN VITRO*:

Kester (1982); define: *clon*, es la regeneración de un solo genotipo, representado por una planta, un ápice, un meristema, una microestaca o cualquier fragmento vegetal.

En la actualidad se reconoce que la multiplicación clonal *in Vitro* o micropropagación, tiene su mayor aplicabilidad en plantas arbóreas.

Kester (1982) y Sondhal et al. (1984).

Pinedo, P.M. (1996); menciona, existen alrededor de 120 sustancias químicas puras extraídas de 100 especies de plantas superiores y son usadas en el mundo. La micropropagación como un engranaje en un sistema de propagación clonal integrado propone la plantación comercial de clones selectos.

El cultivo de tejidos en plantas medicinales se hizo en forma limitada, usando diversas metodologías. En la India, Mirsa y Chatuverdi (1984), en la micropropagación de *Rosmarinus officinalis* usaron segmentos de tallo. **Sharma (1991)**. En 1984, **Firtz y Viola (1991)**, prueban diferentes medios nutricionales para la propagación *in vitro* de *Valeriana welechii*. En Japón, **Ogha (1989)**, logró la formación de embriones y regeneró plantas medicinales como *Angélica actiobe* y *Foeniculum vulgare*.

Pinedo, P. M. y Pinedo F. S. (1994); (Sin publicar); realizaron investigaciones para el establecimiento *in vitro* de semillas de Uña de Gato *Uncaria guianensis* (Aubl) Gmel. Lograron una germinación del 90% a los 12 días de sembrado en medio de cultivo de M&S 1962, la tasa promedio de multiplicación al tercer recultivo fue de 10 microestacas por vitroplanta.

PROPAGACIÓN CONVENCIONAL

Pinedo, et al. (1990); mencionan, la propagación vegetativa asegura la conservación de las características varietales durante generaciones sucesivas lo cual es una ventaja en el mejoramiento del cultivo. Sin embargo, la tasa de multiplicación obtenidas por esta vía son muy bajas (10-30 veces por año); además, constituye un medio de transmisión y diseminación de plagas y enfermedades.

Flores, B. I. (1995); en su trabajo, propagación por semilla de la Uña de Gato *Uncaria tomentosa* (Will.) DC. para ensayos de germinación de semillas, obtuvo porcentajes promedio: A los 10 días del 65% a 84%, a los 60 días del 61% a 73% y a los 120 días del 47% a 58% de germinación respectivamente.

Quevedo, G. A. (1995); estudiando, la propagación por estacas, obtuvo 80% de prendimiento en *Uncaria tomentosa*, cuando a las estacas lo sembraron con abono orgánico en terrenos degradados; en cambio *Uncaria guianensis* respondió a suelos degradados y orgánicos con un 98% de prendimiento. Es importante considerar que las estacas sean de ramas del bejuco y no del principal.

Cuellar, B. J. (1996); menciona, la propagación por estacas de *Uncaria tomentosa* debe realizarse como una operación de enriquecimiento del bosque, puede darse en formas secundarias pero que tengan un dosel protector de luz solar. Las estacas deben tener características como:

- Diámetro promedio de 3 cm a más
- Mínimo 2 yemas viables
- Proceder del tercio inferior de las ramas
- Longitud variable: 30 a 50 cm

ASPECTOS GENERALES SOBRE LAS ESPECIES

CLASIFICACIÓN TAXONOMICA

Brel en 1950, colectó especímenes del género *Uncaria* de la Selva Central del Perú para realizar estudios taxonómicos de la planta; la clasificación taxonómica de la Uña de Gato según A. Croquist (citado por Flores, 1995 y Urrunaga, 1994); es:

Reino : Vegetal
División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Orden : Rubiales
Familia : Rubiaceae
Género : *Uncaria*
Especies : ***Uncaria guianensis*** (Aublet.) Gmelin.
Uncaria tomentosa (Will.) DC.

SINONIMO BOTANICO

Según **Zavala, et al. (1996)**; menciona a *Ouroparia guianensis* en mención a *Uncaria guianensis* y *Nauclea aculeata*, *Nauclea tomentosa* y *Ouroparia tomentosa*, para *Uncaria tomentosa*.

NOMBRES COMUNES O VERNACULARES

Zavala, et al. (1996); afirman, se conoce a:

Uncaria guianensis, como:

- Uña de Gato (Loreto, Ucayali, Cuzco y Madre de Dios),
- Garabato Colorado (San Martín),
- Uña de Gavilán, Garabato Casha, Unganangui, Ancajsillo, Uña del Bajo, Tambor Huasca, Charapa Shillo y Jijyuwamyúho (Loreto),
- Auri Huasca (Huánuco y Junín),
- Toroñ (San Martín y Pasco),
- Paraguayo, Ancayacu, Kugkuukjagki y Ajanke (Amazonas),
- Samento (Junín).

Uncaria tomentosa, como:

- Uña de Gato (Huánuco y Junín),
- Garabato, Uña de Gato Blanco, Bejuco de Agua (Loreto),
- Chachik, Tsachik, Trofi, Tua Juncara (Loreto: Jíbaro),
- Toroñ, Uña de Gato (Pasco),
- Uña de Gato Amarilla, Garabato Amarillo (San Martín), Jipotatsa (Ucayali).

DISTRIBUCIÓN

La Uña de Gato, es una planta nativa de la Amazonía con características de liana, se conocen especies neotropicales distribuidas en Brasil, Venezuela, Colombia, Bolivia, Guyanas, Paraguay y Perú.

