

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



TESIS

**INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN HOJAS
INMADURAS DE SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis* L.).**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADO POR EL BACHILLER:

JUAN CARLOS GUERRERO ABAD

TARAPOTO - PERÚ

2007

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL



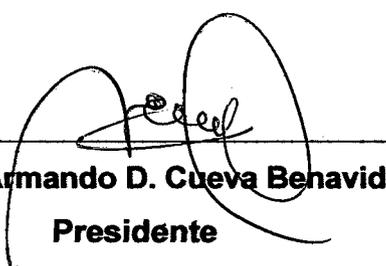
ÁREA DE BIOLOGÍA

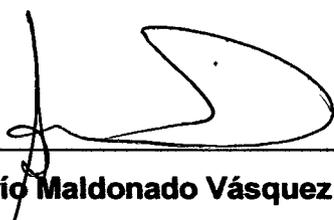
TESIS:

**INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN HOJAS
INMADURAS DE SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis* L.).**

**PRESENTADO POR EL BACH:
JUAN CARLOS GUERRERO ABAD**

MIEMBROS DEL JURADO


Ing. M.Sc. Armando D. Cueva Behavides
Presidente


Ing. Darío Maldonado Vásquez
Miembro


Ing. M.Sc. Guillermo Vásquez Ramírez
Miembro


Ing. Maria E. Ruiz Sánchez
Asesor

DEDICATORIA

*A Dios padre celestial
que siempre ha estado
pendiente de mis pasos.*

*A mis queridos padres
Cresencio y Maria Luisa
Y a mis hermanos queridos
Maria Nerida, Gladis Anamelba
Roger Arbildo y Alexander*

AGRADECIMIENTO

- ✚ Al Ing. Maria Emilia Ruiz Sánchez, asesora del presente trabajo de investigación.

- ✚ Al Blgo. Marco Antonio León Martínez, co-asesor del presente trabajo de investigación, por compartir sus conocimientos, tiempo y dedicación.

- ✚ Al los ingenieros Henri Delgado Haya, Wilmar Murrieta Vela, Roger Aly Gálvez Panduro, Jim Dickerson Vásquez Pinedo, Emma Manco Céspedes y a los biólogos Winston F. Ríos Ruiz, Juan Arévalo Quevedo, quienes de alguna manera siempre me apoyaron en el momento que mas lo necesite.

- ✚ A mis compañeros de estudios del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales: Engels Darwin Padilla Gómez., Ivonne Vásquez Briones, Melis P. Arce Flores, David Paredes Farge y Henri Vera Tudela.

ÍNDICE

Contenido	Pág.
1. Introducción.....	01
2. Objetivos.....	02
3. Revisión de Literatura.....	03
3.1. Características del cultivo.....	03
3.1.1. Origen y distribución.....	03
3.1.2. Clasificación botánica.....	04
3.1.3. Morfología de la planta.....	04
3.2. Cultivo de tejidos vegetales.....	08
3.2.1. Generalidades.....	08
3.2.1.1. Explante.....	09
3.2.1.2. Asepsia.....	09
3.2.1.3. Medios de cultivo.....	10
3.2.1.4. Condiciones ambientales de incubación.....	10
3.2.2. Métodos para la micropropagación.....	10
3.2.2.1. Embriogénesis somática.....	11
3.2.2.2. Modelos de desarrollo y origen de la embriogénesis somática.....	12
3.2.2.3. Embriogénesis zigótica y embriogénesis somática...	14
3.2.2.4. Factores que influyen y controlan la embriogénesis somática.....	16
3.2.2.5. Fases de la embriogénesis somática.....	16
4. Materiales y métodos.....	20
4.1. Materiales.....	20

4.1.1. Materiales de vidrio.....	20
4.1.2. Materiales de metal.....	20
4.1.3. Equipos.....	20
4.1.4. Reactivos.....	21
4.2. Metodología.....	23
4.2.1. Ubicación del experimento.....	23
4.2.2. Preparación de cámara de cría.....	23
4.2.3. Acondicionamiento de plántulas de sachá inchi a la cámara de cría.....	24
4.2.4. Diseño experimental.....	26
4.2.5. Componentes de estudio.....	26
4.2.6. Combinación de tratamientos.....	27
4.2.7. Descripción de ensayos.....	28
4.2.8. Características del diseño experimental.....	28
4.2.9. Desarrollo del estudio para el ensayo 01.....	30
4.2.10. Desarrollo del estudio para el ensayo 02.....	32
4.2.11. Parámetros de evaluación.....	34
5. Resultados.....	35
5.1. Resultados del ensayo 01.....	35
5.2. Resultados del ensayo 02.....	40
6. Discusiones.....	55
7. Conclusiones.....	61
8. Recomendaciones.....	62
9. Resumen.....	63
10. Abstract.....	65

11. Referencias bibliográficas.....	67
12. Anexos.....	74

II. OBJETIVOS

2.1. General

- Desarrollar una metodología adecuada para la inducción de la embriogénesis somática en hojas inmaduras de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.).

2.2. Específicos

- Determinar un procedimiento para la introducción y establecimiento in vitro de explantes de hoja inmadura en sachá inchi.
- Determinar la concentración adecuada de thidiazurón [1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urea], para el proceso de la inducción embriogénica.
- Evaluar formas y tipos de callos, adquiridos durante los procesos de la embriogénesis somática.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO

3.1.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

El género *Plukenetia* comprende de 17 especies de distribución pantropical, 12 de América, tres de África, una de Madagascar y una de Asia (Gillespie, 1993, Jiménez 1993 y Webster, 1994), en México se encuentran *P. carabiasiae* J. Jiménez Ram., *P. penninervia* Müell. Arg. y *P. stipellata* L.:J. Gillespie, mencionado por Galluser, 2004.

Valles (1991), reporta que el Sacha Inchi (*P. volubilis* L.) es una planta voluble, trepadora y semileñosa. Descrita en 1753, botánicamente pertenece a la familia Euforbiacea. Distribuida en el trópico latinoamericano desde el sur de México, Indias Occidentales, la Amazonia y el Acre de Bolivia. En el Perú se ha recolectado en Madre de Dios, Huánuco, Oxapampa, San Martín, Rodríguez de Mendoza, Ucayali (Pucallpa, Contamana y Requena), Putumayo, Loreto, Junín, Cuzco y Caballococha.

3.1.2. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA

Mc-Bride (1951), lo clasifica en:

Reino	: Vegetal
División	: Spermatophyta
Clase	: Dicotyledonea
Orden	: Euphorbiales
Familia	: Euphorbiaceae
Género	: Plukenetia
Especie	: <i>volubilis</i> Linneo.

3.1.3. MORFOLOGÍA DE LA PLANTA

El género pertenece a la subtribu *Plukenetiinae* Benth., junto a *Angostyles*, *Astrococcus*, *Haematostemon* y *Romanoa*, de los que se distingue fácilmente por tener 4 carpelos y 4 sépalos en la flor pistilada, frente a los 3 carpelos y 5-6 sépalos de la flor pistilada del resto de los integrantes de la subtribu. *Plukenetia* puede reconocerse por ser lianas o bejucos con hojas aserradas, glándulas basilaminares, flores unisexuales, sin corola, 16-40 estambres, flores pistiladas con 4 sépalos, ovario con cuatro carpelos y frutos tetralobados o tetralados con 4 semillas. Las especies de *Plukenetia* pueden dividirse en dos grupos: uno, con hojas pinnatinervias y estilos totalmente connatos (al que pertenece *P. pinnatinervia*) y el otro, con hojas palmatinervias o triplinervias y estilo parcialmente connato (al que pertenecen *P. carabiasiae* y *P. stipellata*), aunque existe una especie (*P. verrucosa*) del último grupo con hojas palmatinervias o triplinervias y estilo totalmente connato. Para la distinción entre las especies del primer

grupo son importantes los siguientes caracteres: el tamaño del fruto, el tipo de estambres (dimórficos o todos iguales) y su número y la forma de la columna estilar, el número de glándulas de la base de la lámina, el número de glándulas laminares y las estipelas situadas en la unión pecíolo-lámina; en el segundo grupo, los caracteres que permiten diferenciarlas son el grado de connación de la columna estilar y su tamaño, la forma y tamaño del *fruto*, el tipo de estambres (dimórficos o todos iguales) y su número, la presencia o ausencia de estipelas y la base de la hoja. Este género pertenece a la tribu *Plukenetieae* de la subfamilia *Plukenetieae* (Webster, 1994), la cual se separa de la tribu *Tragiinae* por la ausencia de pelos erectos y urticantes, mencionado por Galluser, 2004.

Guerrero (2006), ilustra algunas de las características que adquiere *Plukenetia volubilis* L.

La **Planta** se caracteriza por ser:
voluble, perenne, semileñosa con
crecimiento indeterminado (Fig. N° 01)



Fig.N° 01: Planta – acc. pacchilla

Las Hojas son:

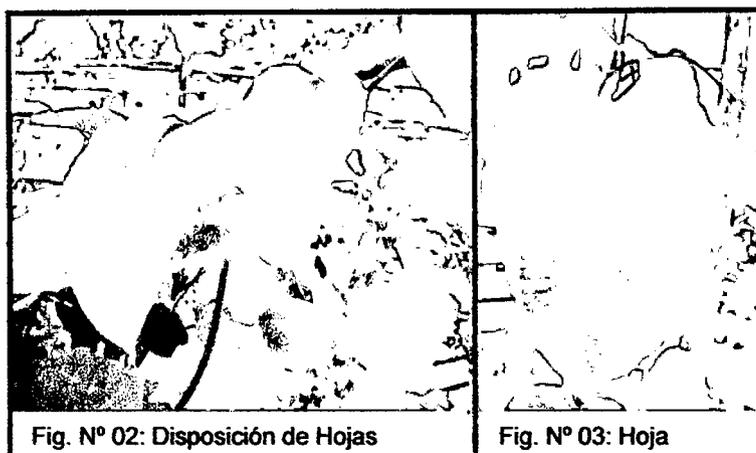


Fig. N° 02: Disposición de Hojas

Fig. N° 03: Hoja

Alternas, acorazonadas, aseruladas, trinervadas con una nervadura central dirigida al ápice acuminado (Fig. N° 02 y 03), así mismo en la base del limbo presenta 2 glándulas laterales (responsables de exudar azúcares orgánicos) y una pequeña proyección intermedia denominada estipela (muy variable en los diversos ecotipos).

Con respecto a las Flores, estas son:

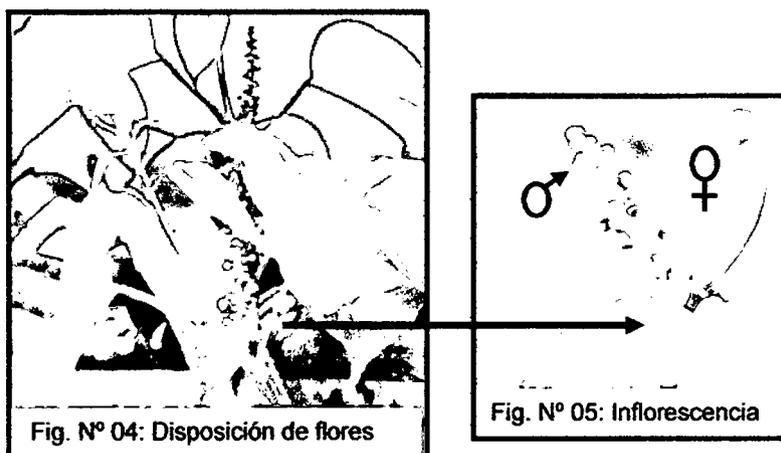


Fig. N° 04: Disposición de flores

Fig. N° 05: Inflorescencia

Monoicas, las flores masculinas son pequeñas, blanquecinas y dispuestas en racimos, en la base del racimo y lateralmente se encuentra una, dos y hasta tres flores femeninas, como se muestran en las (Fig. N° 04 y 05).

Los **frutos** son cápsulas dehiscentes, distribuidos en lóculos, el número de lóculos esta en función a su variabilidad genética del sachá inchi, presentando cuatro, cinco y hasta siete lóculos (Fig. N° 06 y 07).

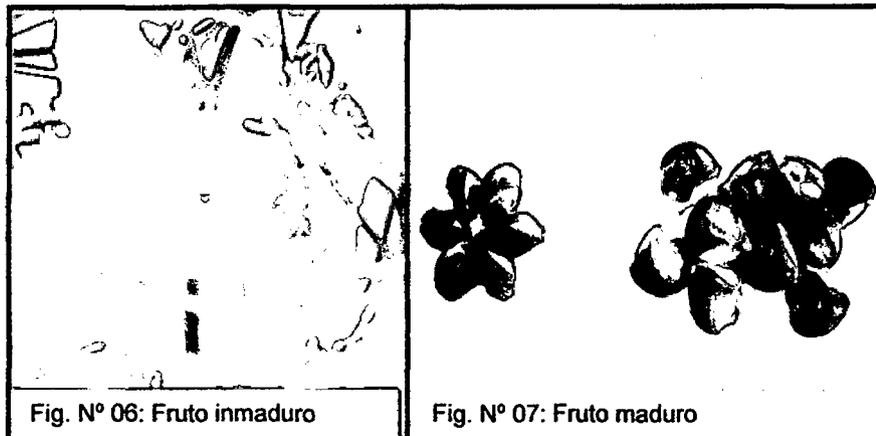


Fig. N° 06: Fruto inmaduro

Fig. N° 07: Fruto maduro

La Semilla

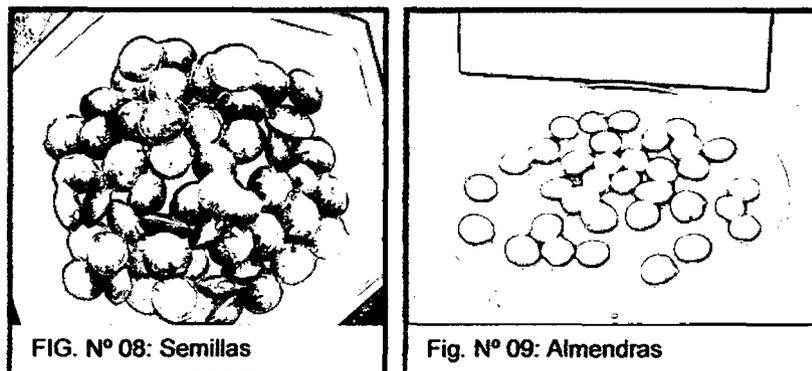


FIG. N° 08: Semillas

Fig. N° 09: Almendras

Tiene forma ovalada de color marrón-oscuro, abultada hacia el centro y aplastada hacia los costados (Fig. N° 08), al abrir la testa de la semilla observamos la almendra de color blanco que esta protegido por una película blanquecina (Fig. N° 09).

3.2. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

3.2.1. GENERALIDADES

El cultivo de tejidos *in vitro* comprende, en su acepción amplia, un grupo heterogéneo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, célula, tejido, órgano), se cultivan asépticamente en un medio de composición química definido, incubándose a condiciones ambientales controladas. (Roca y Mroginski, 1991)

Los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo *in vitro*, son numerosos y diferentes. Resumiéndose así en: a) estudios básicos en fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines; b) bioconversión y producción de compuestos útiles; c) incremento de la variabilidad genética; d) obtención de plantas libres de patógenos; e) propagación de plantas; y f) conservación e intercambio de germoplasma, (Roca y Mroginski, 1991).

Las técnicas del cultivo *In vitro* han contribuido no solo a un mejor entendimiento de los eventos de diferenciación celular, si no a un mejor aprovechamiento de tales eventos en la explotación más eficiente de las plantas. Al igual que otros métodos de multiplicación vegetativa o asexual, los individuos descendientes de una planta madre cultivada *in vitro* son clones, es decir copias genéticamente iguales entre ellas e idénticas a la madre. En plantas propagadas por semilla la descendencia no es clonal, pues cada semilla tiene su propia base genética que resulta de la recombinación de genes de ambos progenitores (Roca y Mroginski, 1991).

Para el establecimiento de cultivos a condiciones in vitro se deben tener consideraciones generales sobre: a) explante; b) normas de asepsia; c) los medios de cultivo y d) condiciones ambientales de incubación, la interacción de estos factores determinará la respuesta que se obtenga in vitro.

3.2.1.1. Explante

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección esta determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada (Roca y Mroginski, 1991).

3.2.1.2. Asepsia

La asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos. Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos si no en su ulterior incubación y manipulación (Roca y Mroginski, 1991).

Maglietti et al, 2006; Mroginski et al, 2005; Fontana et al, 2005, lograron desinfectar superficialmente hojas inmaduras del género *Arachis correntina*, *Arachis villosa*, *Arachis burkatii*, utilizando etanol

70% durante 30 segundos, seguida por una inmersión en una solución de NaOCl al 1% más una gota de Tween 20 durante 12 minutos.

3.2.1.3. Medios de Cultivo

En la actualidad existen innumerables formulaciones, cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que se suministran a base de: a) carbono; b) nutrimentos minerales; c) vitaminas; d) agente gelificante (en el caso de medios semisólidos); e) sustancias reguladoras de crecimiento; f) otros compuestos; generalmente se hace referencia al conjunto de componentes (a+b+c), como el medio basal (MB) (Roca y Mroginski, 1991).

3.2.1.4. Condiciones ambientales de incubación

Es conveniente que los cultivos sean incubados en ambientes controlados, por lo menos en lo que se refiere a luz y temperatura, estos dos factores están relativamente poco estudiados y la información existente sobre ellos suele ser fragmentaria y a menudo contradictoria (Roca y Mroginski, 1991).

3.2.2. MÉTODOS PARA LA MICROPROPAGACIÓN

Existen muchos métodos para realizar la micropropagación como: a) el cultivo de meristemas, ápices caulinares y yemas axilares; b) la organogénesis directa; c) la organogénesis indirecta; d) la embriogénesis somática; e) los órganos de perennidad; f) el micro injerto y g) el cultivo de

embriones, semillas y esporas (Delgado & Rojas 1999). Todos estos métodos presentan ventajas y problemas desde el punto de vista de su multiplicación y fidelidad genética del material propagado (Krikorian, 1991).

3.2.2.1. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es tal vez la más impresionante y espectacular demostración de la persistencia de la totipotencia celular en las plantas superiores, al obtenerse una planta integra a partir de embriones somáticos. Los primeros estudios fueron realizados independientemente, por Steward et al., (1958) y Reinert (1958; 1959), utilizando callos de zanahoria derivados de raíces de almacenamiento (Delgado & Rojas 1999).

Tisserat et al., (1979) reportó la formación de embriones somáticos en 32 familias, 81 géneros y 132 especies. En la actualidad este número ha crecido de manera impresionante. Pero no solo las células esporofíticas han exhibido la potencialidad de formar embriones somáticos si no también en células generativas de las microsporas de las anteras, tal como lo demostraron Guha & Maheshwari (1964) en *Datura innoxia* y Nitsch (1969) en *Nicotiana tabacum*, (Delgado & Rojas 1999).

Como embriones somáticos, asexuales o adventicios se han definido los iniciados a partir de células que son el producto de la fusión de gametos (Tisserat et al., 1979). Son estructuras

bipolares con un eje radical-apical, y no poseen conexión vascular con el tejido materno; las estructuras bipolares deben ser capaces de crecer y formar plantas completas (Litz & Jarret, 2004). Se diferencia de la micropropagación por ápices caulinares y la regeneración de órganos por organogénesis, en que en estos últimos procesos el ápice u órgano formado es unipolar (Delgado & Rojas 1999).

3.2.2.2. Modelos de desarrollo y origen de la embriogénesis somática

Han sido reconocidos dos modelos de desarrollo de la embriogénesis somática *in vitro*: a) embriogénesis somática directa, en la cual los embriones somáticos se originan directamente de los tejidos, sin la formación del callo; b) embriogénesis somática indirecta, en la cual el callo es formado, mantenido y proliferado antes del desarrollo de los embriones somáticos. En ambos casos de embriogénesis somática la secuencia del desarrollo embrionario es similar a la formación de un embrión zigótico, es decir, los estadios globular, acorazonado y torpedo, seguida por la formación de plantas integra (Delgado & Rojas 1999).

