

UNIVERSIDAD NACIONAL “HERMILIO VALDIZÁN”

HUÁNUCO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**PROTOCOLOS EN LA MICROPROPAGACIÓN DE LA
PLANTA MEDICINAL “FLOR DE ARENA” (*Clinopodium
revolutum*) (Ruiz & Pav.) Govaerts**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGRÓNOMO**

LUCÍA SOLEDAD PANDO TUCTO

HUÁNUCO – PERÚ

2016

DEDICATORIA

A Dios

Por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte durante esta etapa de mi vida.

A Mis Padres

Por ser el pilar fundamental en todo lo que soy y mi razón de ser, por su incondicional apoyo, sus consejos, sus valores, por los ejemplos de perseverancia y constancia, por creer en mí siempre, por enseñarme el significado de la vida y sobre todo por su inmenso amor.

A Mis Hermanos

Mis dos grandes amores, por cada una de sus enseñanzas, por sus palabras de aliento, por nuestras alegrías y tristezas, por compartir momentos que nos une cada día más.

AGRADECIMIENTO

A Dios por concederme la salud, bienestar, por haberme acompañado a lo largo de mi carrera y por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y a mis padres por apoyarme en todo momento, por haberme dado la oportunidad de tener una educación y sobre todo por ser excelentes ejemplos de vida a seguir.

Agradecer de manera especial a mi asesora la Dra. Milka Tello, por creer en mí y haberme brindado la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación, por su dedicación, paciencia, por sus enseñanzas en lo profesional y como persona, por inculcarme valores y dejar en mí la semilla de la investigación, gracias por tanto cariño. Quisiera agradecer también a cada uno de mis docentes por los conocimientos transmitidos durante mi formación profesional para alcanzar mis metas.

Mi profundo agradecimiento a la Sra. Predesbinda Borja, por los conocimientos compartidos sobre “la flor de arena” ya que sin su apoyo no hubiese sido posible el desarrollo del trabajo de investigación.

A Guisela, Vanesa y Marco, por ser parte importante de mi vida, por sus consejos, por todos aquellos buenos y malos momentos, por tantos años de amistad, porque siempre estuvieron ahí conmigo a pesar de todo, siempre voy a estar eternamente agradecida con ustedes.

A Inés, Anait, Liesel, David, por su amistad, cariño, su apoyo, ánimo y compañía en todo momento, a Ruth y Noemí por ser parte de este grupo maravilloso que Dios me permitió conocer, y ahora ser grandes amigos.

RESUMEN

La “flor de arena” es una especie nativa silvestre, con alto valor comercial; sin embargo las poblaciones de esta especie son cada día más escasas por la oferta y demanda del mercado local y nacional. Por lo expuesto, el presente trabajo se realizó con la finalidad de: determinar el mejor protocolo de desinfección para la etapa de establecimiento, identificar el mejor explante para la etapa de establecimiento y multiplicación e identificar el mejor medio para una mayor tasa de multiplicación. El material vegetal se obtuvo del caserío de Rodeo de Margo del Distrito de Kichki a más de 3 750 msnm. La investigación fue ejecutada en dos etapas: La primera, etapa de establecimiento *in vitro*, la segunda etapa, de multiplicación y enraizamiento bajo un Diseño Completamente al Azar. La etapa de establecimiento *in vitro*, consistió en 4 ensayos con 6 tratamientos y 25 repeticiones; se probaron diferentes protocolos de desinfección y tipos de explantes. Los protocolos consistieron en sumergir los explantes en una solución de hipoclorito de sodio a diferentes tiempos y concentraciones, tres enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° y por último en una solución con fungicida; luego se sembró e incubó a temperatura promedio de 23 °C. Se estableció *in vitro* a los diez días después de la siembra, obteniendo como resultado al protocolo 2 (2,04 % de solución de lejía por 30", 3 enjuagues en agua estéril, alcohol de 70° por 1" + solución con fungicida por 20" + antibiótico) como el más adecuado y mejor explante, brote terminal. En la etapa de multiplicación y enraizamiento se utilizó dos tipos de explantes (tallos con 3 y 2 nudos) y dos medios de multiplicación (orquídea y papa), determinando que el tallo con 3 nudos es el más adecuado y el medio de orquídea el ideal, presentando los promedios más altos en: sobrevivencia (92 %), número de brotes (2,12), tamaño de explante (4,18) y presencia de raíz (92 %).

ABSTRAC

"Flower sand" is a wild native species with high commercial value; however, populations of this species are increasingly scarce supply and demand for local and national market. For these reasons, this work was done in order to: determine the best disinfection protocol for the establishment stage, identify the best explant for the establishment and multiplication stage and identify the best means to a higher rate of multiplication. The plant material was obtained from the village of Rodeo Margo District Kichki more than 3750 meters. The research was carried out in two stages: the first, in vitro establishment stage, the second stage, multiplication and rooting under a completely random design. The establishment stage in vitro, consisted of 4 trials with 6 treatments and 25 repetitions; disinfection protocols and different types of explants were tested. Protocols consisted of immersing the explants in a solution of sodium hypochlorite at different times and concentrations, three rinses in sterile distilled water, 70° alcohol and finally in a solution containing fungicide; then he seeded and incubated at 23 ° C average temperature. It was established in vitro to ten days after planting, resulting in the Protocol 2 (2.04% solution of bleach 30", 3 rinses in sterile water, alcohol 70 ° for 1" + fungicide solution for 20 " + antibiotic) as the most suitable and best explant, terminal bud. two types of explants (stem with 3 and 2 knots) and two multiplying means (orchid and potato) was used at the stage of multiplication and rooting, determining that the stem with 3 knots is the most appropriate and medium orchid ideal presenting the highest averages: survival (92%), number of sprouts (2,12), size of explant (4.18) and presence of root (92%).

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

RESUMEN

ABSTRAC

I. INTRODUCCIÓN

II. MARCO TEÓRICO

2.1.	Fundamentación teórica.....	16
2.1.1.	Origen y distribución.....	16
2.1.2.	Clasificación taxonómica.....	16
2.1.3.	Características de las Lamiacea.....	17
2.1.3.1.	Caracteres vegetativos.....	17
2.1.3.2.	Caracteres reproductores.....	17
2.1.4.	Características del género (Clinopodium = Satureja).....	18
2.1.4.1.	Caracteres vegetativos.....	18
2.1.4.2.	Caracteres reproductores.....	20
2.1.5.	Cultivo <i>in vitro</i>	22
2.1.5.1.	Micropropagación vegetal.....	23
2.1.5.2.	Aplicaciones.....	24
2.1.5.3.	Clases de crecimiento <i>in vitro</i>	26
2.1.5.4.	Ventajas.....	27
2.1.5.5.	Desventajas.....	28
2.1.5.6.	Etapas de micropropagación.....	30
a)	Establecimiento.....	31
b)	Multiplicación <i>in vitro</i>	31
c)	Enraizamiento.....	32
d)	Aclimatación.....	33

2.1.5.7.	Factores que afectan la micropropagación.....	34
2.1.6.	Composición del medio de cultivo.....	34
a)	Sales minerales.....	35
b)	Reguladores de crecimiento.....	36
c)	Vitaminas.....	38
d)	Fuentes de carbono y energía.....	39
e)	Aminoácidos.....	39
f)	Nitrógeno orgánico.....	39
g)	Agar.....	40
2.1.7.	Protocolos en la Micropropagación.....	40
2.1.7.1.	Protocolos de desinfección.....	40
2.1.7.2.	Tipos de explantes.....	43
2.2.	Antecedentes.....	45
2.3.	Hipótesis.....	52
2.4.	Variables.....	53

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.	Lugar de ejecución.....	55
3.2.	Tipo y nivel de investigación.....	55
3.2.1.	Tipo de investigación.....	55
3.2.2.	Nivel de investigación.....	56
3.3.	Población, muestra y unidad de análisis.....	56
3.3.1.	Población.....	56
3.3.2.	Muestra.....	57
3.3.3.	Tipo de muestreo.....	57
3.3.4.	Unidad de análisis.....	57

3.4.	Tratamientos en estudio.....	57
3.4.1.	Etapa de establecimiento <i>in vitro</i>	58
3.4.1.1.	Fase de campo.....	58
3.4.1.2.	Fase de laboratorio.....	58
3.4.2.	Etapa de multiplicación.....	63
3.4.2.1.	Fase de laboratorio.....	63
3.5.	Prueba de hipótesis.....	64
3.5.1.	Diseño de la investigación.....	64
3.6.	Datos a registrar.....	66
3.6.1.	Etapa de establecimiento <i>in vitro</i>	67
3.6.1.1.	Fase de laboratorio.....	67
3.6.2.	Etapa de Multiplicación y enraizamiento.....	67
3.7.	Materiales, equipos e insumos.....	68
3.7.1.	Materiales.....	68
3.7.2.	Equipos.....	69
3.7.3.	Insumos.....	70
3.8.	Conducción de la investigación.....	70
3.8.1.	Etapa de establecimiento <i>in vitro</i>	70
3.8.1.1.	Fase de campo.....	71
3.8.1.2.	Fase de laboratorio.....	74
3.8.2.	Etapa de multiplicación y enraizamiento.....	79
3.8.2.1.	Fase de laboratorio.....	79

IV. RESULTADOS

4.1.	Etapa de establecimiento <i>in vitro</i>	83
4.1.1.	Fase de laboratorio.....	83
4.1.1.1.	Ensayo uno.....	83

4.1.1.2.	Ensayo dos.....	84
4.1.1.3.	Ensayo tres.....	85
4.1.1.4.	Introducción definitiva.....	88
4.2.	Etapas de multiplicación y enraizamiento.....	92
4.2.1.	Porcentaje de supervivencia.....	92
4.2.2.	Número de brotes.....	94
4.2.3.	Tamaño de explante.....	99
4.2.4.	Presencia de raíz.....	105
4.2.5.	Comparación general de promedios para determinar el mejor explante y medio de multiplicación.....	106
V. DISCUSIÓN		
5.1.	Establecimiento <i>in vitro</i>	109
5.1.1.	Supervivencia del explante a los 3, 5 y 10 días.....	110
5.2.	Multiplicación y Enraizamiento.....	111
5.2.1.	Número de brotes a los 20, 27 y 34 días.....	111
5.2.2.	Tamaño de explante a los 15, 22 y 29 días.....	112
5.2.3.	Presencia de raíz a los 22 y 29 días.....	112
VI. CONCLUSIONES		
VII. RECOMENDACIONES		
VIII. LITERATURA CITADA		
IX. ANEXO		

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 01. Variables y operacionalización de variables.....	53
Cuadro 02. Tratamientos en estudio.....	58
Cuadro 03. Ensayo uno. Para determinar protocolos de desinfección y tipos de explantes de introducción.....	59
Cuadro 04. Ensayo dos. Determinación de protocolos de desinfección y tipos de explantes.....	60
Cuadro 05. Ensayo tres. Determinación de los protocolos y explantes a usar en la introducción <i>in vitro</i>	61
Cuadro 06. Tratamientos para el establecimiento <i>in vitro</i>	62
Cuadro 07. Tratamientos para la determinación del tipo de explante y medio de cultivo apropiado en la fase de multiplicación.....	63
Cuadro 08. Análisis de Varianza para el Diseño Completos al Azar (DCA).....	66
Cuadro 09. Medio base para papa.....	79
Cuadro 10. Medio base para orquídea.....	80
Cuadro 11. Análisis de Varianza para el número de brotes (20 días).....	94
Cuadro 12. Prueba de Tukey para el número de brotes (20 días).....	95
Cuadro 13. Análisis de Varianza para el número de brotes (27 días).....	96
Cuadro 14. Prueba de Tukey para el número de brotes (27 días).....	96
Cuadro 15. Análisis de Varianza para el número de brotes (34 días).....	97
Cuadro 16. Prueba de Tukey para número de brotes (34 días).....	98

Cuadro 17. Análisis de Varianza para altura de explante (15 días).....	100
Cuadro 18. Prueba de Tukey para altura de explante (cm) – 15 días.....	100
Cuadro 19. Análisis de Varianza para altura de explante (22 días).....	101
Cuadro 20. Prueba de Tukey para altura de explante (cm) – 22 días.....	102
Cuadro 21. Análisis de Varianza para altura de explante (29 días).....	103
Cuadro 22. Prueba de Tukey para altura de explante (cm) – 29 días.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01. Morfotipo hembra de “flor de arena”	68
Figura 02. Hábitat natural de la “flor de arena”	71
Figura 03. Sustrato con abundante materia orgánica donde se desarrolla la “flor de arena”	72
Figura 04. Morfotipos encontrados dentro de la especie	72
Figura 05. Obtención de la planta madre	73
Figura 06. Esterilización de materiales contaminados	78
Figura 07. Proceso de siembra para el establecimiento <i>in vitro</i>	78
Figura 08. Supervivencia a los 3 días	83
Figura 09. Supervivencia a los 3 días	85
Figura 10. Supervivencia a los 3 días	86
Figura 11. Supervivencia a los 5 días	87
Figura 12. Supervivencia a los 10 días	88
Figura 13. Supervivencia a los 3 días	89
Figura 14. Supervivencia a los 5 días	90
Figura 15. Supervivencia a los 10 días después de la siembra	91
Figura 16. Sobrevivencia a los 7 días	92
Figura 17. Sobrevivencia a los 15 días	93
Figura 18. Número de brotes por plántula a los 20 días	95
Figura 19. Número de brotes por plántula a los 27 días	97
Figura 20. Número de brotes por planta a los 34 días	99

Figura 21. Altura de explante (cm) - 15 días después de la siembra.....	101
Figura 22. Altura de explante a los 22 días después de la siembra.....	103
Figura 23. Tamaño de explante a los 29 días después de la siembra.....	104
Figura 24. Presencia de raíz a los 27 días.....	105
Figura 25. Presencia de raíz a los 34 días.....	106
Figura 26. Comparación del promedio de número de brotes y altura de explante (cm), para determinar el mejor explante.....	107
Figura 27. Comparación del promedio de porcentaje de sobrevivencia y presencia de raíz, para determinar el mejor medio de multiplicación.....	108

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo *in vitro* de tejidos de especies vegetales nativas y vulnerables se ha convertido hoy en día uno de los objetivos principales de investigación, el cual busca la estandarización de un protocolo de Micropropagación para la conservación y preservación de plantas endémicas y silvestres, como es el caso de la flor de arena (***Clinopodium revolutum*** (Ruiz & Pav.) Govaerts).

La flor de arena es un ejemplar propio de la parte alta de la localidad de Huayllacallán, distrito de Kichki; que se ha visto afectada por la recolecta indiscriminada por los mismos agricultores de la zona dejando escasas poblaciones naturales y produciendo la erosión genética de esta especie.

Cada día hay más demanda de flor de arena en Huánuco y el mercado nacional; por tanto las poblaciones naturales van disminuyendo drásticamente aun cuando son recolectadas con una hoz. La capacidad de regeneración es baja y es de urgencia tener más atención en esta especie en el aspecto de multiplicación, para repoblar y/o iniciar con el proceso de cultivo. Una herramienta muy útil para lograr este objetivo, es empleando la Micropropagación o cultivo *in vitro*.

No existe línea base ni estudios referentes a la propagación sexual y asexual de flor de arena (***Clinopodium revolutum*** (Ruiz & Pav.) Govaerts), tampoco los lugareños saben cómo se reproducen, hace falta estudiar las formas de reproducción asexual; por lo expuesto es necesario recurrir a la técnica del cultivo *in vitro*, para la multiplicación, preservación y conservación de esta especie.

Objetivo general

- a) Obtener plántulas establecidas *in vitro* de “flor de arena” *Clinopodium revolutum* (Ruiz & Pav.) Govaerts empleando la técnica del cultivo *in vitro*.
- b) Obtener una producción masiva de plántulas *in vitro* de “flor de arena” en la etapa de multiplicación.

Objetivos específicos

- a) Determinar el explante adecuado que permita establecer *in vitro* a la “flor de arena”.
- b) Determinar el protocolo de desinfección, que presente un alto porcentaje de plántulas establecidas *in vitro* de “flor de arena”.
- c) Identificar el explante ideal de “flor de arena” que, permita la producción masiva de plántulas *in vitro* de “flor de arena”.
- d) Identificar el mejor medio de multiplicación para una mayor tasa de multiplicación de “flor de arena”.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1.1. Origen y distribución

Según los reportes realizados por el Herbario Missouri Botanical Garden, *Clinopodium revolutum* o “flor de arena” es propia del Páramo Pluvial – Subalpino Tropical (pp-SaT). Según las colecciones encontradas en dicho herbario, esta especie se encuentra distribuida en la zona andina de Perú y Ecuador, donde las muestras colectadas fueron ubicadas en Cajamarca, Junín, La Libertad, Lambayeque, Lima – Cauta, Huancabamba – Piura, Huallaga – San Martín y Huánuco; en altitudes que va desde los 2850 hasta 4150 msnm.

2.1.2. Clasificación taxonómica

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Asteraceae Takht.

Orden: Lamiales Bromhead

Familia: Lamiaceae Martinov

Tribu: Menthinae

Género: *Clinopodium* L.

Especie: *Clinopodium revolutum* (Ruiz & Pav.) Govaerts
(Washington, 2016).

2.1.3. Características generales de las Lamiaceae

Es una familia de plantas aromáticas conformada principalmente por hierbas o arbustos, provistas en todas sus partes de glándulas secretoras de aceites esenciales volátiles (que son muy variados en esta familia) (Fernández y Rivera, 1994).

2.1.3.1. Caracteres vegetativos

Porte: hierbas y pequeños arbustos raramente árboles. Los tallos son frecuentemente cuadrangulares.

Hojas: generalmente simples, opuestas o decusadas, sésiles o pecioladas, sin estípulas. A menudo toda la planta está cubierta por pelos y glándulas que emiten fragancias aromáticas.

2.1.3.2. Caracteres reproductores

Flores: perfectas pero en muchos géneros los órganos estaminados se encuentran reducidos. Zigomorfas, a veces muy contraídas, con menos frecuencia solitarias y axilares.

Perianto: presentan cáliz bilabiado o regular de cinco piezas parcialmente soldadas, que a veces crece rodeando el fruto, y la corola tiene los pétalos unidos, simetría dorsiventral, con una parte cilíndrica (tubo) y otra rasgada que consta de cinco lóbulos parcialmente soldados formando dos labios para facilitar el aterrizaje de los insectos, que se acercan en busca de néctar.

Androceo: estambres insertos en el tubo, inclusos o exertos, 4 en la mayoría de los géneros, con el par inferior más largo; en otros 2, entonces, con o sin estaminodios.

Gineceo: ovario súpero, 2 carpelos soldados, 2 óvulos por lóculo, cada lóculo con un segunda escisión por la cual el ovario aparece con 4 lóculos con 1 óvulo cada uno.

Fruto: de 1-4 nueces uniseminadas con pericarpo duro o raramente drupáceo.

Semilla: con endosperma escaso o nulo; embrión en general recto (Helechosa, 2013).

2.1.4. Características del género (*Clinopodium* = Satureja)

2.1.4.1. Caracteres vegetativos

Hábito

En su gran mayoría, las especies del género *Clinopodium* presentan un hábito leñoso vivaz. El resto de especies son caméfitos cuya forma de crecimiento parece estrechamente condicionada y adaptada a las condiciones climáticas en que se desarrollan. *S. obovata*, de la zona más térmica, presenta tallos erguidos o decumbentes de crecimiento indefinido originado a menudo matas algo elevadas. *S. montana* L., adaptada a vivir en zonas montañosas donde las heladas no son infrecuentes, desarrolla un hábito más compacto y achaparrado, con ramas erecto – ascendentes que mueren anualmente en la época térmicamente desfavorable y alcanzan todos una altura muy semejante;

produce brotes especiales invernantes en la base de los tallos que se desarrollan activamente en la primavera siguiente (López, 1994).

Hojas

La morfología de las hojas es uno de los caracteres más importantes para la diagnosis de los distintos taxones. Las hojas presentan en muchos aspectos gran variabilidad, pues su longitud, anchura y disposición más o menos conduplicadas son caracteres que se pueden modificar según las condiciones ecológicas en que se desarrolla la planta, siendo frecuente observar en los ejemplares que crecen a la sombra unas hojas sorprendentemente anchas y grandes, muchas veces planas; modificaciones similares se aprecian en las plantas cultivadas.

Uno de los caracteres importantes a tener en cuenta es la presencia o no de dimorfismo foliar, fenómeno que tiene una importancia biológica indudable y permite reconocer fácilmente al grupo de taxones más próximamente emparentados con *S. montana*, los únicos en que se produce. La forma de la hoja es otro carácter importante que permite reconocer a los distintos taxones, sobre todo si se asocia a la terminación más o menos aguda u obtusa (López, 1994).