En el Perú, se han identificado por lo menos siete especies diferentes, pero solo dos, *Uncaria guianensis* (Aubl) Gmel y *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. poseen propiedades curativas comprobadas. **Cabieses (1994), Dominguez, et al (1995) y Quevedo (1995).**

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL GENERO *Uncaria*

Las rubiaceas son consideradas cosmopolitas por **Macbride (1936)**, **Ayala (1988)** y **Gentry (1993)**, pero mejor adaptadas a las regiones tropicales y subtropicales.

Cabieses (1994); reporta que *Uncaria hirsuta* y *Uncaria rhynchophylla*, son originarias de la China; que entre sus diversas aplicaciones son utilizadas como protectoras de las células hepáticas y antiinflamatorias. *Uncaria formosana*, empleada en Taiwan como antihipertensivo y *Uncaria kawakamii* de Formosa, disuelve los cálculos urinarios.

Gentry (1993); menciona 50 especies del género *Uncaria* en el mundo y a nivel de nuestro continente solo se reportan las dos mencionadas, las mismas que se distribuyen en el Perú.

Lock (1995); reporta alrededor de 60 especies de *Uncaria* a nivel mundial, la mayoría es países asiáticos y africanos; estudiados químicamente, se reportan compuestos alcaloides en hojas y corteza.

El mismo autor menciona, que algunas de estas especies son utilizadas en la medicina popular como *Uncaria longiflora*, utilizada en Moluccas contra el reumatismo, la fiebre y desórdenes nerviosos y biliares, así como por su actividad sedativa; *Uncaria gambir*, se utiliza en Malasia en lociones y pastas para quemaduras y enfermedades de la piel, así como para dolores producidos por la ciática y el lumbago.

Quevedo (1995); menciona que las plantas del género *Uncaria*, son arbustos trepadores o bejucos que poseen espinas enganchadoras, hojas opuestas, flores blanco verdosas, cremas, amarillas o anaranjadas, dispuestas en cabezuelas densas y globosas axilares o terminales. La corola es usualmente pubescente por fuera, glabra por dentro, con lóbulos valvados. Presentan cinco estambres insertos en la garganta de la corola con filamentos cortos y anteras oblongas. Ovario

fusiforme con estilo delgado excerto, numerosos óvulos ascendentes. Cápsula alargada con testa alada, endospermo carnoso, embrión claviforme con cotiledón pequeño y radícula obtusa.

La etimología del nombre del género *Uncaria* hace alusión a las espinas recurvadas o ganchudas que poseen sus especies, del latín *Uncus*, significa gancho; en tanto que los nombres específicos hacen alusión, en el caso de la *Uncaria tomentosa* a la presencia de tomentos (pilosidades) en el envés de la hojas, en *Uncaria guianensis*, al lugar donde se encontró por primera vez: Las Guayanas, así como el aspecto brillante y lustroso de sus hojas.

La forma, color y sabor de la corteza, que es la parte comercial, son similares en ambas. Las dos especies, conocidas como **Uña de Gato**, en la terminología comercial; son consideradas plantas cálidas dentro de la doctrina térmica existente en la cosmovisión andino-amazónica. **Urrunaga (1994) y Domínguez, et al. 1995.**

CARACTERÍSTICAS ECOLÓGICAS

De acuerdo a la clasificación de zonas de vida de Holdridge (1978), citado por **Flores (1995)**, la Uña de Gato ha sido encontrada en las zonas ecológicas de bosque húmedo tropical, bosque húmedo premontado, bosque muy húmedo premontado y bosque pluvial.

Flores (1995) y Quevedo (1995); indican, respecto a la fisiografía, es hallada frecuentemente en zonas planas, ligeramente ondulados, húmedos y de mal drenaje. En lo referente a suelos, se desarrolla con aceptable vigor en suelos degradados (preferentemente *Uncaria guianensis*).

Brako & Zarucchi (1993), Ocampo (1994) y Quevedo (1995); mencionan que ambas especies son heliófitas, típica de bosques secundarios dada su normal presencia en purmas, pasturas

abandonadas y bosques primarios fuertemente intervenidos. También podemos encontrarlo en la orilla de los ríos principales y quebradas. En lo referente al clima, soporta precipitaciones de 1 800 a 2 500 mm y temperaturas aproximadas de 25 °C.

CARACTERÍSTICAS SILVICULTURALES

Quevedo (1995); los frutos son arracimados en cabezuelas con numerosas cápsulas fusiformes y dehiscentes, cada cápsula presenta dos cavidades o cascocs capsulares donde se insertan las semillas.

Las semillas son imbricadas, poseen testa alada, alas bipartidas, el tamaño: 5 a 8 mm en guianensis y 2 a 4 mm en tomentosa, la cantidad de semillas por kilogramo oscilan entre 5 a 7 millones en guianensis y 8 a 10 millones en tomentosa. La coloración del núcleo de las semillas es importante en la germinación.

La semilla madura tiene un color marrón oscuro y la semilla inmadura es de color marrón claro.

SITUACIÓN POBLACIONAL

Díaz (1994); afirma, la deforestación obedece en 3.2% a extracción forestal, 17.3% a producción de leña y carbón y 79.5% a agricultura migratoria. La extensión de bosques destruidos se estima en 5 millones de has. Anualmente se depredan entre 200 000 a 300 000 has; para el año 2000, se habrán destruido 3 millones de has, equivalente al 8% de nuestros bosques Amazónicos.