Sharp et al., (1980) indicaron que la embriogénesis somática directa ocurre a partir de células pre-embriogénicas determinadas o "pre-embryogenic determined cells" (PEDC), las que se encuentran comprometidas con el desarrollo embriogénico, necesitando solo un estímulo para su expresión; en tanto que la embriogénesis indirecta

ocurre en células diferenciadas no embriogénicas o células determinadas embriogénicas inducidas o "induced embryonic determined cells" (IEDC).

Por otro lado, la cuestión del origen uni o pluricelular de los embriones somáticos parece estar directamente relacionado con el comportamiento de las células (Delgado & Rojas 1999). Hacias (1978) definió al embrión somático como un individuo originado de una célula, sin presentar conexiones vasculares con los tejidos maternos, en tanto que Raghavan (1976) y Tisserat et al., (1979) indicaron que aparentemente los embriones somáticos se forman a partir de agregados de células embriogénicas o complejos proembrionarios, en especial en la embriogénesis indirecta vía callos o suspensiones celulares y que luego dan origen a uno o varios embriones somáticos. Pero los embriones somáticos no solo se forman de tales agregados embriogénicos o nódulos callosos (Vasil & Hildebrandt, 1966), si no también de células simples periféricas (Jones, 1974), de la segmentación de células múltiples (Litz & Conover, 1981) y por varios de los procesos indicados (Handro et al., 1973; Lu & Vasil, 1981). En general, el origen pluricelular parece producir embriones somáticos fusionados con el tejido maternal, en tanto que el origen unicelular produce embriones somáticos ligados al tejido maternal por estructuras similares a los suspensores de los embriones zigóticos (Delgado & Rojas 1999).

3.2.2.3. Embriogénesis zigótica y embriogénesis somática

Aún cuando existe un modelo morfológico básico de embriogénesis zigótica entre las especies vegetales, una considerable variación ha sido observada cuando el estudio ha sido realizado de manera detallada (Steeves & Sussex, 1989).

En dicotiledóneas tomándose a la especie *Arabidopsis thaliana*, un miembro de las Brassicaceae (Cruciferae) como un modelo para la embriogénesis zigótica, donde su proceso de desarrollo embrionario dura de 11 a 12 días; después de la fertilización, el cigoto sufre una división transversal asimétrica hasta formar una célula apical relativamente pequeña y una célula basal más grande. El establecimiento de esta polaridad tendría una función determinante en el proceso puesto que la célula apical formará el embrión propiamente dicho y la célula basal formará el suspensor. La célula apical se divide, primero por dos divisiones en ángulo recto y luego por una división transversal, hasta formar una estructura con ocho células isodiamétricas denominado estado "octante", en el cual las células del propio embrión se organizan en dos hileras. La fila superior de las células formará el meristema apical y los cotiledones y la fila inferior el hipocótilo. El límite entre las dos hileras es denominado límite O'. El propio embrión se sitúa sobre la célula distal del suspensor, el que finalmente formará la raíz de la plántula o "seedling". Durante el estadio globular de desarrollo del embrión, que ocurre aproximadamente ocurre 2-3 días después de la

fertilización, se generan alrededor de 30 células con un diámetro aproximado de 40 μm , luego sigue el estadio de corazón, con aproximadamente 250 células, 3-4 días después de la fertilización, el estadio torpedo, con aproximadamente 3,000 células, 4-5 días después de la fertilización, y finalmente el estadio de embrión zigótico maduro, con aproximadamente 20,000 células y 500 μm de longitud (Lindsey & Topping, 1993).

El desarrollo morfológico y temporal de los embriones somáticos es muy semejante a los embriones zigóticos. En zanahoria, el primer estadio reconocible es el estadio globular, a partir del cual el embrión somático inicia su crecimiento 5 a 7 días después del cambio a un medio sin auxinas (Halperin & Wetherell, 1964). Después de más de 2 a 3 días de crecimiento isodiamétrico, el estadio globular es seguido por un estadio oblongo (Schiavone & Cooke, 1985), cambiando el crecimiento isodiamétrico por un crecimiento simétricamente bilateral e iniciándose el estadio de corazón. La transición globular-corazón es claramente marcada por un mayor crecimiento de los dos cotiledones, la elongación del hipocótilo y el inicio del desarrollo de la radícula. Este proceso continúa a través de los estadios de torpedo a planta en miniatura ("plantlet") (Delgado & Rojas 1999)

3.2.2.4. Factores que influyen y controlan la embriogénesis somática

Aún cuando desde un comienzo fue demostrado que la presencia de una auxina, resultaba crítica para la iniciación de la embriogénesis y la baja concentración de auxina o su total ausencia favorecía la maduración de los embriones somáticos (Halperin, 1966), y que el nitrógeno reducido resultaba importante, tanto para la iniciación (Halperin & Wetherell, 1965); en la actualidad se reconocen otros factores como: a) el genotipo y la clase de explante; b) el medio de cultivo; c) nitrógeno; d) hormonas vegetales; e) condiciones ambientales; f) estado físico del medio y tipo de envase (Delgado & Rojas 1999).

En el cultivo de tejidos las auxinas estimulan el alargamiento celular y el crecimiento del tallo; en combinación con las citocininas estimulan la división celular y diversos procesos morfogénicos, también estimulan la diferenciación del floema y xilema, así como la diferenciación de raíces y el desarrollo de raíces secundarias (Delgado & Rojas 1999). Así mismo George & Sherrington, 1984 explica que existe una interacción auxina-citocinina en la inducción de los procesos morfogénicos.

3.2.2.5. Fases de la Embriogénesis Somática

En general son reconocidas tres fases: a) inducción del callo embriogénico, b) inducción y maduración de los embriones

somáticos y c) desarrollo del embrión somático en planta (Delgado & Rojas 1999).

A) Inducción del callo embriogénico

Comprende desde la selección y desinfección del explante, así como su inoculación en el medio de cultivo. Un hecho notable en este primer medio de cultivo es la persistencia de auxinas, en aproximadamente 60% de las especies revisadas por Evans et al., (1981) y Ammirato (1983), destacando el 2,4 D y en menor proporción el AIA y ANA (Chée & Cantliffe, 1988).

Numerosas angiospermas herbáceas han respondido favorablemente al proceso de inducción del callo embriogénico, en tanto que las especies leñosas se han mostrado muy recalcitrantes (Sommer et al., 1975).

B) Inducción y maduración de los embriones somáticos

Es un segundo medio denominado medio secundario, carecido de auxinas en altas concentraciones con adición de algunas citoquininas y/o giberelinas, tiene como funcionalidad la formación de embriones somáticos en grandes cantidades y con la plasticidad de que rápidamente se puedan convertirse en plantas, fase que ha sido muy dificultosa en muchos sistemas (Delgado & Rojas 1999).

Esta fase es la que muestra el desarrollo normal del embrión somático, destacado por la secuencia de cambios morfológicos: globular, acorazonado y torpedo, sin embargo es posible observar otras formas complementarias como la de torpedo tardío, cotiledonar y torpedo expandido como ocurre en la embriogénesis somática del camote (Chée & Cantliffe, 1989; Delgado 1995). Pero el hecho de mayor significación es la ocurrencia de embriogénesis somática secundaria o repetitiva, es decir la formación de uno o más embriones somáticos sobre otro embrión somático (Delgado & Rojas 1999).

C) Desarrollo de embriones somáticos en plantas

En esta fase, el embrión somático, que ha alcanzado el estadio de torpedo, se convierte en planta integra potencialmente capaz de ser transferida a condiciones de campo (Delgado & Rojas 1999).

3.2.2.6. Desarrollo de modelos de embriogénesis somática en especies leñosas.

Zhijian, et al., (1998) logró regenerar plántulas de cacao mediante embriogénesis somática en estaminoides de cacao (*Theobroma cacao* L.) utilizando thidiazurón en concentraciones de 0.00 a 454.5 nM, resultando favorable concentraciones de 22.7 nM, utilizando cuatro etapas de cultivo: inducción de callos embriogénicos (PCG), crecimiento secundario de los callos

(SCG), desarrollo de embroides (ED), conversión de embroides y regeneración de plantas (ED).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. Materiales de vidrio

- Frascos autoclavables de 7 onz.
- Pipetas DIN/B de 25, 10, 5 y 1 ml
- Erlenmeyer pirex de 500, 250 y 125 ml
- Bageta de vidrio pirex de 30 cm
- Vaso de precipitado kimax de 500 y 1000 ml
- Cajas petri pirex de 100 x 15 mm y 150 x 25 mm
- Mechero para alcohol

4.1.2. Materiales de metal

- Pinzas de acero inox stainless punta roma de 143,0 y 200,0 mm de longitud.
- Espátula de bronce de 293,0 mm de longitud
- Tijera quirúrgica de acero inox stainless de 175 mm de longitud
- Mango para hoja de bisturí N° 10, 11 de acero inox stainless de 165 mm de longitud
- Hojas de bisturí KIP N° 10, 11 descartables

4.1.3. Equipos

- Autoclave vertical sercal de 40 l de capacidad
- Agitador magnético con calentamiento (CAT HOTPLATE STIRRER M6 de 1600 rev/min y 300°C)
- Estereomicroscopio nikon SMZ645 (0,8X - 5X)

- Potenciómetro schot.
 - Cámara de flujo laminar horizontal
 - Destilador de agua sercal de 12 l/hora
 - Refrigerador LG icebeam door cooling, -20°C
 - Aire acondicionado LG tipo ventana de 24000 BTU.
 - Incubador fisher científico (0-100 °C)
 - Balanza analítica ADAM EQUIPMENT
 - Termómetro de máxima-mínima Stortz MMT-15/17.
 - Cámara digital nikon coolpix 4300 de 4.0 megapixels.
 - Adaptador de cámara para estereomicroscopio nikon coolpix MDC2
- Lens

4.1.4. Reactivos

- Nitrato de amonio (NH_4NO_3)
- Nitrato de potasio (KNO_3)
- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Ioduro de potasio (KI)
- Sulfato de manganeso heptahidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Ácido bórico (H_3BO_3)
- Sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Molibdato de sodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- Cloruro de cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

- Ácido etilendiaminotetracético dihidratado ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Sulfato de hierro heptahidratado ($\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Hidróxido de sodio
- Ácido clorhídrico (35%) de pureza.
- Ácido nicotínico
- Piridoxina-HCl
- Tiamina-HCl
- Glicina
- Myo-inositol
- Glutamina
- Pantotenato de calcio
- Biotina
- Ácido ascórbico
- 2,4-D (Ácido-2,4-diclorofenoxiacético)
- KIN (6-furfurylamino-purina)
- Thidiazuron (TDZ) [1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) urea]
- D-(+)-Glucosa
- Sucrosa
- Agua de coco
- Agua destilada
- Agua destilada estéril
- Carbón activado
- Phytigel SIGMA
- Lejía comercial al 5,25% de NaOCl
- Pastillas buffer pH= 4,0; pH= 7,0

- Alcohol etílico de 96°

4.2. METODOLOGÍA

4.2.1. Ubicación del Experimento.

El estudio se ejecutó entre los meses de Noviembre del 2006 a Septiembre del 2007 en los ambientes del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional de San Martín.

4.2.2. Preparación de cámara de cría

Antes de iniciar el trabajo, se diseñó y se construyó una cámara de cría para plántulas de sachá inchi de 1,25 m de ancho x 0,60 m de fondo y 1,0 m de alto, acondicionado a un sistema de iluminación controlado, constituido por un circuito eléctrico de tres (03) fluorescentes de 40 watts, un termómetro de máxima-mínima y una cubierta con plástico blanco para cuatro (04) lados.



Fig. N° 10: Detalle de la cámara de cría

4.2.3. Acondicionamiento de plántulas de sachá inchi a la cámara de cría

Para el acondicionamiento de plántulas, se adquirió del Banco de Germoplasma de Sachá Inchi de la Estación Experimental "El Porvenir" INIEA – Juan Guerra, 70 cápsulas maduras de la accesión PER000416, las que fueron conducidas al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y tratadas con 1 g/l de Benomilo: Metil-1-(butilcarbamoil)-2-bencimidazol-carbamato, durante 5 minutos y luego puestas sobre un papel secante. Por otro lado se esterilizo en una olla autoclave, a una presión de 1 atm/15 min, 10 Kg de arena lavada como sustrato. Una vez obtenido el sustrato estéril y acondicionado a unas bandejas de germinación, se inicio la siembra de semillas preparadas anteriormente, lográndose acondicionar 27 semillas/bandeja, obteniéndose 5 bandejas.

La fertilización de las plántulas se hizo a los 15 días después de su germinación a base 10 ml/planta de una solución nutritiva M&S* [1/4] concentración, que contenía un pH=5,7 y una C.E de 2.06 mS/cm. De igual manera la temperatura de la cámara de cría oscilaba entre los 34°C a 24°C, con una temperatura promedio de 29°C y un fotoperiodo de 12 horas luz a 12 horas de oscuridad. Para el control fitosanitario se aplico benomil (1g/l), 15 días antes de la introducción de hojas inmaduras.



Fig. Nº 11: Tratamiento y preparación de las semillas

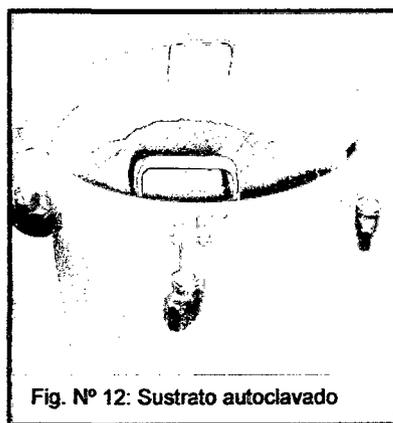


Fig. Nº 12: Sustrato autoclavado



Fig. N° 13: Semillas y plantas en bandejas germinadoras

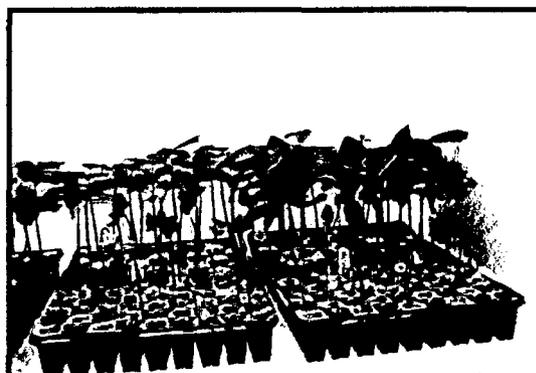


Fig. N° 14: Germinación de las semillas (15 dds**)

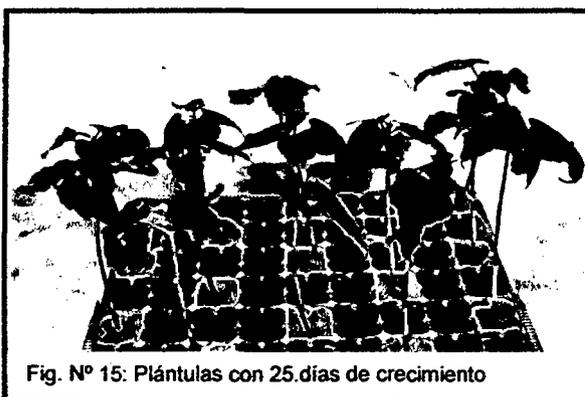


Fig. N° 15: Plántulas con 25 días de crecimiento

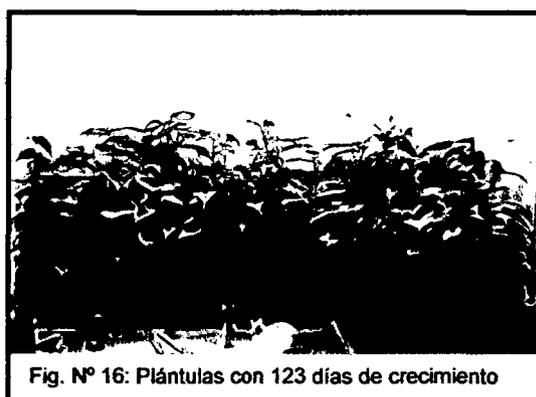


Fig. N° 16: Plántulas con 123 días de crecimiento

* Sales minerales formuladas por Murashigüe & Skoog(1962)

** días después de la siembra

El establecimiento de las plántulas de sachá inchi en la cámara de cría, con sus condiciones controladas, tuvo la finalidad de abastecer con hojas inmaduras (explantes) para los ensayos realizados en el trabajo de investigación.

4.2.4. Diseño Experimental

El desarrollo de la investigación comprendió de dos ensayos secuenciales: El primero consistió en la evaluación cuantitativa y cualitativa de la sincronización (tiempo-inducción). Y para el segundo ensayo sobre “inductor (citoquinina)-tiempo de inducción (días)” se utilizó un DCA con arreglo factorial de 4x3.

4.2.5. Componentes de Estudio.

Cuadro N° 01: **Ensayo 1:** Niveles de concentración hormonal para la evaluación sincronizada (tiempo-inducción).

FITOREGULADOR	CONCENTRACIONES (mg/l)				
Thidiazuron	0,000	0,003	0,005	0,008	0,010

Cuadro N° 02: **Ensayo 2:** Niveles de concentración hormonal y tiempos de inducción en el desarrollo de la embriogénesis somática en los tratamientos puestos en estudio.

FACTORES	NIVELES			
Thidiazurón (A)	Concentración (mg/l)			
	0,000 (a ₁)	0,005 (a ₂)	0,008 (a ₃)	0,010 (a ₄)
Tiempo de inducción (B)	Periodos de inducción (días)			
	5 (b ₁)	7 (b ₂)	10 (b ₃)	

4.2.6. Combinación de Tratamientos

Cuadro N° 03: **Ensayo 1:** Confinamiento de tratamientos para la evaluación sincronizada (tiempo-inducción).

TRATAMIENTOS	Dosis en mg/l
	Thidiazurón
T-0	0,000
T-1	0,003
T-2	0,005
T-3	0,008
T-4	0,010

Cuadro N° 04: **Ensayo 2:** Confinamiento de tratamientos para la evaluación de inducción, en el desarrollo de la embriogénesis somática en tratamientos puestos en estudio

TRATAMIENTOS	COMBINACIONES	TDZ	Tiempo
		[mg/l]	días
T-1	a1b1	0,000	5
T-2	a1b2	0,000	7
T-3	a1b3	0,000	10
T-4	a2b1	0,005	5
T-5	a2b2	0,005	7
T-6	a2b3	0,005	10
T-7	a3b1	0,008	5
T-8	a3b2	0,008	7
T-9	a3b3	0,008	10
T-10	a4b1	0,010	5
T-11	a4b2	0,010	7
T-12	a4b3	0,010	10

4.2.7. Descripción de Ensayos

4.2.7.1. Primer Ensayo

Se realizó una prueba de inducción hormonal en hojas inmaduras de sachá inchi, con un tratamiento (T_0) como testigo utilizado como control y cuatro tratamientos con diferentes concentraciones de thidiazurón (T_1, T_2, T_3, T_4).

4.2.7.2. Segundo Ensayo

Se realizó una prueba de inducción hormonal en hojas inmaduras de sachá inchi, con doce tratamientos ($T_1, T_2, T_3, T_4, \dots, T_{12}$), interactuados en concentración hormonal y tiempos de inducción definidos, consecutivamente se evaluó el proceso de crecimiento

secundario de callos en dos periodos, a los seis y diez días; de igual manera el proceso de desarrollo de embrioides durante periodos de 10 días.

4.2.8. Características del Diseño Experimental.

Ensayo 01: Para este ensayo se consideró cinco tratamientos con diez repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por un tubo de prueba de 25x150 mm con una hoja inmadura segmentada en dos partes.