Indumento

Está integrado por pelos tectores y pelos glandulares; los primeros, generalmente de membrana engrosada, varían desde pelos largos pluricelulares, de unos 0,4 – 0,8 mm , que se presentan en forma de cilios marginales o formando parte del carpostegio, a pelos más cortos, de hasta 0,4 mm , pluricelulares o unicelulares, algo cónicos y ganchudos, con paredes muy gruesas y punteadas; estos últimos se presentan en hojas, tallos y cálices,

variando mucho en longitud y quedando reducidos en algunos casos a pequeñas espículas, con 1 ó 2 células , que en ocasiones son de color blanco, reflejando la luz y constituyendo una excelente protección contra una insolación excesiva; en el tallo son retrorsos mientras que en hojas y cálices suelen ser antrorsos (López, 1994).

2.1.4.2. Caracteres reproductores

Inflorescencia

Como es típico de las labiadas, está formada por cimas axilares bracteoladas que originan verticilastros laxos y no muy bien definidos; en *S. salzmanni* sin embargo, las flores, en corto número, se sitúan en el centro de las rosetas de hojas, en cimas paucifloras tan contraídas que resultan a menudo solitarias.

El número de flores por verticilastro es un carácter muy variable del que generalmente vale más prescindir. La longitud de brácteas y bractéolas constituye un carácter algo mejor, así como la disposición más o menos apretada de los verticilastros; pero estos caracteres muestran excepciones frecuentes por lo que hay que tomarlos con gran reserva. Muchas veces estas diferencias están favorecidas por las condiciones ecológicas en que crece la planta (López, 1994).

Cáliz

La morfología y tamaño del cáliz constituye sin duda el carácter diagnóstico más importante pese a que, sorprendentemente, parece haber sido olvidado por la mayoría de los autores que trabajaron este grupo.

El carácter bilabiado se manifiesta en la disposición dorsiventral, forma ligeramente gibosa en ocasiones y sobre todo por la distinta anchura y longitud de los dientes, resultando los del labio inferior (labélulo) más largos y estrechos que los del labio superior (labro). Parece incluso que el carácter primitivo en *Satureja* es el cáliz bilabiado, ya que aun en las especies de cáliz regular, la escotadura que separa los dientes inferiores suele ser más profunda y a menudo éstos tienen cilios más largos que los otros (carácter típico en los cáliz bilabiados); esto hace pensar en una regresión a partir de un cáliz bilabiado, que es además el general en casi todos los géneros afines (López, 1994).

Corola

La forma, tamaño y color de la corola varían considerablemente y constituyen un mal carácter taxonómico. El color varia de blanco a veces con manchas rosadas o violetas a rosado violáceo. En *S. montana*, *S. intricata* y *S. innota* predominan las flores de color blanco y son de tamaño mayor que en *S. obovata*, en la que predominan las flores rosadas o violetas; pero en todos los casos hay excepciones abundantes. La forma de los lóbulos, la escotadura del labio superior, pilosidad, etc., varían lo suficiente para no prestarles excesiva atención como caracteres diagnósticos (López, 1994).

Frutos

Tampoco en las clusas se aprecian diferencias notables que permita su aplicación como carácter taxonómico; son en general largadas, con dos caras planas, el dorso convexo y rematan en punta redonda semiesférica provista de diminutas glándulas (López, 1994).

2.1.5. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de plantas o tejidos vegetales se define como al conjunto de técnicas de cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles de porciones de una planta madre, semillas, embriones, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos, cuya finalidad es el establecimiento de protocolos de micropropagación de especies vegetativas a gran escala (Pierik, 2007).

El cultivo de tejidos, como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Roca y Mroginski, 1991).

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* posibilita la reproducción de material vegetal de forma más rápida que los métodos tradicionales empleados en los viveros. El método es especialmente ventajoso para la propagación de plantas que han sido limpiadas de patógenos o seleccionadas o introducidas recientemente como variedades que se requiere multiplicar rápidamente.

Además, el cultivo de tejidos puede acelerar el establecimiento de nuevos cultivos a partir de la flora silvestre, y la disponibilidad de semillas híbridas se puede incrementar por el clonaje de las plantas originales. La micropropagación es la técnica de cultivo de tejidos económicamente más utilizada debido a su impacto en la producción comercial de plantas. Inclusive varias compañías tienen una unidad de micropropagación y emplean suficientes trabajadores como investigadores y otros como personal operativo (Pedroza, 2008).

El término “cultivo de tejidos” vegetales o de plantas se refiere al cultivo “*in vitro*” de cualquier estructura viva de una planta, sean éstas una célula, un tejido o un órgano, bajo condiciones asépticas. La técnica “*in vitro*” significa literalmente “en vidrio” debido a que el cultivo se encuentra dentro de un frasco de vidrio o de plástico transparente, la propagación *in vitro*, también se le conoce como “micropropagación” debido a la obtención y manejo de plantas en miniatura llamadas “plántulas”. La tasa de multiplicación es mucho más rápida que por métodos tradicionales, el conjunto de estas técnicas forman parte de la Biotecnología Vegetal (Centro Internacional de la Papa, 1999).

El desarrollo de las diferentes vías del cultivo de tejidos se basa en la capacidad de las células vegetales para regenerar una planta completa idéntica a la original. Esto permite obtener numerosos cambios fisiológicos, genéticos y morfológicos mediante el empleo de reguladores de crecimiento, como auxinas, Citoquininas, giberelinas y poliaminas, los cuales originan una serie de reacciones en las células vegetales que alteran procesos metabólicos y posibilitan obtener resultados de interés (Perea y Tirado, 2011).

1.1.5.1. Micropropagación vegetal

La micropropagación consiste en la propagación de un genotipo a gran escala a través del empleo de técnicas de cultivo *in vitro*. El cultivo es una herramienta para el mejoramiento ya que se producen plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales, esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a estímulos adecuados. Así las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones

somáticos de acuerdo con la competencia que posean y al estímulo que reciba (Cassara, 1999).

La micropropagación vegetal, o propagación clonal masiva de plantas superiores, posibilita la obtención y cultivo a gran escala. Se realiza bajo estrictas condiciones de esterilidad en un medio sintético nutritivo y con control de temperatura, luz y fotoperiodo (Rivero, 2011).

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, a través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. El explante más usado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas de las plantas. Los frascos que contiene las plantas 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 luz. Por su parte el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar. La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación (Calderón, 1987).

1.1.5.2. Aplicaciones

Según Ignacio (2003), Alejandro (2007) y Segretin (2015), refieren que el cultivo de tejidos tiene aplicaciones muy diversas como:

- a. En producción comercial: numerosas ornamentales se producen así, vendiéndose plantitas formadas en medios artificiales de cultivo en tubos o frascos, para su posterior trasplante a macetas o arriates.

- b. En producción de planta comercial libre de enfermedades, en particular de virus.
- c. En conservación de germoplasma que de otra forma habría de conservarse en colecciones vivas.
- d. En la producción de variación utilizable en mejora por medio de la variación somato clonal.
- e. En el llamado rescate de embriones, esto es, la obtención de híbridos interespecíficas cuando el embrión degenera en condiciones naturales: su extracción temprana y cultivo *in vitro* posibilitan la consecución de la planta adulta.
- f. En la obtención de híbridos somáticos.
- g. En la obtención de haploides por medio del cultivo de anteras.
- h. En selección *in vitro* a herbicidas, etc.
- i. Asociada a la ingeniería genética, en la transformación de plantas superiores.
- j. Aunque no sea estrictamente una cuestión de mejora, en la producción (aún experimental) de semillas artificiales, consistentes en un embrión obtenido por cultivo de tejidos rodeado de una capa de un material que admite la desecación y la rehidratación posterior.
- k. Finalmente, como cabe suponer, en la investigación de los procesos de morfogénesis y embriogénesis.

- l. La multiplicación de plantas: Micropropagación
- m. La mejora sanitaria: Microinjerto
- n. Propagación masiva de plantas, especialmente para especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción.
- o. Obtención de plantas libres de virus
- p. Conservación de germoplasma (conjunto de individuos que representan la variabilidad genética de una población vegetal).
- q. Producción de nuevos híbridos.

1.1.5.3. Clases de crecimiento *in vitro*

Existen dos clases de crecimiento en un cultivo *in vitro*:

- a. **Crecimiento organizado** se denomina cuando se utilizan puntos de crecimiento (meristemas apicales) de tallos y raíces, yemas florales, pequeños frutos, nudos y cultivo de embriones. Estos explantes cuando no son cultivados "*in vitro*" continúan creciendo con su estructura.
- b. **Crecimiento desorganizado** se denomina cuando segmentos de tejidos son cultivados *in vitro* estos carecen de estructuras diferenciadas. El tejido diferenciado puede incrementarse en volúmen por sucesivos sub – cultivos y mantenerse en medio de cultivo por períodos largos (CIP, 1999).

1.1.5.4. Ventajas

El CIP, (1999) y Alejandro (2007), mencionan que las ventajas del cultivo *in vitro* son los siguientes:

- a. Es el único método conocido actualmente para erradicar virus, viroides, micoplasmas y otros patógenos a partir de material enfermo.
- b. Propagación clonal masiva de plantas libres de enfermedades en corto tiempo.
- c. Mantiene el cultivo libre de plagas y enfermedades, por ser una técnica que requiere de mucha asepsia.
- d. Evita la erosión genética.
- e. Reduce costos de labores agronómicas en el mantenimiento de grandes colecciones de germoplasma en el campo.
- f. Los clones pueden ser propagados en cualquier época del año, mientras que por métodos convencionales, dependen de condiciones propicias (épocas de siembra, etc.).
- g. Facilita el intercambio de material genético e introducción cuarentenaria.
- h. Reduce el riesgo de pérdidas genéticas, al evitar la mezcla del material por cruzamiento.
- i. Por medio de esta técnica es posible cultivar polen y anteras, mediante los cuales se producen plantas haploides.

- j. Cultivo y fusión de protoplastos para recombinar genes, para la obtención de nuevos genotipos. Igualmente el cultivo de callos y cultivo de suspensión de células, facilitan la realización de trabajos para la obtención de plantas de constitución genética diferente.
- k. Permite realizar estudios de interacción hospedero – parásito y estudios de pruebas a estrés de salinidad y temperatura.
- l. Producción y extracción de productos químicos valiosos en mayor cantidad que de la planta crecida y cosechada en campo.
- m. Uniformidad y reproductibilidad
- n. Obtención de un producto “superior”
- o. Aplicable a un amplio espectro de especies.
- p. Mejor planificación durante el año.
- q. Ahorro de espacio.
- r. Alta tasa de multiplicación.
- s. Disminución de costos.

1.1.5.5. Desventajas

Según Pedroza (2008) y El CIP (1999), el cultivo *in vitro* tiene las siguientes desventajas:

- a. En algunos sistemas de propagación *in vitro* la estabilidad genética es débil.

- b. Las plantas producidas *in vitro* pueden mostrar características poco convenientes *in vivo* como la excesiva producción de ramas laterales y paso total a la fase juvenil.
- c. En el caso de las plantas leñosas la inducción de raíces es frecuentemente difícil. En algunas ocasiones las raíces formadas *in vitro* pueden resultar no funcionales y necesitar ser reemplazadas *in vivo* por nuevas raíces adaptadas al suelo.
- d. La transferencia de las plantas desde el tubo de ensayo al suelo es un poco delicado.
- e. Cuando las plantas que deben ser cultivadas en el exterior han sido clonadas *in vitro* y después trasplantadas al suelo, existe el peligro del clon muera por la acción de patógenos, tan pronto como surja una nueva sepa de microorganismos a la que la planta sea inmune.
- f. Se puede perder la capacidad de regeneración por cultivo de callos o de células en suspensión.
- g. En algunos casos el aislamiento estéril es extremadamente difícil de realizar.
- h. El clonado *in vitro* exige una aportación de mano de obra importante, lo que redundará en precios relativamente altos para las plantas micropropagadas.
- i. Requiere de infraestructura y equipamientos especiales.
- j. La adquisición de productos químicos es costosa y difícil especialmente en países en vías de desarrollo con pocos recursos económicos.

- k. Difícil de instalar laboratorios “*in vitro*” donde no exista fluido eléctrico o se presenten interrupciones periódicas de este porque se malogran los cultivos.
- l. La escasa literatura relacionada a la técnica de cultivo “*in vitro*” en nuestro medio.

1. Criterios deseables para conseguir el éxito del cultivo in vitro

Según Pedroza (2008), para tener éxito al utilizar esta técnica, se debe tener en cuenta los siguientes criterios:

- a. Estabilidad genética, es decir, ausencia de mutaciones.
- b. Selección cuidadosa para conseguir que el material de partida esté libre de enfermedades.
- c. La transferencia desde el tubo al suelo no debería ser demasiado difícil.
- d. La capacidad de regeneración no debería perderse.

1.1.5.6. Etapas de la micropropagación

Perea y Tirado (2011), Aguirre *et al* (2010), Pedroza (2008), hacen referencia que los sistemas *in vitro* agrupan básicamente cinco etapas que consisten en: a) selección de la especie, b) establecimiento, c) multiplicación, d) enraizamiento y acondicionamiento e) aclimatación de las plántulas. Cada una de estas etapas son importantes dependiendo del objetivo que se proponga realizar.

a) Establecimiento

El objetivo de esta etapa es obtener un cultivo aséptico de la especie que se quiere multiplicar. El establecimiento, incluye la selección previa del explante más adecuado, su desinfección y la siembra en condiciones asépticas en medio de cultivo. Esta etapa termina con la obtención de un cultivo libre de contaminaciones visibles y suficientemente adaptadas a las condiciones *in vitro*, de modo que pueda presentar una reacción favorable a la aplicación de fitorreguladores en la etapa siguiente (multiplicación).

Para lograr el establecimiento es necesario tener en cuenta lo siguiente:

1. Selección del explante
 - Tipo de explante
 - Edad fisiológica de la planta madre
 - Estado sanitario
2. Época de recolección de los explantes
3. Tamaño del explante
4. Desinfección
5. Aislamiento de explantes
6. Medios de cultivo y hormonas de crecimiento
7. Condiciones de incubación

b) Multiplicación in vitro

Esta es la fase más importante y determinante en todo programa de propagación *in vitro*, donde se realiza la verdadera multiplicación o micropropagación de una especie o variedad y se define no solo el número de plantas o propágulos a obtener; sino su calidad genética. Como su nombre lo

indica, el objetivo de esta fase es la producción del mayor número posible de propágulos (plantas, microtubérculos, microbulbillos) a partir de explantes (meristemos apicales o axilares, yemas axilares o adventicias) ya establecidos *in vitro*.

La proliferación de los diferentes explantes en el cultivo *in vitro* puede lograrse con el uso de reguladores de crecimiento como componentes principales de un medio de cultivo previamente establecido y un adecuado manejo del proceso *in vitro*. Los explantes, al ser seccionados en condiciones estériles y cultivadas nuevamente en el medio fresco, inducen nuevos brotes, operación que se repite hasta lograr la cantidad de propágulos deseados para pasar a la fase III: enraizamiento.

Los factores que determinan la multiplicación, que pueden ser manipulados para optimizar esta etapa son:

1. La composición del medio de cultivo
2. Las condiciones de incubación
3. Los cuidados en la manipulación del material durante los subcultivos.

c) Enraizamiento

Estado de “maduración”, de endurecimiento o de preparación de la plántula para el ambiente natural.

En este estado se induce el enraizamiento de las plántulas, al estado autotrófico. Estas son cultivadas generalmente en frascos de boca ancha conteniendo medio sólido, al cabo de un tiempo son trasplantadas a macetas o a camas en condiciones de invernadero.

Dependiendo de la especie, en ocasiones los brotes generan la formación de raíces durante la etapa de multiplicación; sin embargo, resulta más exitoso el comportamiento *ex vitro* si se realiza un diseño exclusivo para la etapa de enraizamiento y acondicionamiento. Las condiciones en las que se encuentran las plántulas en el laboratorio son muy diferentes a las condiciones de exterior y se requiere de un proceso especial.

Los factores que determinan el enraizamiento son:

1. Influencia del material vegetal
2. Medio de cultivo
3. Condiciones de incubación
4. Tamaño del explante

d) Aclimatación

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. La etapa de trasplante involucra la transferencia de la planta de condiciones *in vitro* a condiciones *in vivo* en invernadero, donde es sometida a una etapa de aclimatación y endurecimiento. Esta etapa es bastante crítica y representa en algunos casos un factor limitante en el proceso de micropropagación. Esto se debe básicamente a los siguientes factores:

- 1) La planta pasa de una situación de reducido flujo transpiratorio debido a la baja intensidad de luz y elevada humedad relativa a un ambiente que demanda un incremento en la tasa de transpiración, quedando muy susceptible al estrés hídrico.

- 2) La planta pasa de una condición heterotrófica, en la cual depende de un suplemento externo de energía (sacarosa en el medio), para un estado autotrófico, en el cual precisa realizar fotosíntesis para sobrevivir.
- 3) Pasa de una condición de alta disponibilidad de nutrientes en el medio hacia otra donde precisa rápidamente incrementar la absorción de sales.
- 4) La planta sale de un estado aséptico hacia un ambiente donde está sujeta al ataque de microorganismos saprófitos y eventualmente patogénicos.

1.1.5.7. Factores que afectan la micropropagación

Según Pedroza (2008), entre los factores que influyen en el comportamiento morfogénico del explante bajo condiciones *in vitro*, con fines de propagación masiva, se encuentran los siguientes:

- a) Naturaleza de la planta a micropropagar.
- b) Estado fisiológico de la planta fuente del explante.
- c) El explante.
- d) Condiciones medioambientales.
- e) Número de subcultivos.
- f) Aclimatación de las plántulas micropropagadas.

2.1.6. Composición del medio de cultivo

Los medios de cultivo deben ser preparados con sumo cuidado, ya que los diversos productos que lo conforman intervienen en cantidades pequeñas. Un adecuado medio de cultivo debe contener sales minerales, vitaminas,

reguladores de crecimiento, aminoácidos y otros suplementos orgánicos, los que varían ampliamente respecto a su composición y concentración.

La mayoría de los medios contienen uno o más clases de vitaminas, igualmente reguladores de crecimiento, aminoácidos como estimuladores de crecimiento y, para darle a la planta una buena estructura, se agrega una fuente de energía como la sacarosa. Finalmente, como agente solidificante del medio, se agrega agar (CIP, 1999).

a. Sales minerales

Para un rápido y vigoroso crecimiento, las plantas necesitan tomar del medio, cantidades relativamente grandes de algunos iones inorgánicos llamados macronutrientes y cantidades pequeñas o trazas de otros llamados micronutrientes.

Los macronutrientes son indispensables para el crecimiento de la planta y están constituidos por seis principales elementos: nitrógeno (N), fósforo (P), calcio (Ca), potasio (K), magnesio (Mg), y azufre (S); también son considerados dentro de este grupo iones de sodio (Na) y cloro (Cl), aunque el rol de estos en la planta son poco conocidos.

Los micronutrientes generalmente se usan como sales de iodo (I), hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu), molibdeno (Mo) y cobalto (Co).

Son componentes de la célula de la planta, y son importantes para el metabolismo y su fisiología (CIP, 1999).

b. Reguladores de crecimiento

Son compuestos que se sintetizan naturalmente dentro del tejido de la planta, es decir, endógenamente y cumplen un rol regulatorio más que nutricional en el crecimiento y desarrollo. Estos compuestos generalmente activos a muy bajas concentraciones, son conocidos como sustancias de crecimiento, fitohormonas u hormonas vegetales. Químicos sintéticos con similar actividad fisiológica para modificar el crecimiento y desarrollo de la planta son denominados también como reguladores de crecimiento (CIP, 1999).

El (CIP, 1999), reporta que existen varias clases de sustancias reconocidas como reguladores de crecimiento y son:

Auxinas

Son ampliamente usadas en trabajos de micropropagación y son incorporados al medio de cultivo para estimular el crecimiento de callos, suspensión de células u órganos (meristemas, tallos o ápices de raíces) y para regular la morfogénesis, especialmente en interacción con Citoquininas.

El ANA (ácido naftalenacético), es la auxina más usada en el cultivo de tejidos, concentraciones altas de esta favorecen el crecimiento de callos. El 2,4 – D es la auxina más fuerte, induce la formación de callos, puesto que tiende a suprimir la organogénesis en muchas dicotiledóneas y actúa antagónicamente en el desarrollo. Puede causar rápido incremento de ploidía y de pérdida de cromosomas resultando en aneuploidía.

Citoquininas

Son compuestos que también intervienen como sustancias de desarrollo. Son muy importantes para la regulación de crecimiento y morfogénesis en

cultivo de tejidos. Como en el caso de auxinas existen compuestos naturales y sus análogos sintéticos.

Las Citoquininas son constituyentes del ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) y del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y tiene interacción sinérgica con las auxinas. Cuando la proporción citoquinina/auxina es alta favorece la formación de tallos y si es baja favorece el enraizamiento.

Gibberalinas

Las Gibberalinas constituyen otra clase de sustancias de crecimiento de plantas. Varias Gibberalinas se han sintetizado a partir de la planta, pero solamente dos o tres compuestos activos se encuentran disponibles en el mercado. El ácido giberélico (AG₃) es el producto más frecuentemente empleado en el cultivo *in vitro*.

