

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE
PLANTAS**



**MORFOGÉNESIS *IN VITRO* DE SACHA INCHI
(*Plukenetia volubilis* L.)**

**Presentada por:
REYNALDO SOLIS LEYVA**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE
PLANTAS**

**Lima - Perú
2016**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE
PLANTAS**

**“MORFOGÉNESIS *IN VITRO* DE SACHA INCHI
(*Plukenetia volubilis* L.)”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

REYNALDO SOLIS LEYVA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dr. Alberto Julca Otiniano
PRESIDENTE

Mg.Sc. María de Lourdes Tapia y Figueroa
PATROCINADORA

Dr. Raúl Blas Sevillano
MIEMBRO

Dr. Gilberto Domínguez Torrejón
MIEMBRO

A mi madre Justina, por su gran amor.

A mis hermanos: Lauro, Virginia, Hilda, Luz, Andrea, Remigio y Fernando; por el
inmenso amor fraternal que nos une.

AGRADECIMIENTO

A la profesora María de Lourdes Tapia y Figueroa, patrocinadora del presente trabajo de investigación.

Al ingeniero Danter Cachique Huansi, por la oportunidad de realizar el presente trabajo de investigación en el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana.

A los ingenieros María Emilia Ruiz Sánchez, Juan Carlos Guerrero Abad y Henry Ruiz Solsol, por compartir sus conocimientos.

A mis compañeros de trabajo: Georgette, Jhon, Wilmar, Roger, Ximena y Guinaldo, por su apoyo constante en el desarrollo del trabajo.

A los miembros del jurado por su paciencia y gran apoyo en la revisión de la tesis.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Generalidades del cultivo	4
2.1.1. Origen y distribución.....	4
2.1.2. Clasificación taxonómica.....	4
2.1.3. Morfología de la planta.....	5
2.1.4. Ecología.....	5
2.1.5. Propagación.....	6
2.2. Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.....	6
2.2.1. Aspectos generales.....	6
2.2.2. Métodos de propagación <i>in vitro</i>	7
2.2.2.1. Organogénesis.....	7
2.2.2.2. Embriogénesis somática.....	9
2.3. Antecedentes del cultivo <i>in vitro</i> en <i>Plukenetia volubilis</i>	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Organogénesis.....	16
3.1.1. Material biológico.....	16
3.1.2. Desinfección.....	17
3.1.3. Establecimiento <i>in vitro</i>	18
3.1.4. Multiplicación.....	18
3.1.5. Enraizamiento.....	19
3.2. Embriogénesis somática.....	20
3.2.1. Material biológico.....	20
3.2.2. Preparación del material biológico.....	20
3.2.3. Desinfección.....	21
3.2.4. Inducción de la embriogénesis somática.....	22
3.2.5. Formación de embriones somáticos.....	23
3.2.6. Maduración de embriones somáticos.....	23
3.3. Análisis estadístico.....	25

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1. Organogénesis.....	26
4.1.1. Desinfección.....	26
4.1.2. Establecimiento <i>in vitro</i>	27
4.1.3. Multiplicación.....	29
4.1.4. Enraizamiento.....	34
4.2. Embriogénesis somática.....	38
4.2.1. Desinfección.....	38
4.2.2. Inducción de la embriogénesis somática.....	39
4.2.3. Formación de embriones somáticos.....	43
4.2.4. Maduración de embriones somáticos.....	44
V. CONCLUSIONES	47
VI. RECOMENDACIONES	48
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Niveles de concentración hormonal (BAP y ANA) empleadas en la introducción <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de sachá inchi	18
Tabla 2:	Niveles de concentración hormonal (BAP y ANA) empleadas en la multiplicación <i>in vitro</i> de sachá inchi	19
Tabla 3:	Niveles de concentración hormonal (kinetina y ANA) empleadas en la multiplicación <i>in vitro</i> de sachá inchi	19
Tabla 4:	Niveles de concentración hormonal (ANA e IBA) empleadas en el enraizamiento <i>in vitro</i> de sachá inchi	20
Tabla 5:	Niveles de concentración hormonal (2,4-D y thidiazurón) empleadas en la inducción de la embriogénesis somática de sachá inchi	23
Tabla 6:	Niveles de concentración de maltosa y ABA empleadas en la maduración de embriones somáticos de sachá inchi	24
Tabla 7:	Influencia de diferentes concentraciones de BAP y ANA en el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices de sachá inchi	28