Ensayo 02: El diseño completamente al azar con arreglo factorial de 4 x 3 estuvo constituido por doce tratamientos con cuatro repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por un frasco de 7 onz con cuatro hojas inmaduras segmentadas en dos partes.

Modelo Matemático: $Y_{k(ij)} = \mu + \lambda_i + \beta_j + \lambda\beta_{ij} + \xi_{k(ij)}$
--

Donde:

Y_{ij} = Resultado de una unidad experimental

μ = Media general

λ_i = Efecto principal del factor A

β_j = Efecto principal del factor B

$\lambda\beta_{ij}$ = Efecto de la interacción AB

$\xi_{k(ij)}$ = Error de la unidad experimental

Cuadro N° 05: Análisis de varianza para el experimento del DCA con arreglo factorial 4x3.

Fuente de Variabilidad	Grado de Libertad
Tratamientos	$t-1=11$
F(A)	$p-1=3$
F(B)	$q-1=2$
AB	$(p-1)(q-1)=6$
Error	$(r-1)(pq)=36$
Total	$pqr - 1=47$

4.2.9. Desarrollo del estudio para el Ensayo 01

4.2.9.1. Medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo M&S (1962) [Total] modificado (únicamente sales macro y micro)*, suplementado con Vit DKW (1984)**; 20.0 g/l de glucosa, 2.0 mg/l de 2,4-D y 2.5 g/l de phytigel como medio base, y diferentes concentraciones de thidiazurón como se muestra en el cuadro N° 01 y el anexo 01.

Para la preparación de este medio de cultivo se utilizó el procedimiento sugerido por George (1992), detallado en el anexo 02.

***. Vitaminas formulas por Driver & Kuniyuki (1984)

4.2.9.2. Preparación de solución desinfectante y tensoactiva

Se preparó 100 ml de una solución desinfectante al 0.5% de NaOCl, de igual manera 100 ml de una solución tensoactiva a 70° de alcohol etílico. Para la preparación de las soluciones se utilizó la ley de concentraciones.

$$C_1 \times V_1 = V_2 \times C_2$$

C_1 = Concentración inicial de NaOCl y/o Alcohol etílico.

V_2 = Volumen inicial de NaOCl y/o Alcohol etílico.

C_2 = Concentración final de la solución.

V_1 = Volumen final de la solución.

Preparación de 100 ml de solución desinfectante a una concentración de 0.5% de NaOCl.

$$5.25\% \times X = 100 \text{ ml} \times 0.5\%$$

$$X = \frac{100 \text{ ml} \times 0.5\%}{5.25\%}$$

X = 9.52 ml de lejía comercial con 5.25% de NaOCl aplicados a
90.48 ml de agua destilada estéril.

4.2.9.3. Preparación del material vegetal

Con la ayuda de una tijera quirúrgica y una pinza mediana punta roma previamente desinfectadas con alcohol de 96°, se colectó de plantas con 123 días de edad; hojas inmaduras de 25-26 mm de longitud promedio a un erlenmeyer con 100 ml de agua destilada

estéril. Realizándose un total de doce colecciones por cada proceso de introducción. Cada erlenmeyer fue asegurado con una tapa de aluminio y conducido a la cámara de siembra para el proceso de desinfección.

4.2.9.4. Desinfección e introducción del material vegetal

Este proceso se realizó en la cámara de flujo laminar, colocándose las hojas inmaduras a la solución tensoactiva (Alcohol etílico a 70°) por un intermedio de 3 segundos, de inmediato se realizó un enjuague de un minuto con agua destilada estéril. Luego las hojas inmaduras fueron sumergidas a la solución desinfectante (NaOCl al 0.5%) por un lapso de diez minutos e inmediatamente después se realizaron tres enjuagues de un minuto con agua destilada estéril, enseguida con la ayuda de una pinza grande punta roma se transportaron las hojas inmaduras preparadas a una placa petri estéril que contenía una fina película de agua destilada estéril, con el fin de evitar la deshidratación.

Terminado el proceso de desinfección se hizo un corte transversal a cada hoja inmadura y se inoculo los segmentos con el haz sobre la superficie inclinada del medio de cultivo que contenían los tubos de prueba, posteriormente se taparon y se rotularon.

4.2.9.5. Incubación de explantes.

Las unidades experimentales se agruparon y se incubaron en

oscuridad durante 14 días, mantenidos a condiciones ambientales controladas con una temperatura promedio de 25°C y una H.R promedio de 46%

4.2.10. Desarrollo del estudio para el Ensayo 02

4.2.10.1. Medios de cultivo

Para este ensayo, se prepararon tres medios de cultivo utilizados por Zhijian et al., 1998 en las tres primeras etapas de cultivo.

Medio de cultivo 01: Inducción del callo embriogénico (MICE)

Formula utilizada para un litro de medio de cultivo (anexo 03): M&S (1962) [Total] modificado (únicamente sales macro y micro)*, suplementado con Vit DKW (1984)***; 20.0 g de glucosa, 0.25 g de glutamina, 2.0 mg de 2,4-D y 2.0 g de phytigel como medio base y diferentes concentraciones de thidiazurón tal como se muestra en el cuadro N° 02, todo esto ajustado a un pH= 5,75 para todos los tratamientos.

Medio de cultivo 02: Crecimiento secundario de callos (MCSC)

Formula utilizada para un litro de medio de cultivo (anexo 04): M&S (1962) [Total] modificado (únicamente sales macro y micro)*, suplementado con Vit Gamborg (1966)****; 20.0 g de glucosa, 2.0 mg de 2,4-D, 0.14 mg de kinetina, 50 ml de agua de coco y 2.2 g de phytigel, todo esto ajustado a un pH = 5,78

**** Vitaminas formuladas por Gamborg et al., (1996)

Medio de cultivo 03: Desarrollo de embrioides (MDE)

Formula utilizada para un litro de medio de cultivo (anexo 05):
M&S (1962) [Total] modificado (únicamente sales macro y micro)*, suplementado con 1.0 mg de ácido nicotínico, 2.0 mg de tiamina-HCl, 2.0 mg de glicina, 100.0 mg de myo-inositol, 1g de glucosa, 30.0 g de sacarosa, 2.0 g de carbón activado y 2.0 g de phytigel, todo esto ajustado a un pH = 5,76.

Los procedimientos para su preparación se adjuntan en los anexos 04, 06 y 08.

Nota: Los procesos para el preparado de la solución desinfectante y tensoactiva, el preparado del material vegetal, la desinfección e inoculación del material vegetal, fueron similares a los realizados en el ensayo 01.

4.2.10.2. Condiciones de incubación.

Para los procesos de inducción del callo embriogénico y el crecimiento secundario de callos estuvieron acondicionados en oscuridad a una temperatura promedio de 25°C y una humedad relativa promedio de 46%. Para el proceso de desarrollo de embrioides somáticos se paso por una etapa de oscuridad de 14 días y luego expuestos a luz por un fotoperiodo de 16/8 con temperaturas promedio de 25,5 °C, una H.R. promedio de 46,5% y una intensidad luminosa de 600 lux aproximadamente.

4.2.11. Parámetros de evaluación

A. Parámetros para el ensayo 01

- Porcentaje de contaminación en hojas inmaduras.- Realizado a los 06 días de haberse instalado el ensayo.
- Quemado de hojas inmaduras.- Realizado a los 06 días de haberse instalado el ensayo.
- Porcentaje de inducción de callos.- Evaluación realizada por frecuencia consecutiva de tres días (3,6,9) para cada tratamiento, evaluándose un total de 10 repeticiones por tratamiento.

$$\% \text{ IC} = \frac{\text{Hojas con respuesta callogénica}}{\text{Hojas totales}}$$

4.2.11.1. Parámetros para el ensayo 02

- Peso de callo fresco. Se pesaron hojas inmaduras inducidas en los tiempos establecidos por cada tratamiento.
- Caracterización de la embriogénesis somática.- Para cada tratamiento se evaluó los cambios morfológicos de las hojas inmaduras sometidas al proceso de la embriogénesis somática.
- Evaluación de forma y tipo de callos.- Se caracterizó en forma visual la forma y tipo de callo, utilizando la metodología desarrollada por Chanaatásig, 2004.

V. RESULTADOS

5.1. Resultados del primer ensayo

Cuadro N° 06: Porcentaje de contaminación microbiana en hojas inmaduras a los 6 días de su cultivo.

Repetición	TRAT. 0	TRAT. 1	TRAT. 2	TRAT. 3	TRAT. 4
1	b	b	b	b	b
2	b	b	b	b	b
3	b	b	b	b	b
4	b	b	b	b	b
5	b	b	b	b	b
6	b	b	b	b	b
7	b	b	b	b	b
8	b	b	b	a	b
9	b	b
10	b	b	b
% Contam:	0%	0%	0%	12.50%	0%
% No Contam:	100%	100%	100%	87.50%	100.00%
% Prom. Contam:	2.50%				
% Prom. No Contam:	97.50%				

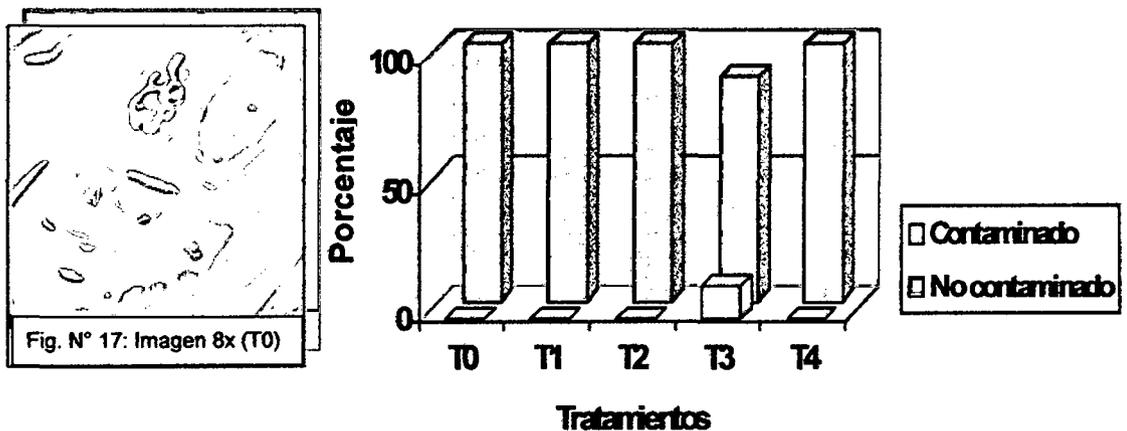
a = contaminado

b = no contaminado

.... = unidades perdidas

$$\% \text{Contaminación} = \frac{\#a \times 100}{\#(a+b)}$$

Grafico N° 01: Porcentaje de contaminación microbiana en hojas inmaduras a los 6 días de su cultivo.



Cuadro N° 07: Porcentaje de quemado de hojas inmaduras en tratamientos puestos en estudio a los 6 días de su cultivo.

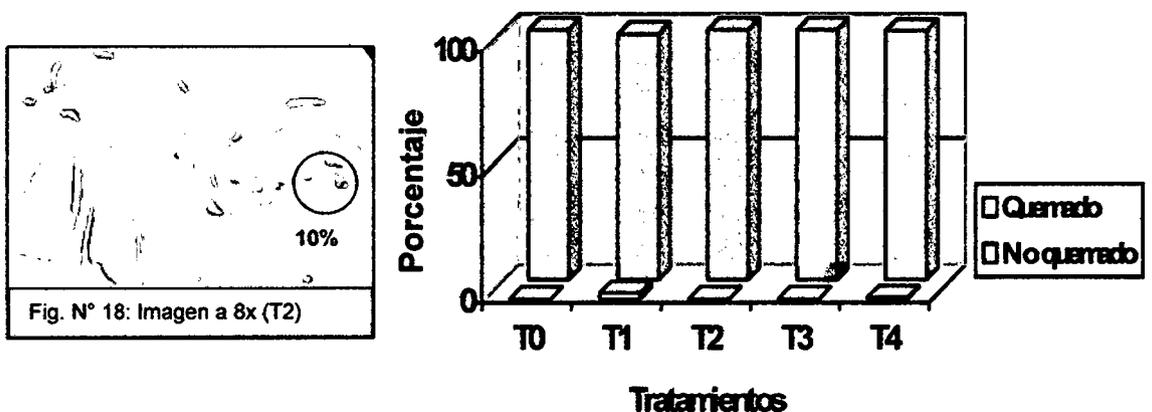
Repetición	TRAT. 0	TRAT. 1	TRAT. 2	TRAT. 3	TRAT. 4
1	0	5	0	0	0
2	0	2	0	0	0
3	0	1	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	2	0	0	0
7	0	2	0	0	0
8	0	10	0	0	0
9	0	0
10	0	0	5
% Quemado	0.00	2.20	0.00	0.00	0.50
% No quemado	100.00	97.80	100.00	100.00	99.50
% promedio quemado	0.54				
% promedio no quemado	99.46				

Nota.- Los datos mostrados en la tabla se expresan en porcentajes

.... = unidades perdidas

$$\% \text{ Quemado} = \frac{\text{Rep 1} + \text{Rep 2} + \dots + \text{Rep 10}}{\text{Total Repeticiones}} \times 100$$

Grafico N° 02: Porcentaje de quemado de hojas inmaduras en tratamientos puestos en estudio a los 6 días de su cultivo.



Cuadro N° 08: Porcentaje de inducción de callos en explantes inducidos a los 3 días de cultivo.

Repetición	TRAT. 0	TRAT. 1	TRAT. 2	TRAT. 3	TRAT. 4
1	b	b	b	b	a
2	b	b	b	b	a
3	b	b	b	b	a
4	b	b	b	a	a
5	b	b	b	b	a
6	b	b	b	b	a
7	b	b	a	b	a
8	b	b	b	b	a
9	b	b
10	b	b	b
% Prom. Inducción	0.00	0.00	11.11	12.50	80.00
% Prom. No inducido	100.00	100.00	98.89	87.50	20.00

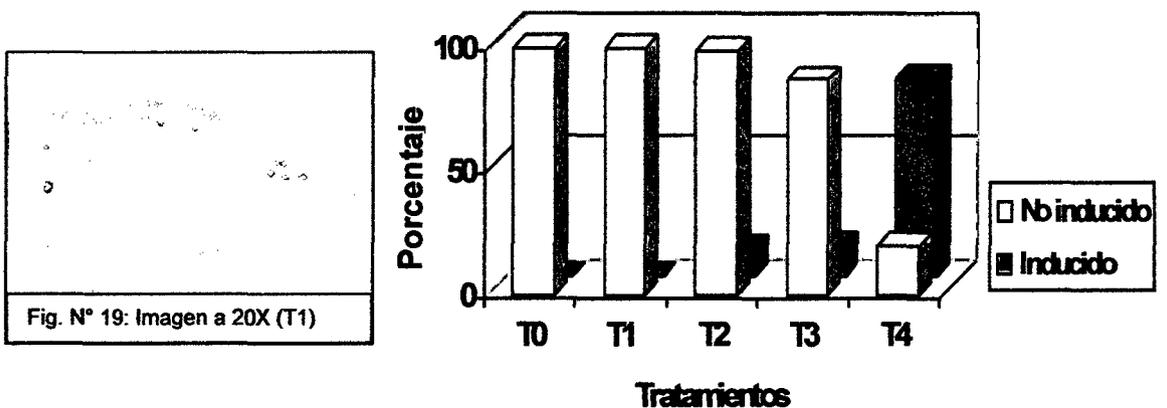
a = inducido

b = no inducido

.... = unidades perdidas

$$\%IC \text{ promedio} = \frac{\#a \times 100}{\#(a+b)}$$

Grafico N° 03: Porcentaje de inducción de callos en explantes inducidos a los 3 días de cultivo.



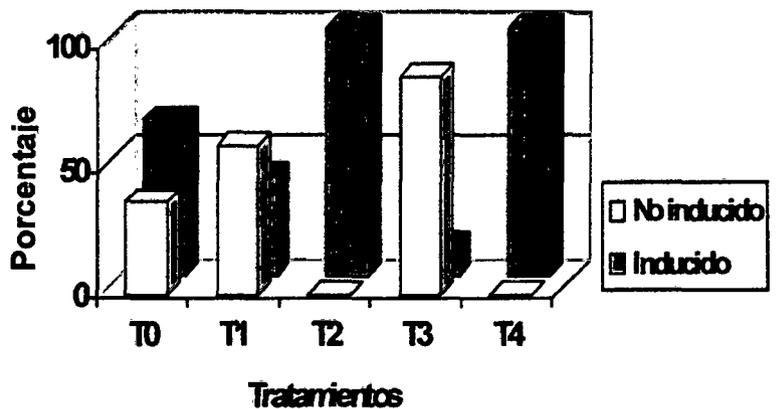
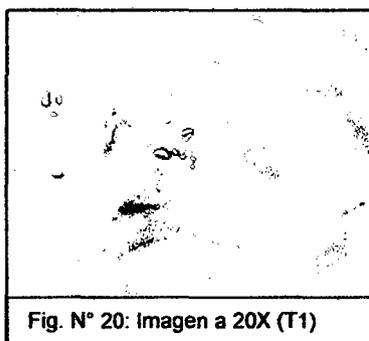
Cuadro N° 09: Porcentaje de inducción de callos en explantes inducidos a los 6 días de cultivo.

Repetición	TRAT. 0	TRAT. 1	TRAT. 2	TRAT. 3	TRAT. 4
1	a	b	a	b	a
2	a	a	a	b	a
3	a	b	a	b	a
4	a	b	a	a	a
5	b	b	a	b	a
6	a	b	a	b	a
7	b	b	a	b	a
8	b	a	a	b	a
9	a
10	a	a	a
% Prom. Inducción	62.50	40.00	100.00	12.50	100.00
% Prom. No inducido	37.50	60.00	00.00	87.50	00.00

a = inducido b = no inducido = unidades perdidas

$$\%IC \text{ promedio} = \frac{\#a \times 100}{\#(a+b)}$$

Grafico N° 04: Porcentaje de inducción de callos en explantes inducidos a los 6 días de cultivo.



Cuadro N° 10: Porcentaje de inducción de callos en explantes inducidos a los 9 días de cultivo.

Repetición	TRAT. 0	TRAT. 1	TRAT. 2	TRAT. 3	TRAT. 4
1	a	a	a	a	a
2	a	a	a	a	a
3	a	a	a	a	a
4	a	a	a	a	a
5	a	a	a	a	a
6	a	a	a	a	a
7	a	a	a	a	a
8	a	a	a	a	a
9	a
10	a	a	a
% Prom. Inducción	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
% Prom. No inducido	00.00	00.00	00.00	00.00	00.00

a = inducido

b = no inducido

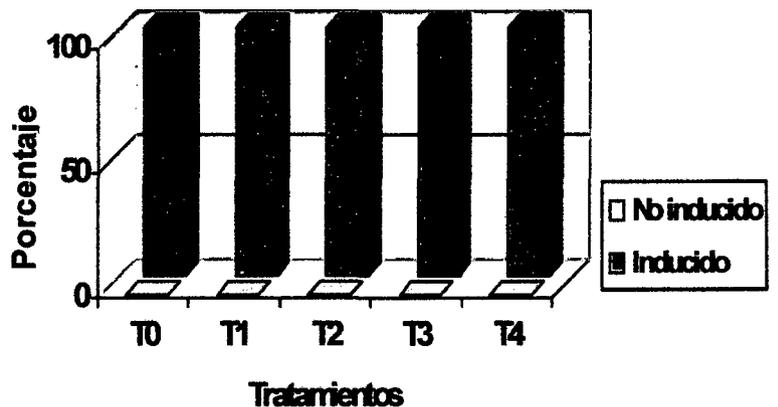
.... = unidades perdidas

$$\%IC \text{ promedio} = \frac{\#a \times 100}{\#(a+b)}$$

Grafico N° 05: Porcentaje de inducción de callos en explantes inducidos a los 9 días de cultivo.