Las Gibberalinas influyen en el crecimiento y desarrollo de diferentes maneras: por ejemplo, promueven el crecimiento de entrenudos, estimulan y aceleran la floración, inducen la fructificación y partenocarpia de éstos. Sin embargo tienden a inhibir el normal crecimiento de raíces y tallos en cultivos de callos.

Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) es otra sustancia de actividad regulatoria en el crecimiento de las plantas y es sintetizado en plastidios o cloroplastos.

El ABA actúa como inhibidor de crecimiento y por ende bloquea el efecto de las Gibberalinas y Citoquininas, promueve el estado de dormancia, estimula la

abscisión de las hojas e inhibe la síntesis del ácido ribonucleico (ARN), pero no la del ácido desoxirribonucleico (ADN). También promueve el cierre de los estomas, tiene efecto sinérgico con auxinas en el enraizamiento de esquejes. Se utiliza solamente para casos especiales.

Etileno

La presencia del gas etileno (C_2H_4) en la atmósfera causa anomalías en el crecimiento de las plantas. Sin embargo se ha descubierto que el etileno es producido por la misma planta y se cree que puede actuar como una sustancia de crecimiento con algunas funciones reguladoras.

c. Vitaminas

Son numerosos compuestos orgánicos complejos, presentes en productos naturales o pueden ser fabricados sintéticamente. Son esenciales en pequeñas proporciones en la dieta de los animales y de los humanos. Estas mismas sustancias también son necesarias para ciertas funciones catalíticas en el metabolismo celular de las plantas; sin embargo, estas no son necesarias en el cultivo de las plantas *in vivo* y que estas las sintetizan según su requerimiento, mientras que en plántulas *in vitro* son:

1. Tiamina o vitamina B₁ o tiamina – HC1 o clorhidrato de tiamina.
2. Ácido nicotínico, niacina o vitamina B5.
3. Piridoxina o Piridoxina – HC1 o vitamina B6.
4. Mio – inositol, meso – inositol o i – inositol.
5. Ácido D – pantoténico de calcio.

d. Fuentes de carbono y energía

La mejor fuente de carbono y energía universalmente usada es la sucrosa llamada también sacarosa.

Otras como la glucosa, maltosa y rafinosa también son preferidas después de la sucrosa en orden de importancia. Otros carbohidratos como fructosa, lactosa, dextrosa, galactosa y almidón pueden usarse, pero sus efectos son inferiores como fuente de carbono y energía.

El azúcar blanco refinado, de uso doméstico, es suficientemente pura como para ser utilizada en el medio de cultivo para múltiples propósitos, en reemplazo de la sucrosa.

e. Aminoácidos

Los aminoácidos pueden acumularse en forma libre en los tejidos o pueden asociarse entre sí formando proteínas. La proporción de aminoácidos libres y aminoácidos proteicos de las plantas varían con la especie y la variedad, con el tipo de órgano, con su estado fisiológico, con su estatus nutricional y con el microclima dentro del cual se desarrolla la planta.

f. Nitrógeno orgánico

Como fuente de nitrógeno orgánico tenemos a los aminoácidos (glutamina, asparagina), bases nitrogenadas (adenina), etc. Una fuente de nitrógeno orgánico en el medio de cultivo no es necesario, pero su inclusión es benéfica.

g. Agar

Es deseable que el explante tenga contacto con el medio de cultivo sin que esta se encuentre sumergida en dicho medio. Por otra razón, agregue al medio sustancias gelatinizantes como agar, gelatina o geles derivados de almidón para que no se sumerja el explante. Estos productos además sirven de soporte a la plántula para mantenerse en forma vertical dentro del material de vidrio.

La sustancia más usada es el agar, exclusivamente como agente gelatinizante, es decir para preparar medio semi – sólido, comúnmente llamado en el laboratorio medio sólido.

2.1.7. Protocolos en la Micropropagación

2.1.7.1. Protocolos de desinfección

La desinfección superficial de los explantes se puede realizar mediante el uso de compuestos químicos con el objeto de eliminar los microorganismos con el menor daño posible para el explante. El procedimiento más utilizado consiste en una doble desinfección mediante la inmersión de los explantes en etanol (70 % v/v) durante 20 - 60 segundos seguido de hipoclorito de sodio 1 – 3 %, durante 3 - 30 minutos, dependiendo de la naturaleza del explante. Algunos procedimientos se basan en el empleo de únicamente etanol o de hipoclorito de sodio. Finalmente, es necesario eliminar los restos de estos productos mediante varios lavados con agua destilada estéril.

En los casos en los cuales no se utilice etanol, la adición de agentes tensoactivos junto con el desinfectante es lo recomendado. El más utilizado es Tween-20. El proceso de desinfección superficial con hipoclorito de sodio es de

fácil manejo y no es tóxico para el material de siembra utilizado. Se sumergen los explantes en una solución al 5 % (p/v), con dos gotas de Tween 20, durante diez minutos y se enjuagan cuatro veces con agua destilada estéril. Con esta desinfección se obtiene una contaminación cero en todos los explantes utilizados. Un lavado previo de los explantes con agua corriente y detergentes, ayuda a una mejor desinfección (Revista Corpoica, 2007).

Sumergir el material retirado de la planta madre en etanol 70°, durante uno a dos minutos, antes de desinfectarlo con un agente químico como el hipoclorito de sodio (NaClO con 0,5 – 1 % de principio activo) en solución, a la que se agregará una gota de detergente. La concentración de la solución de hipoclorito y el tiempo necesario para la desinfección varía con el tipo de explante. La función del detergente es disminuir la tensión superficial, favoreciendo el contacto entre el explante y el desinfectante. La agitación suave y continua durante el proceso cumple la misma función. El hipoclorito de sodio será eliminado mediante tres lavados con agua destilada estéril (Guía 90: Micropropagación- La desinfección de los explantes). A continuación, puede ser necesaria una disección en condiciones asépticas para eliminar las partes dañadas de los explantes (Raven, 2001).

Desinfectar el material vegetal (las ramas de donde se tomarán los nudos) antes de realizar la disección del mismo; este material fue sumergido en Benlate (fungicida sistémico) al 2 % durante una hora y luego se realizaron cuatro enjuagues con solución jabonosa y agua destilada estéril; después se hizo una inmersión de las ramas en alcohol al 70 % durante un minuto y se lavaron con agua destilada estéril, tres veces (Pedroza, 2008).

Antes de colocar las semillas en el sustrato de germinación, es necesario lavar las semillas con agua destilada esterilizada, más 5 gotas de jabón líquido

y antioxidantes como ácido cítrico y ascórbico (50 mg/litro). Enseguida se hacen cuatro (4) enjuagues con agua destilada estéril. A continuación se ejecuta una inmersión en etanol al 70 % durante un minuto, luego se realiza una inmersión en NaOCl al 5 % (p/v) durante 5 minutos. Finalmente se enjuaga con agua destilada esterilizada, más antioxidantes como ácido cítrico y ácido ascórbico (50 mg/litro) (Marquínez, 1998).

La esterilización se puede hacer mediante inmersión en etanol al 70 % durante 30 segundos, seguida de 25 minutos en agitación en una solución acuosa al 21 % de Hipoclorito de sodio tomada de una solución de lejía comercial. Después se lavan tres veces con agua destilada esterilizada (Zárate, *et al*, 1997).

Los explantes se deberán desinfectar para liberarlos de bacterias y hongos y poder realizar posteriormente los cultivos, ya que existe una gama de productos o compuestos químicos que es posible utilizar como desinfectantes, pero en la actualidad, se ha generalizado el empleo de etanol (70 % v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1 % al 5 % (p/v), con menor frecuencia se utilizan el hipoclorito de calcio $[Ca(OCl)_2]$ del 6 % al 12 % y el cloruro de mercurio ($HgCl_2$) del 0,1 % al 1,5 % que es muy tóxico y difícil de remover del explante, en algunos casos, resulta útil emplear un agente tenso activo, por ejemplo Tween-20 del 0,01 % al 0,1 %. Después de usar los desinfectantes será necesario remover los restos de estos por medio de lavados con agua destilada estéril, haciendo un mínimo de tres enjuagues sucesivos durante mínimo 5 minutos cada uno (Roca y Mroginski, 1991).

Para la desinfección de los nudos, se recomienda aplicar tratamientos mediante el uso de Alcohol al 70 % y NaOCl en concentraciones de 2,5 % y 5 % durante diferentes lapsos que podrán ser de 1, 2, 3, 4 y 5 minutos, donde se

evalúan los siguientes parámetros: porcentaje de contaminación, porcentaje de oxidación y porcentaje de supervivencia, siendo este último, la variable respuesta definitiva, para escoger el mejor tratamiento de desinfección (Díaz *et al*, 2005).

2.1.7.2. Tipos de explantes

Explante es cualquier parte vegetal que ha sido separada de la planta, que puede ser un tejido (fragmentos de hojas, tallos, raíces, pétalos, etc.). Con excepción de los óvulos y el polen, los explantes están constituidos por tejidos y/o células somáticos. Cuando se extrae un explante de la planta se debe tener en cuenta el tamaño, la fuente, la edad fisiológica del mismo. La asepsia de los explantes y las condiciones de esterilidad, donde se desarrolla el proceso de establecimiento del material vegetal *in vitro*, es de vital importancia para el éxito de la técnica de cultivo de tejidos vegetales (Ramos, 2012).

Respecto a la fuente de explantes se recomienda utilizar un banco de plántulas *ex vitro* utilizando semilla colectada de árboles sanos y vigorosos. También se puede realizar la germinación *in vitro* de las semillas seleccionadas, pero teniendo cuidado en el cumplimiento estricto de los protocolos de asepsia; además, es recomendable mantener estas plantas madres, es decir, las plantas donadoras, durante un tiempo que puede oscilar entre varias semanas a varios meses, en un invernadero bajo condiciones controladas (Marquinez, 1998).

Los explantes que mejores resultados dan son los tomados de las plantas jóvenes, debido a que el desarrollo de la morfogénesis (capacidad de regenerar órganos y tejidos a partir de un explante inicial) es más rápido, la

extracción de explantes se debe realizar en cabinas de flujo laminar para garantizar la asepsia (López, 2010).

La edad del explante es importante en el desarrollo *in vitro* y crítico para las especies maderables; la micropropagación es más fácil empleando tejidos juveniles, y más difícil, con tejidos adolescentes y maduros (Villalobos *et al*, 1984).

Se debe procurar utilizar explantes que contengan mayor proporción de tejido meristemático o que contengan mayor capacidad de expresar la totipotencia. Yemas apicales normalmente presentan mayor capacidad de crecimiento que las yemas axilares, que se encuentran bajo efecto de la dominancia apical (Aguirre *et al*, 2010).

La propagación *in vitro* de la mayoría de las plantas semi leñosas requiere de la utilización de explantes provenientes de materiales juveniles. Es importante por lo tanto, formar un banco de plántulas *ex vitro* utilizando semillas recolectadas de árboles sanos y vigorosos preferentemente cercanos al sitio donde se van a plantar los futuros árboles; los explantes se toman de plantas jóvenes (López, 2010).

De acuerdo con el material vegetal utilizado, la técnica la propagación *in vitro* puede ser de: Cultivo de órganos (yemas axilares y apicales, nudos en tallos), cultivo de tejidos (hojas, peciolo, meristemos) y cultivo de células (células y protoplastos), utilizando reguladores de crecimiento. En todos los casos se puede lograr como producto final, plantas enraizadas, que van a ser aclimatadas previamente a la etapa de desarrollo en viveros convencionales, en donde lograrán el crecimiento necesario para su instalación en el campo en forma definitiva (Domínguez, 2002).

2.2. ANTECEDENTES

Cultivo in vitro de segmentos nodales de hierbabuena (*Mentha piperita*)

La hierbabuena es una especie de la familia de las Lamiaceas, utilizada en infusiones y cataplasmas por sus propiedades estimulantes, carminativas y antiespasmódicas. El objetivo del trabajo fue realizar el cultivo *in vitro* a partir de segmentos nodales; para lo cual se utilizó una muestra bien limpia de hierbabuena, se cortaron segmentos del tallo de la hierbabuena conteniendo un nudo y se eliminaron las hojas, en seguida se procedió a lavar la muestra.

Se Pasó rápidamente el material vegetal por alcohol de 70° y sumergió el explante durante 10 minutos, en una solución de agua sanitaria diluida con 1 gota de detergente. Agitar suavemente durante todo el proceso de desinfección. Se realizó tres lavados de 1, 3 y 5 minutos, con agitación suave. En condiciones asépticas, se transfirió los explantes a los recipientes con medio nutritivo y luego se acondicionó en un ambiente a 20 – 28 °C , en presencia de luz.

Los resultados se obtuvieron después de tres semanas de sembrada la muestra. Se observó a pesar del cuidado en la desinfección, muestras contaminadas y para contrarrestar este problema, se sembró la hierbabuena en un vaso y se extrajeron los segmentos nodales que crecían (Malajovich, 2014).

Multiplicación in vitro de segmentos de tallo apical de ajedrea (*Satureja hortensis* L.)

Ajedrea L. (Lamiaceae) es ampliamente utilizada como infusión por su aroma y sabor y como planta medicinal para el tratamiento de diversas

enfermedades. Aunque el género *Satureja*, por ser una fuente de importantes compuestos biológicamente activos, la información científica sobre estas plantas son muy escasas. Por lo tanto los estudios sobre métodos adecuados de técnicas de propagación y cultivo son importantes en la búsqueda de soluciones que dan lugar a una mayor producción de biomasa.

Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de BAP en presencia y ausencia de ANA, en la multiplicación *in vitro* a partir de segmentos del tallo apical de ajedrea de jardín. Los explantes utilizados fueron a partir de plántulas germinadas *in vitro* y se cultivaron en medio MS de nutrientes, además de 30 g de sacarosa 100 mg de myo-inositol y 7 g de agar. Anteriormente, las semillas se esterilizaron superficialmente por inmersión durante 30 segundos 70 % (v/v), durante 15 minutos en hipoclorito de sodio (NaClO) y 1,5 % (v/v), por último fueron sometidas a un triple enjuague con agua destilada estéril. El diseño experimental fue completamente al azar en un esquema factorial 2x5, que corresponden a las concentraciones de ANA (0 y 1 μ M) y BAP (0, 5, 10, 15 y 20 μ M) con seis repeticiones, cada una compuesto de tres explantes.

Después de 60 días del inicio del cultivo *in vitro*, se observó la interacción ($p < 0,05$) entre ANA y BAP para las variables de número de brotes por explante y porcentaje de explantes con formación de raíces. Para el porcentaje de explantes con brotes y número de hojas por explante, hubo efecto significativo solo para el factor de BAP. El número variable de brotes por explante mostró interacción entre los factores, siendo el porcentaje más alto en presencia de ANA y BAP en el rango de 10 - 15 μ M. En presencia de auxina, el valor más alto se obtuvo con 15 μ M.

El enraizamiento de los segmentos apicales fue mayor en presencia de ANA y ausencia de BAP. El mayor número de hojas fue influenciado por la mayor concentración de BAP (15 μ M), esta concentración independientemente de ANA, siempre mostró mejores resultados en la multiplicación de la especie. Para el aumento del número de brotes y hojas excepto para el enraizamiento fueron influenciados por la auxina (Navroski, *et al.* 2013).

Micropropagación de *Hedeoma drummondii* Benth

La especie ***Hedeoma drummondii* Benth** (Lamiaceae) es una planta útil de Hidalgo, México, con uso medicinal, comestible y con potencial de insecticida por el contenido de pulegona en sus aceites esenciales extraídos. En parte por su valor, la especie ha sido sobrecolectada en el medio silvestre, por lo que es necesario establecer estrategias como la micropropagación para la conservación de la misma y para la obtención de sus aceites esenciales. Este trabajo es un reporte de los avances en el cultivo de **H. drummondii**.

El material biológico utilizado fueron las semillas de **H. drummondii** que se obtuvieron a partir de frutos provenientes de una planta adulta. Las semillas se colocaron en una caja Petri con agua destilada y cinco gotas de hipoclorito de sodio comercial (6 % de cloro activo) durante 24 horas. Se escarificaron las semillas con ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) durante 15 segundos, posteriormente se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en sobres de papel filtro asegurado con grapas. Los sobres se transfirieron a 50 ml de hipoclorito de sodio comercial (6 % de cloro activo) al 30 % durante 20 minutos. Por último en una campana de flujo laminar, se realizaron tres enjuagues de un minuto, cada uno en agua destilada esterilizada.

Se estableció *in vitro* en cuatro medios de cultivo diferentes: medio de Murashige y Skoog al 50 y al 100 % de sus componentes y medios de MS al 100 %, adicionados con 1 o 2 mg de ácido giberélico (AG₃). Las plántulas que se desarrollaron a partir de las semillas sirvieron como fuente de explantes (microesquejes con dos entrenudos), los cuales se transfirieron a cinco tratamientos: medio de MS 100 % adicionados con 1 ó 2 mg de N6 - benciladenina (BA) y medio de MS 100 % adicionados con 1 ó 2 mg de N6 -2, isopentenil adenina (2iP) y un control de MS al 100 % de sus componentes.

Los resultados que se obtuvieron mostró que los tratamientos de MS al 100 % de sus componentes y MS al 100 % adicionado con 2 mg de ácido giberélico, fueron los mejores medios para promover la germinación; mientras que para la producción de brotes, los medios óptimos fueron MS 100 % adicionado con 2 mg de BA y MS 100 % adicionado con 2iP (Samora y López, 2013).

La propagación in vitro de Muña Muña (*Clinopodium odorum* (Griseb.) Harley)

Un protocolo de micropropagación fue desarrollado para poder ayudar en la protección y el aumento de las poblaciones naturales de ***Clinopodium odorum*** (Griseb.) Harley, planta medicinal en peligro de extinción. Los factores que afectan a la iniciación del cultivo en brotación, crecimiento, enraizamiento y aclimatación, fueron estudiadas utilizando segmentos nodales a partir de las plántulas germinadas *in vitro*, en seis medios suplementados con diferentes concentraciones y combinaciones de 6-bencilaminopurina (BAP) 0,5 - 1,5 y 2 se obtuvieron ácido naftaleno acético (NAA) (0,5 a 1,5).

Los mejores resultados para la iniciación del cultivo con tasas de multiplicación sostenibles (100 %) en medio WP sin ningún regulador del crecimiento de WP con la adición de (0,5: 1 o 0,5: 1,5) de BAP y ANA promovió un mayor alargamiento; mientras que el número óptimo de nudos se obtuvieron el plántulas en crecimiento en medio MS con la adición de 1 : 1,5 de BAP y ANA. Sin embargo, se obtuvieron el número óptimo de nudos en plántulas cultivadas en medio MS con la adición de 1: 1,5 de BAP y ANA.

El cultivo de los nudos individuales seccionados, fueron transferidos a los medios de cultivo con diferentes tasas de BAP y ANA medio MS - 9 (1,5: 1,5), SH - 8 (1,5: 1,0), y medio B5 - 4 (1,0: 0,5). Las plantas *in vitro* se aclimataron con éxito utilizando tierra de jardín y arena a una proporción de (2 : 1) en el invernadero, con una tasa de supervivencia superior al 90%. Las plantas cultivadas *in vitro* fueron transferidos a condiciones *ex vitro* y se evaluó la eficacia para apoyar este crecimiento, con el fin de desarrollar estrategias a largo plazo para la transferencia y la reintroducción en sus hábitats naturales (Palacio, 2012).

Reguladores de crecimiento en la multiplicación *in vitro* de *Thymus vulgaris* L.

El experimento fue realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, del Departamento de Botánica, Universidad Federal. Este trabajo se propuso como objetivo determinar los requerimientos hormonales para la multiplicación *in vitro* de esta especie, como parte de una tecnología para la multiplicación acelerada y la consiguiente obtención de material de propagación de especies de este género.

Como fuente de explante, se utilizó segmentos nodales de aproximadamente 1 cm de longitud, tallos de plantas pre establecidas en medio MS que contiene 30 g de sucrosa y 100 mg/L de mio inositol. Los tratamientos consistieron en tres concentraciones de BAP (0, 1 y 2 mg L) y tres de ANA (0, 0,25 y 0,5 mg L).

El pH se ajustó a 5,8 para luego ser autoclavadas a 121 °C con 1,05 kg de presión por cm^2 durante 20 minutos. Los frascos conteniendo a los explantes, fueron conservados en la sala de crecimiento con temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, densidad de flujo de fotones de $40 \mu \text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$, provista por lámparas fluorescentes blanco – frio y fotoperiodo de 16 horas. Después de 40 días de cultivo *in vitro*, los parámetros evaluados fueron la medida de altura, número de brotes, hojas, entrenudos y yemas.

Los resultados hizo posible concluir que la baja concentración de ANA sin la adición de BAP en el cultivo es favorable para la multiplicación *in vitro* de plantas de **Thymus vulgaris L.**, proporcionando características morfológicas y fisiológicas aptas para su comercialización (Rubin *et al*, 2007).