Según **Zavala et al. (1996);** a la especie, se asignó la categoría V (Vulnerable); actualmente su población experimenta una acelerada disminución debido a la extracción excesiva y destrucción de su hábitat.

INVESTIGACIÓN FITOTERAPEUTICA, QUÍMICA Y FARMACOLÓGICA

Los primeros estudios químicos, fueron realizados en hojas de *Uncaria guianensis*, se remontan a 1952, por Raymond Hamet; de la Academia de Ciencias de París, Francia.

Laccarino (1994); sostiene, el tratamiento efectuado a dos pacientes con patología ocular (ceguera), recuperaron completamente la vista, el tratamiento fitoterapéutico con «Uña de Gato», determina la autoinmunidad como proceso natural.

En *Uncaria tomentosa* se determinaron propiedades antitumorales atribuidas al alcaloide oxindólico rincofilina, el que fue patentado por Keplinger (1974). Asimismo, Montenegro (1976) encontró alcaloides y flavonoides en las dos especies de *Uncaria*.

Wagner (1985); de la Universidad de Munich; realizó estudios experimentales *in vitro* probando por diversos métodos la medición de la intensidad de la fagocitosis y la capacidad inmunoestimulante de la planta. El investigador asegura que todas las pruebas resultaron positivas para estimular los mecanismos inmunológicos.

En 1974 y 1975; Phillipson y colaboradores, citado por Obregón, V. L. 1994; examinaron muestras y brotes tanto de *Uncaria tomentosa* así como de *Uncaria guianensis*, dentro de un plan de cromatografía de comparación de capa delgada, observando que ambas especies de *Uncaria* presentaban alcaloides semejantes.

Estudios fitoquímicos realizados por Amerso (1989) y Ramírez (1992); definieron a 6 alcaloides y otros principios activos:

- Pteropidina: inhibidor de tumor.
- Alcaloides: fortalecedores del sistema nervioso.
- Procianidinas dimétricas: antitumoral.
- Rincofilina: hipoestético, estimulante del útero y antifebril.
- Isorincofilina e hirsuta: ganglio parasimpático.
- Hirsutina: contracción muscular.
- Nitrafilina: actividad diurética.
- Alcaloides derivados: increm. activ. fagocítica.
- Triterpenoides: inhibe multiplicación del virus en el DNA.

Alvarez, et al. (1988); en un estudio de los constituyentes de *Uncaria guianensis*, mencionan que de las hojas se ha aislado el alcaloide oxindólico pentacíclico nitrafilina; además de 7 compuestos fenólicos que han sido detectados en la corteza de la planta, 2 de los cuales fueron separados como glicósidos y aislados como agliconas para las cuales se propusieron las estructuras de Kaemferol y Dihidrokaemferol. El material fue recolectado del departamento: San Martín, 450 msnm.

Lock, de U. O. (1995); menciona, Phillipson y colaboradores estudiando a *Uncaria guianensis* con muestras de otros países, mostraron la presencia de compuestos alcaloides; reportó el alcaloide angustina en las hojas, flores y tallos. Hamet, citado por Lock; también encontró en hojas el alcaloide rincofilina.

DIFERENCIAS BOTANICAS

ORGANO	<i>Uncaria guianensis</i>	<i>Uncaria tomentosa</i>
Porte	Arbusto trepador o rastrero	Arbusto más o menos trepador
Espinas	Recurvadas como Cuerno de carnero	Dirigidas hacia abajo, rectas
F. limbo	Aovada o elíptica	Oblonga
Consist.	Coriácea	Membranosa
Nervad.	Pinnat. Curva 6-7 pares	Pinnat. Oblicua 9-10 pares
Pecíolo	Color rojizo	Color verde pálido
Haz	Verde brillante	Verde opaco
Envés	Glabro	Tomentoso
Flores	Pediceladas	Sésiles
Color:	Rojo-naranja	Amarillas
Pétalos:	Reflexos	
Corola	Pilosa pubesc.	Glabra
Cápsulas	2-3 cm	No se observó
Infloresc.	Umbelas esféricas diám.: 1.5-4 cm	Cabezuelas globosas diám.: 1.5-2.5 cm
Racimos	Terminales grandes	Axilares, terminales
cabez.	Muchos capítulos	hasta 5 capítulos.

FUENTE: Obregón Vilches, Lida 1994; Zavala Carrillo, C. A. y Zevallos Pollito P. A. 1996.

ESTUDIOS FITOQUIMICOS

Parte planta	<i>Uncaria guianensis</i>	<i>Uncaria tomentosa</i>
RAIZ:		
Alcaloides	Angustina	Isoteropodina
	Pteropodina	Pteropodina
	Isoteropodina	Nitrafilina
	Speciofilina	Isomitrafilina
	Isomitrafilina	Rincofilina
		Isorincofilina
		Speciofilina
		Gelsemine

Propagación y conservación in vitro de la uña de gato

Flavonoides	Epicatequina	
	Procianidinas	
	Diméricas (A, B1, B2, B4).	
Taninos	Catequínicos	
Compuestos del isopentano		8-Triterpeno (metil éster).
Glicósidos		6- Glicósidos del ác. Quinónv.
		7- Glicósidos del ác. Quinónv.
HOJAS:		
Alcaloides	Rincofilina	Rincofilina
	Angustina	Isorincofilina
	Nitrafilina	Nitrafilina
		Dihidrocoriantefina
		Hirsutefina, Hirsutina
Flavonoides	Kaenferol	
	Dihidrokaenferol	
Taninos	Abundante	
TALLO: Corteza (parte comercial)		
Alcaloides	Angustina	Rincofilina
	Rincofilina	Isorincofilina
		Nitrafilina
		Dihidrocoriantefina
		Hirsutefina
		Hirsutina
Flavonoides	Kaenferol y Dihidrokaenferol	
Compuestos del isopentano		3 Triterpenos
		Hidroxilados
Glicósidos	4 Glicós. Ácido ácido quinónvico. 2 glicós. ác. quinónv.	3 Glicósidos del quinónv.
FLORES:		
Alcaloides	Angustina	

FUENTE: Yopez, A. M. et. al. 1991. (citado por Lock de Ugaz, Olga. 1994).