Fig. N° 21: Imagen a 10X (T1)



5.2. Resultados del segundo ensayo

5.2.1. Determinación del peso de callo fresco en hojas inmaduras de sachá inchi

Cuadro N° 11: Análisis de varianza para el peso de callo fresco en mg obtenidos en los tratamientos puestos en estudio.

F. Variación.	G.L	SC	CM	FC	FT	Signific.
Tratamientos	11	7210,52	655,5019059	85,3892959	(2,06-2,78)	**
A	3	380,015	126,6716587	16,5009494	(2,86-4,38)	**
B	2	4450,83	2225,415407	289,894893	(3,26-5,25)	**
Int. AB	6	2379,68	396,6125292	51,6649369	(2,36-3,35)	**
Error	36	276,359	7,676628539			
Total	47	14697,4	312,7106501			

** Altamente significativo

$\bar{X} = 34,6$

$R^2 = 96,36 \%$

$C.V = 8,01\%$

Grafico N° 06: Peso de callo fresco en hojas inmaduras a los 5 días de inducción.

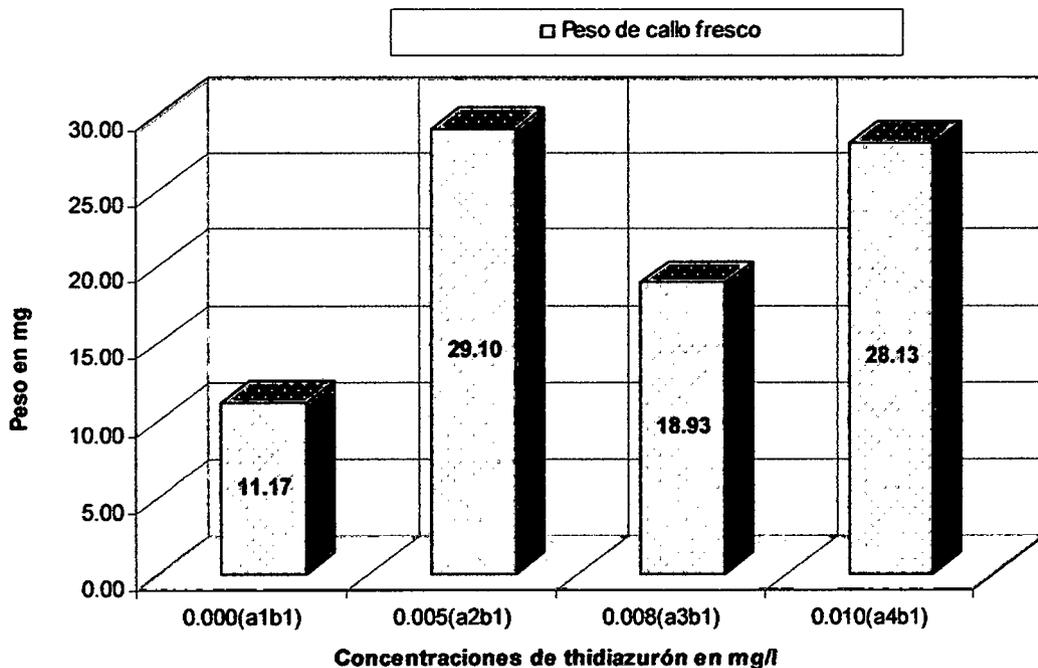


Grafico N° 07: Peso de callo fresco en hojas inmaduras a los 7 días de inducción.

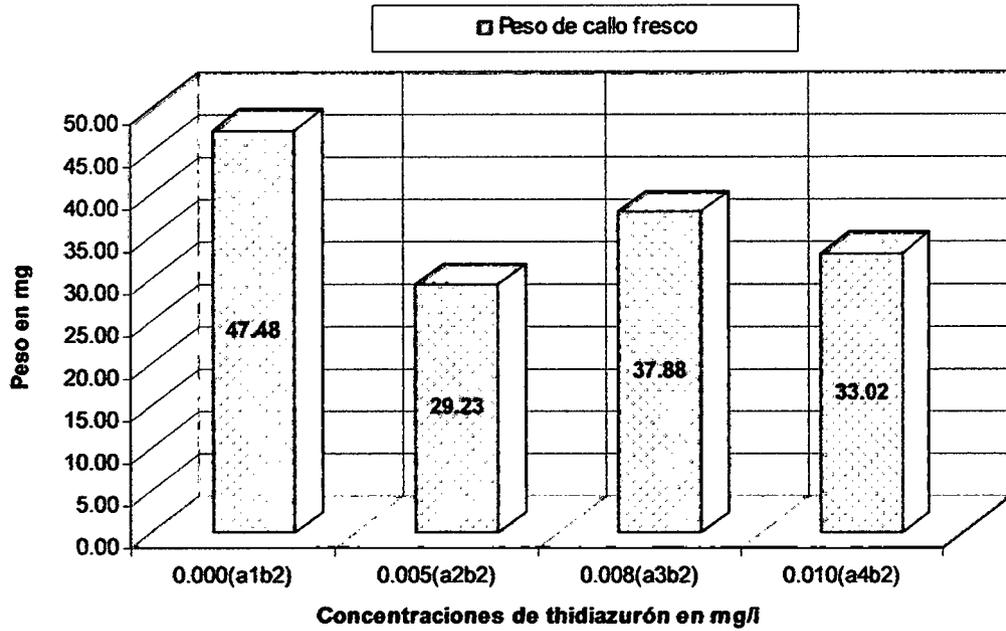


Grafico N° 08: Peso de callo fresco en hojas inmaduras a los 10 días de inducción.

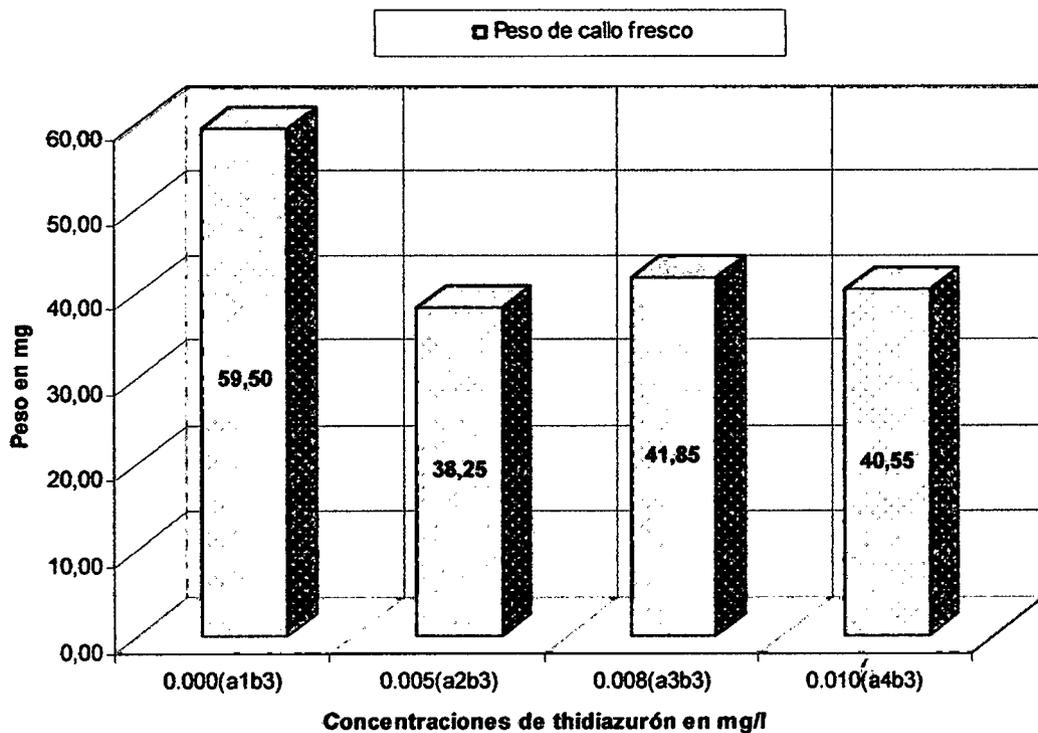


Grafico N° 09: Momento del incremento máximo en peso de callo fresco en hojas inmaduras de sachá inchi.

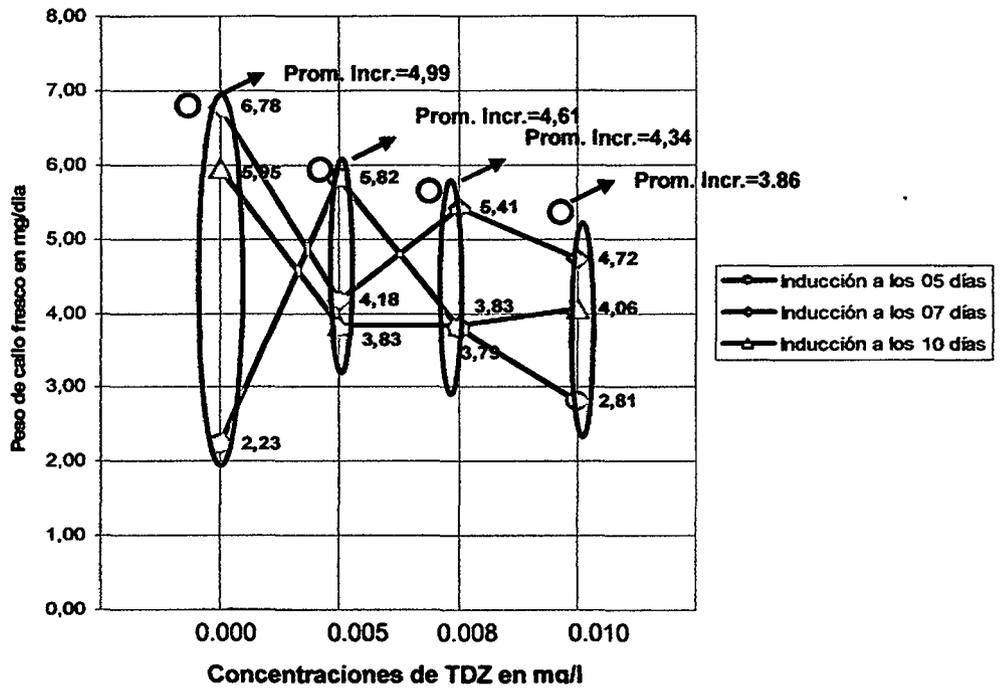
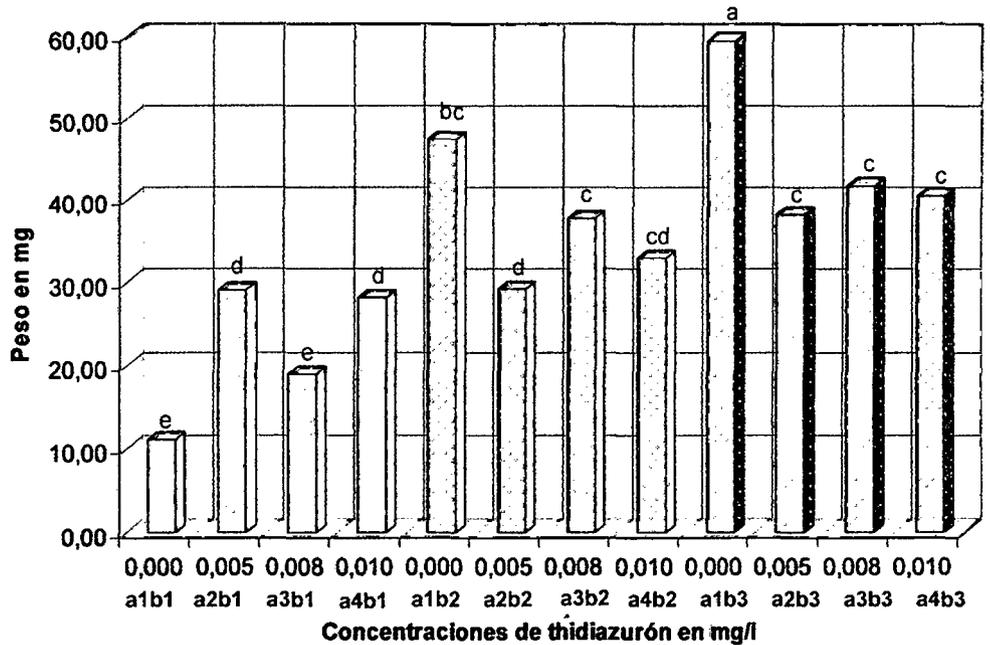


Grafico N° 10: Prueba de DUNCAN al 0.01% para el peso de callo fresco, obtenido bajo cuatro concentraciones de thidiazurón evaluados en tres tiempos de inducción.



Expi. con 05 días de inducción
 Expi. con 07 días de inducción
 Expi. con 10 días de inducción

5.2.2. Caracterización de la embriogénesis somática en los tratamientos puestos en estudio.

T-1: a₁b₁ (0.000 mg/l thidiazurón (TDZ), bajo 05 días de inducción)

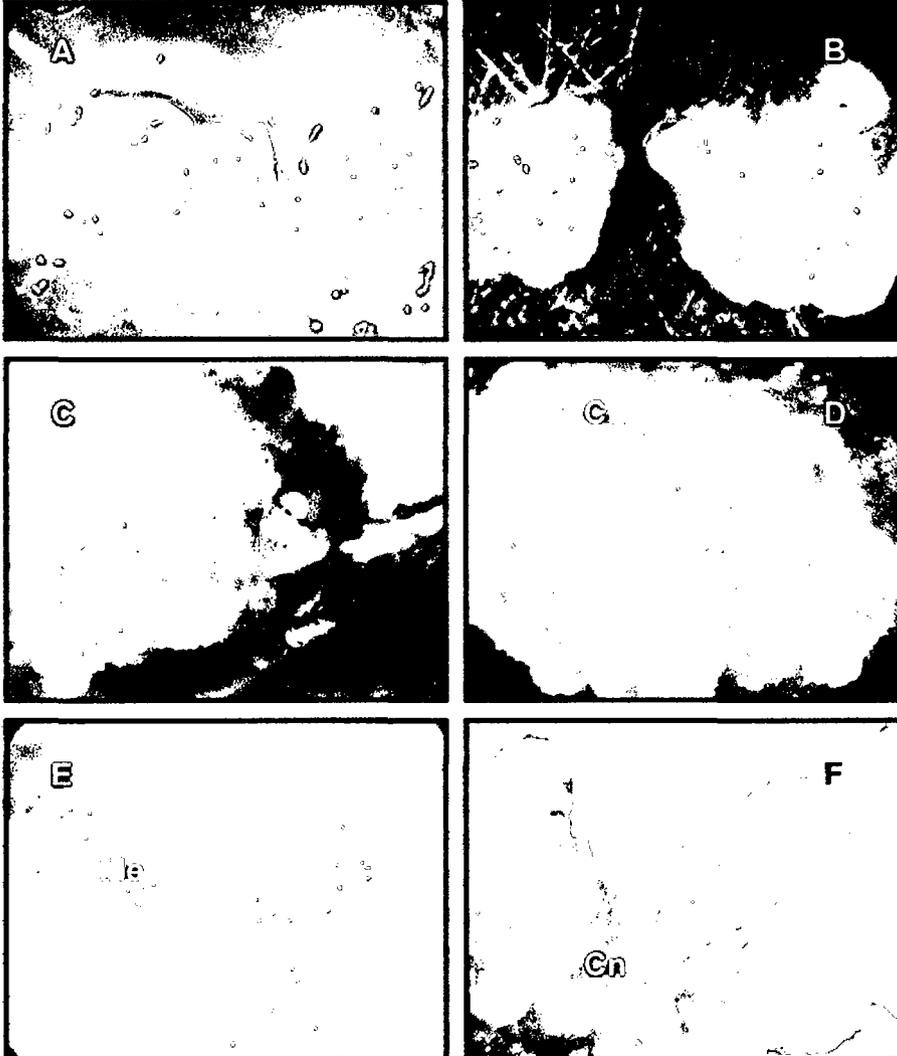


Figura Nº 22. A-F: A (10X). Hoja inmadura con 05 días de inducción; B (10X). Hoja inmadura con 06 días de incubación en el (MCSC); C (20X). Hoja inmadura con 10 días de incubación en el (MCSC); D (20X). Callo nodoso con 20 días de desarrollo embrionario proveniente de explantes de la Fig. 22-B; E (20X). Callo con meristemoides con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig.22-C; F (20X). Callo nodoso y con meristemoides con 30 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig. 22-C.
Cn = Callo nodoso , Me = meristemoide

T-2: a₁b₂ (0.000 mg/l thidiazurón (TDZ), bajo 07 días de inducción)

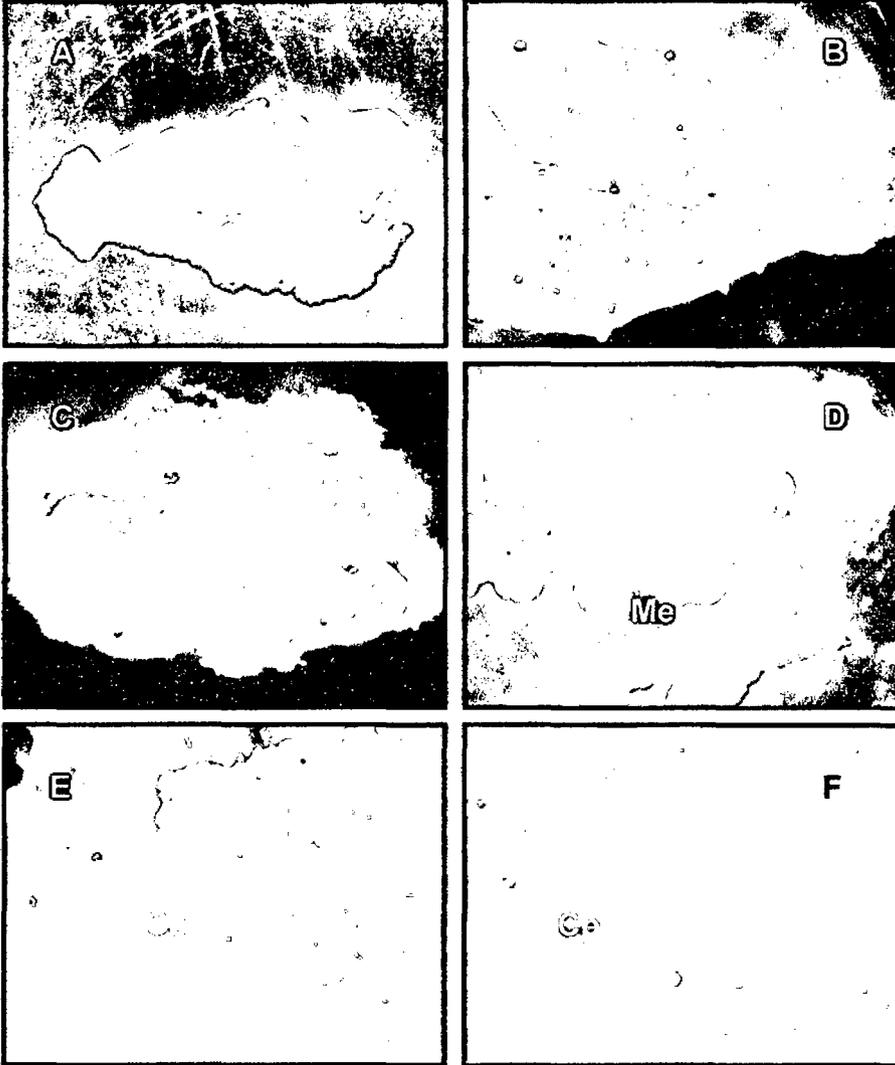


Figura N° 23. A-F: A (10X). Hoja inmadura con 07 días de inducción; B (20X). Hoja inmadura con 06 días de incubación en el (MCSC); C (20X). Hoja inmadura con 10 días de incubación en el (MCSC); D (20X). Callo con nodos y meristemoides con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig. 23-B; E (50X). Callo compacto no embriogénico con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig.23-C; F (80X). Callo embriogénico con estructuras proembrionarias con 40 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig. 23-B. Cc = callo compacto cremoso, Cp = Callo proembrionario, Me = meristemoide.