Tabla 8:	Influencia de diferentes concentraciones de BAP y ANA en la multiplicación <i>in vitro</i> de brotes de sachá inchi	30
Tabla 9:	Influencia de diferentes concentraciones de kinetina y ANA en la multiplicación <i>in vitro</i> de brotes de sachá inchi	30
Tabla 10:	Influencia de diferentes concentraciones de ANA y AIB en el enraizamiento <i>in vitro</i> de brotes de sachá inchi	36
Tabla 11:	Número de embriones somáticos globulares en callos de sachá inchi a los 35 días de cultivo en el medio de cultivo MDE	44
Tabla 12:	Influencia de diferentes concentraciones de maltosa y ABA en el desarrollo de embriones somáticos y plántulas regeneradas de sachá inchi	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Plantas de sachá inchi germinadas en invernadero	16
Figura 2:	Ápice meristemático de sachá inchi sembrado en medio de cultivo MS	17
Figura 3:	Granos de sachá inchi	21
Figura 4:	Embriones cigóticos de sachá inchi	22
Figura 5:	Propagación de callos embriogénicos para la regeneración de plántulas	24
Figura 6:	Efecto de diferentes tratamientos de desinfección en la introducción <i>in vitro</i> de ápices meristemáticos de sachá inchi	26
Figura 7:	Plántulas de sachá inchi obtenidas a partir de ápices meristemáticos en el medio de cultivo de establecimiento T9	29
Figura 8:	Plántulas de sachá inchi obtenidas en el medio de cultivo de multiplicación T3, que contiene BAP como fuente de citoquinina ...	31
Figura 9:	Plántulas de sachá inchi obtenidas en el medio de cultivo de multiplicación T9, que contiene BAP como fuente de citoquinina	32
Figura 10:	Plántulas de sachá inchi obtenidas en el medio de cultivo de multiplicación T3, que contiene kinetina como fuente de citoquinina	33

Figura 11:	Evaluación de diferentes concentraciones de ANA y AIB en el porcentaje de enraizamiento de brotes de sachá inchi	37
Figura 12:	Plántulas de sachá inchi con 35 días en el medio de cultivo de enraizamiento	37
Figura 13:	Plántulas de sachá inchi con 70 días en el medio de cultivo de enraizamiento	38
Figura 14:	Evaluación de diferentes tratamientos de desinfección en la introducción <i>in vitro</i> de embriones cigóticos de sachá inchi	39
Figura 15:	Estados de desarrollo de callo en los explantes: E0 (Ausencia de callos), E1 (Inicio de pequeñas formaciones de callo), E2 (El callo más de la mitad del explante) y E3 (El callo cubre por completo el explante).....	41
Figura 16:	Porcentaje de inducción de los distintos estados de desarrollo de callos en embriones cigóticos de sachá inchi	41
Figura 17:	Sub cultivo de callos procedentes de embriones cigóticos inmaduros en el medio de cultivo MCSC	42
Figura 18:	Embriones somáticos globulares en el medio de cultivo MDE obtenidos en callos procedentes de hojas inmaduras de sachá inchi ...	43
Figura 19:	Embriones somáticos en estadio acorazonado en T8, 9 semanas después de la siembra en el medio de cultivo MMES	45
Figura 20:	Plántula regenerada en T8, 15 semanas después de la siembra en el medio de cultivo MMES	45
Figura 21:	Plántulas regeneradas en T4, 15 semanas después de la siembra en el medio de cultivo MMES	46