MATERIALES Y METODOS

LOCALIZACION DEL ESTUDIO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales e invernadero de la Estación Experimental "San Roque" - INIA (Instituto Nacional de Investigación Agraria) - Iquitos.

A) Ubicación:

Región	:	Loreto
Provincia	:	Maynas
Distrito	:	Iquitos
Sede	:	Av. San Roque s/n
Latitud Sur	:	03° 45' 18"
Long. Oeste	:	73° 14' 00"
Altura	:	126 msnm

B) Clima y Ecología:

Temperatura °C	:	Mayor de 24 °C
Precipitación	:	2 000 - 4 000 mm
Zona Agroecológica	:	Selva Baja
Grupo Ecológico	:	Bosque Húmedo Tropical
Cuenca Hidrog.	:	Amazonas

MATERIALES, EQUIPOS, REACTIVOS Y DESINFECTANTES

Materiales:

- Gradillas de plástico (Nalgene)
- Agua destilada estéril (pH 7.00)
- Mecheros de vidrio (125 cc de capac.)
- Papel de aluminio

- Papel filtro y periódico estéril
- Pinzas, tijeras y bisturí
- Tapas de plástico
- Tubos de ensayo (25 x 150 mm)
- Malla de plástico (10 x 10 cm)
- Erlenmeyer (diferentes capacidades)
- Algodón absorbente estéril.
- Plástico (cling Wrap)

Equipos:

- Balanza analítica (precisión 0.1 mg)
- Destilador de agua (capacidad 5 lt/hora)
- pH-metro o potenciómetro
- Autoclaves (esterilización: calor húmedo)
- Cámara de flujo laminar
- Lupa 100 x
- Agitador magnético
- Estufas (esterilización: calor seco)
- Dispensador manual (10 cc capac.)

Reactivos:

- Medio básico: Murashige y Skoog 1962
- Gelificante: Phytigel
- Ácido clorhídrico 1 N.
- Hidróxido de sodio 1 N.
- Alcohol de 96 °C

Desinfectantes:

- Jabón líquido
- Hipoclorito de sodio: 6% cloro activo
- Benomyl "Benlate" (fungicida)
- Formol (37-40%)

METODOLOGIA:

PREPARACION DE SOLUCIONES STOCK DE M&S (1962)

- **Solución 1:** Macronutrientes 10 veces concentrado (10 x). Se utiliza 50 cc de la solución por litro de medio a preparar. Se inicia la preparación con 200 cc de agua destilada y se sigue el orden:

NH_4NO_3	16 500 mg
KNO_3	19 000 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3 700 mg
KH_2PO_4	1 700 mg

Luego se enrasa a 500 cc con agua destilada.

- **Solución 2:** Micronutrientes 100 veces concentrado (100 x). Se utiliza 5 cc de la solución por litro de medio a preparar. Se inicia la preparación con 200 cc de agua destilada y se sigue el orden:

KI	83 mg
H_3BO_3	620 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2 230 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.5 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.5 mg

Luego se enrasa a 500 cc con agua destilada.

- **Solución N° 03:** Macronutriente 100 veces concentrado (100 x). Se utiliza 5 cc de la solución por litro de medio a preparar. Se inicia la preparación con 200 cc de agua destilada y se sigue el orden:

CaCl₂.2H₂O 44 000 mg

Luego se enrasa a 500 cc con agua destilada.

- **Solución 4:** Fierro 100 veces concentrado (100 x). Se utilizó 5 cc de la solución por litro de medio a preparar. Se inicia la preparación con 200 cc de agua destilada y se sigue el orden:

FeSO₄.7H₂O 2 780 mg

Na₂-EDTA.2H₂O 3 730 mg

Luego se enrasa a 500 cc con agua destilada.

- **Solución 5:** Vitaminas 100 veces concentrado (100 x). Se utiliza 5 cc de la solución por litro de medio a preparar. Se inicia la preparación con 200 cc de agua destilada y se sigue el orden:

Mio-Inositol 10 000 mg

Tiamina-HCl 50 mg

Glicina 200 mg

Pyridoxina-HCl 50 mg

Acido nicotínico 50 mg

Luego se enrasa a 500 cc con agua destilada.

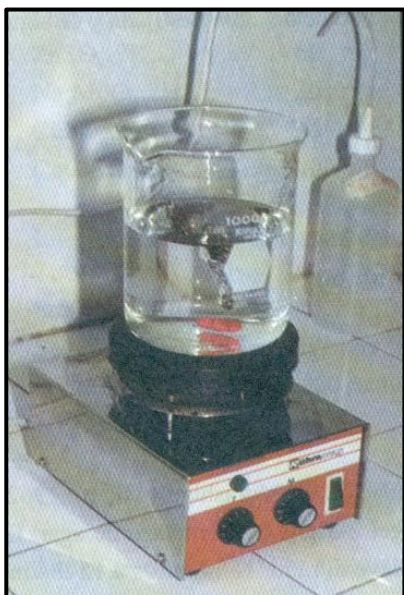
MEDIO DE CULTIVO:

Está compuesto por la formulación de Murashige y Skoog 1962. Cuadro N° 1. Se usa Phytigel 2-3 g/lit en reemplazo de agar. El medio se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 15 lbs/in² (1 kg/cm²) de presión (Psi) y 121 °C de temperatura.