T-3: a₁b₃ (0.000 mg/l thidiazurón (TDZ), bajo 10 días de inducción)

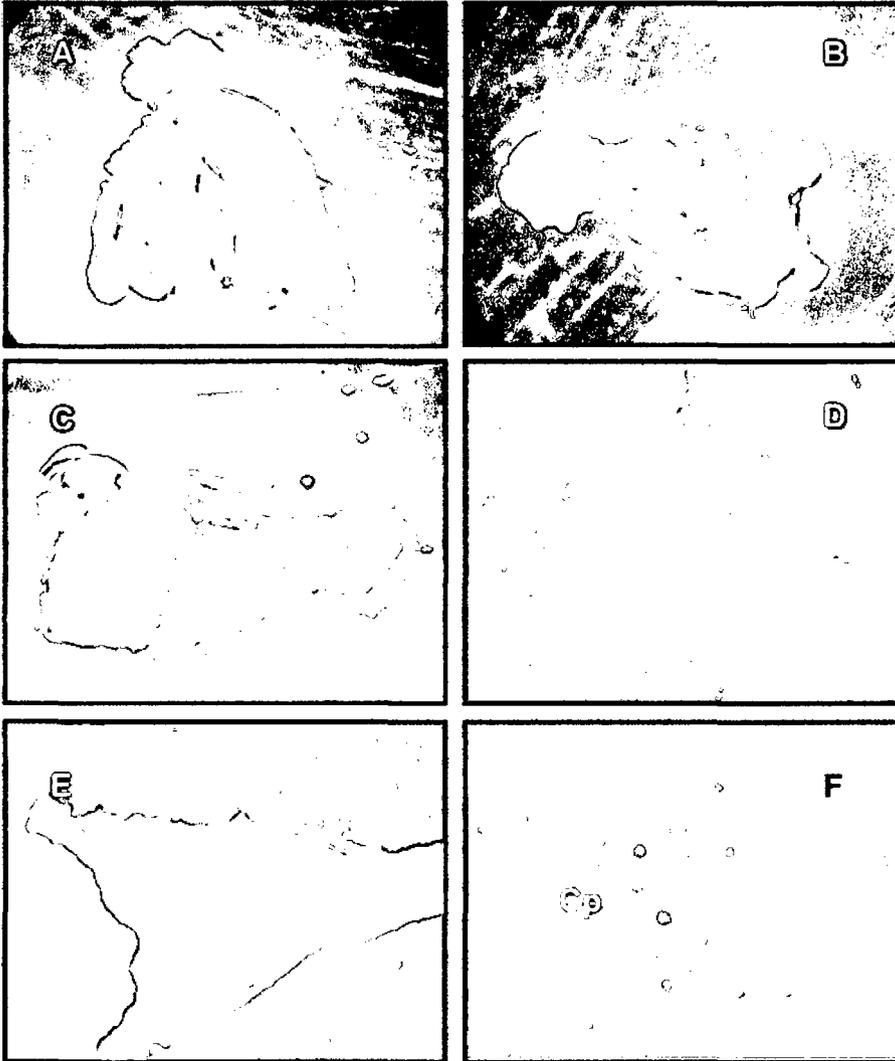


Figura N° 24. A-F: A (10X). Hoja inmadura con 10 días de inducción; B (10X). Hoja inmadura con 06 días de incubación en el (MCSC); C (10X). Hoja inmadura con 10 días de incubación en el (MCSC); D (20X). Callo no embrionario con nodos y meristemoides con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig. 24-B; E (10X). Callo compacto embriogénico con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig.24-C; F (80X). Callo embriogénico con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig. 24-E. Ccr = Callo cristalino delgado irregular, Cp = Callo proembrionario.

T-4: a₂b₁ (0.005 mg/l thidiazurón (TDZ), bajo 05 días de inducción)

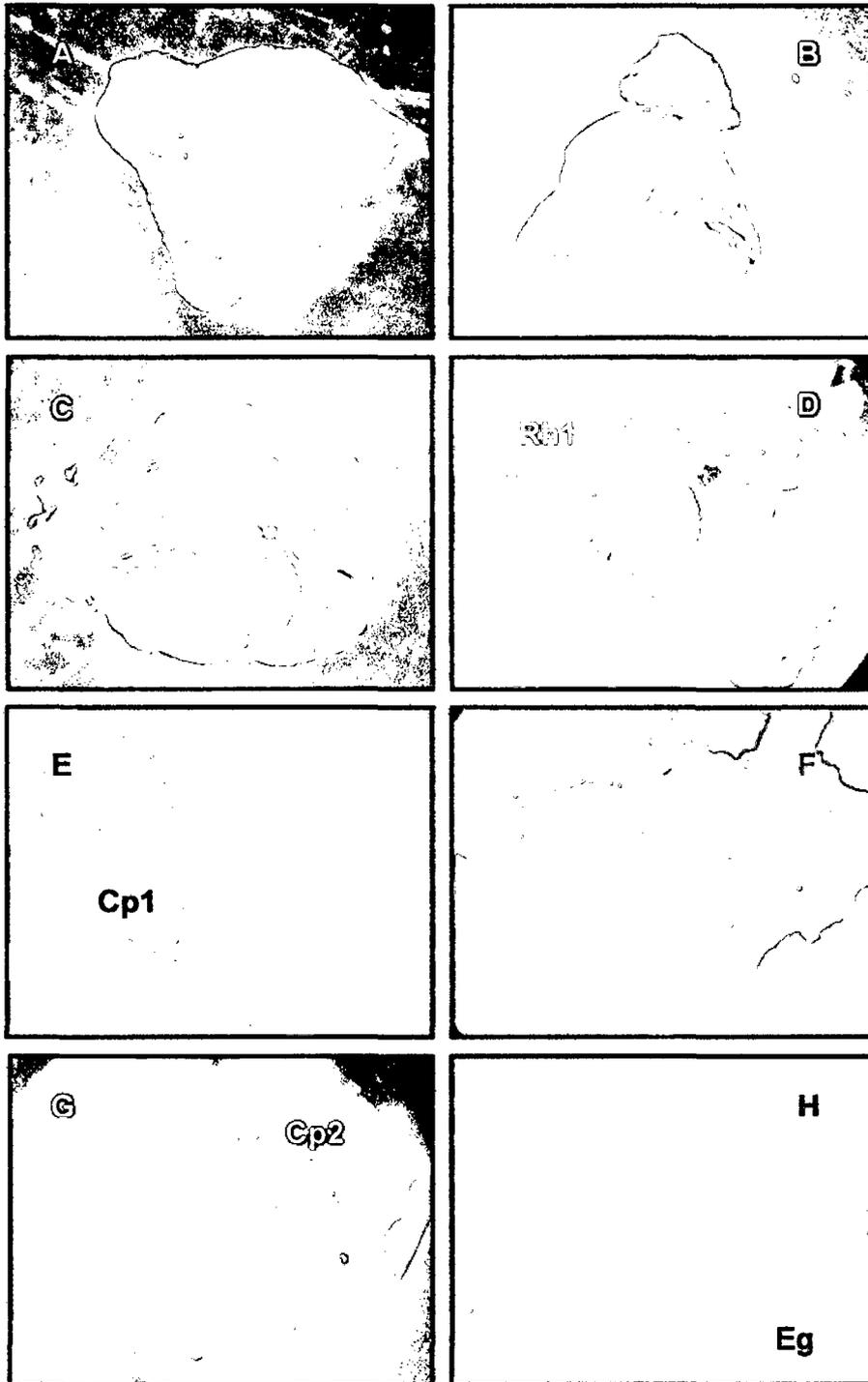


Figura N° 25. A-H: A (10X). Hoja inmadura con 05 días de inducción; B (10X). Hoja inmadura con 06 días de incubación en el (MCSC); C (20X). Hoja inmadura con crecimiento intermerval con 10 días de incubación en el (MCSC); D (20X). Meristemoides expresados en organogénesis indirecta (rizogénesis) con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig. 25-B; E (80X). Callo con estructuras globulares pre-embriónicas proveniente de explantes de la Fig. 25-D; F (50X). Callo compacto no embriogénico con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig. 25-C; G (60X). Proembrioides globulares pigmentados a los 30 días de incubado en el (MDE); H (80X). Proembrioides globulares con embrioides en estadio globular a los 40 días de incubado en el (MDE). Rh1 = rizogénesis indirecta, Cp1 = callo proembriionario cristalino, Cp2 = callo proembriionario pigmentado, Eg = estadio globular.

T-5: a₂b₂ (0.005 mg/l thidiazurón (TDZ), bajo 07 días de inducción)

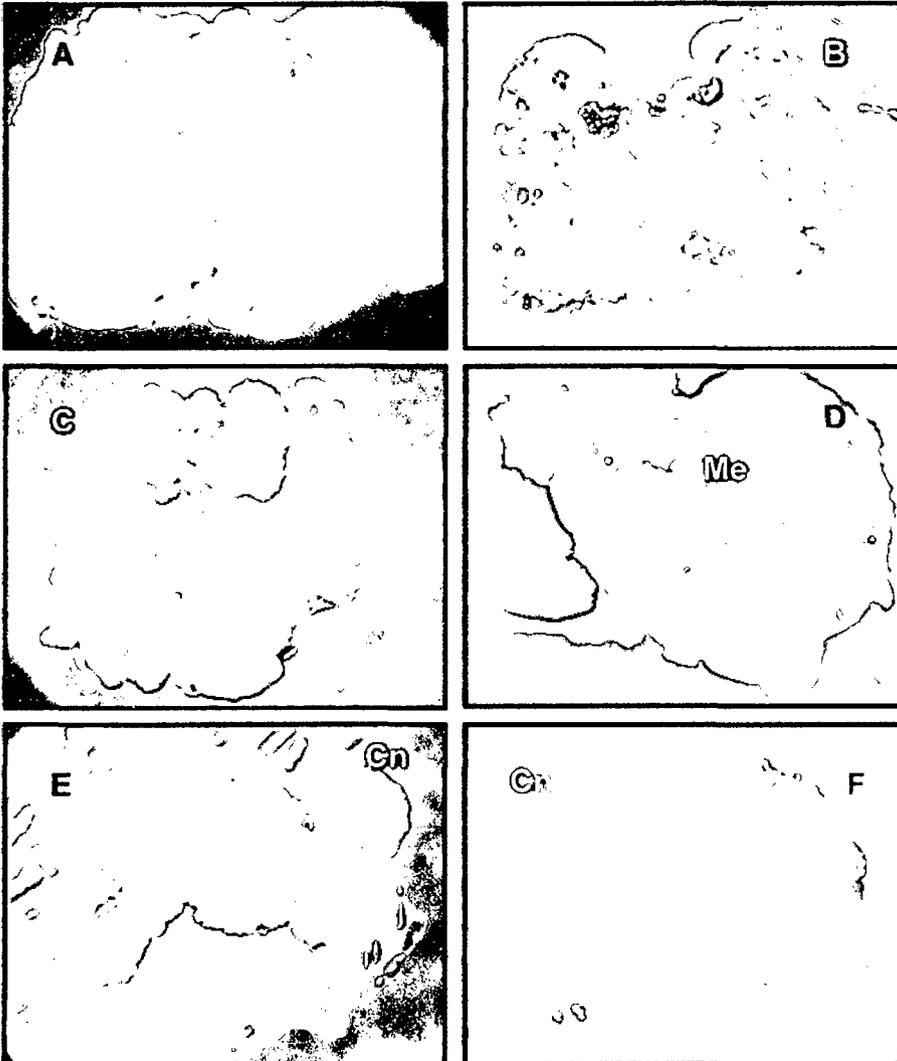


Figura Nº 26. A-F: A (20X). Hoja inmadura con 07 días de inducción; B (20X). Hoja inmadura con 06 días de incubación en el (MCSC); C (20X). Hoja inmadura con 10 días de incubación en el (MCSC); D (20X). Callo compacto con meristemoides expresados en organogénesis indirecta (rizogénesis) con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig. 26-B; E (80X). Nodos de callo compacto con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig.26-C; F (50X). Nodo calloso compacto. Me = meristemoide, Cn = Callo nodoso.

T-6: a₂b₃ (0.005 mg/l thidiazurón (TDZ), bajo 10 días de inducción)

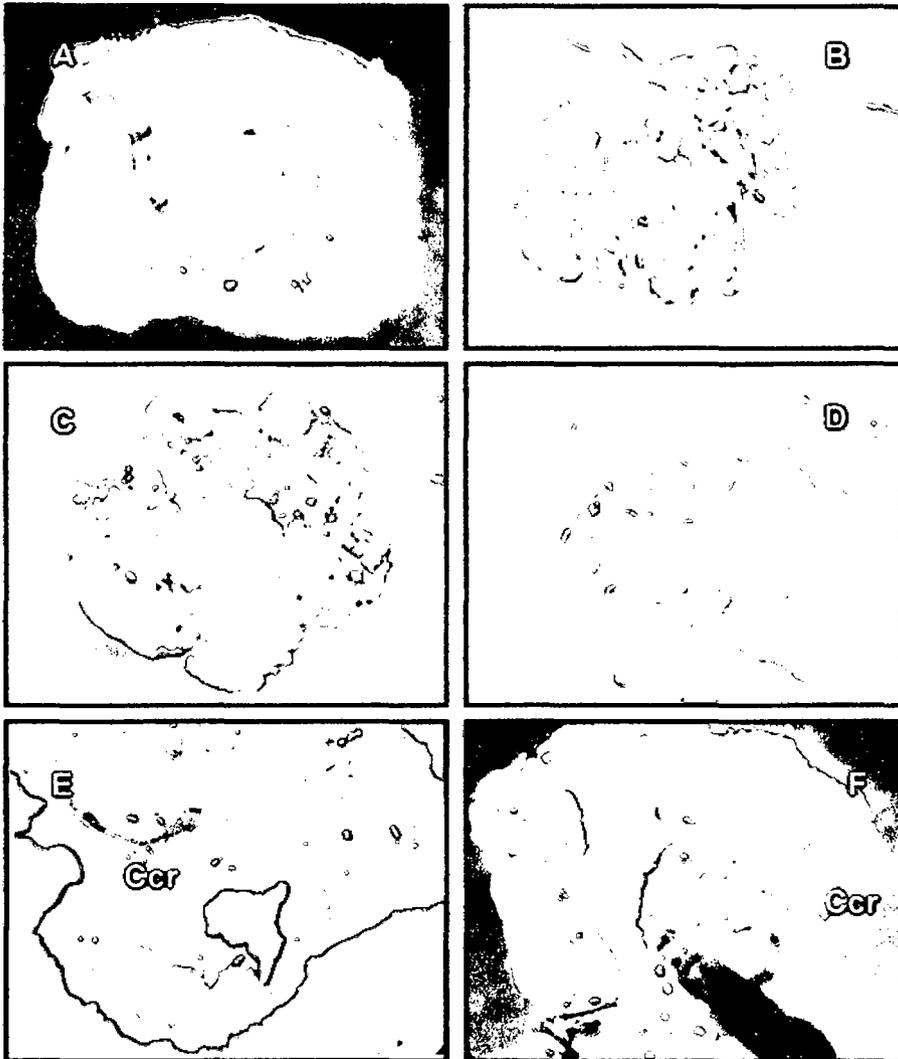


Figura N° 27. A-F: A (10X). Hoja inmadura con 10 días de inducción; B (10X). Hoja inmadura con 06 días de incubación en el (MCSC); C (10X). Hoja inmadura con 10 días de incubación en el (MCSC); D (20X). Callo compacto no embriogénico con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig. 27-B; E (20X). Callo compacto no embriogénico con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig.27-C; F (20X). Callo compacto no embriogénico con células irregulares provenientes de explantes de la Fig. 27-C. Ccr = Callo cristalino delgado irregular.

T-7: a₃b₁ (0.008 mg/l thidiazurón (TDZ), bajo 05 días de inducción)

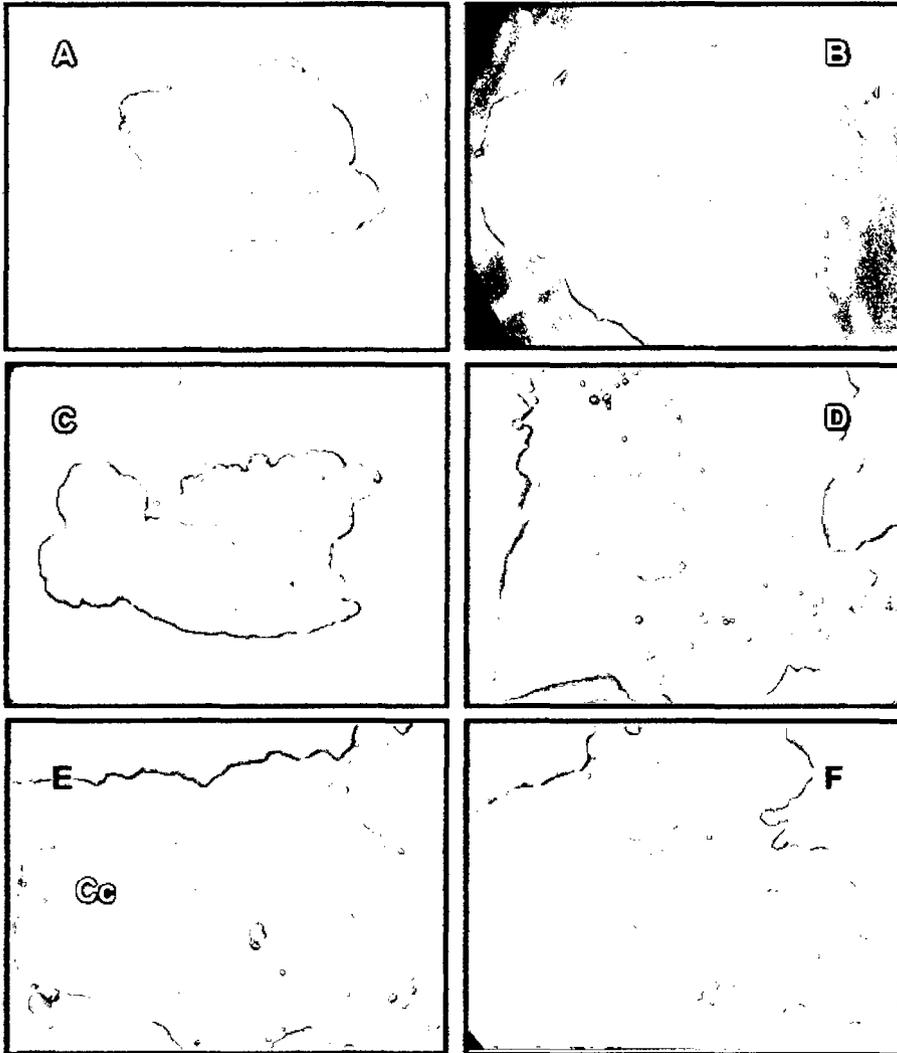


Figura N° 28. A-F: A (10X). Hoja inmadura con 05 días de inducción; B (20X). Hoja inmadura con 06 días de incubación en el (MCSC); C (10X). Hoja inmadura con 10 días de incubación en el (MCSC); D (20X). Callo compacto necrótico no embriogénico con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig. 28-B; E y F (20X). Callo compacto con meristemoides no embriogénico con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig.28-C. Cc = callo compacto cremoso.