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1:	Análisis de varianza para la fase de establecimiento: Altura de plántula (mm) y número de brotes	55
ANEXO 2:	Análisis de varianza para la fase de multiplicación empleando BAP como fuente de citoquinina: Altura de plántula (mm), número de brotes y número de nudos por brote	56

ANEXO 3:	Análisis de varianza para la fase de multiplicación empleando kinetina como fuente de citoquinina: Altura de plántula (mm), número de brotes y número de nudos por brote	57
ANEXO 4:	Análisis de varianza para la fase de enraizamiento: número de raíces y longitud de raíces (mm)	58
ANEXO 5:	Análisis de varianza para número de estructuras embrionarias globulares en callos de sachá inchi obtenidos a partir de hojas inmaduras y embriones cigóticos	59
ANEXO 6:	Análisis de varianza para número de estructuras embrionarias acorazonadas en fase de maduración de embriones somáticos	60

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar metodologías de propagación *in vitro* de sachá inchi a través de organogénesis y embriogénesis somática. En las pruebas sobre organogénesis, el medio MS suplementado con 0,1 mg/L de BAP y 0,05 mg/L de ANA permitió obtener 1,4 brotes de 14,55 mm por cada ápice meristemático introducido. La mejor multiplicación se logró empleando el medio MS suplementado con 0,1 mg/L de BAP y 0,25 mg/L de ANA, que permitió obtener un coeficiente de multiplicación de 2,25 y brotes de 18,35 mm con 2,35 segmentos nodales. El mayor porcentaje de enraizamiento (73,33 %) se obtuvo empleando el medio MS suplementado con 0,5 mg/L de ANA y 2 mg/L de AIB. En las pruebas sobre embriogénesis somática, la combinación de las sales MS, vitaminas Gamborg, agua de coco, 4 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de thidiazurón generó 87,5 % de inducción callogénica a partir de embriones cigóticos. Para la formación de embriones somáticos, se sembraron callos obtenidos a partir de embriones cigóticos y hojas inmaduras en un medio MS modificado. Los callos procedentes de las hojas inmaduras presentaron en promedio 7 embriones somáticos globulares por explante. El tratamiento con el medio MS modificado, suplementado con 90 g/L de maltosa y 0,1 mg/L de ABA permitió la formación de 1,5 embriones somáticos en estadio corazonado y regeneración de 0,5 plantas por explante. En conclusión los resultados muestran que el sachá inchi tiene mejor respuesta a la propagación *in vitro* a través de la organogénesis.

Palabras claves: sachá inchi, organogénesis, embriogénesis somática, ápice meristemático, callos.

ABSTRACT

The aim of this study was to develop methodologies for *in vitro* propagation of sachá inchi through organogenesis and somatic embryogenesis. In tests on organogenesis, MS medium supplemented with 0,1 mg/L of BAP and 0,05 mg/L of NAA allowed to obtain 1,4 sprouts of 14,55 mm per each shoot tip introduced. The best multiplication was achieved using MS medium supplemented with 0,1 mg/L of BAP and 0,25 mg/L of NAA, which allowed to obtain a multiplication coefficient of 2,25 and sprouts of 18,35 mm with 2,35 nodal segments. The highest percentage of rooting (73,33 %) was obtained using MS medium supplemented with 0,5 mg/L of NAA and 2 mg/L of IBA. In tests on somatic embryogenesis, the combination of MS salts, Gamborg vitamins, coconut water, 4 mg/L of 2,4-D and 1 mg/L of thidiazuron generated 87,5 % of callogenic induction from zygotic embryos. For the generation of somatic embryos, calluses derived from zygotic embryos and immature leaves were placed in a modified MS medium. Calluses from immature leaves showed an average of 7 globular somatic embryos per explant. The treatment which contain the modified MS medium supplemented with 90 g/L of maltose and 0,1 mg/L of ABA allowed the formation of 1,5 somatic embryos in heart stage and regeneration of 0,5 plants per explant. In conclusion sachá inchi had better response to *in vitro* propagation through organogenesis.