Micropropagación de “Tomillo de las Sierras” *Hedeoma multiflorum* Benth

El estudio de la especie **Hedeoma multiflorum** resulta de interés por sus múltiples usos y su creciente explotación. El objetivo de este trabajo fue optimizar la micropropagación adicionando al medio de cultivo distintas combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento.

El material vegetal que se utilizó fueron a partir de esquejes de plantas crecidas en campo, seleccionando estacas con un nudo las que, previamente

desinfectadas se sembraron en medio basal MS suplementado con BA: 0,01; 0,1 y 0,5 mg/L, combinadas con 0,01; 0,1 y 0,5 mg/L de ANA. Las estacas nodales se colocaron en tubos con 10 ml de medio estéril, y se cultivaron en cámara de cría a 22 °C de temperatura con fotoperiodo de 16 horas luz durante tres meses de cultivo.

Los resultados muestran que el medio basal Murashige and Skoog (MS) diluido $\frac{1}{2}$ la concentración de sales minerales, suplementado con 0,01 de mg/L de N6-benciladenina (BA) y 0,5 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) promueve una mayor elongación del eje principal, un mayor número de nudos y de ramificaciones, además de favorecer el enraizamiento. La adición de ácido giberélico AG3 a concentraciones de 0,1; 1; 5 y 10 mg/L al medio óptimo dio como resultado plántulas de entrenudos más largos (1 cm) (Paula, *et al.* 2007).

Propagación In Vitro del “toronjil” (*Melissa officinalis* L.)

Melissa officinalis L. (Lamiaceae), es una hierba perenne conocida como “toronjil”, sus hojas son utilizadas en la medicina popular en infusiones, debido a sus propiedades sedativas, antiespasmódicas entre otros.

La especie presenta una propagación natural ineficiente e insuficiente para establecer una buena población clonal, por ello la necesidad de encontrar un método de micropropagación efectivo. En base a estudios previos de esta especie se diseñó un protocolo con la aplicación conjunta de los reguladores de crecimiento benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) en medio Murashige y Skoog (MS) con concentración salina diluida a la mitad, con el objetivo de lograr la propagación vegetativa *in vitro* de *M. Officinalis* en una sola etapa.

Como fuente de explantes se emplearon plántulas de 60 días de edad obtenidas a partir de semillas germinadas *in vitro*. Se sembraron segmentos uninodales con dos yemas axilares y ápices en medio basal Murashige y Skoog's (MS) con concentración salina diluida a la mitad (control) con la adición de 3 % de sacarosa, 0,8 % de agar y pH 5,6. Los medios fueron suplementados con distintas combinaciones y concentraciones de benciladenina (BA: 0,22; 0,45; 0,67 μM) y ANA (0,26; 0,53; 0,80 μM).

Los resultados obtenidos indican que las plántulas originadas a partir de estacas con un nudo y ápices en relación a la longitud del eje principal y número de nudos, poseen valores similares, por ello es más adecuado cultivar estacas uninodales debido a que estas regeneran dos ramificaciones, mientras que a partir de los ápices solo se produce la elongación del eje principal. El porcentaje de supervivencia *in vitro* de los explantes (uninodales y apicales) fue de un 95,8 %. Las plántulas acondicionadas en tierra y perlita tuvieron un 94,5 % de supervivencia. Se observó enraizamiento en el 100 % de todas las variantes implementadas *in vitro* y hubo diferenciación a nivel del grosor de las mismas, esto favoreció la etapa posterior de aclimatación (Lloret, *et al.* 2007).

2.3. HIPÓTESIS

Hipótesis general

- a. Se podrá obtener plántulas establecidas *in vitro* de "flor de arena *Clinopodium revolutum* (Ruiz & Pav.) Govaerts), al evaluar diferentes explantes y protocolos de desinfección.

- b. Se podrá obtener una producción masiva de plántulas *in vitro* de “flor de arena” *Clinopodium revolutum* (Ruiz & Pav.) Govaerts), al evaluar diferentes explantes y protocolos de multiplicación.

Hipótesis específicas

- a. Al usar diferentes explantes, se seleccionará el adecuado, que permita establecer *in vitro* a la “flor de arena”.
- b. Al desarrollar diferentes protocolos de desinfección, se podrá identificar al que presente un alto porcentaje de plántulas establecidas *in vitro* de “flor de arena”.
- c. Si se prueban diferentes tipos de explantes, se determinará el ideal, que permita la producción masiva de plántulas *in vitro* de “flor de arena”.
- d. Será necesario experimentar distintos medios de cultivo, para obtener una alta tasa de multiplicación de plántulas *in vitro* de “flor de arena”.

2.4. VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Cuadro 01. Variables y operacionalización de variables

VARIABLES	INDICADORES
Var. Independiente ➤ Tipo de explante	<ul style="list-style-type: none"> • Tallo uninodal (parte basal) • Brotes con hojas (parte media) • Brotes sin hojas (parte media) • Brotes terminales • Brotes laterales (parte media) P1: 1.25% de solución de lejía por 30"; 3 enjuagues en agua

<p>➤ Protocolo de desinfección</p>	<p>destilada estéril; alcohol de 70° por 20".</p> <p>P2: 1.53% de solución de lejía por 1'; 3 enjuagues en agua destilada estéril; alcohol de 70° por 20".</p> <p>P3: 2.04% de solución de lejía por 2'; 3 enjuagues en agua destilada estéril; alcohol de 70° por 10".</p> <p>P4: 1.53% de solución de lejía por 5", 3 enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° por 1".</p> <p>P5: 0.5% de solución de lejía por 5", 3 enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° por 1".</p> <p>P6: 0.25% de solución de lejía por 10", 3 enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° por 1".</p> <p>P7: 2.04% de solución de lejía por 30", 3 enjuagues en agua destilada estéril.</p> <p>P8: 2.04% de solución de lejía por 40", 3 enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° disminuido al 50% por 10" + carbón activado.</p> <p>P9: 1.53% de solución de lejía por 30", 3 enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° por 1" + antibiótico.</p> <p>P10: 2.04 % de solución de lejía por 30 ", 3 enjuagues en agua estéril.</p> <p>P11: 1.53 % de solución de lejía por 30 ", 3 enjuagues en agua estéril, alcohol de 70° por 1".</p>
<p>Var. Dependiente</p> <ul style="list-style-type: none"> • Etapas de la micropropagación 	<ul style="list-style-type: none"> • Establecimiento in vitro: tasa de supervivencia • Multiplicación: porcentaje de supervivencia, número de brotes, tamaño de explante, presencia de raíz.
<p>Var. Interviniente</p> <ul style="list-style-type: none"> • Condiciones de laboratorio 	<ul style="list-style-type: none"> • T°

Fuente. Elaboración propia

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Escuela Académico Profesional de Agronomía de la Universidad Nacional Hermilio Valdizán ubicado en:

Ubicación Política

Región : Huánuco
Provincia : Huánuco
Distrito : Pillco Marca
Lugar : Laboratorio Central de la UNHEVAL

Ubicación Geográfica

Latitud Sur : 09° 55' 40''
Longitud Oeste : 76° 14' 00''
Altura : 1 935 msnm

3.2. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN

3.2.1. Tipo de investigación

Aplicada, porque se recurrió a los principios de la ciencia expresada en protocolos en la micropropagación de flor de arena, generando tecnologías para solucionar los problemas prácticos de los agricultores de esta especie.

3.2.2. Nivel de investigación

Descriptivo, la etapa de establecimiento *in vitro*, porque se observó las características morfológicas y las respuestas cualitativas de los explantes a los diferentes protocolos de desinfección.

Experimental, las dos últimas etapas de multiplicación y enraizamiento, porque se manipuló intencionalmente la variable independiente (protocolos) y la variable dependiente (micropropagación), aplicando técnicas de cultivo de células y tejidos.

3.3. POBLACIÓN, MUESTRA Y UNIDAD DE ANÁLISIS

3.3.1. Población

a) Etapa de Establecimiento in vitro

Ensayos previos

La población total del área experimental, se conformó por 01 morfotipo de “flor de arena” (hembra) la cual estuvo constituido por 6 tratamientos con 25 repeticiones cada uno, haciendo un total de 150 unidades experimentales.

Introducción definitiva

La población del área experimental se conformó 01 morfotipo de “flor de arena” (hembra) la cual estuvo constituido por 04 tratamientos cada una con 25 repeticiones, haciendo un total de 100 unidades experimentales.

b) Etapa de Multiplicación y enraizamiento

Para esta etapa la población se conformó por 04 tratamientos cada uno con 25 repeticiones, haciendo un total de 100 unidades experimentales.

3.3.2. Muestra

La muestra estuvo constituida por toda la población existente en cada una de las etapas.

Dónde: $n = N$

3.3.3. Tipo de muestreo

Es probabilístico en su forma de Muestreo Aleatorio por Conglomerados (MAC) porque todos los elementos de la población formaran parte de las unidades muestrales.

3.3.4. Unidad de análisis

La unidad de análisis están representados por cada tubo de ensayo que contiene una plántula de flor de arena cultivadas en condiciones *in vitro*.

3.4. TRATAMIENTOS EN ESTUDIO

El presente trabajo de investigación se realizó en dos grandes etapas: la primera de establecimiento *in vitro*, que a su vez consistió en dos actividades (3 ensayos previos e introducción definitiva); y la segunda etapa fue la de multiplicación y enraizamiento, para lo cual en todas ellas se designaron tratamientos de acuerdo a las necesidades del experimento, los que se detallan a continuación (ver cuadro 02):

Cuadro 02. Tratamientos en estudio

ETAPAS	ACTIVIDADES
1° Establecimiento <i>in vitro</i>	Tres ensayos previos
	Introducción definitiva
2° Multiplicación y Enraizamiento	

3.4.1. Etapa de establecimiento *in vitro*

3.4.1.1. Fase de campo

En este periodo de campo se realizaron visitas al caserío de Rodeo de Margo donde se encuentran las poblaciones silvestres y juntamente con los pobladores de la zona, guiados por ellos se observaron e indagó sobre sus formas de reproducción y crecimiento de esta planta, así mismo se visitó 4 hábitats que estaban distribuidos en este distrito para ratificar como crecían, en qué condiciones ambientales, el tipo de suelo, así mismo tomamos conocimiento de que existe 2 morfotipos de esta especie que son denominados como “flor de arena hembra” y “flor de arena macho”, que tienen características diferenciales en las hojas y considerando que la demanda en el mercado es el morfotipo de “flor de arena hembra”.

Se recolectó ramas de esta especie tanto para hacer en primer lugar, identificada por especialistas como también para los trabajos de micropropagación.

3.4.1.2. Fase de laboratorio

Se realizaron tres ensayos preliminares, cada uno con seis tratamientos y veinticinco repeticiones. Luego se realizó la introducción definitiva con cuatro

tratamientos y veinticinco repeticiones cada uno, en ellas se evaluó los explantes vivos y muertos. Los detalles se muestran en los siguientes cuadros (03, 04, 05 y 06):

Cuadro 03. Ensayo uno. Para determinar protocolos de desinfección y tipos de explantes de introducción.

Tipo de explante	Protocolos de desinfección	Tratamientos	N° de repeticiones
(Bt) Brotos terminales	P1: 1,25 % de solución de lejía por 30"; 3 enjuagues en agua destilada estéril; alcohol de 70° por 20".	T1: Bt + P1	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
	P2: 1,53 % de solución de lejía por 1'; 3 enjuagues en agua destilada estéril; alcohol de 70° por 20".	T2: Bt + P2	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
	P3: 2,04 % de solución de lejía por 2'; 3 enjuagues en agua destilada estéril; alcohol de 70° por 10".	T3: Bt + P3	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
Tu Tallos uninodal	P1: 1,25 % de solución de lejía por 30"; 3 enjuagues en agua destilada estéril; alcohol de 70° por 20".	T4: Tu + P1	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
	P2: 2,04 % de solución de lejía por 1'; 3		R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9,

(parte basal)	enjuagues en agua destilada estéril; alcohol de 70° por 20".	T5: Tu + P2	R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
	P3: 1,53 % de solución de lejía por 2'; 3 enjuagues en agua destilada estéril; alcohol de 70° por 10".	T6: Tu + P3	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
Total de unidades experimentales (UE)			150

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 04. Ensayo dos. Determinación de protocolos de desinfección y tipos de explantes.

Tipo de explante	Protocolo de desinfección	Tratamiento	N° de Repeticiones
Brotos con hojas (parte media)	P1: 1,53 % de solución de lejía por 5", 3 enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° por 1".	T1: Brote con hojas + P1	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
	P2: 0,5 % de solución de lejía por 5", 3 enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° por 1".	T2: Brote con hojas + P2	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
	P3: 0,25 % de solución de lejía por 10", 3 enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° por 1".	T3: Brote con hojas + P3	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.

Brotos sin hojas (parte media)	P1: 1,53 % de solución de lejía por 5", 3 enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° por 1".	T4: Bote sin hojas + P1	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
	P2: 0,75 % de solución de lejía por 5", 3 enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° por 1".	T5: Bote sin hojas + P2	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
	P3: 0,5 % de solución de lejía por 10", 3 enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° por 1".	T6: Bote sin hojas + P3	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 05. Ensayo tres. Determinación de los protocolos y explantes a usar en la introducción *in vitro*.

Tipo de explante	Protocolo de desinfección	Tratamiento	N° de Repeticiones
Bt Brote terminal	P1: 2,04 % de solución de lejía por 30", 3 enjuagues en agua destilada estéril.	T1: Bt + P1	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
	P2: 2,04 % de solución de lejía por 40", 3 enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° disminuido al 50 % por 10" + carbón activado.	T2: Bt + P2	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
	P3: 1,53 % de solución de lejía por 30", 3 enjuagues en agua	T3: Bt + P3	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13,

	destilada estéril, alcohol de 70° por 1" + antibiótico.		R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
BI Brote lateral (parte media)	P1: 2,04 % de solución de lejía por 30", 3 enjuagues en agua destilada estéril.	T4: BI + P1	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
	P2: 2,04 % de solución de lejía por 40", 3 enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° disminuido al 50 % por 10" + carbón activado.	T5: BI + P2	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
	P3: 1,53 % de solución de lejía por 30", 3 enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° por 1" + antibiótico.	T6: BI + P3	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 06. Tratamientos para el establecimiento *in vitro*.

Explantes	Protocolos de desinfección	Tratamientos	N° de Repeticiones
(Bt) Brotos terminales	P1: 2,04 % de solución de lejía por 30", 3 enjuagues en agua estéril + solución con fungicida por 20" + antibiótico.	T1: Bt + P1	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
	P2: 1,53 % de solución de lejía por 30", 3 enjuagues en agua estéril, alcohol de 70° por 1" + solución con fungicida por 20" +	T2: Bt + P2	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19,

	antibiótico.		R20, R21, R22, R23, R24, R25.
(BI) Brotos laterales	P1: 2,04 % de solución de lejía por 30", 3 enjuagues en agua estéril + solución con fungicida por 20" + antibiótico.	T3: BI + P1	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
	P2: 1,53 % de solución de lejía por 30", 3 enjuagues en agua estéril, alcohol de 70° por 1" + solución con fungicida por 20" + antibiótico.	T4: BI + P2	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
Total de unidades experimentales (UE)			100

Fuente. Elaboración propia

3.4.2. Etapa de multiplicación

3.4.2.1. Fase de laboratorio

De las plántulas de flor de arena obtenidas en la etapa de establecimiento *in vitro*, se propuso dos explantes tomados de la parte basal y apical dando como resultado cuatro tratamientos con veinticinco repeticiones cada uno, la multiplicación se realizó en dos medios de cultivos diferentes los cuales se detallan en el siguiente cuadro:

Cuadro 07. Tratamientos para la determinación del tipo de explante y medio de cultivo apropiado en la fase de multiplicación.

N° de nudos	Medio de cultivo	Tratamientos	N° de Repeticiones
	A	T1: tallo con 3 nudos y medio A.	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20,

3			R21, R22, R23, R24, R25.
	B	T2: tallo con 3 nudos y medio B.	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
2	A	T3: tallo con 2 nudos y medio A.	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
	B	T4: tallo con 2 nudos y medio B.	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25.
Total de Unidades Experimentales (UE)			100

Fuente: elaboración propia.

Dónde:

A: medio base para orquídea

B: medio base para papa

3.5. PRUEBA DE HIPÓTESIS

3.5.1. Diseño de la investigación

1° Etapa de Establecimiento *in vitro*

Se hizo la distribución de la población en tratamientos con sus repeticiones con fines cualitativos, los mismos que se presentan en porcentajes.

2° Etapa de Multiplicación

El tipo de diseño de investigación es experimental, en su forma de Diseño Completamente al Azar con error de muestreo (DCA con error de muestreo), constituido por:

Las unidades experimentales fueron establecidas y conducidas en condiciones de laboratorio en un solo ambiente de siembra e incubación.

A. Modelo aditivo lineal

Se utilizó el siguiente modelo aditivo lineal para un diseño completamente al azar:

$$Y_{ij} = \sim + t_i + e_{ij}$$

Para:

$i = 1, 2, 3, \dots, t$ (N° de tratamientos)

Dónde:

Y_i = Unidad experimental que recibe el tratamiento i (observación de la unidad experimental)

\sim = Media general a la cual se espera alcanzar todas las observaciones (media poblacional)

t_i = Efecto verdadero del i ésimo tratamiento

e_{ij} = Error experimental

B. Análisis de varianza

Se utilizó la técnica estadística de Análisis de Varianza o prueba de F (ANVA o ANDEVA), con 0,05 y 0,01 de margen de error de las fuentes de variabilidad de los tratamientos (nivel de significación). Para la prueba de comparación de promedios de los tratamientos se utilizó la prueba de TUKEY (comparaciones múltiples) con margen de error de 5 % y 1 %.

Cuadro 08. Análisis de Varianza para el Diseño Completos al Azar (DCA)

Fuentes de Variación (F. V)	Grados de Libertad (GL)	CME
Tratamientos	$(t-1) = 17$	$\sigma_e^2 + r\sigma_t^2$
Error experimental	$t(r-1) = 72$	σ_e^2
TOTAL	$tr-1 = 89$	

Fuente: Eyzaguirre, 1999.

3.6. DATOS A REGISTRAR

Los datos a registrar se basaron en los objetivos propuestos en la investigación en cada una de las etapas de la micropropagación, tal como se detallan a continuación:

3.6.1. Etapa de Establecimiento in vitro

3.6.1.1 Fase de Laboratorio

Tasa de Supervivencia

La evaluación se realizó a los 3, 5 y 10 días después de la siembra utilizando el método de observación y conteo, para determinar el número de explantes vivos lo que significa que pasaron la barrera de contaminación. Los datos se presentan en porcentajes.

3.6.2. Etapa de Multiplicación

Porcentaje de sobrevivencia

Los 4 tratamientos con sus respectivas repeticiones fueron evaluadas a los 7 y 15 días de su multiplicación, haciendo un conteo y se determinará cuál es el mejor explante para esta etapa. Los datos se presentan en porcentajes.

Número de brotes

Esta variable se estimó contabilizando el número de brotes, emitidos por el explante durante su desarrollo, a los 20, 27 y 34 días de su multiplicación.

Tamaño de explante después de la siembra

Esta evaluación se realizó a los 15, 22 y 29 días después de la siembra, se midió desde la base sobre el medio de cultivo hasta el ápice de la plántula, con la ayuda de papel milimetrado

Presencia de raíz en las plántulas

Se utilizó el método de la observación y conteo para determinar la presencia o ausencia de raíces en esta etapa. La evaluación se realizó en los 4 tratamientos a los 22 y 29 días después de la multiplicación.

3.7. MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS

3.7.1 Materiales

Material vegetal

Se utilizó la planta flor de arena (***Clinopodium revolutum***) (planta madre) morfotipo hembra, proveniente del comunidad campesina de Rodeo de Margo del distrito de Kichki; de la cual se extrajo los explantes propuestos para el desarrollo de la investigación.

Algunas de las características que presenta este morfotipo son: las hojas por su forma son cordadas, distribución opuesta, cubierto por abundantes pelos o tricomas, de 1,70 mm de tamaño; las flores son grandes y regulares, hermafroditas, de 2,5 – 4,0 cm de largo; herbáceas o semileñosas, son muy ramificadas y crecen semi postrados sobre el suelo. Este morfotipo es la más cotizada en el mercado.



Figura 01. Morfotipo hembra de flor de arena

Materiales para la recolección del material vegetal

Tijera podadora

Bolsas plásticas

Etiquetas

Lápiz

Material de laboratorio

Se utilizaron los materiales y equipos del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Escuela Académico Profesional de Agronomía.