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR MEDIO DE CULTIVO:

En la preparación, se usa erlenmeyer de diferentes capacidades, dependiendo del volumen de medio final, en ello se adicionan alicuotas de las soluciones madre o stock de los compuestos orgánicos del medio M&S 1962, sacarosa y phytigel.

Se mezclan los componentes con ayuda de un agitador magnético y se enrasa el volumen final con agua destilada, para luego ajustar el pH del medio de cultivo a 5.7 ± 0.1 con Hidróxido de Sodio o Ácido Clorhídrico a la 1 N.



Preparación de medios de cultivo para la micropropagación de Uña de Gato

MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN:

Se emplean plántulas provenientes de germinación *in vitro* de semilla botánica de las especies *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa*. Este material fue colectado de localidades de la Selva Peruana: Iquitos, Pucallpa y Madre de Dios.

MANEJO Y DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL:

La desinfección de las semillas se realiza en cámara de flujo laminar bajo condiciones estériles.

Las semillas se sumergen en una solución de Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 5% (lejía comercial con 6% de cloro activo), por 20 minutos; luego se hacen 3 lavados con agua destilada estéril, cada uno por 5 minutos. Seguidamente se efectúa otra desinfección de profundidad con el fungicida Benomyl (Benlate) a razón de 30 g/lit, para permitir una mejor penetración del agente desinfectante en el material; por espacio de 10 minutos, luego se realizan 3 lavados con agua destilada estéril; cada lavado por 5 minutos. Para cada desinfección se utiliza mallas de plástico estériles de 10 x 10 cm para retener a las semillas una vez desinfectados.

SIEMBRA DE SEMILLAS:

Se coloca las semillas desinfectadas en tubos de ensayo de 25x150 mm los cuales contienen alícuotas de 5 cc de medio de cultivo de M&S 1962 (ver anexo cuadro 2). La cantidad de semillas por tubo, en promedio es 20.

OBTENCION DE YEMAS:

Ocho a diez semanas después de sembrar las semillas, se obtienen plántulas con buenas características fenotípicas para efectuar la

excisión de las yemas, este factor va a estar influenciado por el momento de cosecha de las semillas.

Esta labor se realiza en la cámara de flujo laminar, las yemas disectadas se colocan sobre papel estéril; estas poseen un tamaño de 1 cm en promedio.

Esta operación se efectúa con pinzas y bisturí previamente esterilizados así como con la ayuda de un mechero con alcohol.

De cada plántula en sus diferentes tamaños se aíslan las yemas teniendo en cuenta su posición en el eje caulinar, es decir: explante de la zona terminal (yema apical), explantes de las zonas medias (yemas medias) y explante de la zona basal o inferior (yema basal).

SIEMBRA DE YEMAS:

La siembra de las yemas en el medio de cultivo se realiza tomando las precauciones de asepsia y lo más importante es tener en cuenta la polaridad de desarrollo de éstas; los tubos se sellan con plástico para microondas, con esto se evita el ingreso de contaminantes y pérdida de agua del medio de cultivo; luego los tubos se colocan en gradillas plásticas de capacidad para 40 tubos de ensayo, cuyas dimensiones son: 30 cm de largo, 12 cm de ancho y 9 cm de altura.

CONDICIONES DE CRECIMIENTO:

Los tubos conteniendo las yemas se incuban en una cámara de crecimiento (ver Foto N° 2 del anexo), con:

- Fotoperíodo : 16/8 hrs. (luz/oscuridad)
- Temperatura : 25 ± 1 °C
- Humedad relat. : 70%

CONSERVACION IN VITRO:

El material colectado, fue propagado en forma masiva y se conserva in vitro un banco de germoplasma con 05 procedencias, esta conservación nos permite:

- Preservación de información genética
- Máxima tasa de supervivencia
- Reducción de frecuencia de subcultivos
- Intercambio internacional de germoplasma

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales se viene conservando el siguiente germoplasma (Ver anexo Cuadro N° 3).



*Condiciones de crecimiento
para la micropropagación y
conservación in vitro de la
Uña de Gato*

MANEJO DE PLANTAS (INVERNADERO: CAMARA HUMEDA):

Es conocido que el manejo y producción intensiva de plantas requieren de cuidados especiales, las labores en los invernaderos tienen que ser apoyados por personal técnico especializado y debidamente equipado.

En el manejo de vitroplantas se debe tener mucho cuidado, ya que estas son muy sensibles a los cambios ambientales en especial al adecuado suministro de agua, su escasez provoca además del stres hídrico (que puede ser irreversible) deficiencias nutricionales que alteran su metabolismo haciéndolas más sensibles a plagas y enfermedades. La EE "San Roque", cuenta con un invernadero de 100 m².

Plataforma, es de concreto y mide 8.50 m largo x 1.50 m ancho x 0.08 m altura, esto va a servir para construir la cámara húmeda.



Vitroplantas aptas para el repique a cámara húmeda (invernadero).