Key words: sachá inchi, organogenesis, somatic embryogenesis, shoot tip, callus.

ABREVIACIONES

ABA	:	Ácido abscísico
AIA	:	Ácido indolacético
AIB	:	Ácido indolbutírico
AG₃	:	Ácido giberélico
ANA	:	Ácido naftalenacético
BAP	:	6-Benzilaminopurina
DCA	:	Diseño completamente aleatorizado
DKW	:	Medio Driver y Kuniyuki (1984)
HgCl₂	:	Bicloruro de mercurio
MCSC:		Medio de crecimiento secundario de callos
MDE	:	Medio de desarrollo embrionario
MMES:		Medio maduración de embriones somáticos
MS	:	Medio Murashige y Skoog (1962)
NaOCl:		Hipoclorito de sodio
PEG	:	Polietilenglicol
TDZ	:	Thidiazurón
2,4-D	:	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

I. INTRODUCCIÓN

Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) es una especie nativa de la Amazonía Peruana con posibilidades de industrialización y con un alto potencial de rendimiento económico para reemplazar en alguna medida a los cultivos ilícitos.

Asimismo, el Sacha inchi es considerado un alimento nutracéutico debido a sus beneficios nutricionales y en la salud. Las semillas presentan niveles elevados de proteínas y ácidos grasos insaturados, principalmente omega 3, 6 y 9 (Hamaker *et al.*, 1992; Guillén *et al.*, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2011) y este tipo de ácidos grasos proporcionan protección contra las enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, cáncer y posiblemente las infecciones virales. A comienzos de la década del 2000, debido al impulso del biocomercio en el Perú, instituciones de los ámbitos nacional e internacional, públicas y privadas, se interesaron por revalorar productos de la biodiversidad como el sachá inchi. Los objetivos eran conservar el recurso por su valor genético y darle un uso económico, considerando la situación de los actores que participan en la cadena, en especial de las comunidades nativas responsables de su cultivo (Proyecto PERÚ BIODIVERSO, 2013). Además, el establecimiento de plantaciones de sachá inchi genera un impacto ambiental positivo, ya que pueden instalarse en áreas intervenidas y que su cultivo empleando tutores vivos y asociado con leguminosas contribuye a revitalizar los suelos degradados. Debido a estas razones, la exportación del sachá inchi se inició el 2005 y desde entonces se han registrado crecientes volúmenes de venta a diversos mercados del mundo.

El sachá inchi es una especie alógama (Cachique, 2006) por lo que la descendencia es heterogénea y no reúne las mismas características genéticas que el material parental. El Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana viene trabajando en el mejoramiento genético de esta especie y a la fecha se ha logrado identificar accesiones promisorias con altos contenidos de aceite y alto rendimiento; sin embargo, estos son susceptibles al complejo nematodo-hongo que ocasiona una elevada mortandad de plantas durante su segundo año de producción.

Desde el punto de vista de mejoramiento genético, la clonación del sachá inchi se considera una etapa necesaria para optimizar la explotación de los beneficios directos de un genotipo seleccionado que responda a los requerimientos de resistencia a plagas y enfermedades, altos rendimientos y altos contenidos de aceite. Ante esta situación, el uso del cultivo de tejidos vegetales surge como una alternativa de propagación clonal de sachá inchi con características agronómicas deseadas.

Barrera (2004) desarrolló trabajos de investigación con el objetivo de determinar los protocolos adecuados de desinfección para la introducción *in vitro* de segmentos nodales, yemas axilares y ápices terminales de sachá inchi. Millones & Vásquez (2008) germinaron embriones cigóticos en condiciones *in vitro* empleando un medio MS suplementado con 0,1 mg/L de AG₃ a partir de los cuales se obtuvieron segmentos nodales, cuyo enraizamiento se logró empleando el medio MS modificado (reducción al 50 por ciento de NH₄NO₃ y KNO₃) suplementado con dosis de ANA (2 mg/L) y AIB (1 y 2 mg/L), obteniéndose un 57 y 71 por ciento de enraizamiento respectivamente.