Tubos de ensayo

Erlenmeyer

Placas Petri

Vaso de precipitado de 1 litro

Magentas

Frascos de vidrio de 200 ml

Probetas de 100 y 500 ml

Pipeta

Piceta

Mango de bisturí N° 4

Hojas de bisturí N° 21

Pinzas de punta fina

Tijera

Papel de aluminio

Cinta parafilm

Mechero

Papel toalla

Papel bond reciclado

Mascarilla

Gorro

3.7.2 Equipos

Cámara fotográfica

Cámara de flujo laminar

Autoclave

Destilador de agua

Balanza analítica electrónica

Estereoscopio
Horno microondas
Refrigeradora

3.7.3 Insumos

Sales de MS (Murashige y Skoog)
Agar
Sucrosa
Alcohol de 96°
Alcohol de 70°
Agua destilada
Detergente
Lejía comercial (4,9 % de hipoclorito de sodio).
Carbón activado (0,05 g)
Antibiótico (Ceftriaxona a razón de 1 g/l)
Fungicida (Benlathe a razón de 0,6 g/l)

3.8 CONDUCCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Con la finalidad de determinar el mejor protocolo de desinfección, tipo de explante y medio de cultivo para la micropropagación de “flor de arena” se realizó 2 etapas:

3.8.1 Etapa de establecimiento in vitro

En esta etapa se tiene dos fases: la primera de campo y la segunda de laboratorio, y en cada una de ellas se realizaron diferentes actividades, las mismas que se describen a continuación:

3.8.1.1 Fase de Campo

A. Visita a las zonas del hábitat natural

En vista de que la “flor de arena” no se encuentra en el mercado como material fresco, y además, cuando lo comercializan lo venden en mezcla con otros morfotipos similares, no apto para el desarrollo del presente trabajo de investigación; por lo expuesto fue necesario coleccionar en su hábitat natural fresco y apto para la micropropagación. Esta especie silvestre se encuentra en la comunidad de Rodeo de Margo a más de 3750 msnm, perteneciente al centro poblado de Huayllacallán distrito de Kichki – Huánuco; a una temperatura promedio de 15 °C durante el día y entre 7 a 8 °C por las noches (Ver figura 02). Se realizaron más de ocho visitas al campo.



Figura 02. Hábitat natural de la “flor de arena”.

La flor de arena se encuentra sobre las rocas, con abundante materia orgánica proveída por los musgos y otras especies propios de la zona como se observa en la figura 03. Se reproduce naturalmente por semilla botánica que

cae en el sustrato y rebrote aéreo después del corte con hoz realizado por los colectores de esta planta medicinal.

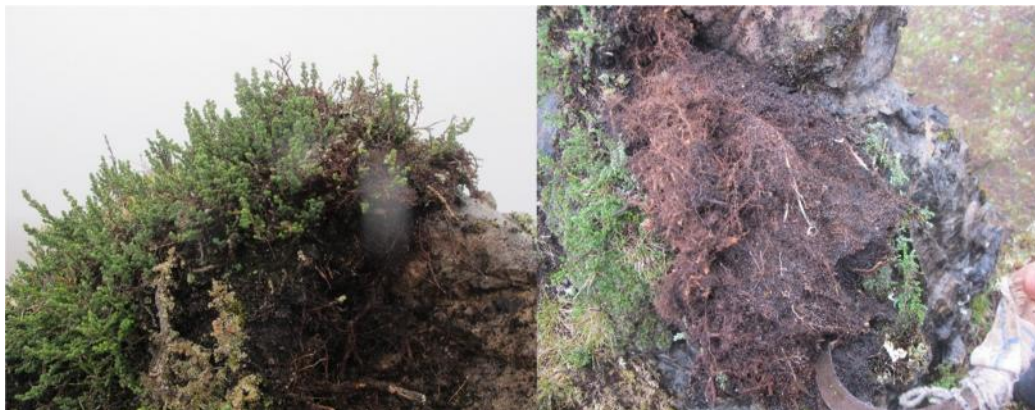


Figura 03. Sustrato con abundante materia orgánica donde se desarrolla la flor de arena.

Dentro de esta especie se observaron diferentes morfotipos con otras denominaciones como se aprecia en la figura 04. Por tal motivo se mandó a identificar la especie seleccionada para el presente trabajo.



Figura 04. Morfotipos encontrados dentro de la especie.

B. Identificación de la especie

Se colectó muestras de flor de arena hembra con flores; luego se prensó y se colocó una etiqueta con los datos del lugar de colección, fecha, altitud y una pequeña descripción del hábitat. La muestra se envió al Herbario Vargas CUZ y la determinación la realizó el Dr. Washington Galiano, como se muestra en el anexo número 1.

C. Selección y recojo de la planta madre

Una vez identificada la muestra la especie de interés comercial de los demás morfotipos, se seleccionó *in situ* de las poblaciones silvestres de “flor de arena” hembra a los individuos con las mejores características de la especie como son: vigorosidad, estado fisiológico, libre de plagas y que posean los tipos de explantes propuestos. Estas muestras se obtuvieron de las plantas en rebrote, después de haber sido colectadas.

Con la ayuda de una hoz, se extrajo plantas con sustrato, estas se colocaron en bolsas de plástico, cerrados herméticamente para evitar la pérdida de humedad durante el traslado al laboratorio. Se etiquetó con los datos de: lugar de colección, altitud, fecha de colección, nombre común de la especie.



Figura 05. Obtención de la planta madre.

D. Traslado y acondicionamiento

Las muestras traídas del campo fueron conservadas en una refrigeradora a 4 °C en las bolsas de plástico cerradas herméticamente, con la finalidad de que se mantenga fresco para extraer los explantes a introducir *in vitro*. Las muestras pueden conservarse como material fresco entre 9 a 12 días.

3.8.1.2 Fase de Laboratorio

a) Ensayos previos al establecimiento

Habiendo realizado la revisión de literaturas y no encontrado antecedentes sobre trabajos de investigación con respecto a la especie en estudio, se llevó a cabo, tres ensayos previos para determinar probables protocolos y explantes adecuados. Estas actividades se desarrollaron en base a la sugerencia de la Dra. Milka Tello Villavicencio y a la experiencia obtenida en el curso de Biotecnología Vegetal, las mismas que se detallan a continuación:

Ensayo uno:

El primer paso que se realizó fue, preparar 250 ml de medio de cultivo de introducción (medio de introducción para papa); para lo cual se necesitó:

- 7,5 g de azúcar
- 125 ml de MS
- 1,5 g de agar

En un vaso de precipitado de 500 ml se adicionó 50 ml de agua destilada, se añadió el azúcar y con la ayuda de una pipeta se fue moviendo la

solución hasta disolverlo completamente; seguido, se fue adicionando el agar y luego el MS, por último se fue adicionando agua destilada hasta enrazar a los 250 ml; se llevó al horno microondas por un espacio de 8 minutos. Se dejó reposar por 5 minutos. Transcurrido este tiempo se llevó el medio a la cámara de flujo laminar para trasvasar a los tubos de ensayo previamente esterilizados, se tapó con papel de aluminio y se esterilizó en la autoclave. Finalmente se sellaron con cinta parafilm con sus respectivas etiquetas y se acondicionaron a la espera de su gelificación para iniciar con el trabajo de siembra (1 día).

Se procedió a preparar cada protocolo de desinfección propuesto, a partir de una lejía comercial al 4.9 % de concentración de hipoclorito de sodio.

a) 1,25 % de solución de lejía por 30"; 3 enjuagues en agua destilada estéril; alcohol de 70° por 20"

b) 2,04 % de solución de lejía por 1'; 3 enjuagues en agua destilada estéril; alcohol de 70° por 20"

c) 1,53 % de solución de lejía por 2'; 3 enjuagues en agua destilada estéril; alcohol de 70° por 10".

La solución de lejía se preparó en un frasco de erlenmeyer de 250 ml, se selló con papel de aluminio y se rotuló para evitar equivocaciones al momento de la siembra, se adicionó agua destilada en frascos de 250 ml para los enjuagues, se envolvieron con papel bond reciclado.

Después de preparar los protocolos, se seleccionaron los materiales como placas Petri, pinzas, mangos de bisturí, magentas, erlenmeyer, se envolvieron con papel bond reciclado y se esterilizaron en conjunto con los protocolos en la autoclave a 20 °F por 60 minutos. Transcurrido este tiempo se

retiró la tapa y con la mano limpia se trasladó la olla interna al ambiente donde se acondicionan los materiales esterilizados, guardándose con sumo cuidado cada material.

Después de todo el proceso de esterilización (1 día), se procedió a lavar la muestra con agua y detergente, se utilizó una escobilla que ayude a eliminar las impurezas de la muestra; se enjuagó con abundante agua y se colocó en una magenta con agua destilada, esta se llevó a la cámara de flujo laminar donde se realizó la siembra. Se siguió cada uno de los protocolos propuestos para este primer ensayo. Los tubos se etiquetaron y acondicionaron en la sala de incubación, para realizar las respectivas evaluaciones.

Ensayo dos:

Observando los resultados obtenidos se hicieron nuevos ajustes y nuevas propuestas que consistieron en: a) 1,53 % de solución de lejía por 5", 3 enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° por 1"; b) 0,5 % de solución de lejía por 5", 3 enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° por 1"; c) 0,25 % de solución de lejía por 10", 3 enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° por 1" y dos tipos de explantes: brotes con hojas y brotes sin hojas tomados de la parte media de la planta madre.

Se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Ensayo tres:

En vista de los resultados obtenidos, se mejoró los protocolos y explantes y se obtuvo los siguientes: a) 2,04 % de solución de lejía por 30", 3 enjuagues en agua destilada estéril; b) 2,04 % de solución de lejía por 40", 3

enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° disminuido al 50 % por 10" + carbón activado y c) 1,53 % de solución de lejía por 30", 3 enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° por 1" + antibiótico; y los explantes brote terminal y brote lateral (parte media). En cada ensayo se realizó el mismo procedimiento descrito en el ensayo 1.

b) Introducción definitiva

En base a los resultados obtenidos en los ensayos previos, se hizo un último reajuste a los protocolos de desinfección para realizar el establecimiento *in vitro*, que consistió en:

- 2,04 % de solución de lejía por 30", 3 enjuagues en agua destilada estéril + solución con fungicida por 20" + antibiótico.
- 1,53 % de solución de lejía por 30", 3 enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° por 1", solución con fungicida por 20" + antibiótico.

Dos tipos de explantes: brotes terminales y brotes laterales tomados de la parte media de la planta madre.

En primer lugar se esterilizó los materiales contaminados de los ensayos anteriores (ver figura 6); luego se lavó cada de ellos con detergente, agua y lejía para eliminar todo residuo dentro de los tubos, terminado la limpieza se colocaron en recipientes y se esperó dos días hasta que sequen. Se envolvieron con papel reciclado y se esterilizó juntamente con los protocolos.

Para la preparación del medio se siguió el mismo procedimiento descrito en el ensayo uno con la única diferencia de que al final de la preparación del

medio de introducción antes de trasvasar a los tubos de ensayo se disolvió en 100 ml de agua destilada 0,1 g de un antibiótico (Ceftriaxona), lo cual con la ayuda de un papel filtro se fue adicionando poco a poco hasta homogenizar.



Figura 06. Esterilización de materiales contaminados.

Se realizó la siembra siguiendo los protocolos de cada tratamiento, dentro de la cámara de flujo laminar. Se etiquetó e incubó a temperatura ambiente (23 – 24 °C).



Figura 07. Proceso de siembra para el establecimiento *in vitro*.

3.8.2 Etapa de Multiplicación y enraizamiento

3.8.2.1 Fase de Laboratorio

En esta etapa, se seleccionó dos tratamientos con los mejores resultados de la etapa anterior que fueron: **T3**: brote lateral + 2,04 % de solución de lejía por 30", 3 enjuagues en agua destilada estéril, solución con fungicida por 20" + antibiótico y el **T4**: brote lateral + 1,53 % de solución de lejía por 30", 3 enjuagues en agua destilada estéril, alcohol de 70° por 1" + solución con fungicida por 20" + antibiótico.

En esta etapa de multiplicación se trabajó en dos tipos de medios de cultivo que son:

a) Medio de multiplicación para papa

Cuadro 09. Medio base para papa

Macronutrientes	Micronutrientes	Vitaminas
<ul style="list-style-type: none"> • Nitrato de amonio (NH₄NO₂) 1,650 mg/l • Cloruro de calcio (CaCl₂2H₂O) 440ml/g • Sulfato de magnesio (MgSO₄7H₂O) 370 mg/l • Fosfato de potasio (KH₂PO₄) 170 mg/l • Nitrato de potasio (KNO₃) 1,900 mg/l 	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido bórico (H₃BO₃) 6,2 mg/l • Cloruro de cobalto (CoCl₂6H₂O) 0,025 mg/l • Sulfato de cobre (CuSO₄7H₂O) 27,8 mg/l • Sulfato de hierro (FeSO₄7H₂O) 27,8 mg/l • Sulfato de magnesio (MnSO₄4H₂O) 22,3 mg/l 	<ul style="list-style-type: none"> • I-Inositol 100mg/l • Niacina 0,5 mg/l • Piridoxina HCl 0,5 mg/l • Tiamina HCl 0,1 mg/l • Glicina 2 mg/l

	<ul style="list-style-type: none"> • Yoduro de potasio (KI) 0,83 mg/l • Molibdato de sodio (Na₂MoO₄·2H₂O) 0,25 mg/l • Sulfato de Zinc (ZnSO₄·7H₂O) 8,6 mg/l • Na₂EDTA·2H₂O 37,2 mg/l <p>Ph 5,6</p>	
--	---	--

Fuente: Elaboración propia

b) Medio de multiplicación para orquídea

Cuadro 10. Medio base para orquídea

Macronutrientes 100x5 ml	Micronutrientes 100x5 ml	Vitaminas
<ul style="list-style-type: none"> • Nitrato de amonio (NH₄NO₂) 1,650 mg/l • Cloruro de calcio (CaCl₂·2H₂O) 440mg/g • Sulfato de magnesio (MgSO₄·7H₂O) 370 mg/l • Fosfato de potasio (KH₂PO₄) 170 mg/l <p>Nitrato de potasio (KNO₃) 1,900 mg/l</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido bórico (H₃BO₃) 6,2 mg/l • Cloruro de cobalto (CoCl₂·6H₂O) 0,025 mg/l • Sulfato de cobre (CuSO₄·7H₂O) 27,8 mg/l • Sulfato de hierro (FeSO₄·7H₂O) 27,8 mg/l • Sulfato de magnesio (MnSO₄·4H₂O) 22,3 mg/l • Yoduro de potasio (KI) 0,83 mg/l • Molibdato de sodio (Na₂MoO₄·2H₂O) 0,25 mg/l • Sulfato de Zinc (ZnSO₄·7H₂O) 8,6 mg/l • Na₂EDTA·2H₂O 37,2 mg/l <p>Ph 5,6</p> <p>FeNa EDTA 10 ml</p>	<ul style="list-style-type: none"> • I-Inositol 100mg/l • Niacina 0,5 mg/l • Piridoxina HCl 0,5 mg/l • Tiamina HCl 0,1 mg/l • Glicina 2 mg/l <p>ANA 0,5 ml BAP 2ml pH 5,2 Carbón activado 4 g</p>

Fuente: Elaboración propia

Se preparó 250 ml de medio de multiplicación de papa y 250 ml de orquídea, en un vaso de precipitado de 500 ml de capacidad para cada uno siguiendo el mismo procedimiento descrito en el ensayo uno.

Para ello se necesitó:

1,5 g de agar

7,5 g de azúcar

125 ml de MS.

El medio de cultivo se trasvasó en tubos de ensayo para ser esterilizados en la autoclave; terminado este paso, se procedió a sellar los tubos con cinta parafilm y se acondicionaron en la sala de incubación. Se esperó hasta que el medio haya gelificado por completo.

Se envolvieron con papel bond reciclado todos los materiales que se utilizó en esta etapa (placa Petri, magentas, pinzas, mangos y hojas de bisturí); se colocaron en la autoclave para su esterilización, luego se almacenaron en un estante.

Terminado el proceso de esterilización, se procedió a acondicionar la cámara de flujo laminar con los materiales esterilizados y el material vegetal obtenidos en la etapa anterior.

La multiplicación se realizó con la ayuda de un bisturí y una pinza, se realizaron cortes para obtener los explantes de 3 y 2 nudos de la plántula de “flor de arena”.

La siembra se realizó en cada uno de los tubos con los dos tipos de medio de cultivo, se tapó con papel de aluminio y selló con cinta parafilm, se etiquetó con los respectivos códigos de cada tratamiento; finalmente se acondicionaron a temperatura ambiente para las respectivas evaluaciones.

IV. RESULTADOS

4.1. ETAPA DE ESTABLECIMIENTO IN VITRO

4.1.1. Fase de Laboratorio

4.1.1.1. Ensayo uno

A) Tasa de Supervivencia

Evaluación a los 3 días después de la siembra

La tasa de supervivencia con el porcentaje más alto lo obtuvo el tratamiento 3 y 2 con 20 y 16 % respectivamente, seguido de los tratamientos 5 y 1 con 8 y 4 %. Llegando a obtener un 0 % de supervivencia obtenidas por los tratamientos 4 y 6, tal como se observa en la figura 08.

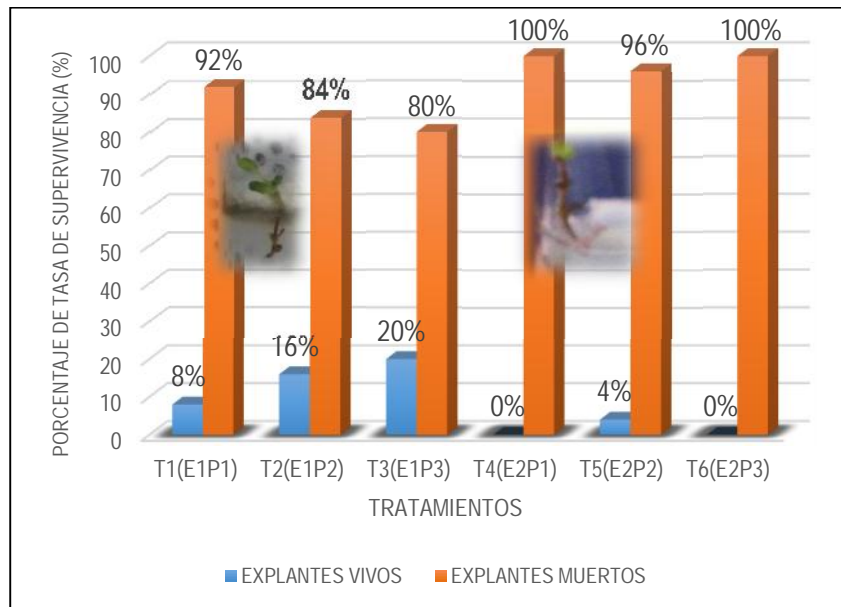


Figura 08. Supervivencia a los 3 días

En este primer ensayo al realizar la primera evaluación a los tres días después de la siembra se observó que el explante tallo uninodal en los tratamientos 4, 5 y 6 presentaban oxidación total, esto se debió a la alta concentración de hipoclorito de sodio que se empleó en el protocolo, de igual manera del tiempo de exposición del explante en el alcohol; sin embargo en los tratamientos 3 (P3: 1,53 ml de solución de lejía por 2'; 3 enjuagues en agua destilada estéril; alcohol de 70° por 10" + brote terminal) y 2 (P2: 2,04 ml de solución de lejía por 1'; 3 enjuagues en agua destilada estéril; alcohol de 70° por 20" + brote terminal) se observó un pequeño porcentaje de explantes vivos, debido a ello no se llegó a realizar las dos siguientes evaluaciones. En base a estos resultados se reformuló los protocolos y tipos de explantes para realizar un nuevo ensayo.

4.1.1.2. Ensayo dos

A) Tasa de Supervivencia

Evaluación a los 3 días después de la siembra

La tasa de supervivencia más alto para el ensayo 2 lo obtuvo el tratamiento 1 con un porcentaje de 56 %, seguido del tratamiento 4 con 40 % y los tratamientos 3 y 5 con 28 %. El porcentaje más bajo de supervivencia lo obtuvo el tratamiento 6 con 20 %.

En esta prueba se observó a los tres días después de la siembra que los explantes presentaron una alta contaminación y en algunos casos como en los tratamientos 4, 5 y 6 oxidación. Sin embargo en los tratamientos donde se presentaron mayor contaminación (1, 2 y 3), los explantes se conservaron igual que al momento de la siembra. Lo que permitió afirmar que el explante (brotes

sin hojas) tomadas de la parte media de la planta madre resultan ser muy susceptibles a los protocolos propuestos. Al igual que en el primer ensayo no se pudo realizar las siguientes evaluaciones.