Cámara húmeda, tiene una capacidad para albergar 800 plántulas, las dimensiones son largo 8.00 m x ancho 1.50 m x altura 0.65 m esta cámara debe ser forrado con plástico doble y transparente.

Sustrato para cámara húmeda, se usa aserrín tipo fino de cualquier especie maderable, de preferencia madera roja, el espesor del colchón de aserrín es 2 cm.

Desinfección del sustrato de cámara húmeda, se realiza con 540 ml de lejía comercial en 10 lt de agua, en caso de no usar este producto, también podemos desinfectar con Benomyl (Benlate) 40 g del producto en 10 lt de agua. Luego dejar cerrado por 2 días.

Preparación y desinfección del sustrato: repique/plantas

- Se calcula el número de plantas para ser repicadas al sustrato, normalmente cada compartimento de la cámara húmeda albergan a 200 plántulas.
- Se cierne con un tamiz artesanal la tierra negra, luego se adiciona palo podrido o aserrín, la proporción es 2:1.
- Se mezcla bien cada una de las partes para luego proceder al llenado de las macetas.
- Llenado las macetas requeridas, se procede a desinfectar con formol (37-40%), el desinfectante diluir al 3%. Si no se cuenta con este producto, desinfectar con agua hervida por 2 días consecutivos.

- Se tapan las macetas con plástico o bolsa de polietileno, preferentemente de color negro la permanencia del tapado de macetas es por 2-3 días, al cuarto día se hace un riego pesado y se destapa.
- Al quinto o sexto día de la desinfección, las macetas conteniendo el sustrato están aptas para recibir a las vitroplantas.
- El tamaño de plántula ideal para repicar es 6 cm.

CUIDADOS POSTERIORES:

- El riego debe aplicarse con regadera en forma de lluvia fina, de preferencia en las mañanas e interdiariamente, teniendo en cuenta la climatología del lugar.
- Se prepara una solución fungicida (Benlate 2 g/l), cuando las plántulas empiecen a secarse sus hojas, esto es normalmente a 2-3 días después del repique.
- Poda de limpieza: hojas secas, amarillentas u hongueadas.
- Al observar un amarillamiento de hojas, se debe aplicar nutriente foliar líquido Bayfolan 0.2% adicionando un adherente Agridex 0.05% semanalmente.

- El riego de plántulas con una solución de fertilizante químico (urea 46%), la dosis recomendada es 0.2%, se hace de preferencia cuando las plántulas tengan 1 a 2 meses de su aclimatación y cuando se observa que hayan desarrollado de 4 a 6 hojas.
- Mantener alta humedad en la cámara húmeda.
- El control de malezas es muy escaso, debe efectuarse en forma manual.



Plantones aptos para su trasplante a campo definitivo

BIBLIOGRAFIA

1. ALVAREZ, M. C.; SANCHEZ, O.; STILKE, R.; LOCK, O. U. De. 1988. Algunos constituyentes de *Uncaria guianensis*. Rev. de Química. 2:2. 99 - 104 p.
2. AYALA, F. F. 1988. Taxonomía Vegetal. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Iquitos-Perú. 173 p.
3. BEELEN, J. (s/f). Introductory course on *In Vitro* culture. Wageningen, International Agricultural Centre. 84 p.
4. BRAKO, L. & ZARUCCHI, J. 1993. Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. Missouri Botanical Garden. St. Louis, Estados Unidos de América. 1288 p.
5. CABIESES, M. F. 1994. La "Uña de Gato" y su entorno. Lima-Perú. 113 p.
6. CUELLAR, B. J. 1996. Propagación por estacas de *Uncaria tomentosa* Willd D.C. in: Resumen del Curso teórico- práctico: Identificación, producción, propagación y manejo de "Uña de Gato. Lima - Perú. 2 p.
7. DIAZ, P. V. 1994. Desarrollo Sostenible de la Amazonía Peruana. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana Pontificia Universidad Católica del Perú. CISEPA. 234 p.
8. DOMINGUEZ, T. G. y TAPIA, F. L. 1995. Uña de Gato: Situación Actual y Avances en la Investigación. in: Agro Enfoque. Edic. 76. Lima - Perú. 10 - 12 p.

9. FLORES, B. Y. 1995. Propagación por Semilla de la Uña de Gato *Uncaria tomentosa*. Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA). Proyecto Suelos Tropicales. Bol. Tec. 5. Lima - Perú. 32 p.
10. GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Eversley, G. B. Exegetics. 709 p.
11. GENTRY, A. 1993. Woody plants of northwest south américa. (Colombia, Ecuador y Perú). Conservation International (CI). Washington D.C., USA. 895 p.
12. HUGHES, K. W. 1981. Ornamental species. In: Cloning agricultural plants vía *In Vitro* techniques. Ed. by B.V. Conger. Boca Ratón, Fla. CRC Press. 20 - 21 p.
13. HURTADO, M. D. V. y MERINO, M. M. E. 1994. Cultivo de Tejidos vegetales. Editorial Trillas. Tercera reimpresión. Impreso en México. 232 p.
14. INGRAND, D.S. and HEIGESON, J. P. 1983. Tissue Culture methods for plant pathologists. Blaccwell Scientific Publications. 250 p.
15. INTRODUCTION. 1981. In Cloning agricultural plants vía *in vitro* techniques. Conger. Boca Ratón, Fla. CRC Press 1 - 4 p.
16. KESTER, D. E. 1982. The Clone in Horticulture. Hort Science. (U.S.A.). 18(6): 831-837 p.