Asimismo, Gárate (2009) obtuvo mayor número de raíces por explante empleando segmentos nodales y 200 ppm de AIB. La mayor longitud de raíces en ápices se obtuvo empleando una concentración de 50 ppm de AIB y en segmentos nodales empleando una concentración de 100 ppm, observando no solo desarrollo de raíces a partir de los explantes sino también a partir de los callos generados sobre los explantes. Finalmente, Guerrero (2007) estableció una metodología para la inducción de callos embriogénicos en hojas inmaduras de sachá inchi.

Una metodología eficiente de propagación *in vitro* se convertiría en una herramienta de apoyo al mejoramiento genético en términos de multiplicación, conservación de germoplasma e intercambio de material genético, acciones que en conjunto permitirían reducir el problema de suministro de semilla vegetativa para el establecimiento y renovación de plantaciones comerciales con material de alta calidad.

Objetivo General:

- Desarrollar metodologías de propagación *in vitro* en sachá inchi (*Plukenetia volubilis*) a través de la organogénesis y embriogénesis somática.

Objetivos Específicos:

- Establecer el protocolo de desinfección para la introducción *in vitro* de yemas apicales y embriones cigóticos de sachá inchi (*Plukenetia volubilis*).
- Determinar los requerimientos nutricionales y hormonales de los medios de cultivo durante las fases de introducción de yemas apicales, multiplicación y enraizamiento de plántulas de sachá inchi (*Plukenetia volubilis*).
- Determinar los requerimientos nutricionales y hormonales de los medios de cultivo para la inducción y maduración de embriones somáticos de sachá inchi (*Plukenetia volubilis*).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. GENERALIDADES DEL CULTIVO

2.1.1. Origen y distribución

Plukenetia (Euphorbiaceae) es un género pantropical de lianas y enredaderas. De las 20 especies conocidas, 12 están presentes en el Neotrópico, 7 en África y Madagascar y 1 en Asia (Bussman *et al.*, 2009; Bussman *et al.*, 2013).

Según Manco (2006) en el Perú podemos encontrarlo en estado silvestre en diversos lugares de San Martín, Ucayali, Huánuco, Cuzco, Amazonas, Loreto y Madre de Dios. En la región San Martín se encuentra en toda la cuenca del Huallaga, en la provincia de Lamas, en el valle del Sisa, en Alto Mayo y Bajo Mayo. En la costa peruana fue cultivado durante la época prehispánica, prueba de ello es que se han encontrado semillas y representaciones en cerámicas (Brack, 1999).

2.1.2. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de sacha inchi, según Mc-Bride (1951) es:

Reino : Vegetal
División : Spermatophyta
Clase : Dicotyledonea
Orden : Euphorbiales
Familia : Euphorbiaceae
Género : *Plukenetia*
Especie : *Plukenetia volubilis* Linneo

Las especies del género *Plukenetia* registrados en el Perú son: *Plukenetia polyadenia*, *Plukenetia brachybotria*, *Plukenetia lorentensis*, *Plukenetia volubilis*, *Plukenetia huayllabambana* y *Plukenetia carolis-vegae* (Bussman *et al.*, 2009; Bussman *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2010).

2.1.3. Morfología de la planta

Es una planta trepadora, voluble, semileñosa y de altura indeterminada (Manco, 2006). Se encuentra en bordes de boques secundarios, en cañaverales, sobre cercos vivos y como malezas en platanales y cultivos perennes. Fue cultivado también en la costa peruana en la época prehispánica y se han encontrado semillas y representaciones en cerámicas (Brack, 1999).