T-8: a₃b₂ (0.008 mg/l thidiazurón (TDZ), bajo 07 días de inducción)

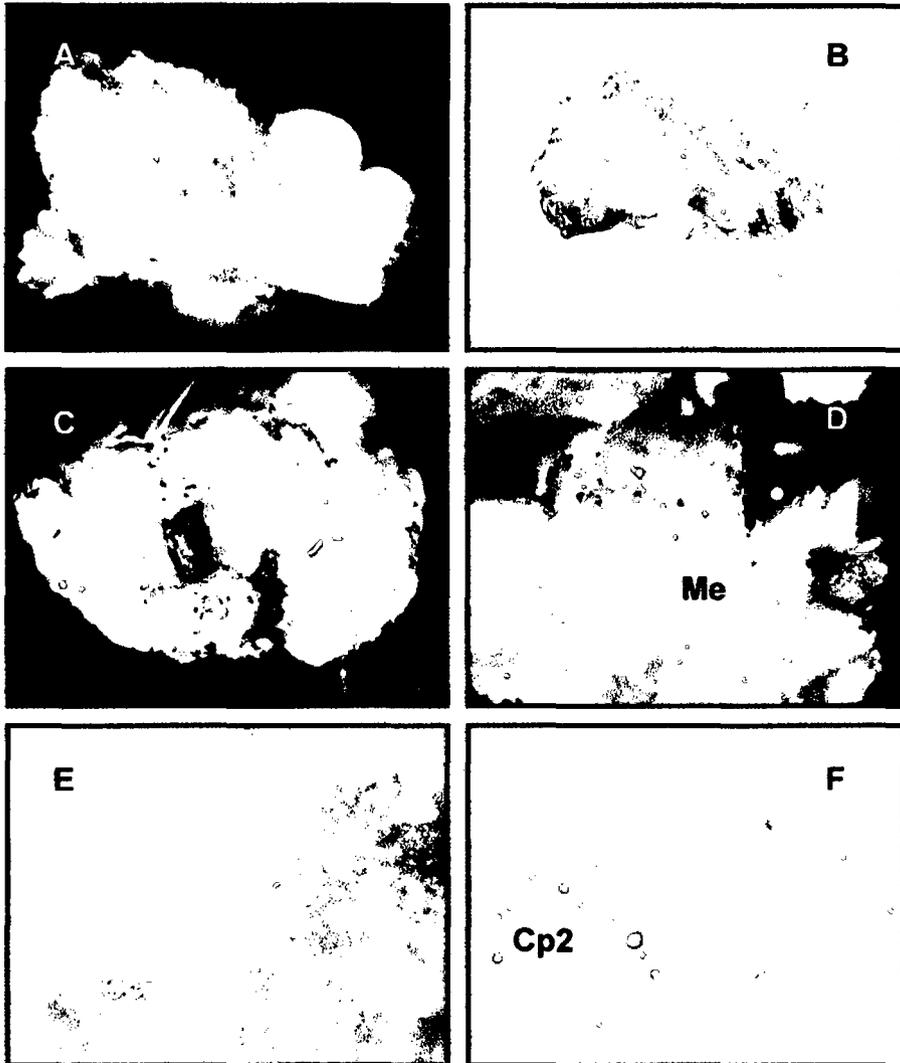


Figura N° 29. A-F: A (20X). Segmento de hoja inmadura con 07 días de inducción; B (10X). Segmento de hoja inmadura con 06 días de incubación en el (MCSC); C (20X). Segmento de hoja inmadura con 10 días de incubación en el (MCSC); D (20X). Callo compacto conteniendo nodos y meristemoides con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig. 29-B; E (50X). Callo compacto y disgregado con pequeños espacios embriogénicos con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig. 29-C; F (80X) Estructuras proembrionarias pigmentadas con 30 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig. 29-D. Me = meristemoide, Ccr = Callo cristalino delgado irregular, Cp2 = callo proembrionario pigmentado.

T-9: a₃b₃ (0.008 mg/l thidiazurón (TDZ), bajo 10 días de inducción)

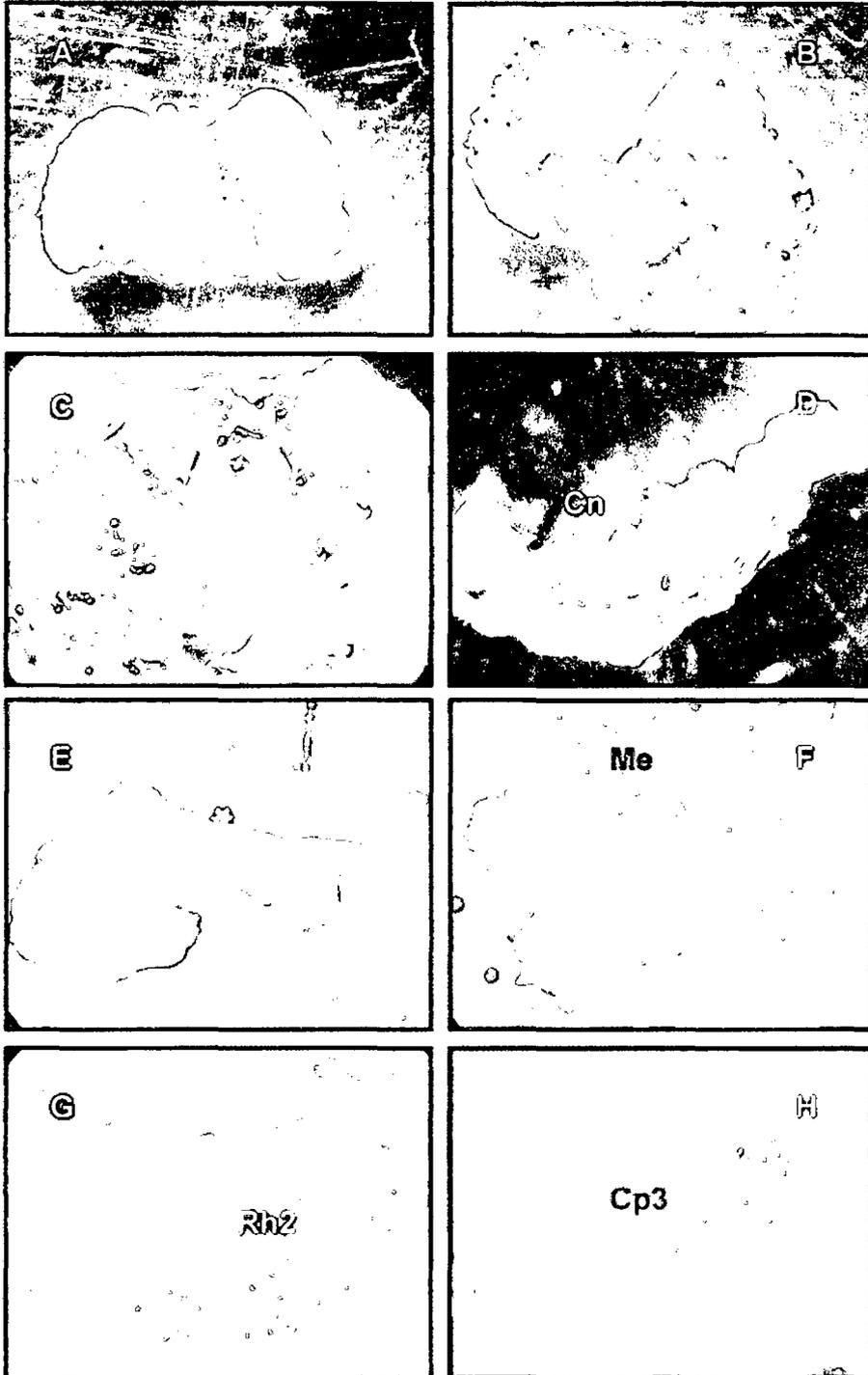


Figura Nº 30. A-H: A (20X). Segmento de hoja inmadura con 10 días de inducción; B y D (20X). Segmentos de hoja inmadura con 06 días de incubación en el (MCSC), con formación de nodos callosos; C y E (20X). Segmentos de hoja inmadura con 10 días de incubación en el (MCSC), callo compacto y crecimiento internerval necrotico; F (30X). Callo compacto conteniendo nodos y meristemoides con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig. 30-B, D; G (20X). Organogénesis directa (Rhizogénesis) con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig.30-F; H (80X) Estructuras proembrionarias oscuras con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig. 30-C, E. Cn = Callo nodoso Me = meristemoide, Rh2=rhizogénesis directa, Cp3 = callo proembrionario oscuro

T-10: a₄b₁ (0.010 mg/l thidiazurón (TDZ), bajo 05 días de inducción)

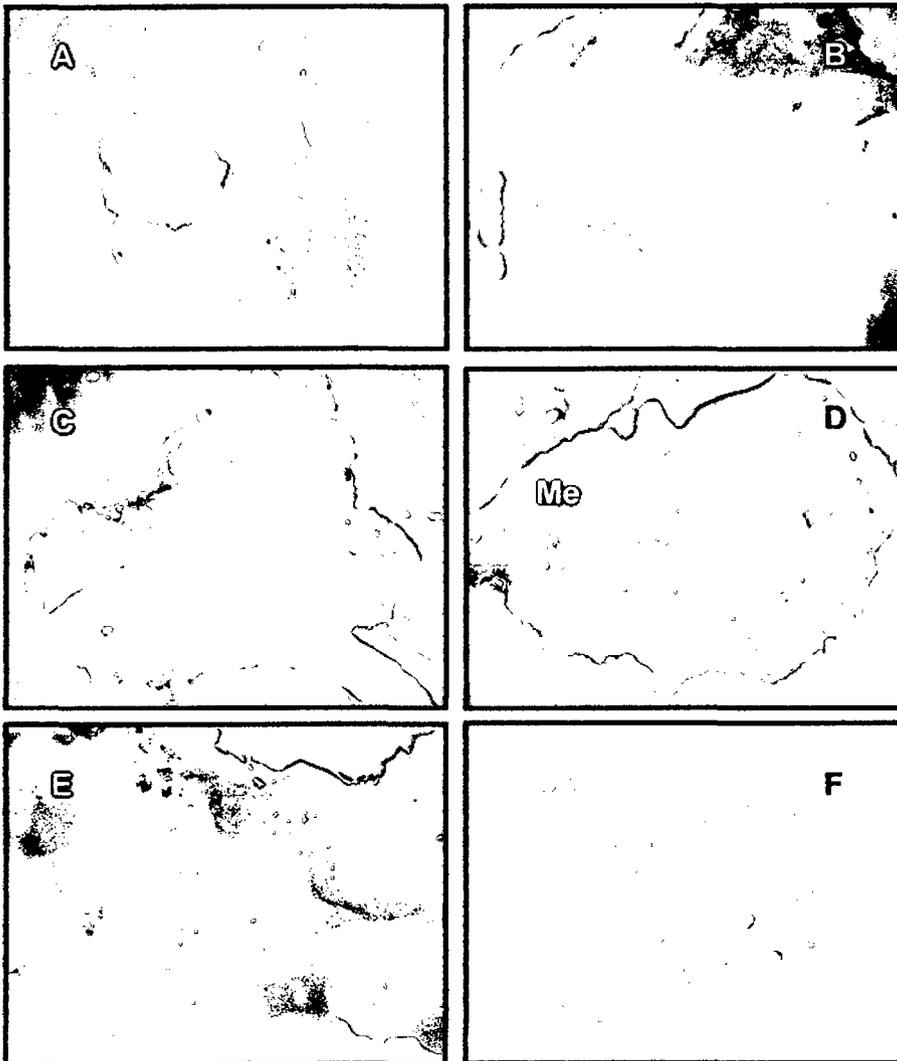


Figura N° 31. A-F: A (10X). Segmento de hoja inmadura con 05 días de inducción; B (20X). Segmentos de hoja inmadura con 06 días de incubación en el (MCSC); C (20X). Segmentos de hoja inmadura con 10 días de incubación en el (MCSC), D (20X). Callo conteniendo nodos y meristemoides con 20 días de incubado en el (MDE) provenientes de explantes de la Fig. 31-B; E (20X). Callo con meristemoides y regiones de callo embrionario con 20 de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig.31-B. F (60X): Estructuras pro-embriónicas con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig. 31-B.
Me = meristemoide, Cp2 = callo proembrionario pigmentado.

T-11: a₄b₂ (0.010 mg/l thidiazurón (TDZ), bajo 07 días de inducción)

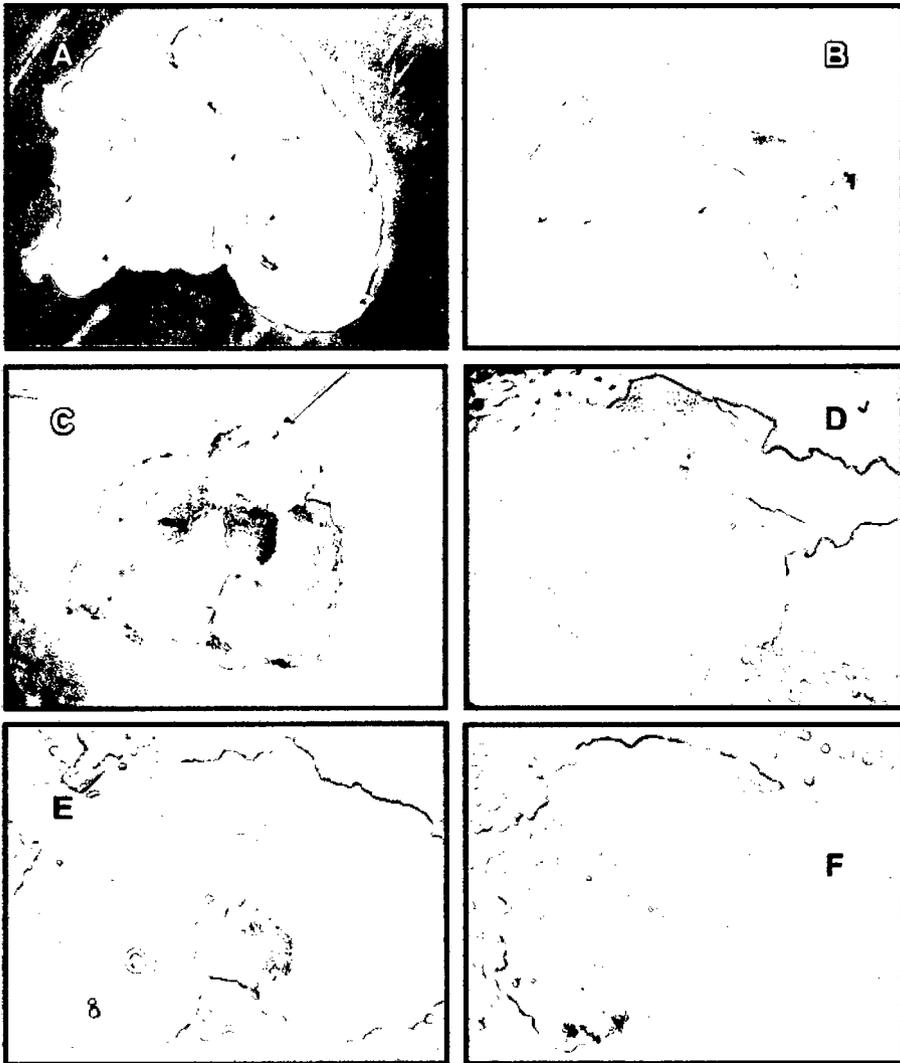


Figura N° 32. A-F: A (10X). Segmento de hoja inmadura con 07 días de inducción; B (10X). Segmentos de hoja inmadura con 06 días de incubación en el (MCSC); C (10X). Segmentos de hoja inmadura con 10 días de incubación en el (MCSC), D (20X). Callo compacto no embriogénico con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig. 32-B; E-F (20X). Presencia nodos callosos y regiones de callo embrionario con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig.32-C. Cn=Callo nodoso.

T-12: a₄b₃ (0.010 mg/l thidiazurón (TDZ), bajo 10 días de inducción)

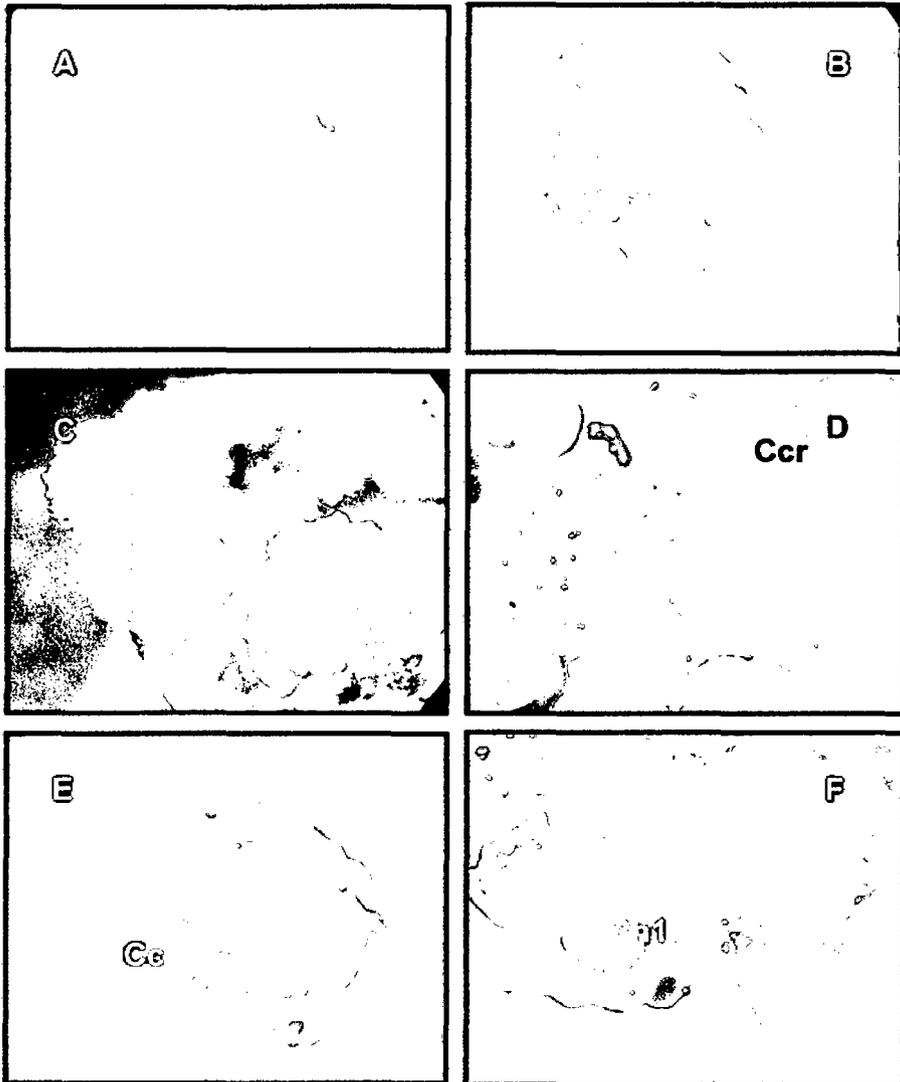


Figura N° 33. A-F: A (10X). Segmento de hoja inmadura con 10 días de inducción; B (20X). Segmentos de hoja inmadura con 06 días de incubación en el (MCSC); C (20X). Segmentos de hoja inmadura con 10 días de incubación en el (MCSC) con formación callosa compacta. D-E (20X). Callo compacto no embriogénico con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig. 33-B; F (20X). Callo compacto, acompañado de órganos diferenciados (rizogénesis) con 20 días de incubado en el (MDE) proveniente de explantes de la Fig.33-C. Cc = callo compacto cremoso, Rh1 = rizogénesis indirecta.