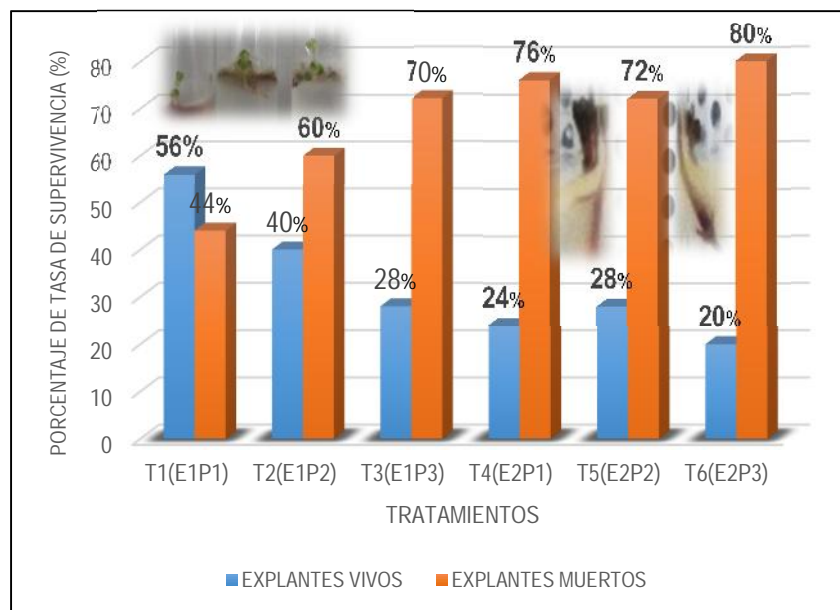


Figura 09. Supervivencia a los 3 días.

4.1.1.3. Ensayo tres

A) Tasa de Supervivencia

Evaluación a los 3 días después de la siembra

En el gráfico 10 se observa que el porcentaje más alto de supervivencia lo obtuvo el tratamiento 3 con 80 %, seguido de los tratamientos 2, 6 y 5 con 76, 72 y 68 % respectivamente. Obteniendo los porcentajes más bajos los tratamientos 1 y 4 con 64 y 60 %.

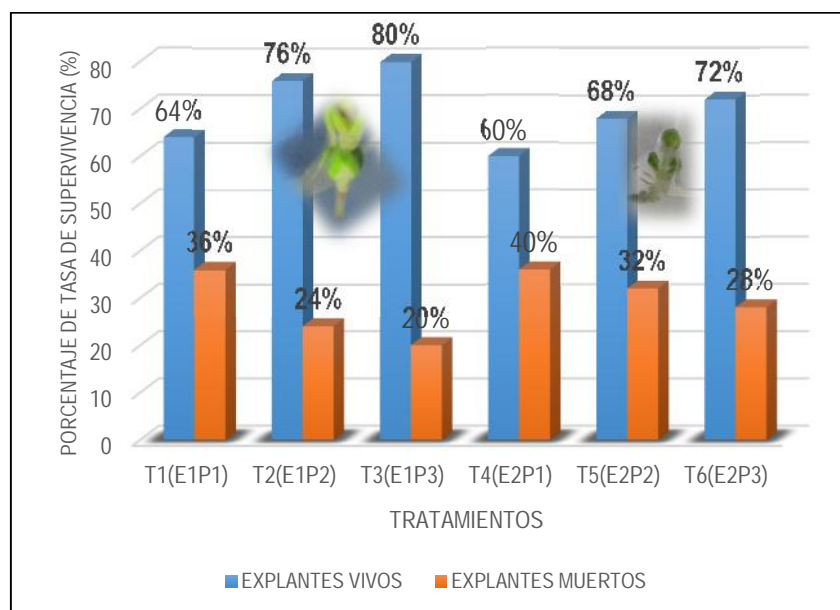


Figura 10. Supervivencia a los 3 días.

Evaluación a los 5 días después de la siembra

En esta evaluación se aprecia una ligera variación en cuanto al porcentaje de explantes vivos, tal como se aprecia en la figura 11. El tratamiento 3 obtuvo un 68 % de supervivencia bajando un 12 % en su porcentaje en comparación a lo obtenido a los tres días.

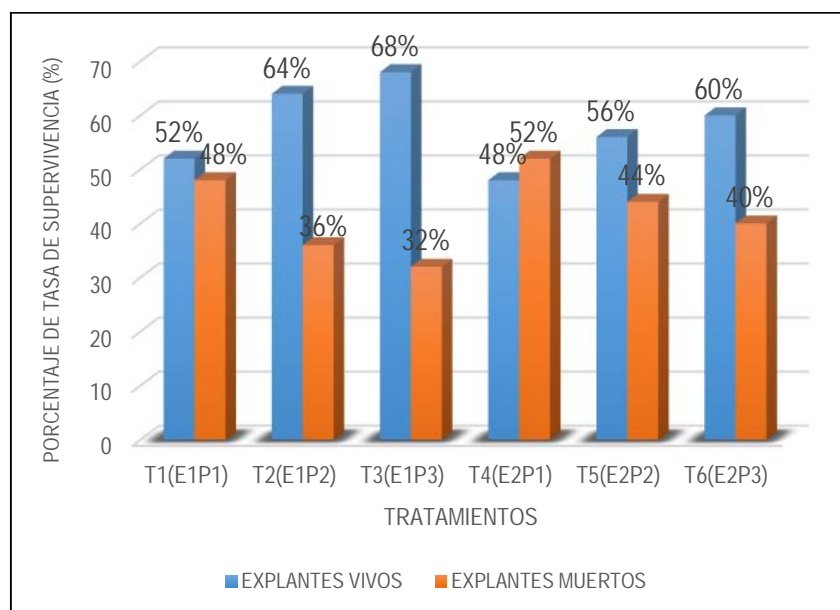


Figura 11. Supervivencia a los 5 días.

Evaluación a los 10 días después de la siembra

En el figura 12 se puede observar una variación considerable en cuanto al porcentaje de explantes vivos. Así el tratamiento tres llegó a obtener un 36 % menos en comparación a lo obtenido a la evaluación de cinco días.

En el ensayo tres se observó en cada uno de los seis tratamientos, de acuerdo a las evaluaciones realizadas que, los explantes ya no presentaron oxidación como se obtuvo en los dos ensayos anteriores, sino un alto grado de contaminación, que se iniciaba en el explante y se propagaba por todo el medio de cultivo, lo que permitió plantear dos hipótesis: que la contaminación se debía a que las concentraciones de hipoclorito de sodio en los protocolos no eran suficientes para lograr la limpieza total en los explantes, o al ambiente donde se desarrollaba la siembra, ya que las condiciones no eran las más adecuadas pero tampoco fue una limitante para el logro de nuestros objetivos.

En vista de los resultados se determinó que el mejor explante son los brotes terminales y para determinar el protocolo de desinfección, se realizó un último ensayo.

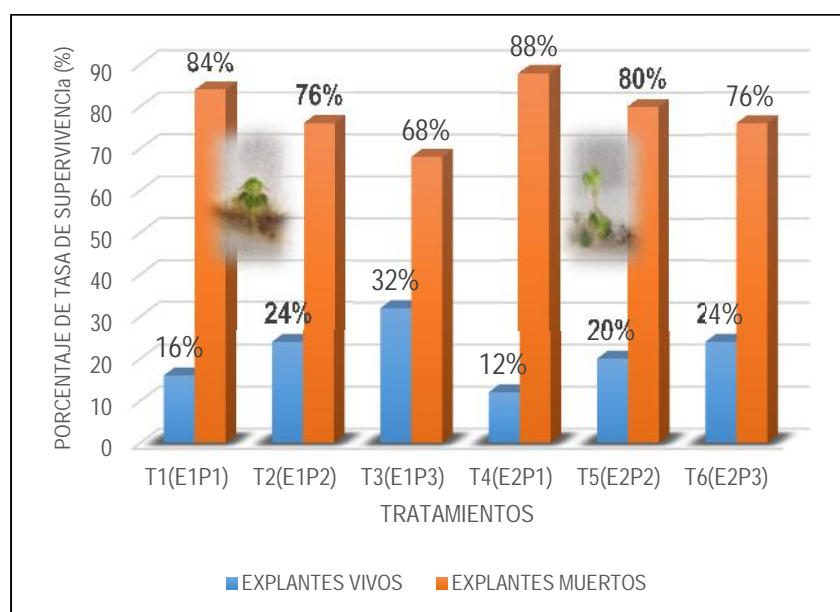


Figura 12. Supervivencia a los 10 días.

4.1.1.4. Introducción definitiva

A) Tasa de Supervivencia

Evaluación a los 3 días después de la siembra

En este último ensayo se puede apreciar que el porcentaje más alto de explantes vivos lo obtuvo el tratamiento 2 con 100 %, seguidos del tratamiento 1 y 4 con 92 %, siendo el porcentaje más bajo 88 % obtenido por el tratamiento 3.

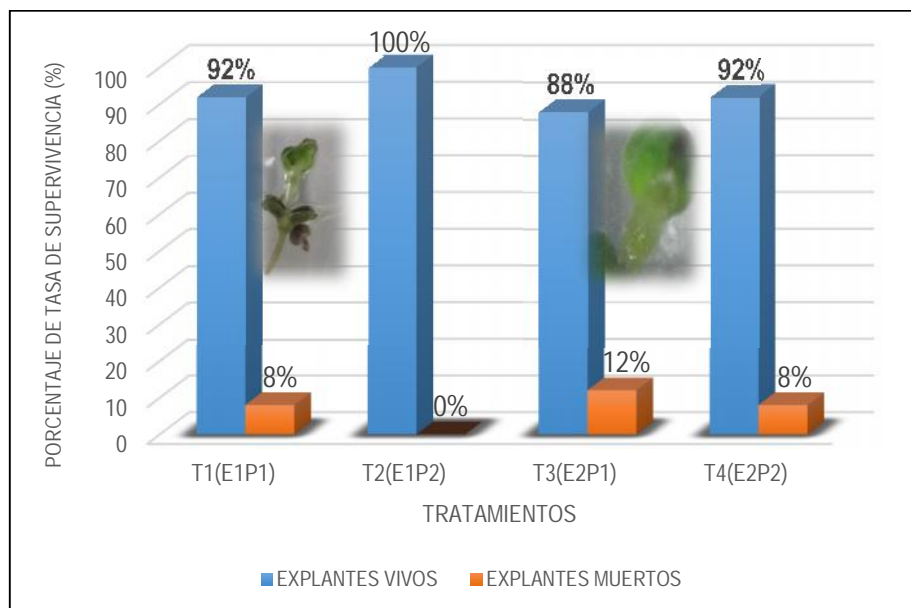


Figura 13. Supervivencia a los 3 días.

Ñ Evaluación a los 5 días después de la siembra

La figura 14 nos muestra una ligera variación en cuanto al porcentaje de explantes vivos, evaluados a los cinco días después de la siembra. Así el tratamiento dos obtuvo un 88 % de supervivencia bajando un 12 % en su porcentaje en comparación a lo obtenido a los tres días.

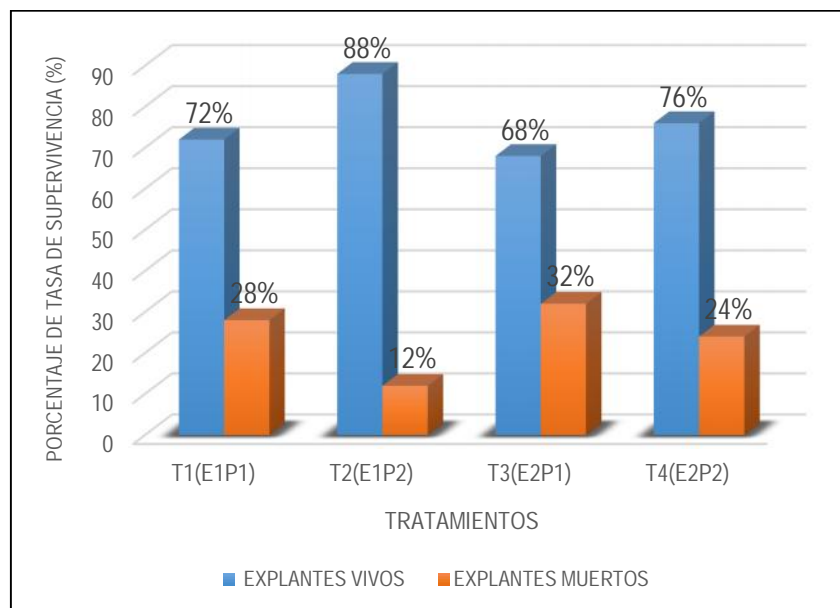


Figura 14. Supervivencia a los 5 días.

Evaluación a los 10 días después de la siembra

En esta última evaluación se puede observar que todos los tratamientos a excepción del tratamiento 2 sufrieron una variación en cuanto a su porcentaje, logrando obtener el mayor porcentaje de supervivencia con 88 % de explantes vivos obtenidas por el tratamiento 2.

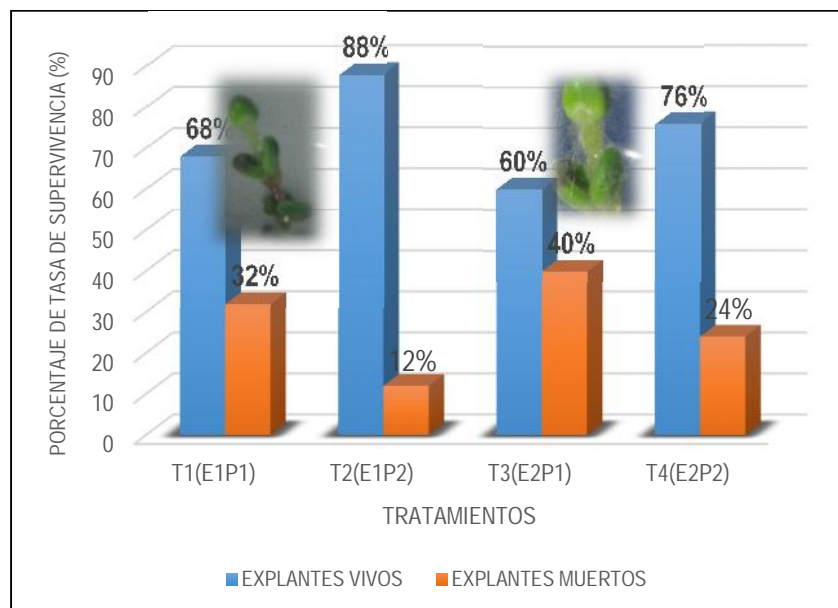


Figura 15. Supervivencia a los 10 días después de la siembra.

En este último ensayo de acuerdo a las evaluaciones realizadas a cada uno de los cuatro tratamientos, el grado de contaminación fue menor en comparación a los ensayos realizados anteriormente, la misma que se pudo controlar para el tratamiento dos, logrando pasar la barrera de contaminación y por ende se logró establecer *in vitro* la planta medicinal de “flor de arena”, con el protocolo dos que corresponde a: 1,53 ml de solución de lejía por 30", 3 enjuagues en agua estéril, alcohol de 70° por 1" + solución con fungicida por 20" + antibiótico y el tipo de explante brote terminal

4.2. ETAPA DE MULTIPLICACIÓN

Habiendo logrado establecer *in vitro* la especie en estudio y con la finalidad de determinar el explante ideal y el medio adecuado para la etapa de multiplicación, se evaluó el porcentaje de sobrevivencia, número de brotes, altura de explante y presencia de raíz. A continuación se dan a conocer los resultados obtenidos.

4.2.1. Porcentaje de sobrevivencia

a) Evaluación a los 7 días después de la siembra

El porcentaje más alto de sobrevivencia lo obtuvo el tratamiento uno con un porcentaje del 92 %, seguido del tratamiento 2 y 3 con 84 % y 76 % respectivamente.

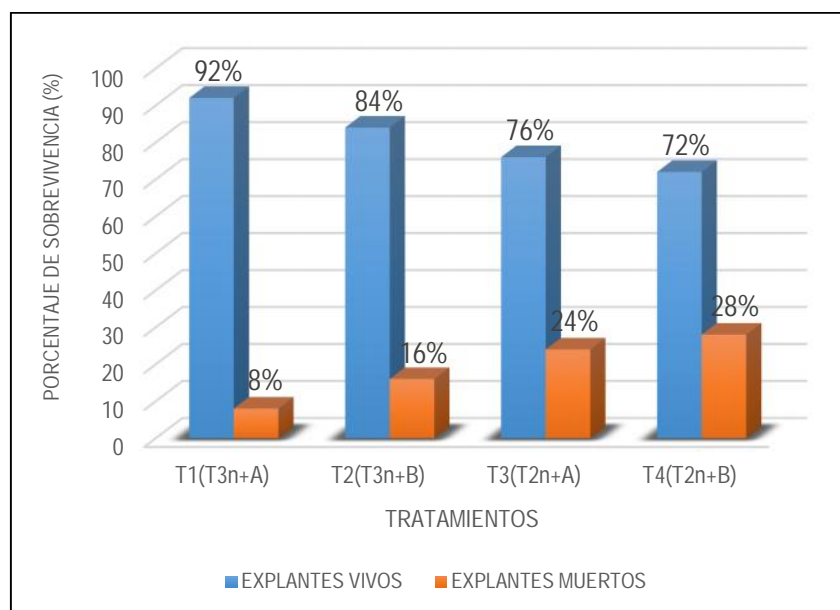


Figura 16. Sobrevivencia a los 7 días

b) Evaluación a los 15 días

Esta evaluación nos muestra una ligera variación en el porcentaje de explantes vivos, en comparación a los resultados observados a los siete días, tal como se aprecia en la figura 17, cabe mencionar que a excepción del tratamiento cuatro, todos los demás tratamientos mantienen el mismo porcentaje de sobrevivencia a los 15 días después de la siembra.

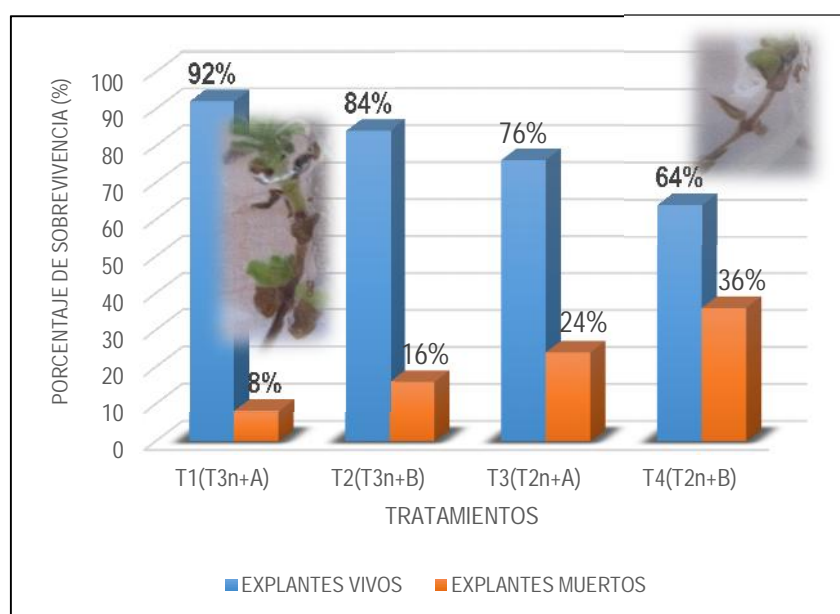


Figura 17. Sobrevivencia a los 15 días

Como se puede apreciar en la figura 17 el tratamiento uno que corresponde al explante tallo con tres nudos sobre un medio de orquídea mostró un porcentaje superior al 90 % en la etapa de multiplicación lo que demuestra que son el tipo de explante y medio de multiplicación que se debe emplear en la flor de arena; es necesario anotar que el 64 % de sobrevivencia que mostró el tratamiento 4 responde al empleo del explante tallo con dos nudos en un medio de papa lo cual provoca más del 30 % de muerte en

plántulas establecidas *in vitro* por oxidación; por tanto no es recomendable el uso de este tratamiento en la etapa de multiplicación de flor de arena.

4.2.2. Numero de brotes

a) Evaluación a los 20 días después de la siembra

El Análisis de Variancia indica que no existe significación para los tratamientos. El coeficiente de variabilidad (CV) es 13,60% y la desviación estándar (S_x) \pm 0,42, lo que nos permite tener confiabilidad y aceptar los resultados obtenidos en la presente investigación.

Cuadro 11. Análisis de Varianza para el número de brotes (20 días)

F.V.	GL	SC	CM	F Observado	F requerido	
					0.05	0.01
Tratamiento	3	0,08	0,02	1,79 n.s.	3,24	5,29
Error	16	0,25	0,01			
Total	19	0,34				

$S_x = 0,42$

CV= 13,60 %

La prueba de Tukey nos muestra que al nivel de significación del 0,05 y 0,01 no existen diferencias estadísticas en el número de brotes evaluadas en condiciones de laboratorio. El mayor promedio lo obtuvo el tratamiento 1 (tallo con tres nudos + medio base para orquídea) con 1,04 número de brotes por plántula y el promedio más bajo lo obtuvieron el tratamiento 3 y 4 con 0,88.