Sus hojas son alternas, elípticas, aseruladas, pinnitinervias y de color verde oscuro. El ápice es puntiagudo y la base es plana o semi arriñonada (Manco, 2006). En la base de la hoja, justo al inicio del pedúnculo, muchas plantas presentan una estípula.

Las flores masculinas son pequeñas, blanquecinas y dispuestas en racimos. En la base del racimo y lateralmente se encuentran una a dos flores femeninas. El sachá inchi es una especie alógama y por lo tanto la descendencia es heterogénea y no reúne las mismas características genéticas que los progenitores (Cachique, 2006).

Los frutos son cápsulas de 3 a 5 cm de diámetro, dehiscentes, de color verde que cuando maduran se ponen de un color marrón. Están formados por 4 lóbulos aristados dentro de los cuales se encuentran 4 semillas. Excepcionalmente algunos ecotipos presentan cápsulas con 5 a 7 lóbulos. Las semillas son ovaladas, de color marrón oscuro, abultados en el centro y aplastados hacia el borde. Según los ecotipos, el diámetro fluctúa entre 1,3 y 2,1 cm (Manco, 2006).

2.1.4. Ecología

El sachá inchi en estado silvestre crece desde los 100 m.s.n.m. en Selva Baja hasta los 2000 m.s.n.m. en Selva Alta. Se desarrolla y tiene buen comportamiento a diversas temperaturas que caracterizan a la Amazonía Peruana (mínimo 10 °C y máximo 36 °C). Las temperaturas muy altas son desfavorables y ocasionan la caída de flores y frutos pequeños, principalmente los recién formados. A bajas intensidades de luz, la planta necesita de mayor número de días para completar su ciclo vegetativo y cuando la sombra es muy intensa la floración disminuye y por lo tanto la producción es menor (Manco, 2006).

La disponibilidad de agua debe ser permanente para su crecimiento sostenido, siendo mejor si las lluvias se distribuyen en forma uniforme durante los 12 meses. El riego es

indispensable en los meses secos y períodos relativamente prolongados de sequía o de baja temperatura originan un crecimiento lento de la planta. Tiene una amplia adaptación a diferentes tipos de suelo, crece en suelos ácidos y con alta concentración de aluminio. Necesita terrenos con buen drenaje, que elimine el exceso de agua tanto a nivel superficial como profundo (Manco, 2006).

2.1.5. Propagación

Actualmente la propagación de sachá inchi es básicamente por semillas y al ser esta una especie alógama su descendencia es heterogénea y no reúne las mismas características genéticas que los progenitores ocasionando la pérdida de materiales genéticos promisorios (Cachique, 2006).

La propagación vegetativa permite mantener el genotipo intacto y asegurar la conservación de germoplasma valioso, además de multiplicar genotipos superiores. La ausencia de métodos confiables de propagación asexual del sachá inchi ha limitado su plantación y su uso a nivel industrial (Ruiz-Solsol y Mesén, 2010), ya que no se puede clonar plantas madres con características agronómicas y de aptitud industrial superiores.

La propagación vegetativa de sachá inchi a través del enraizamiento de estacas juveniles en cámaras de subirrigación es posible empleando arena de textura media como sustrato con aplicación de 0,2% de ácido indolbutírico como inductor hormonal y el uso de estacas basales o intermedias de 8 cm de longitud con 50% de área foliar (Cachique, 2007). El uso de cámaras de subirrigación contribuye al enraizamiento de estacas juveniles de sachá inchi ya que las condiciones de humedad relativa, radiación solar y temperatura en el interior permiten mantener la turgencia en las hojas (Ruiz-Solsol & Mesén, 2010). Una desventaja de la propagación por enraizamiento de estacas es que las plantas obtenidas no pueden seguir siendo multiplicadas en procesos sucesivos.