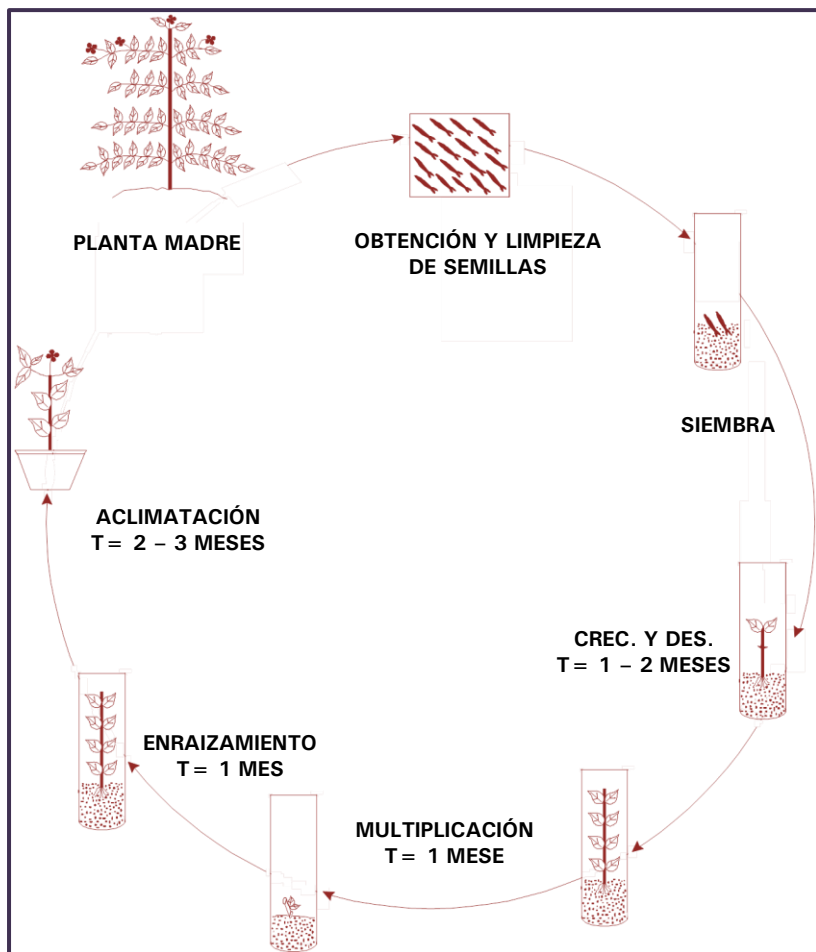
17. LOCK, DE U. O. 1995. Revisión del Género *Uncaria*. *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*: La "Uña de Gato". in: Rev. de Química. Vol. IX. N° 1. Lima - Perú. 49 - 61 p.
18. LOCY, R. D. 1984. Notes on principles and applications; state of the art. ATAS Bulletin (EE.UU) 1:8 - 13 p.
19. LOPEZ, P. C. (s/f). Medios de cultivo. Mecanografiado. 9 p.
20. MACBRIDE, F. 1936. Flora of Perú. Field Museum of natural History. Botanical Series. V. 13. p. 6. N° 1. USA. 11 - 12 p.
21. MARAYANAS, S. 1977. Regeneration of plants from tissue cultures. In: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. (J. Reinert y P.S. Bajaj Eds.), Springer Verlag. Berlín. 179 - 206 p.
22. MEJIA, A. R. y VITTORELLY, C. 1988. Cultivo *in vitro* de plantas de papa. Manual de Laboratorio. Programa Nacional de Papa INIAA. 11 p.
23. MULLER, L. y KRIKORIAN, A. D. 1985. Glosario de los términos más frecuentes empleados en el cultivo de tejidos vegetales. CATIE. Turrialba - Costa Rica.
24. MURASHIGE, T. y SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* (Dinamarca). 15(3): 473 - 497 p.
25. -----1977. Manipulation of organ initiation in plant tissue cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* (Taiwan) 18:1 - 24 p.

26. OBREGON, V. L. 1994. «Uña de Gato» género *Uncaria*. Estudios botánicos, químicos y farmacológicos de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*. Segunda Edición. Lima - Perú. 162 p.
27. OCAMPO, P. 1994. *Uncaria tomentosa*, aspectos etnomédicos, médicos, farmacológicos, botánicos, agronómicos, comerciales, legales, antropológicos, sociales y políticas. Instituto de Desarrollo Rural Peruano (IDDRP). Lima - Perú. 77 p.
28. PIERIK, R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi Prensa. Madrid. 325 p.
29. PINEDO, P. M. y PINEDO, F. S. 1994. (Sin Publicar). Germinación *in vitro* de semillas de Uña de Gato *Uncaria guianensis*. INIA - EE «San Roque» Iquitos.
30. PINEDO, F. S. y VILCHEZ, E. R. 1990. Saneamiento y micropropagación de variedades de Yuca (*Manihot esculenta*) y Plátano (*Musa sp.*) cultivados *in vitro*. Informe para optar el título de Tec. Agrop. I.S.T. "P.A.D.A.H". Iquitos - Perú. 76 p.
31. PINEDO, P. M. 1996. Introducción a la Biotecnología. Tema expuesto en el "Curso Práctico de Cultivo de Tejidos". INIA. EE "San Roque". Iquitos. Mecanografiado. 6 p.
32. QUEVEDO, G. A. 1995. Silvicultura de la Uña de Gato. Alternativa para su Conservación. Centro Regional de Investigación e Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (CRI-IIAP). Pucallpa - Perú. 43 p.
33. RAO, A. N. y LEE, S. K. 1982. Importance of tissue culture in tree propagation. In: International Congress of Plant, Tissue and Cell Culture. Tokio-Japón. Ed. by A. Fujiwara. Japanese Association for Plant Tissue Culture. 715 - 718 p.