Cuadro 12. Prueba de Tukey para el número de brotes (20 días)

O. M	Tratamientos	Promedio	Nivel de significación	
		Numero de brotes	0,05	0,01
1°	T1 (T3n+A)	1,04	A	A
2°	T3 (T2n+A)	0,92	A	A
3°	T2 (T3n+B)	0,88	A	A
4°	T4 (T2n+B)	0,88	A	A



Figura 18. Número de brotes por plántula a los 20 días.

b) Evaluación a los 27 días después de la siembra

El Análisis de variancia nos muestra que existe significación entre los tratamientos. El coeficiente de variabilidad (CV) es 12,45 % y la desviación estándar (S_x) \pm 0,06, dando confiabilidad a los resultados obtenidos.

Cuadro 13. Análisis de Varianza para el número de brotes (27 días)

F.V.	GL	SC	CM	F Observado	F requerido	
					0.05	0.01
Tratamiento	3	0,52	0,17	5,18 *	3,24	5,29
Error	16	0,54	0,03			
Total	19	1,07				

$S_{\bar{x}} = 0,06$

Cv= 12,45 %

El cuadro de Tukey nos indica que al 1% no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos y al 5 % los tratamientos 1 (T_{3n+A}) y 2 (T_{2n+A}) son estadísticamente superiores a los demás tratamientos.

Cuadro 14. Prueba de Tukey para el número de brotes (27 días)

O. M	Tratamientos	Promedio	Nivel de significación	
		Numero de brotes	5 %	1 %
1°	T1 (T _{3n+A})	1,64	A	A
2°	T3 (T _{2n+A})	1,64	A	A
3°	T2 (T _{3n+B})	1,36	AB	AB
4°	T4 (T _{2n+B})	1,28	B	B

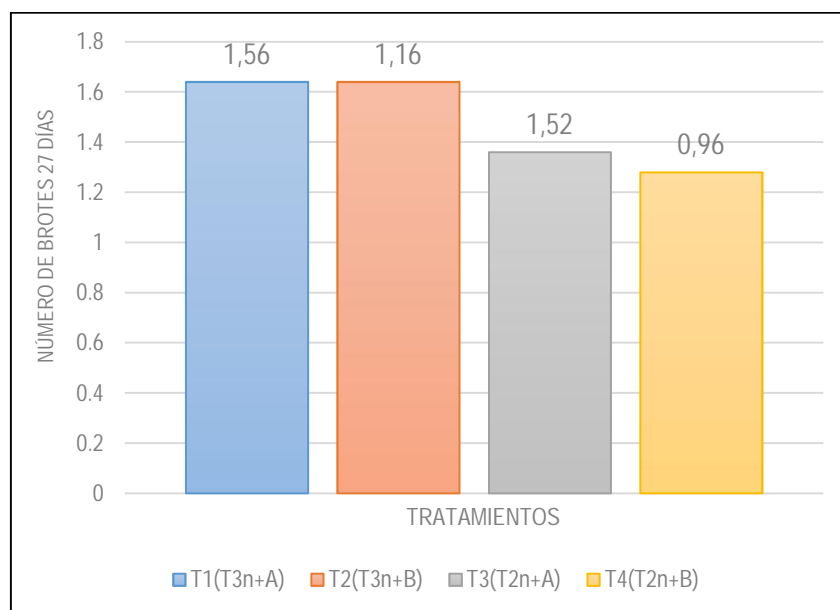


Figura 19. Número de brotes por plántula a los 27 días.

c) Evaluación a los 34 días

El Análisis de Variancia nos muestra que existe significación para los tratamientos. El coeficiente de variabilidad (CV) es 15,64 % y la desviación estándar (S_x) $\pm 0,09$, lo que nos da confianza para poder aceptar los resultados obtenidos.

Cuadro 15. Análisis de Varianza para el número de brotes (34 días)

F.V.	GL	SC	CM	F	
				Observado	requerido 0.05 0.01
Tratamiento	3	1,03	0,34	4,19 *	3,24 5,29
Error	16	1,31	0,08		
Total	19	2,34			

$S_{\bar{x}} = 0,09$

Cv = 15,64 %

La prueba de Tukey nos muestra que a los 34 días después de la siembra el promedio más alto lo obtuvo T1 (T3n+A) con 2,16 brotes por plántula. Al nivel de significación del 5 % los tratamientos que ocuparon los puestos de orden de mérito del 2 al 4 muestran cierta similitud en los promedios obtenidos (T2 (T2n+A), T3 (T3n+B) y T4 (T2n+B)), y los tratamientos que ocuparon los dos últimos lugares corresponden a los tratamientos T3 (T3n+B) y T4 (T2n+B) que obtuvieron promedios de 1,64 y 1,60 respectivamente.

La prueba de Tukey nos indica que al 1 % no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos y al 5 % el tratamiento 1 es estadísticamente superiores a los demás tratamientos.

Cuadro 16. Prueba de Tukey para número de brotes (34 días)

O. M	Tratamientos	Promedio	Nivel de significación	
		Numero de brotes	5 %	1 %
1°	T1 (T3n+A)	2,16	A	A
2°	T3 (T2n+A)	1,92	AB	AB
3°	T2 (T3n+B)	1,64	B	B
4°	T4 (T2n+B)	1,60	B	B

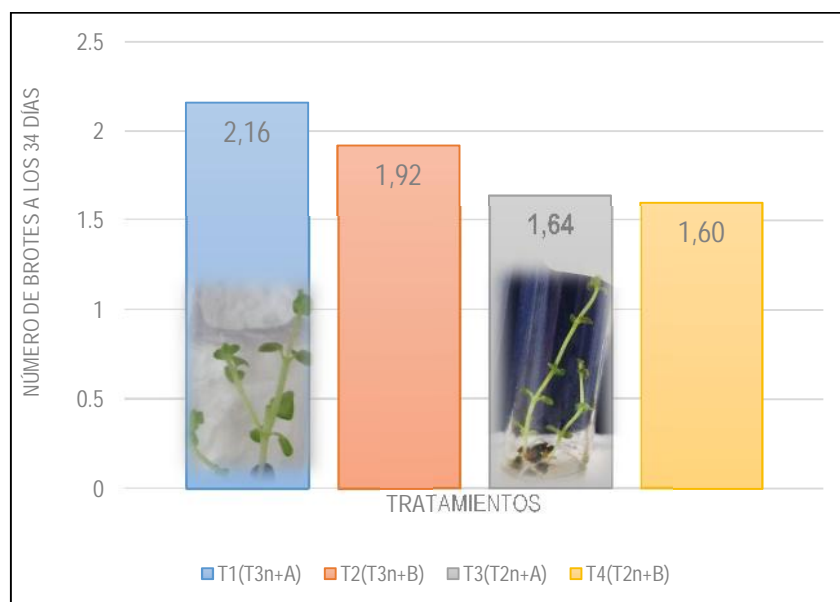


Figura 20. Número de brotes por planta a los 34 días.

En cuanto a los resultados obtenidos para número de brotes se puede apreciar en la figura 20 que el tratamiento 1 que corresponde al explante de tallo con tres nudos respondió positivamente sobre el medio de cultivo de orquídea por presentar mayor número de brotes en comparación a los demás tratamientos, en vista de los resultados podemos afirmar que el número de brotes está relacionado con el número de nudos del explante.

4.2.3. Tamaño de explante

a) Evaluación a los 15 días después de la siembra

El Análisis de Variancia nos muestra un valor altamente significativo para los tratamientos, lo que nos permite afirmar que existen diferencias estadísticas marcadas entre los tratamientos del experimento. El coeficiente de variabilidad (CV) es 12,56 % y la desviación estándar (S_x) $\pm 0,03$ centímetros, dando confiabilidad a los resultados obtenidos.

Cuadro 17. Análisis de Varianza para altura de explante (15 días)

F.V.	GL	SC	CM	F Observado	F requerido	
					0,05	0,01
Tratamiento	3	0,40	0,13	12,14**	3,24	5,29
Error	16	0,17	0,01			
Total	19	0,58				

S \bar{x} = 0,03

Cv= 12,56 %

Cuadro 18. Prueba de Tukey para altura de explante (cm) – 15 días

O. M	Tratamientos	Promedio	Nivel de significación	
		Altura de explante	0,05	0,01
1°	T1 (T3n+A)	0,98	A	A
2°	T3 (T2n+A)	0,93	AB	AB
3°	T2 (T3n+B)	0,81	B	B
4°	T4 (T2n+B)	0,61	C	C

Los tratamientos T1 (T3n+A) y T3 (T2n+A) ocuparon el orden de mérito uno y dos con 0,98 y 0,93 cm de promedio no existiendo diferencias estadísticas entre ellos, tales tratamientos corresponden a los explantes de tallos con 3 y 2 nudos en medio base de orquídea. El tratamiento que ocupó el último lugar corresponde al tratamiento T4 (T2n+B) con 0,61 cm. El nivel de significación al 1 % y 5 % nos muestra dos grupos a y b lo que nos indica las diferencias estadísticas entre los promedios obtenidos.

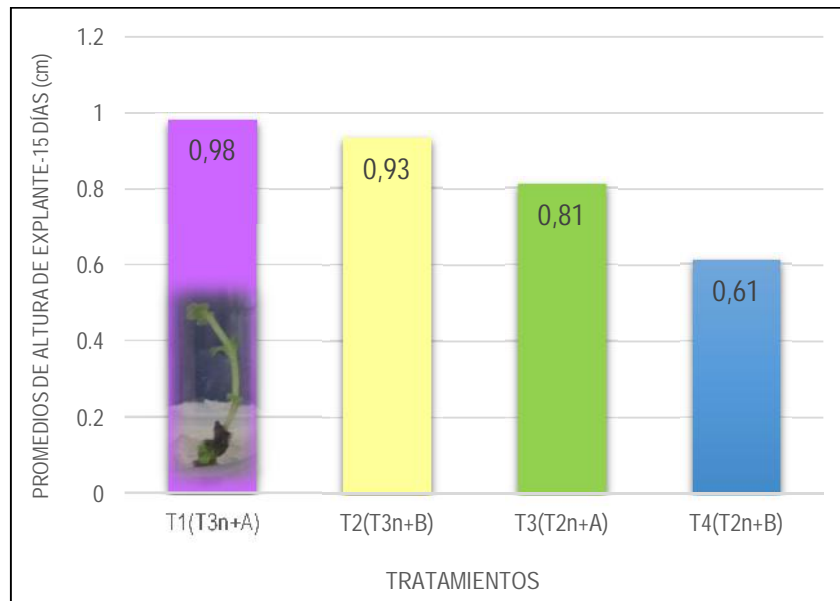


Figura 21. Altura de explante (cm) - 15 días después de la siembra.

b) Evaluación a los 22 días después de la siembra

El Análisis de Variancia indica que existe significancia para los tratamientos. El coeficiente de variabilidad (CV) es 13,48 % y la desviación estándar (S_x) \pm 0,09 cm, los cuales nos indican confianza para aceptar los resultados obtenidos.

Cuadro 19. Análisis de Varianza para altura de explante (22 días)

F.V.	GL	SC	CM	F Observado	F requerido 0,05 0,01
Tratamiento	3	1,29	0,37	4,46*	3,24 5,29
Error	16	1,34	0,08		
Total	19	2,47			

$S_x = 0,09$

$Cv = 13,48 \%$

Los tratamientos T1 (T3n+A) y T3 (T2n+A) obtuvieron los promedios más altos con 2,51 y 2,21 cm respectivamente para este parámetro, siendo estadísticamente superior a los tratamientos 3 y 4 los cuales obtuvieron promedios de 1,96 y 1,92 cm de tamaño de explante. El último orden de mérito lo obtuvo el tratamiento T4 (T2n+B) con 1,92 cm de promedio de altura de explante en su evaluación a los 22 días después de la siembra.

Cuadro 20. Prueba de Tukey para altura de explante (cm) – 22 días

O. M	Tratamientos	Promedio	Nivel de significación	
		Altura de explante	0,05	0,01
1°	T1	2,51	A	A
2°	T3	2,21	AB	AB
3°	T2	1,96	B	B
4°	T4	1,92	B	B

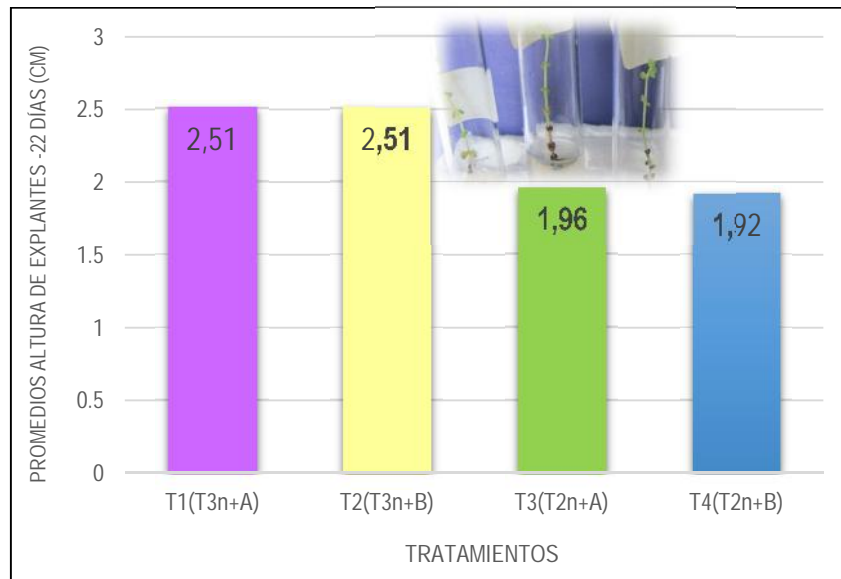


Figura 22. Altura de explante a los 22 días después de la siembra

c) Evaluación a los 29 días después de la siembra

El Análisis de Variancia nos muestra un valor altamente significativo para los tratamientos, lo que nos permite afirmar que existen diferencias estadísticas marcadas entre los tratamientos. El coeficiente de variabilidad (CV) es 13,44 % y la desviación estándar (Sx) $\pm 0,14$ cm, lo que nos da confianza para poder aceptar los resultados obtenidos.

Cuadro 21. Análisis de Varianza para altura de explante (29 días)

F.V.	GL	SC	CM	F	F requerido	
				Observado	0.05	0.01
Tratamiento	3	10,96	3,65	18,47**	3,24	5,29
Error	16	3,16	0,19			
Total	19	14,13				

Sx= 0,14

Cv= 13,44

Cuadro 22. Prueba de Tukey para altura de explante (cm) – 29 días

O. M	Tratamientos	Promedio	Nivel de significación	
		Altura de explante	0,05	0,01
1°	T1	4,45	A	A
2°	T3	3,46	B	B
3°	T2	2,74	BC	BC
4°	T4	2,58	C	C

La prueba de Tukey nos muestra que a los 29 días después de la siembra el promedio más alto lo obtuvo T1 (T3n+A) con 4,45 cm, seguido del tratamiento T3 (T2n+A) con 3,46 cm de promedio. Al nivel de significación del 5 % y 1 % los tratamientos presentan una heterogeneidad entre las diferentes respuestas mostrando tres grupos (a, b y c).

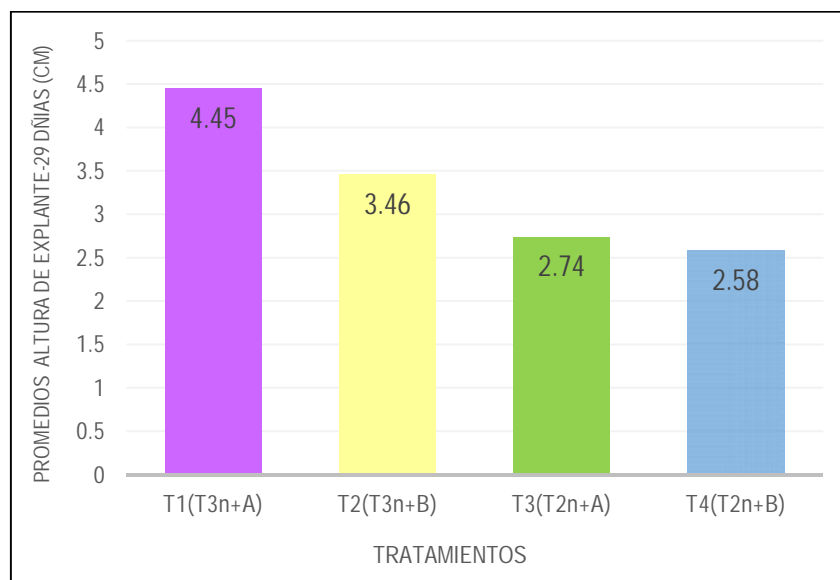


Figura 23. Tamaño de explante a los 29 días después de la siembra.

En esta variable se observó con respecto al tratamiento 1 que los explantes se desarrollaron mejor en comparación a los demás tratamientos ya que presentaban mayor vigorosidad y mayor tamaño.

4.2.4. Presencia de raíz

a) Evaluación a los 27 días después de la siembra

Esta evaluación se observa que el tratamiento 1 (T3n+A) presenta el mayor porcentaje de enraizamiento con 64 % a los 27 días después de la siembra, seguido del tratamiento 3 (T2n+A) con 56 %, obteniendo el porcentaje más bajo el tratamiento 4 (T3n+B) con 16 %.

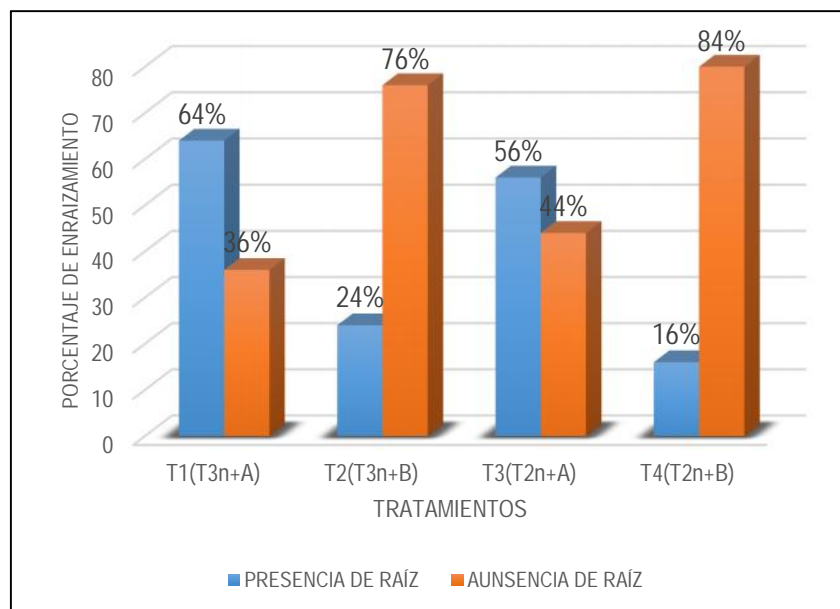


Figura 24. Presencia de raíz a los 27 días.

b) Evaluación a los 34 días después de la siembra

Esta última evaluación se observa una variación en los resultados obtenidos siendo el tratamiento 1 (T3n+A) quien presenta el mayor porcentaje

de enraizamiento con 92 % a los 34 días después de la siembra, seguido del tratamiento 3 (T2n+A) con 80 %, obteniendo el porcentaje más bajo el tratamiento 4 (T2n+B) con 32 %.

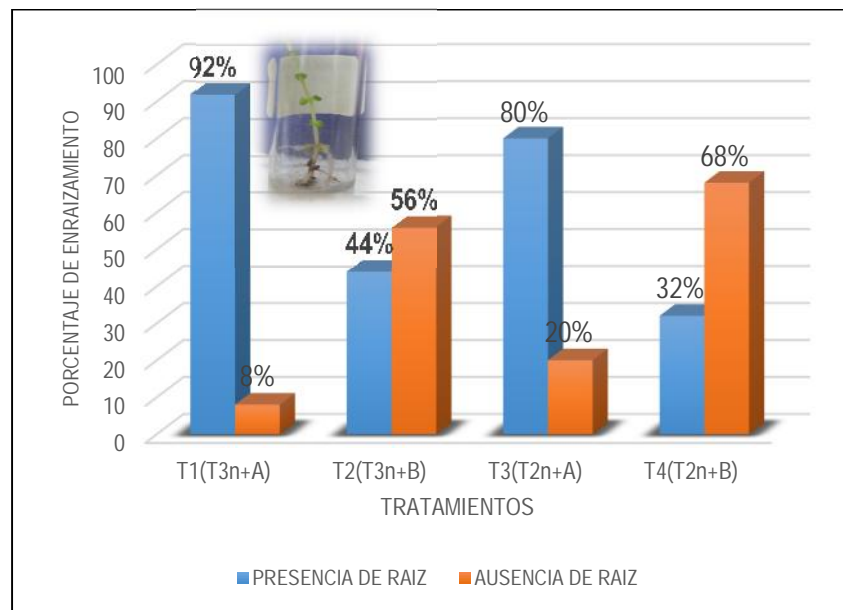


Figura 25. Presencia de raíz a los 34 días.

En vista de los resultados obtenidos para la evaluación de presencia de raíz en esta etapa, no se tuvo la necesidad de transferir las plántulas de “flor de arena” a un medio de enraizamiento. Logrando obtener una planta completa de flor de arena en condiciones *in vitro*.