2.2. CULTIVO *IN VITRO* DE TEJIDOS VEGETALES

2.2.1. Aspectos generales

El cultivo de tejidos es la herramienta biotecnológica que tiene mayor aplicación práctica en la agricultura: micropropagación, obtención de plantas libres de patógenos, conservación de germoplasma, producción de plantas haploides, producción de metabolitos secundarios, mejora por mutagénesis y selección *in vitro* e ingeniería genética.

El cultivo de tejidos consiste en cultivar células vegetales o fragmentos de tejidos vegetales en medios nutritivos artificiales y en condiciones asépticas y su posterior regeneración en plantas funcionales. La elección del explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento *in vitro* de cultivos, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. Los explantes pueden provenir de una gran variedad de tejidos vegetales: tallos, hojas, raíces, peciolo, cotiledones, anteras, embriones, meristemos, etc.

Los buenos resultados en la regeneración de plantas depende de la especie, del genotipo de la especie, del tipo de explante, de la edad y estado fitosanitario de la planta donadora, del medio nutritivo y de los factores ambientales de las cámaras de incubación.

Según Serrano & Piñol (1991) la micropropagación permite clonar en corto tiempo, en condiciones bien establecidas, un gran número de especies, potencialmente todas las plantas superiores, esto ha permitido el desarrollo de una industria de micropropagación a través de la regeneración *in vitro* de plantas vía organogénesis o embriogénesis somática.

Los métodos de transformación genética para la introducción de genes de interés agrícola en plantas se han visto beneficiados también por el desarrollo del cultivo de tejidos y la principal limitante para su utilización en un mayor número de especies ha sido la no disponibilidad de sistemas de regeneración eficientes para los genotipos de mayor interés comercial (Jiménez, 1998).

2.2.2. Métodos de propagación *in vitro*

La propagación masiva de plantas es la más popular de las aplicaciones del cultivo *in vitro*. Las ventajas de este sistema de propagación vegetativa son: altos volúmenes de multiplicación que permiten manipular volúmenes elevados de plantas, producción independiente de las condiciones ambientales, saneamiento y rejuvenecimiento de los tejidos y uniformidad de las plantas producidas.

2.2.2.1. Organogénesis

Para Jiménez (1998) la organogénesis es un evento morfogenético que se caracteriza por su desarrollo unipolar, es decir, es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de este en un brote vegetativo, existiendo siempre

una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de primordios de raíces y el subsecuente enraizamiento final. Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos.

El mismo autor menciona que el estado de desarrollo de la planta madre y la edad fisiológica del explante, así como su tamaño, son de gran influencia en el éxito del cultivo *in vitro*. Los explantes tomados de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo. A medida que es más joven y menos diferenciado el tejido que se va a implantar, mejor será la respuesta *in vitro*. El genotipo y las condiciones ambientales (suministro de nutrientes, reguladores de crecimiento y condiciones físicas) también determinan la capacidad de regeneración de las plantas.

La adición exógena de citoquininas en los medios de cultivo es generalizada ya que en los meristemos y ápices la citoquinina endógena es muy baja porque el principal sitio de síntesis son las raíces. Hu & Wang (1983) indican que en la mayoría de los medios de establecimiento se emplean citoquininas: BAP (68%), kinetina (23%) y zeatina (9%).

Los meristemos y ápices tienen alta concentración endógena de auxinas ya que son áreas de síntesis de estas hormonas. De acuerdo a Jiménez (1998) normalmente cuando se emplean ápices no se adicionan auxinas al medio aunque estas pueden estimular el crecimiento, pero en los meristemos de 0,4 mm o menos y en yemas en reposo es frecuente que no exista suficiente auxina endógena, siendo necesaria su adición exógena.

Pierik (1990) explica las diferentes fases del proceso de reproducción vegetativa *in vitro*:
Fase 0: se refiere a lo que ocurre antes de que el cultivo *in vitro* comience: El pre-tratamiento correcto del material inicial, manteniendo las plantas, en la medida de lo posible, libres de enfermedades.