34. ROCA, W. y MROGINSKI, L. 1991. Cultivo de Tejidos en la agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Colombia. 20 - 36 p.
35. URRUNAGA, S. R. M. 1994. Uña de Gato, Valioso Recurso Fitogenético del Perú. Tema expuesto en reciente reunión sobre *Uncaria tomentosa* en Pucallpa. In: Revista Pura Selva, edición N° 118.
36. VILLALOBOS, V. M. y THORPE, T. A. 1984. La Micropropagación: Conceptos, metodologías y resultados. In: Fundamentos y aplicaciones del cultivo de tejidos en la agricultura. Ed. por W. Roca. Cali - Colombia. CIAT. 127 - 140 p.
37. WETHERELL, D. F. 1982. Introduction to *in vitro* propagation. Wayne N. J. Avery Publishing Group. 87 p.
38. WINTON, L. L. y HUHTINEN. s/f. Tissue culture of trees. In: Modern methods in forest genetics (J.P. Milksche. Ed.) Springer-Verlag. Berlin. 243 - 264 p.
39. ZAVALA, C. C. y ZEVALLOS, P. P. 1996. Taxonomía, distribución y Status del Género *Uncaria* en el Perú Uña de Gato. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Ciencias Forestales. Lima - Perú. 73 p.
40. ZIMMERMAN, R.H. 1985. Application of tissue culture propagation to woody plants. In: Tissue culture in forestry and agriculture. Ed. by R. R. Henke; K. W. Hughes; M. J. Constantin; A. Hollaender. New York, Plenum Press. 165 - 177 p.

ANEXOS

FLUJOGRAMA DE LA MICROPROPAGACIÓN DE UÑA DE GATO



Cuadro 1 Medio Basal Murashige & Skoog 1962

Componentes	Contenido/medio (mg/l)
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
KH_2PO_4	170
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
KI	0.83
H_3BO_3	6.20
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.60
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.80
$\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.30
Tiamina-HCl	0.10
Acido nicotínico	0.50
Pyridoxina-HCl	0.50
Glicina	2.00
Myo-Inositol	100.00

FUENTE: Roca y Mroginski, (1991).

Cuadro 2 Medios de Cultivo para la Propagación Uña de Gato *Uncaria spp.*

Componentes o Ingredientes	Soluc. Stock N°	FASES DE LA PROPAGACION				
		I	II	III	IV	V
Macronut. (ml)	1	50	50	25	25	25
Micronut. (ml)	2	5	5	2.5	2.5	2.5
Macronut. (ml)	3	5	5	2.5	2.5	2.5
Hierro (ml)	4	5	5	2.5	2.5	2.5
Vitaminas (ml)	5	5	5	2.5	2.5	2.5
GA3(uM)			30	16		
Sacarosa (M)		0.09	0.09	0.09	0.06	0.117
Phytigel (g)		2	2	3	3	3
Ph		5.75	5.75	5.75	5.75	5.75

LEYENDA:

- I Siembra o germinación
- II Crecimiento y desarrollo
- III Multiplicación o proliferación
- IV Enraizamiento
- V Conservación

Cuadro 3 Accesiones *in vitro* de Uña de Gato, Laboratorio de Cultivo Tejidos Vegetales

Acces.	Especie	Procedencia	Lugar/Colectión
01	<i>U. guianensis</i>	Iquitos	Allpahuayo/carretera Iquitos-Nauta km 26
02	<i>U. tomentosa</i>	Pucallpa	Alto Ucayali/Comité Reforestación
03	<i>U. tomentosa</i>	Pucallpa	A.Von Humboldt/carretera F. Basadre km 86
04	<i>U. guianensis</i>	Madre de Dios	Comité de Reforestación Madre de Dios
05	<i>U. guianensis</i>	Iquitos	El Dorado/carretera Iquitos-Nauta km 25

COSTO DE PRODUCCIÓN IN VITRO Y EX VITRO EN UÑA DE GATO (*Uncaria spp.*)

DATOS OPERACIONALES

• Semilla botánica (1g)	
• Explantes (número de yemas)	40
• Número recultivos	3
• Total de semanas	28
• Total plantas enraizadas	20 480
• Horas de propagación	328

COSTOS EN CULTIVO DE TEJIDOS

• Jornales	\$ 75
• Preparación medio de cultivo	\$ 10
• TOTAL	\$ 485
• Costos medio de cultivo	\$ 15
• Recipientes de cultivo amortización	\$ 20
• Equipo amortización(5 años \$1 000)	\$ 47
• Implentación amortización (20 años \$ 50 000)	\$ 103
TOTAL	\$ 185

COSTO DEL CULTIVO \$ 670

COSTO POR PLANTA S/.0.0327

S/.0.1145

COSTOS DE ACLIMATACIÓN

• Jornales	\$ 128
• Materiales diversos	\$ 112

TOTAL \$ 240

COSTO POR PLANTA \$ 0.0117

S/.0.0410

COSTO TOTAL POR PLANTÓN	\$ 0.1262
(Cambio \$ 1.00 A S/. 3.50)	S/. 0.4417