4.2.5. Comparación general de promedios para determinar el mejor explante y medio de multiplicación.

Considerando que se utilizó dos tipos de explantes el primero tallo con tres nudos y el segundo con dos nudos, ambos tipos de explantes se sembraron en dos diferentes medios de cultivo, con de objetivo de determinar el

explante ideal para la etapa de multiplicación se evaluó el número de brotes y tamaño de explante; los resultados nos muestra que aun cuando el explante con dos nudos es sembrado en un medio de cultivo de papa, las variables evaluadas son diferentes y menos que cuando se utiliza un explante con tres nudos, todo estos resultados demuestran y ratifican que el explante ideal para la multiplicación es tallo con tres nudos lo que se muestra en la figura

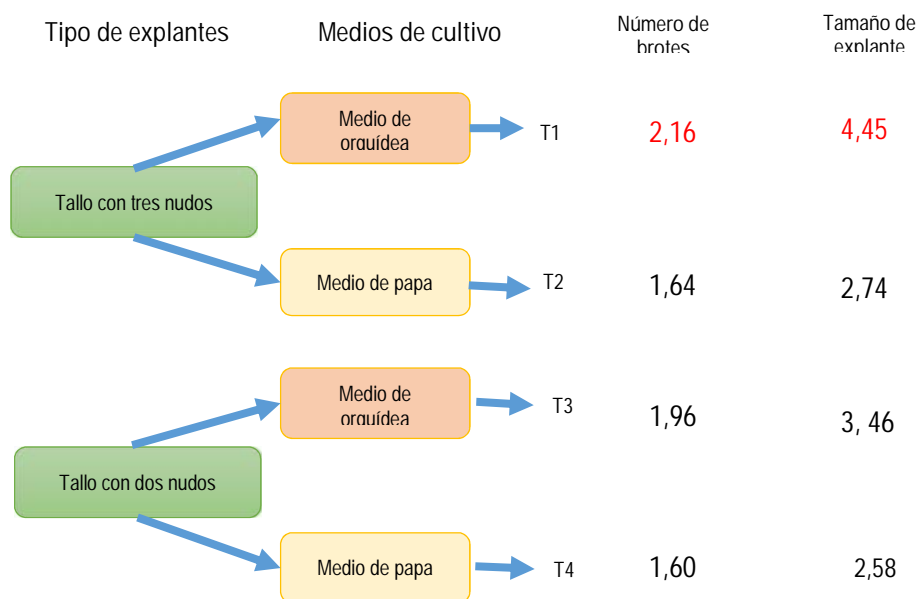


Figura 26. Comparación del promedio de número de brotes y altura de explante (cm), para determinar el mejor explante.

Por otro lado para determinar el mejor medio de multiplicación se evaluaron el porcentaje de sobrevivencia y la presencia de raíz en esta etapa, teniendo en cuenta los explantes de tallo con tres y dos nudos sembrados en diferentes medio de cultivo se obtuvo que, los mejores resultados se logró con el medio de orquídea, aun cuando los mismos explantes fueron sembrados en medio de papa. Por lo expuesto se puede decir que el mejor medio de

multiplicación para para los explantes de flor de arena sembrados bajo condiciones de laboratorio es el medio de orquídea.

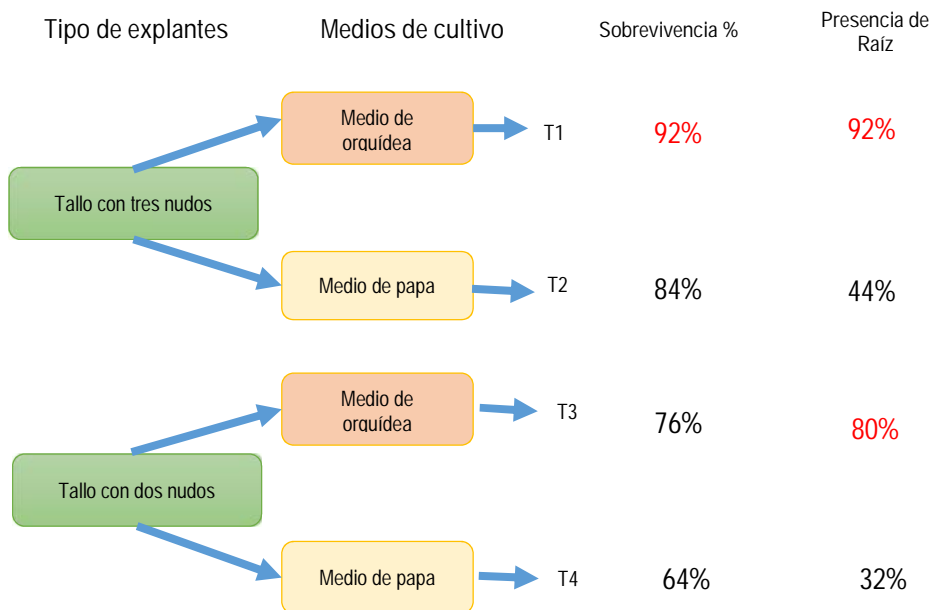


Figura 27. Comparación del promedio de porcentaje de sobrevivencia y presencia de raíz, para determinar el mejor medio de multiplicación.

V. DISCUSIÓN

Como es una especie nativa no estudiada en el campo de la Biotecnología Vegetal, son escasos los trabajos de antecedentes en esta especie, por tanto se recurre a especies emparentadas (de la misma familia) para la discusión sobre los resultados obtenidos.

5.1. Establecimiento *in vitro*

En el trabajo de cultivo *in vitro* de segmentos nodales de hierbabuena (*Mentha piperita*) realizado por Malajovich (2014), menciona que, a pesar del cuidado en la desinfección de explantes previo a la siembra, tuvo problemas de contaminación, lo cual pudo contrarrestar y lograr establecer *in vitro* después de tres semanas de sembrada la muestra, esto se logró a partir de brotes crecidos en un recipiente en condiciones de cobertor.

En comparación con mi trabajo, que logré establecer *in vitro* a los diez días después de la siembra, esto se logró manejando las concentraciones de hipoclorito de sodio (lejía) en los diferentes protocolos de desinfección al igual que el tiempo de exposición a las mismas, también se aplicó una solución con fungicida (Benlathe) al explante previo a la siembra y un antibiótico incorporado al medio de cultivo.

5.1.1. Supervivencia del explante a los 3, 5 y 10 días

Al comparar los protocolos de desinfección empleados en “hierba buena” y “flor de arena” se observó que, la hierba buena no es tan exigente en emplear protocolos de desinfección con alta concentración pero si en tiempo de exposición a la misma a comparación de la “flor de arena”; aun cuando esta última es una planta mucho más pequeña, con tallos muy delgados, con componentes esenciales y abundante pilosidad, tanto en tallos como en hojas, que al ser sometidas a los protocolos de desinfección tiene respuestas diferentes, con mayor exigencia para eliminar los patógenos externos.

Tal como se ratifica en los resultados obtenidos por Malajovich (2014), en el cultivo *in vitro* de hierba buena (*Mentha piperita*) a partir de segmentos nodales, donde señala que los resultados se obtuvieron después de tres semanas de sembrada la muestra siendo el tallo con un nudo y sin hojas el explante con mejores resultados; mientras que el mejor protocolo fue: alcohol de 70° por 10 ; solución de agua sanitaria diluida al medio, adicionada con una gota de detergente; tres lavados de 1, 3 y 5 minutos, con agitación suave, se acondicionó a 20 – 28°C de temperatura, en presencia de luz. Mientras que para la “flor de arena”, se obtuvieron con los brotes terminales y el protocolo de desinfección corresponde a: 1,53 ml de solución de lejía por 30", 3 enjuagues en agua estéril, alcohol de 70° por 1" + solución con fungicida por 20" + antibiótico, acondicionados a temperatura ambiente (24 °C). El establecimiento se logró en un medio de introducción de papa.

5.2. Multiplicación y Enraizamiento

Las plantas silvestres de “flor de arena” morfotipo hembra, prosperan muy bien en su hábitat natural, en sustrato con abundante materia orgánica y climas fríos (10 – 12 °C) con alta humedad. Por lo tanto, para el cultivo *in vitro* es conveniente emplear un medio nutritivo enriquecido con nutrientes orgánicos.

Que habiendo evaluado tanto en un medio de multiplicación de orquídea como de papa y considerando que los explantes sembrados fueron tallos con tres y dos nudos, se obtuvo buenos resultados, probablemente porque el medio de orquídea a diferencia del medio de papa adicional a los macro y micro nutrientes contiene ANA, BAP y carbón activado de tal forma que enriquecen el medio con mayores compuestos orgánicos, simulando así a los suelos donde crece en su hábitat natural. Es por eso que se obtuvieron buenos resultados en las evaluaciones realizadas.

Tal como se afirma en el trabajo: reguladores de crecimiento en la multiplicación *in vitro* de *Thymus vulgaris* L. realizado por Rubin *et al* (2007), quienes mencionan que, los compuestos orgánicos con propiedades hormonales (ANA), son favorables para la multiplicación *in vitro* de plantas de *Thymus vulgaris* L. proporcionando características morfológicas y fisiológicas aptas para su comercialización.

5.2.1. Número de brotes a los 20, 27 y 34 días

Investigaciones realizadas por Navroski *et al*, (2013) entorno al número de brotes de “ajedrea” (*Satureja hortensis* L.) obtenidos en un medio con

contenido de compuestos orgánicos, se encontró que el mayor número de brotes por explante lo obtuvo el medio de cultivo con presencia de ANA en el rango de 10 – 15 μ M. En comparación con nuestros resultados, podemos afirmar que, la flor de arena requiere de altas concentraciones de compuestos orgánicos para esta variable, obteniendo el mejor resultado con el medio de orquídea que contiene ANA (0,5 ml), BAP (2 ml) y carbón activado (4 g).

5.2.2. Tamaño de explante a los 15, 22 y 29 días

Resultados obtenidos por Rubin *et al* (2007), en su trabajo de: reguladores de crecimiento en la multiplicación *in vitro* de *Thymus vulgaris* L. Señala que el mejor resultado para el tamaño de explante del “tomillo” (*Thymus vulgaris* L.), lo obtuvo en un medio de cultivo con una baja concentración de ANA (0.25 a 0.5 mg L) y sin la presencia de BAP y como fuente de explante, utilizó segmentos nodales de aproximadamente 1 cm de longitud, conservadas en una sala de crecimiento con temperatura controlada de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. En comparación con los resultados obtenidos para la “flor de arena”, los resultados muestran que el medio de cultivo de orquídea con presencia de ambos componentes ANA (0,5 ml) y BAP (2 ml) más carbón activado (4 g) y como fuente de explante tallos con tres nudos obtienen los mejores resultados.

5.2.3. Presencia de raíz a los 22 y 29 días

En vista de que no hubo la necesidad de tener un sub cultivo y se notó la presencia de raíz, se decidió evaluar el crecimiento al inicio y en su máxima expresión a los 21 y 29 días.

Resultados similares como “Multiplicación *in vitro* de segmentos de tallo apical de ajedrea (*Satureja hortensis* L.)”, estudiada por Navroski *et al*, (2013) quien señala que el enraizamiento de segmentos apicales fue mayor en la presencia de ANA y ausencia de BAP. En comparación a nuestros resultados que muestran que se desarrollan mejor en medio con presencia de ambos compuestos.

VI. CONCLUSIONES

- A. Es el primer trabajo que se realiza en, estandarizar un protocolo de micropropagación, en una planta medicinal nativa de los andes.
- B. El explante más adecuado para el establecimiento *in vitro* de “flor de arena”, es el brote terminal.
- C. El mejor protocolo de desinfección para el establecimiento *in vitro* de “flor de arena”, es el que corresponde a: 1.53 ml de solución de lejía por 30", 3 enjuagues en agua estéril, alcohol de 70° por 1" + solución con fungicida por 20" + antibiótico.
- D. El medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de “flor de arena” es el medio de introducción de papa más un antibiótico (0,1 g de Ceftriaxona).
- E. El mejor explante para lograr una alta tasa de multiplicación de “flor de arena”, es el tallo con tres nudos.
- F. El número de brotes y altura de explante de flor de arena durante la etapa de multiplicación, es influenciado positivamente por el medio de cultivo con alto contenido de materia orgánica (medio de orquídea) especialmente por la presencia de compuestos orgánicos como ANA, BAP y carbón activado.
- G. No se requiere de un sub cultivo y medio de enraizamiento para lograr la estimulación del sistema radicular en plántulas *in vitro* de flor de arena.

- H. La incubación de las plántulas *in vitro* establecidas, deben ser sometidas a ambientes con temperaturas menores de 24 °C y baja luminosidad.
- I. Las muestras traídas del campo deben estar conservadas en una refrigeradora a 4 °C, embolsadas para que se mantengan hidratadas y frescas.
- J. Los resultados de este trabajo permite conservar *ex situ* esta especie con grado de vulnerabilidad.
- K. La multiplicación masiva mediante el cultivo *in vitro* de “flor de arena”, facilitará el repoblamiento de esta especie en los hábitats naturales en la Región Huánuco.

VII. RECOMENDACIONES

- A. Es recomendable realizar varios ensayos previos cuando se trabaja con una especie nativa.
- B. Continuar con trabajos de investigación en “flor de arena”, ya que es una especie nativa no muy conocida pero con un gran valor en el mercado y una gran diversidad de morfotipos que no han sido estudiadas aun.
- C. Identificar los diferentes morfotipos de esta especie.
- D. Es recomendable estudiar las formas de propagación sexual y asexual de la especie en condiciones *in situ* y *ex situ*, de esta manera reducir la erosión genética.
- E. Estudiar los componentes bioquímicos de sus aceites esenciales.
- F. Es recomendable estudiar la parte etnobotánica, ya que no se tiene información sobre esta especie.
- G. Estudiar la distribución de la especie en el Departamento de Huánuco.
- H. Estudiar la cadena de comercialización y cuál es el destino final de esta especie.
- I. Es recomendable hacer estudios del hábitat donde se desarrollan y observar las características morfológicas que posean, para el establecimiento *in vitro* de una especie nativa.

VIII. LITERATURA CITADA

Aguilar *et al.* 2010. Organogénesis y Embriogénesis Somática en “te nurite” (*Satureja macrostema* Brenth Briq.). (En línea). Consultado el 31 de Agosto del 2013. Disponible en: <http://agroforestal.com.mx/sites/agroforestal.com.mx/files/ORGANOGENESIS%20Y%20EMBRIOGENESIS%20SOMATICA.pdf>

Alejandro. 2007. El cultivo *in vitro* de plantas: ventajas y aplicaciones. Biotecnología Vegetal: Plantas para el futuro. Valencia – España. 160 p.

Calderón A. 1987. Cultivo de tejidos vegetales *in vitro* y la producción de semilla de papa. “El cultivo de papa con énfasis en la producción de semilla”. Impreso por la Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima- Perú. P.p. 107, 120.

Cassara 1999. Producción de micro tubérculos de papa *in vitro*. “Efectos del ABA, Fotoperiodo y características físicas del medio nutritivo”. Tesis, Saltillo, Coahuila.

CIP (Centro Internacional de la Papa). 1999. Manual del CIP: Cultivo de Tejidos. 90 p.

Diaz, J. *et al.* 2005. Meristem and shoot-tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm conservation. Horticultural Reviews. 277 p.

- Domínguez V, 2002. Usos medicinales de la familia Labiatae en Chiapas, México. 31 p. (En línea). Consultado el 28 de Noviembre del 2014. Disponible en: <http://www.asociacionetnobiologica.org.mx/mx2/administrator/202.pdf>
- Fernández A. y Rivera D. 1994. Las labiadas (familia Labiatae). Instituto de Ciencias Naturales – Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 296 pp.
- Helechosa, A. 2013. Manual de recolección sustentable de plantas aromáticas nativas de la región central y noreste de argentina. (En línea). Consultado el 5 de diciembre del 2013. Disponible en: http://www.redbioargentina.org.ar/Institucional/href/4_12libroRecoleccion.pdf
- Ignacio C. 2003. Introducción a la Mejora Genética Vegetal. 2 ed. Edit. Mundi Prensa. Córdoba. 567 pp.
- Lloret *et al.* 2007. Propagación *In Vitro* de Citronela (**Melissa officinalis**). 32p.
- López, G. 1994. Compendio de las *Saturejas* Ibéricas con las noticias más notables referentes sobre todo a algunas de ellas. Edit. Anales Jardín Botánico. Madrid. 55 p.
- López. 2010. Introducción de una nueva metodología para la esterilización de los medios de cultivo. Tesis en opción al grado científico de Máster en Biotecnologías Vegetal. IBP. Santa Clara.

- Malajovich. 2014. Cultivo *in vitro* de segmentos nodales de menta (hierbabuena). 11p.
- Navroski, *et al.* 2013. Multiplicación *in vitro* de segmentos de tallo apical de ajedrea (**Satureja hortensis L.**). 16p.
- Marquínez. 1998. Cultivo de tejidos vegetales. Departamento de fisiología, biología molecular y facultad de ciencias exactas y naturales. Universidad de Buenos Aires. (En línea). Consultado en 14 de Diciembre del 2015. Disponible en: <http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/teoricos/2011%20Cultivo%Tejidos%20l.pdf>
- Paula, *et al.* 2007. Micropropagación de “Tomillo de las Sierras” **Hedeoma multiflorum Benth.** 09p.
- Palacio, L. 2012. La propagación *in vitro* de Muña Muña-(**Clinopodium odorum (Griseb.) Harley**). 10p.
- Pedroza M. 2008. Aplicaciones del Cultivo de Tejidos Vegetales en Condiciones *in vitro*. Editoriales Universitarias de Colombia (ASEUC). Bogotá. 348 pp.
- Perea D., Tirado P. 2011. Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro*: Manual de Practicas de Laboratorio. Edit. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.160 pp.

- Pierik, R. 2007. *In vitro* culture of higherplants. Editorial Marinus Nijhoff Publishers. Edicioness Mundi-Prensa. España. 120 p.
- Ramos. 2012. Revista Centro Agrícola, 2/95:54 – 67 de plantas por biotecnología. IBP. Santa Clara. 191 p.
- Raven, *et al.* 2001. Biología Vegetal. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan. (En línea) consultado el 12 de Diciembre del 2015. Disponible en: http://bteduc.bio.br/guias_es/80_Micropropagacion_laboratorio_educacion_al.pdf
- Revista Corpoica. 2007. Manejo de planta *in vitro* fase IV. Ponencia al XI, Forum Nacional de Ciencia y Técnica. Ciudad de la Habana Cuba.
- Rivero, M. 2011 Cultivo de tejidos vegetales. Departamento de fisiología, biología molecular y facultad de ciencias exactas y naturales. (En línea). Consultado el 14 de octubre del 2015. Disponible en: <http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/teoricos/2011%20Cultivo%Tejidos%20l.pdf>
- Roca y Mroginski. 1991. Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia. 970 p.
- Rubin *et al.* 2007. Reguladores de crecimiento en la multiplicación *in vitro* de **Thymus vulgaris L.** 58 p.

Samora and López. 2013. Micropropagación de **Hedeoma drummondii Benth.** 180 p.

Segrentin. 2015. Aumento de la eficiencia en la micropropagación. (Ed) Propagación y Mejora de plantas por Biotecnología. IBP. Santa Clara. 191 p.

Zárate R, *et al.* 1997. Mejoramiento Genético en tejidos (En línea). Consultado el 14 de Diciembre del 2015. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/55/4/28-3-Capi-3.pdf>

Villalobos A, *et al.* 1984. Plantas libres de virus. Ciencia y Desarrollo. CONACYT. México. 49 p.

Washington. 2016. Herbario Vargas CUZ. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Ficha de determinación de la flor de arena.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS

CERTIFICACION

Certificacion Dra Mirka Tello

El que suscribe, Profesor Investigador Asociado del Herbario Vargas (CUZ), certifica que la Dra. Milka Tello de la Universidad Nacional Hermilio Valdizan-Huanuco, ha sometido a consulta muestras botánicas colectadas para su determinación, las que al ser diagnosticadas a tratamiento taxonómico corresponden a la especie:

***Clinopodium revolutum* (Ruiz & Pav.) Govaerts** (Menthinae - Lamiaceae).

Nombres comunes: “Runtuwayra”, “cjuñu muña”, cjuñuka.

En la clasificación APG IV (Angiosperm Phylogenetic Group) la ubicación taxonómica corresponde a:

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Asteraceae Takht.
- Orden: Lamiales Bromhead
- Familia: Lamiaceae Martinov
- Tribu: Menthinae
- Género: *Clinopodium* L.
- Especie: ***Clinopodium revolutum* (Ruiz & Pav.) Govaerts**

Cusco, 12 de
Marzo del 2016

Washington Galiano Sánchez

Prof. Principal Dpto. Académico de Biología
Investigador Asociado al Herbario Vargas
CUZ Experto científico CITES