VI. DISCUSIÓN

6.1. Para el primer ensayo

6.1.1. Contaminación y quemado de hojas inmaduras

El estudio realizado en el ensayo N° 01, en los tratamientos T0, T1, T2, T3, T4 reporto un 97.50% de desinfección microbiana (Ver cuadro N° 06), garantizando un 99.46% al riesgo de no sufrir el quemado foliar (Ver cuadro N° 07), resultados consecuentes a los obtenidos por (Maglietti et al, 2006; Mroginski et al, 2005; Fontana et al, 2005), quienes obtuvieron resultados muy similares utilizando alcohol etílico al 70% y concentraciones de 0.83 a 1.0 % de hipoclorito de sodio en hojas inmaduras del genero *Arachis correntina*, *Arachis villosa*, *Arachis burkatii*.

Evitar la contaminación con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos, sino en su ulterior incubación y manipulación (Mroginski y Roca, 1991). Si la esterilización inicial de la superficie del explante es ineficiente, hongos, levaduras y bacterias pueden ser introducidas en el cultivo *in vitro* con el material vegetal (Leifert *et al.*, 1991). Es importante señalar que el procedimiento para la desinfección superficial de los explantes debe permitir eliminar los microorganismos procurando el menor daño posible para los explantes (Mroginski y Roca, 1991).

Con los resultados obtenidos y previamente comentados teóricamente; se logró cumplir con los requerimientos para considerar que el procedimiento

de desinfección para el establecimiento de cultivos asépticos en hojas inmaduras de sachá inchi resulte casi eficiente al 100%. Es posible que estos resultados se deban a que los explantes fueron tomados de plántulas criadas y monitoreadas fitosanitariamente a condiciones de laboratorio a través cámaras de cría.

6.1.2. Porcentaje de inducción de callos

Cuando se cultivaron secciones de hoja inmadura en M&S (1962) suplementado con las Vit DKW y 2.0 mg/l de 2,4-D conteniendo varias concentraciones de TDZ (desde 0.000 a 0.010 mg/l); según el cuadro N° 08, el tratamiento T4 logró un 80% de inducción callogénica a los 3 días de su establecimiento frente a un 0.0%, 0.0%, 11.11%, y 12.0% logrados por los tratamientos T0, T1, T2 y T3 respectivamente. Así mismo en el cuadro N° 09, los tratamientos T2 y T4 lograron un 100% de inducción callogénica a los 6 días de su establecimiento frente a un 62.50%, 40.0% y 12.50% logrados por los tratamientos T0, T1 y T3 respectivamente. Sin embargo a los nueve días de inducción en los tratamientos T0, T1, T2, T3 y T4, lograron un 100% de inducción callogénica, resultando ser el periodo máximo para la inducción. Los resultados obtenidos en los cuadros N° 08 y 09 en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 existe una inducción progresiva y competitiva (auxina-citoquinina), esto se debe a la existencia de fenómenos morfogénicos internos progresivos de multiplicación y diferenciación celular al interior de nervaduras y zonas específicas del área foliar de las hojas inmaduras de sachá inchi, fenómenos que se reafirman a los explicados por (George & Sherrington, 1984) sobre los efectos generales

de la interacción auxina-citocinina en la inducción del proceso morfogénico.

6.2. Para el segundo ensayo

6.2.1. Peso de callo fresco

El análisis de varianza para el peso de callo fresco en mg obtenidos en los tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11 y T12), obtuvieron una media de 34,6 mg, con un coeficiente de variabilidad de 8.01% y un coeficiente de determinación de 96,36% resultados que están dentro del rango de dispersión aceptable según Calzada (1982) lo que se demuestra la eficiencia en la conducción del trabajo. Según el cuadro N° 11, los resultados obtenidos por los tratamientos y sus interacciones resultan altamente significativos, debido al incremento de callo fresco en masa promedio incremental de 3.86 mg/día inducido con 0.010 mg/l de TDZ, 4.34 mg/día inducido con 0.008 mg/l de TDZ, 4.60 mg/día inducido con 0.005 mg/l de TDZ y 4.98 mg/día inducido con 0.000 mg/l de TDZ. (Ver los gráficos N° 06, 07, 08, 09).

Según el grafico N° 09, se reporta que el periodo de inducción mas adecuado con 0.000 mg/l se logra a los siete días, con 0.005 mg/l de TDZ se logra a los cinco días y el periodo de inducción mas adecuado con 0.008 y 0.010 mg/l de TDZ se logra a los 7 días, resultados que demuestra que a nivel de hojas inmaduras de sachá inchi durante su proceso de inducción se ve acompañado de un proceso de división y diferenciación

celular, procesos morfogenéticos que se reafirman a los explicados por (George & Sherrington, 1984) sobre el fenómeno (auxina-citoquinina).

Según el grafico N° 10, se reporta que el tratamiento (T3-a1b3) ha demostrado obtener el mayor peso de callo fresco en 59.50 mg, frente a los demás tratamientos puestos en estudio; seguido por el tratamiento (T2-a1b2) con 47.48 mg, Así mismo los tratamientos (T6-a2b3, T8-a3b2, T9-a3b3 y T12-a4b3) obtuvieron pesos de 38.25, 37.88, 41.85 y 40.55 mg respectivamente, existiendo una diferencia mínima significativa, por otra parte los tratamientos (T5-a2b2, T10-a4b1 Y T4-a2b1) obtuvieron pesos de 29.23, 28.13 y 29.10 mg respectivamente, reportándose una diferencia mínima significa entre tratamientos, no obstante los tratamientos (T1-a1b1 y T7-a3b1) obtuvieron pesos de 11.17 y 18.93 mg, ganancias de peso inferior a los demás tratamientos. Cabe mencionar que los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos puestos en estudio mantienen una estrecha relación en que, el incremento de peso de callo fresco evoluciona favorablemente conforme vaya pasando el tiempo de inducción.

6.2.2. Caracterización de la embriogénesis somática en los tratamientos puestos en estudio.

Una observación analítica para los doce tratamientos nos muestra que, el tratamiento T2 (Fig. N° 23, imagen F), tratamiento T4 (Fig. N° 25, imagen E), tratamiento T10 (Fig. 31, imagen F) con 6 días de de incubación en el (MCSC), y el tratamiento T9 (Fig. N° 30, imagen H) con 10 días de incubación en el (MCSC), y con respuestas durante 20 días de incubado en el (MDE) se observan regiones con estructuras globulares pre-embriónicas, unidades que anticipan la formación del primer estadio globular tal y como lo demuestra el tratamiento T4 (Fig. N° 25, imagen H) mantenido por 40 días de incubado en el (MDE). Resultados morfológicos muy consecuentes a lo que explica detalladamente (Radice, 1994), sobre los procesos morfogénicos de las células.

La conformación nodos callosos fue uno de las observaciones más importantes, como expresa el tratamiento T1 (Fig. N° 22, imagen D, F), tratamiento T5 (Fig. N° 26, Imagen E-F), tratamiento T9 (Fig. N° 30, imagen D), tratamiento T11 (Fig. N° 31, imagen E-F) esta expresión demuestra que el explante tiene una buena respuesta embriónica y son estructuras capaces de poder organizarse y formar embrioides como se muestra en la Fig. N° 22, imagen E, Fig. N° 23, imagen D, Fig. N° 26, imagen D, Fig. N° 29, imagen D, Fig. N° 31, imagen D y la capacidad de poder expresar una organogénesis indirecta considerándose para el estudio una rhizogénesis tal como se demuestra en la Fig. N° 25, imagen D; Fig. N° 26, imagen D; Fig N° 29, imagen D, Fig. N° 30, imagen F., estos

nodos callosos o complejos proembrionarios son estructuras que además de poder organizarse y expresar la organogénesis, tienen la capacidad de poder formar embroides dependiendo de la condición mas favorable para su cultivo, tal y como lo ha demostrado Hacıuss (1978), Raghavan (1976) y Tisserat et al., (1979).

6.2.3. Formas y tipos de callos

Una proporción de la callogénesis formada en el explante, es la presencia de callo no embriogénico, demostrado en una masa callosa compacta de color crema (tratamiento T2: Fig. N° 23, imagen E, tratamiento T7: Fig. N° 28, imagen D-F, tratamiento T11: Fig. N°. 31, imagen D-E), callo cristalino delgado e irregular (tratamiento T3: Fig. N° 24, imagen D, tratamiento T6: Fig. N° 27, imagen E-F, tratamiento T11: Fig. N° 31, imagen C-E, tratamiento T12: Fig. N° 32, imagen D, E), respuestas que se corroboran con lo describe e indica Chanatásig, 2004, cuando realiza la caracterización de callo en cacao (*Theobroma cacao* L.).

VII. CONCLUSIONES

- 7.1. Se ha logrado determinar una metodología para la introducción y el establecimiento de hojas inmaduras de sachá inchi a condiciones de cultivo in vitro.
- 7.2. Existe un alta respuesta de inducción de callos, en hojas inmaduras de sachá inchi utilizándose solo 2.0 mg/l de 2,4-D), contenidos en el medio de cultivo base.
- 7.3. El desarrollo del proceso embriogénico del tratamiento T4 [0.005 mg/l thidiazurón (TDZ), bajo 05 días de inducción], garantiza la formación de estructuras pre-embrionarias capaces de desarrollar los siguientes estadios embriogénicos del sachá inchi.
- 7.4. Uno de los factores mas importantes en el proceso crecimiento secundario de callos es el tiempo, resultando tener menores dificultades de división secundaria a un periodo de seis días.
- 7.5. La mejor respuesta a los procesos de inducción del callo, para el proceso de embriogénesis somática en hojas inmaduras de sachá inchi, esta dentro de 5-7 días.
- 7.6. Durante los procesos de la embriogénesis somática en hojas inmaduras de sachá inchi, se han identificado y caracterizado tres formas y tipos de callos (Callo compacto cremoso (Cc), Callo cristalino alargado e irregular (Ccr), callo embriogénico con estructuras pre-embrionarias (Cp).
- 7.7. El cultivo de hojas inmaduras bajo condiciones de oscuridad adquiere mayor respuesta de organogénesis indirecta mediante conformación de raíces (rhizogénesis), resultado que podria complementar la producción de metabolitos secundarios.

VIII. RECOMENDACIONES

- 8.1. Realizar un estudio sobre caracterización histológica de la embriogénesis somática en sachá inchi, con el fin de lograr los mejores entendimientos de los eventos morfológicos internos.

- 8.2. Para lograr continuar con el desarrollo embrionario en los pro-embroides globulares logrados en los tratamientos T4-a2b1, T2-a1b2, T9-a3b3 y T10-a4b1, se recomienda realizar un trabajo de investigación en cultivo de células en suspensión líquida.

IX. RESÚMEN

Con el propósito de desarrollar una metodología adecuada para la inducción de la embriogénesis somática *sacha inchi* (*Plukenetia volubilis* L.), se emplearon explantes de hoja inmadura de 25-26 mm, desinfectados por inmersión con alcohol etílico de 70° bajo tres segundos continuado por una desinfección con 0.5 % de NaOCl por un intermedio de diez minutos. Se evaluaron dos ensayos, el primero consistió en la evaluación de la sincronización del tiempo de inducción, utilizando 05 tratamientos con diferentes concentraciones de thidiazurón (0.000, 0.003, 0.005, 0.008, 0.010 mg/l), acompañado de un medio de cultivo base constituido por los compuestos minerales M&S (1962) suplementado con Vit DKW, 2.0 mg/l 2,4-D, 2.0 g/l phytigel; de igual manera para el segundo ensayo se evaluaron 12 tratamientos con diferentes combinaciones de dos factores [citoquinina (thidiazurón) -tiempos de inducción (días)]. Para el desarrollo del proceso de la embriogénesis somática y en particular para el segundo ensayo se utilizaron tres medios de cultivo, medio de inducción del callo embriogénico (MICE), Medio de crecimiento secundario de callos (MCSC) y un medio de desarrollo de embroides (MDE). Para el proceso de inducción del callo embriogénico del primer y el segundo ensayo los explantes fueron incubados en oscuridad, para el segundo ensayo el crecimiento secundario de callos se acondiciono a un periodo de oscuridad de 6 y 10 días respectivamente, para luego ser cultivados en el medio de cultivo MED por un lapso de 14 días en condiciones de oscuridad y luego sometidos a luz. El porcentaje de inducción de callos evaluado en todos los tratamientos del primer ensayo demuestra que a los 9 días de inducción existe un 100% de reactividad callogénica, el crecimiento de callo evaluado en todos los tratamientos del segundo ensayo demuestra que existe una ganancia de callo promedio en 3.86 a 4.99 mg/día, la aparición de estadios

globulares pro-embrionarios de sachá inchi se manifestaron los tratamientos T2, T4, T9 y T10, y la conformación del primer estadio embrionario (estadio globular) se manifestó en el tratamiento T4. Cabe mencionar que durante el desarrollo del proceso de embriogénesis somática se identificaron callos no embriogénicos de consistencia cremosa y cristalino delgado e irregular. La rizogénesis como producto de la organogénesis indirecta en las hojas inmaduras fue una de las más importantes observaciones en este trabajo de investigación.

X. ABSTRACT

With the objective of developing a suitable methodology for the sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) somatic embryogenic induction, explants of immature leaf of 25-26 mm were used, two studies were evaluated, the first one consisted of the evaluation of the synchronization of the induction time, using 05 treatments with different concentrations of thidiazurón (0.000, 0.003, 0.005, 0.008, 0.010 mg/l), with base culture media of the mineral compounds M&S (1962) supplemented with Vit DKW, 2.0 mg/l 2,4-D, 2.0 g/l phytigel; the same media for the second study 12 treatments with different combinations of two factors [citoquinina (thidiazurón) - times of induction] were evaluated. For the development of the somatic embryogenesis process and especially for the second study (MICE) three means of culture were used, media of induction of embryogenic callus, media of secondary growth of callus (MCSC) and a media of development of embryos (MDE). For the induction process of embryogenic callus of the first and second study, the explants were incubated in darkness, for the second study the secondary growth of callus the period of darkness was limited to 6 and 10 days respectively, to be cultivated afterwards in the culture media MED for a time of 14 days in darkness and then submitted to light. The percentage of induction of callus evaluated in all the treatments of the first study demonstrates that up to 9 days of induction 100 % of callogenic reactivity exists, the growth of callus evaluated in all the treatments of the second study demonstrates that a profit of average callus in 4.46 to 4.97 mg/day exists, the appearance of pro-embryonic globular stages of sachá inchi was confirmed in the T2, T4, T9 and T10, and the conformation of the first embryonic stage (globular stage) was confirmed in the T4. It is necessary to mention that during the development of the process of somatic not embryogenic callus of creamy and

crystalline thin irregular consistency were identified. The rhizogenesis as a product of the indirect organogenesis in the immature leaves was one of the most important observations of this investigation.



XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ammirato, P.V. 1983. Embryogenesis en: Handbook of Plant Cell Culture.
W.R. Sharp, D.A. Evans, P.V. Ammirato & Y. Yamada (eds). Vol. I.
Macmillan Publishing Co. New Cork. 83-123 pp.
2. Calzada, B. 1982. Métodos Estadísticos para la Investigación. Editorial
Milagros S.A. Lima-Perú. 644 p.
3. Chanatásig, I. 2004. Inducción de la Embriogénesis Somática en Clones
Superiores de Cacao (*Theobroma cacao* L.), con Resistencia a
Enfermedades Fungosas. M.Sc. Tesis. CATIE. Turrialba -Costa
Rica . 33-65 p.
4. Cheé, R.P. & Cantliffe, D.J. 1988. Somatic Embryony Patterns and Plant
Regeneration in *Ipomoea batatas* Poir. In Vitro Cell Dev. Biol 24:
955-958 pp.
5. Cheé, R.P. & Cantliffe, D.J. 1989. Composition of Embryogenic Suspensión
Cultures of *Ipomoea batatas* Poir. And Produnction of Individualized
Embryos. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 23: 923-925 pp.
6. Delgado, G.E. 1995. Cultura de Tecidos de Batata (*Ipomoea batatas* (L)
Lam.): Propagacao, Morphogenese e Veriacao Somaclonal. Ph.D.
Tese. IB/USP. 166 p.

7. Delgado, G. & Rojas C. 1999. Cultivo de Tejidos Vegetales. Fundamentos y Aplicaciones. Universidad Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque-Perú. 166-191, 221-254 p.
8. Evans, D.A., Sharp, W.R. & Flick, C.E. 1981. Growth and Behaviour of Cell Cultures: Embryogenesis and Organogenesis en: Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture. T.A. Thorpe (e.d). Academic Press. New York. 45-113 pp.
9. Fontana, M. Vidoz M. Rey, Hebe Y. Mroginski, L. 2006. Resumen A-006. Regeneración de Plantas por Cultivo in Vitro de *Arachis villosa* (Leguminosae). 1-2 p.
10. Galluser, E. 2004. Informe Preliminar. Caracterización e Identificación de Ecotipos del género *Plukenetia*. Tarapoto-Perú. 4 p.
11. George, E.F & Sherrington, P.D. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Part. 1. The Technology. Exegetics Ltd. 709 pp.
12. Guha, S. & Maheshwari, S.C. 1964. In Vitro Production of Embryos from Anthers of *Datura*. Nature 204:497.

13. Guerrero, J. 2006. Boletín Técnico. Investigaciones Realizadas en Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.), en la Región San Martín. Edit. UNSM-FCA. 1-20 p.
14. Hacias, B. 1978. Question of Unicellular Origin of Non-zygotic Embryos in Callus Cultures. *Phytomorphology* 28:74-81 pp.
15. Halperin, W., & Wetherell, D.F. 1965. Ammonium Requeriment for Embryogenesis in vitro. *Nature* 205:519-520 pp.
16. Halperin, W. 1966. Alternative Morphogenic Ebents in Cell Suspensions. *AMER. J. Bot.* 53:443-453 pp.
17. Handro, W., Roa, P.S. & Harada, H. 1973. A histological Study of the Depelopment of Buds, roots, and Embryos in Organ Cultures of *Petunia inflata* R. Fries. *Ann. Bot.* 37:817-821 pp.
18. Jones, L.H. 1974. Long-term Survival of Embryoids of Carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Sci. Lett.* 2:221-224 pp.
19. Krikorian, A. 1991. Medios de Cultivo. "Generalidades Composición y Formulación". Departament of Biochemistry of New York – EEUU. 42 p.

20. León, M. 1995. Conservación de Especies Peruanas de Orquídeas Utilizando Técnicas de Cultivo de Tejidos In Vitro. Universidad Nacional Agraria la Molina. Tesis. Lima-Perú. 45 p.
21. Lindsey, K. & Topping, J.F. 1993. Embryogenesis: a Question of Pattern. J. Exp.Bot. 259: 359-374 pp.
22. Linz, R.E & Conover, R.A. 1991. In Vitro Polyembryony in *Carica papaya* L. ovules. Z. Pflanzenphysiol. 104:185-188 pp.
23. Litz, R. & R. Jarret. 1991. Regeneración de Plantas en el Cultivo de Tejidos. "Embriogénesis Somática". Tropical Research and Educación Center. University of Florida – EEUU. 144 p.
24. Lu, C. & Vasil, I.K. 1981. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaf Tissues of *Panicum maximum* Jacq. Theor. Appl. Genet. 59:275-280 pp.
25. Maglietti, A. & Hebe Y. 2006. Resumen A-028. Organogénesis in vitro a partir de explantes de hoja de *Arachis burkartii*. 1-4 pp.
26. Mc-Bride, J. F. 1951. Eufhorbiaceae In Flora of Perú. Botanical Series. Vol. 13, Part. III. Field Museum History. 115-118 pp.

27. Mroginski, E. Rey. Hebe Y. Mroginski, L. 2006. Resúmen A-036. Obtención de Plantas a Partir del Cultivo *in vitro* de Explantes Foliares de *Arachis correntina* (Leguminosae). 1-4 pp.
28. Nitsch, J.P. 1969. Experimental Androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology* 19: 389-404 pp.
29. Radice, S. 1994. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Morfogénesis In Vitro. Cap II. 1-4p.
30. Raghavan, V. 1976. Experimental Embryogenesis in Vascular Plants. Academic Press. New Cork. 12: 23-50 pp.
31. Reinert, J. 1958. Morphogenese und Ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Karotten. *Naturwissenschaften* 45: 344-345 pp.
32. Reinert, J. 1959. Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Advientive Embryonen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta* 58:318-333 pp.
33. Roca, W y L. Mroginski 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. 499 - 553 –554 p.

34. Sharp, W. R., Sondahl, M. R. Caldas, L. S. & Maraffa, S. B. 1980. The Physiology of in Vitro Asexual Embryogenesis. *Hortic. Rev.* 2: 268-310 pp.
35. Schiavione, G. & Cooke, R. 1985. Genotypic Effects on Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Callus Cultures of alfalfa. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 8:73-81 pp.
36. Sommer, H.E., Brown, C.L. & Kormanik, P.P. 1975. Differentiation of Plantlets in Long-Leaf pine (*Pinus palustris* Mill.) Tissue Cultured In Vitro. *Bot. Gaz.* 136:196-200 pp.
37. Steward, F.C., Mapes, M.O. & Smith, J. 1958. Growth and Organized Development of Cultured Calls. I. Growth and Division of Freely Suspended Cells. *Amer. J. Bot.* 45:705-708 pp.
38. Steeves, T.A. & Sussex, I.M. 1989. *Patterns in Plant Development*. 2da ed. Cambridge: Cambridge University Press 26-35 pp.
39. Tisserat, B., Esan, E. & Murashigue, T. 1979. Somatic Embryogenesis in Angiosperms. *Hort. Rev.* 1: 1-78 pp.
40. Valles, R. 1991. Potencial agroalimentario Industrial del "Sacha Inchi" para la selva alta. P.O. Box. 239. 1-8 p.

41. Vasil, I.K. & Hildebrandt, A.C. 1966. Variations of Morphogenetic Behavior in Plant Tissue Cultures. II. *Pstroselinum hortense*. Am. J. Bot. 53:869-874 pp.
42. Zhijian Li, Abdoulaye Traore, SIELA Maximota. And Mark J. Gultinan. 1998. Somatic Embriogenesis and Plant Regeneration from Floral Explants of Cacao (*Theobroma cacao* L.) Using Thidiazuron. Pennsylvania. Edición P. Ozias-Akins. 1-7 pp.

ANEXOS

Anexo N° 01. Composición del medio de cultivo para el proceso de la callogénesis

ITEM	CONSTITUYENTES (SALES MACRO- Y MICRO- NUTRIENTES)	□ mg/l
01	Nitrato de Amonio NH_4NO_3	1650.000
02	Nitrato de Potasio KNO_3	1900.000
03	Cloruro de Calcio $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.000
04	Sulfato de Magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.000
05	Fosfato de Potasio KH_2PO_4	170.000
06	Sulfato de Manganeso $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	16.000
07	Sulfato de Zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.600
08	Ácido Bórico H_3BO_3	6.200
09	Ioduro de Potasio KI	0.830
10	Ac. Molibdico $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250
11	Cloruro de Cobalto $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
	HIERRO:	
12	Sulfato Ferroso $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.800
13	Agente Quelante Na_2 . EDTA	37.300
	VITAMINAS DKW	
14	Ácido Nicotínico	1.000
15	Piridoxina-HCl	0.500
16	Tiamina-HCl	2.000
17	Glicina	2.000
18	Mio-Inositol	200.000
	AZUCARES	
19	Glucosa	20000.000
	HORMONAS	
20	2,4-D	2.000
21	TDZ (Diferentes concentraciones distribuidos para los tratamientos)	
	T0	0.000
	T1	0.003
	T2	0.005
	T3	0.008
	T4	0.010
22	Phytigel	2500.000
23	pH: 5.75	

Tomado de León, 1995 & Zhijian et al., 1998.

Anexo N°. 02. Procedimiento sugerido por George (1992), para el anexo N° 01

PASOS	ACTIVIDAD	ITEM (Formulación)
1	Rotular los tubos de prueba de 25x150 mm	
2	Agregar 650 mL de agua destilada	
3	Agregar Glucosa 20.0 g	19
4	Agregar Compuestos Macro-	1,2,3,12,13
5	Agregar Compuestos Micro-	4,5,6,7,8,9,10,11
6	Agregar Vitaminas:	
	Ácido Nicotínico	14
	Piridoxina – HCl	15
	Tiamina – HCl	16
	Glicina	17
	Mio – Inositol	18
7	Agregar Hormonas (2,4-D y TDZ):	15,16
	2,4-D	20
8	Enraizar a: 1000.00 mL con agua destilada	
9	Separar en: 5 partes de 198 ml de medio cultivo base	
10	Agregar: TDZ las concentraciones indicadas en el cuadro N° 03	21
11	Enraizar a: 200.00 mL con el medio de cultivo base restante para cada tratamiento	
12	Medir: pH: 5.7 – 5.8 como rangos	23
13	Agregar: Phytigel 0.5 g por tratamiento	22
14	Calentar el medio en microondas hasta disolver el phytigel	
15	Dispensar el medio en los tubos de prueba 15 ml por cada tubo de prueba	
16	Esterilizar a 15 lbs por 20 minutos	
17	Dejar enfriar en cámara de incubación	

Anexo N° 03. Medio de cultivo 01: Inducción del callo embriogénico (MICE)

ITEM	CONSTITUYENTES (SALES MACRO- Y MICRO- NUTRIENTES)	[mg/l
01	Nitrato de Amonio NH_4NO_3	1650.000
02	Nitrato de Potasio KNO_3	1900.000
03	Cloruro de Calcio $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.000
04	Sulfato de Magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.000
05	Fosfato de Potasio KH_2PO_4	170.000
06	Sulfato de Manganeso $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	16.000
07	Sulfato de Zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.600
08	Ácido Bórico H_3BO_3	6.200
09	Ioduro de Potasio KI	0.830
10	Ac. Molibdicco $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250
11	Cloruro de Cobalto $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
	HIERRO:	
12	Sulfato Ferroso $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.800
13	Agente Quelante Na_2 . EDTA	37.300
	VITAMINAS DKW	
14	Glutamina	250.000
15	Ácido Nicotínico	1.000
16	Piridoxina-HCl	0.500
17	Tiamina-HCl	2.000
18	Glicina	2.000
19	Mio-Inositol	200.000
	AZUCARES	
20	Glucosa	20000.000
	HORMONAS	
21	2,4-D	2.000
22	TDZ (Diferentes concentraciones distribuidos en el cuadro N° 02)	
23	Phytigel	2000.000
24	pH: 5.75	

Tomado de León, 1995 & Zhijian et al., 1998.

Anexo N°. 04. Procedimiento sugerido por George (1992), para el anexo N° 03

PASOS	ACTIVIDAD	ITEM (Formulación)
1	Rotular los frascos de 7 onz.	
2	Agregar 650 mL de agua destilada	
3	Agregar Glucosa 20.0 g	20
4	Agregar Compuestos Macro-	1,2,3,12,13
5	Agregar Compuestos Micro-	4,5,6,7,8,9,10,11
6	Agregar Vitaminas:	
	Glutamina	14
	Ácido Nicotínico	15
	Piridoxina – HCl	16
	Tiamina – HCl	17
	Glicina	18
	Mio – Inositol	19
7	Agregar Hormonas (2,4-D y TDZ):	15,16
	2,4-D	21
8	Enraizar a: 1000.00 mL con agua destilada	
9	Separar en: 4 partes de 198 ml de medio cultivo base	
10	Agregar: TDZ las concentraciones indicadas en el cuadro N° 03	22
11	Enraizar a: 250.00 mL con el medio de cultivo base restante para cada tratamiento	
12	Medir: pH: 5.7 – 5.8 como rangos	24
13	Agregar: Phytigel 0.5 g por tratamiento	23
14	Calentar el medio en microondas hasta disolver el phytigel	
15	Dispensar el medio en los frascos de 7 onz. 15 ml por cada frasco.	
16	Esterilizar a 15 lbs por 15 minutos	
17	Dejar enfriar en cámara de incubación	

Anexo N° 05. Medio de cultivo 02: Crecimiento secundario de callos (MCSC)

ITEM	CONSTITUYENTES (SALES MACRO- Y MICRO- NUTRIENTES)	□ mg/l
01	Nitrato de Amonio NH_4NO_3	1650.000
02	Nitrato de Potasio KNO_3	1900.000
03	Cloruro de Calcio $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.000
04	Sulfato de Magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.000
05	Fosfato de Potasio KH_2PO_4	170.000
06	Sulfato de Manganeso $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	16.000
07	Sulfato de Zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.600
08	Ácido Bórico H_3BO_3	6.200
09	Ioduro de Potasio KI	0.830
10	Ac. Molibdico $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250
11	Cloruro de Cobalto $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
	HIERRO:	
12	Sulfato Ferroso $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.800
13	Agente Quelante Na_2 . EDTA	37.300
	VITAMINAS GAMBORG (1996)	
14	Myo-inositol	100.000
15	Ácido Nicotínico	0.500
16	Piridoxina-HCl	0.500
17	Tiamina-HCl	0.500
18	Pantotenato de Ca	0.400
19	Biotina	0.00025
20	Ácido Ascórbico	0.400
	AZUCARES Y COMPUESTOS ORGANICOS	
21	Glucosa	20000.000
22	Agua de Coco	50.000 ml
	HORMONAS	
23	2,4-D	2.000
24	Kinetina	0.140.
25	Phytigel	2200.000
26	pH: 5.78	

Tomado de León, 1995 & Zhijian et al., 1998.

Anexo N°. 06. Procedimiento sugerido por George (1992) para el anexo N° 05

PASOS	ACTIVIDAD	ITEM (Formulación)
1	Rotular los frascos de 7 onz.	
2	Agregar 650 mL de agua destilada	
3	Agregar Glucosa 20.0 g	21
4	Agregar Compuestos Macro-	1,2,3,12,13
5	Agregar Compuestos Micro-	4,5,6,7,8,9,10,11
6	Agregar Vitaminas:	
	Myo-inositol	14
	Ácido Nicotínico	15
	Piridoxina-HCl	16
	Tiamina-HCl	17
	Pantotenato de Ca	18
	Biotina	19
	Ácido Ascórbico	20
7	Agregar Hormonas (2,4-D y KIN):	15,16
	2,4-D	23
	KIN	24
8	Agregar 50 ml de agua de coco	22
9	Enrazar a: 1000.00 mL con agua destilada	
10	Medir: pH: 5.7 – 5.8 como rangos	23
11	Agregar: Phytigel	25
12	Calentar el medio en microondas hasta disolver el phytigel	
13	Dispensar el medio en los frascos de 7 onz. 20 ml por cada frasco.	
14	Esterilizar a 15 lbs por 15 minutos	
15	Dejar enfriar en cámara de incubación	

Anexo N° 07. Medio de cultivo 03: Desarrollo de embrioides (MDE)

ITEM	CONSTITUYENTES (SALES MACRO- Y MICRO- NUTRIENTES)	□ mg/l
01	Nitrato de Amonio NH_4NO_3	1650.000
02	Nitrato de Potasio KNO_3	1900.000
03	Cloruro de Calcio $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.000
04	Sulfato de Magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.000
05	Fosfato de Potasio KH_2PO_4	170.000
06	Sulfato de Manganeso $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	16.000
07	Sulfato de Zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.600
08	Ácido Bórico H_3BO_3	6.200
09	Ioduro de Potasio KI	0.830
10	Ac. Molibdico $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250
11	Cloruro de Cobalto $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
	HIERRO:	
12	Sulfato Ferroso $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.800
13	Agente Quelante Na_2 . EDTA	37.300
	VITAMINAS	
14	Ácido Nicotínico	250.000
15	Tiamina – HCl	1.000
16	Glicina	2.000
17	Mio – Inositol	100.000
	AZUCARES Y COMPUESTOS ORGANICOS	
18	Glucosa	1000.000
19	Sacarosa	30000.000
20	Carbón Activado	4000.000
21	Phytigel	2500.000
22	pH: 5.76	

Tomado de León, 1995 & Zhijian et al., 1998.

Anexo N° 08. Procedimiento sugerido por George (1992), para el Anexo N° 07

PASOS	ACTIVIDAD	ITEM (Formulación)
1	Rotular los frascos de 7 onz.	
2	Agregar 650 mL de agua destilada	
3	Agregar Glucosa 1.0 g	18
4	Agregar Sacarosa 30.0 g	19
4	Agregar Compuestos Macro-	1,2,3,12,13
5	Agregar Compuestos Micro-	4,5,6,7,8,9,10,11
6	Agregar Vitaminas:	
	Ácido Nicotínico	14
	Tiamina – HCl	15
	Glicina	16
	Mio – Inositol	17
	Agregar: Carbón Activado	20
8	Enraizar a: 1000.00 mL con agua destilada	
12	Medir: pH: 5.7 – 5.8 como rangos	22
13	Agregar: Phytigel	21
14	Calentar el medio en microondas hasta disolver el phytigel	
15	Dispensar el medio en los frascos de 7 onz. 20 ml por cada frasco.	
16	Esterilizar a 15 lbs por 15 minutos	
17	Dejar enfriar en cámara de incubación	

Anexo 09: Características agronómicas e industriales de la accesión**PER000416.****Procedencia:**

Material silvestre colectado en el Departamento y Provincia de San Martín, Distrito de Chazuta.

Características destacables de la accesión:

Habito de crecimiento	:	Trepador
Diámetro de cápsula	:	4.43 cm.
Diámetro de semilla	:	1.99 cm.
% de cáscara	:	49.67
% de semilla	:	50.33
Peso de 100 semillas	:	100.02 g.
Nº de cosechas/año	:	20-23
Susceptibilidad a <i>Meloidogyne incognita</i>	:	Intermedia a alta
Susceptibilidad al stress hídrico	:	Mediamente tolerante
Rendimiento al 1er año (Kg/Ha/Año)		
	Año 2003	: 4 186,85
	Año 2005-2006	: 2 070,74
% de aceite	.	51.51

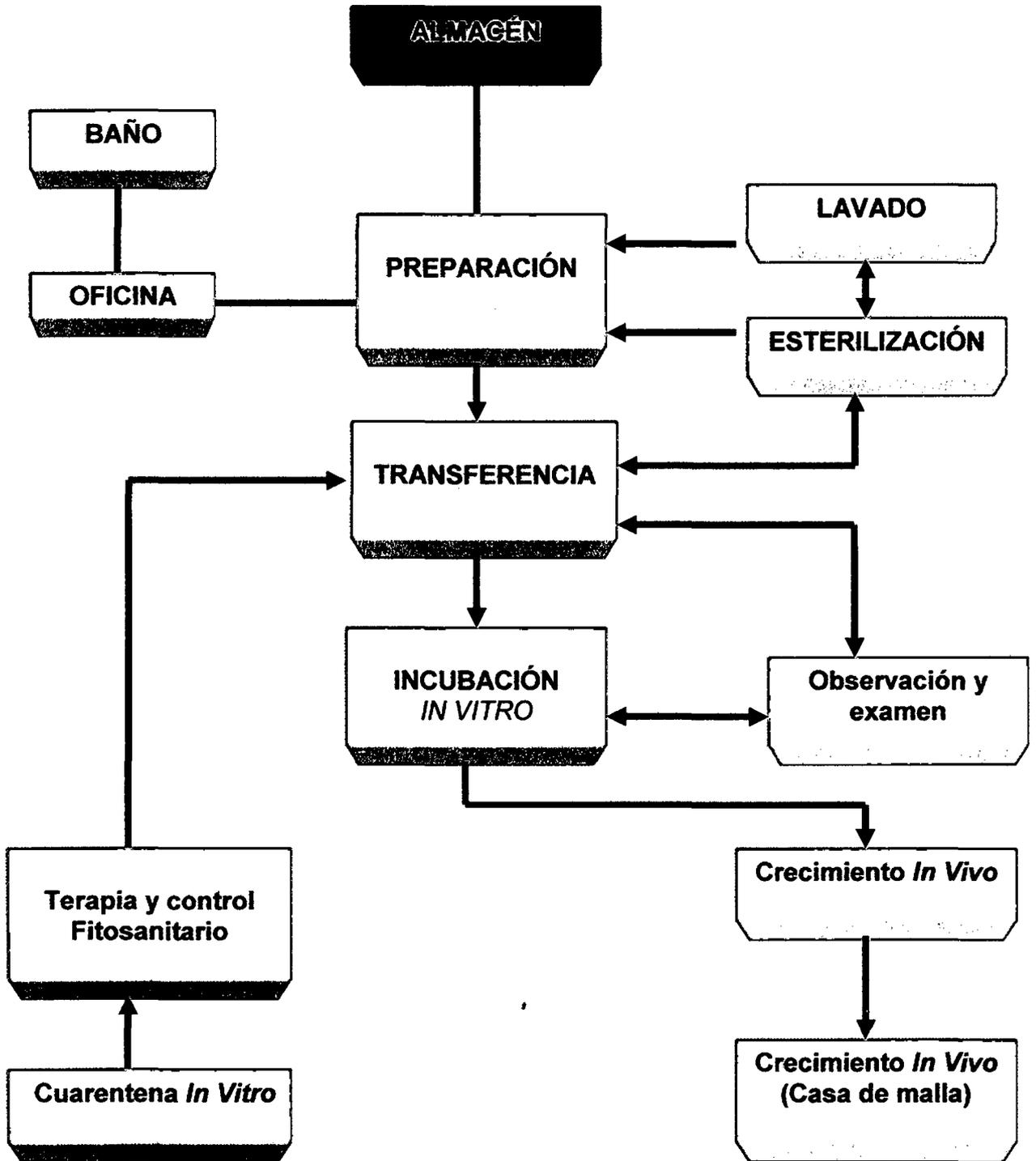
Fuente: Sub-Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología – E.E. INIA “El Porvenir”-Juan Guerra 2007

TERMINOLOGÍAS

- **Antioxidante.-** Compuesto químico que permite la captación de fenoles y polifenoles.
- **Ápice.-** Tejido meristemático que ocupa la parte terminal del tronco, raíces y ramas.
- **Apomixis.-** Producción de descendientes en las estructuras sexuales habituales, sin mezcla y segregación de cromosomas.
- **Callogénesis.-** Proceso fisiológico que da origen a la formación de callos en una forma desordenada.
- **Callo.-** Estructura somática no diferenciada.
- **Clon.-** Célula que posee carga genética idéntica a la célula madre.
- **Embriogénesis somática.-** Técnica de multiplicación clonal, que permite obtener embriones cigóticos sin tener que pasarse por la reproducción sexual.
- **Embrioides.-** Célula de óptimo desarrollo que permite la expresión de la totipotencialidad mediante la generación de un individuo.
- **Embrión.-** Planta esporofítica joven, que se encuentra retenida en el gametofito o en la semilla.
- **Explante.-** Porción de tejido vegetal adquirido de cualquier parte de una planta.
- **Medio de cultivo.-** Compuesto enriquecido en sales macro y micro, en adición de vitaminas, hormonas, antioxidantes proveen los requerimientos nutricionales para su desarrollo.
- **Organogénesis.-** Evento fisiológico que permite la generación de órganos a partir de un tejido.

- **Protocolo.-** Procedimiento sincronizado y ordenado de técnicas *In Vitro* para lograrse un objetivo.
- **Regeneración.-** Capacidad que expresan las células a la formación de nuevos individuos.
- **Regeneración directa.-** Ruta de la Embriogénesis somática que permite obtenerse nuevos individuos a partir de tejidos.
- **Regeneración indirecta.-** Una de las rutas de la Embriogénesis somática que permite la obtención de nuevos individuos a partir de la formación de callos.
- **Somático.-** Células diploides de los organismos.
- **Totipotencialidad.-** Capacidad de regeneración de una célula.
- **Lejía comercial.-** Solución desinfectante que contiene diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio.

Diagrama de flujo: ESTABLECIMIENTO DE UN LABORATORIO DE TEJIDOS VEGETALES



Diferentes áreas de un laboratorio de tejidos - Tomado de Roca 1991