Fase 1: en ella se realiza el aislamiento estéril de los meristemos, ápices del vástago, explantes, etc.

Fase 2: es la fase de multiplicación, donde el primer objetivo es conseguir la propagación sin perder la estabilidad genética.

Fase 3: incluye la preparación de los vástagos y plantas, que se obtienen en la fase 2, para ser transferidas al suelo. Esto significa frenado de la formación de vástagos axilares e inicio de la elongación del vástago. A continuación se debe inducir la formación de raíces, ya sea *in vitro* o posteriormente *in vivo*.

Fase 4: comprende el proceso de aclimatación.

2.2.2.2. Embriogénesis somática

Para Tiserrat *et al.* (1979) & Gómez (1998) la embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos, proceso conocido en la naturaleza como una forma de apomixis llamada embrionía adventicia. Los primeros trabajos en los cuales se demostraba que las plantas podían producir embriones somáticos *in vitro* fueron desarrollados por Reinert (1958) & Stewart *et al.*, (1958) quienes lograron la regeneración de plantas a partir de callos mediante la formación de embriones somáticos *in vitro* en zanahoria.

Freire (2003) indicó que este método, teóricamente, es el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* debido a la naturaleza bipolar del embrión, a la posibilidad de ser automatizado todo el proceso productivo, a los altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo, al poder aplicarse los principios de la cinética microbiana y a la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales. Además, constituye una herramienta de trabajo para la conservación *in vitro* de germoplasma y mejoramiento genético de plantas.

Las desventajas radican en el desconocimiento que existe sobre los parámetros que regulan este proceso, siendo aún limitado el número de especies en los cuales se describe una embriogénesis somática eficiente que permita un uso productivo del método (Yeung *et al.*, 1996).

De manera general las células de las que se derivan los embriones somáticos muestran características comunes a las células en activa división, las cuales son de tamaño pequeño, citoplasma denso, núcleo grande con nucléolo prominente, vacuola pequeña y profusión de gránulos de almidón (Freire, 2003).

Freire (2003) reporta que el embrión somático presenta las siguientes características:

- Tiene autonomía frente al tejido generador (protegido generalmente por una epidermis).
- Es una estructura bipolar con un ápice radical, apical y cotiledonar.
- Presenta bandas procambiales entre los ápices.

Gómez (1998) indicó que morfológicamente un embrión somático es muy similar a uno cigótico, sobre todo en su desarrollo evolutivo desde proembrión, fase globular, corazón, torpedo y fase cotiledonar o embrión maduro, esto para las especies dicotiledóneas. Contrariamente a los embriones cigóticos, los embriones somáticos no contienen un nuevo grupo de genes, sino que poseen la misma combinación genética de la planta fuente del explante (Freire, 2003).

Los mecanismos moleculares que determinan y controlan la embriogénesis somática son poco conocidos. Se ha determinado que ocurren cambios en la expresión de los genes al inducirse el desarrollo embriogénico, como es la síntesis específica de proteínas del embrión somático, incremento en la actividad descarboxilasa orgánica, incremento en la actividad enzimática en la vía pirimidínica y en el desarrollo de la capacidad para inactivar ciclohexamidas (Barbón, 2003).

De Vries *et al.*, (1988) citado por Borbón (2003) indica que en explantes de zanahoria (*Daucus carota* L.) no existen células competentes para formar embriones. Estas adquirieron la competencia 19 días después de iniciado el proceso de cultivo en un medio de cultivo que contenía 2,4-D. El óptimo de la capacidad embriogénica fue adquirido después de 50 días de iniciado el cultivo. La adquisición del potencial embriogénico en cultivos en frescos es acelerada adicionando al medio de cultivo un medio condicionado libre de células o co-cultivo para establecer cultivos embriogénicos. El análisis del medio condicionado ha revelado que proteínas extracelulares son secretadas por células embriogénicas en el medio de cultivo, las cuales actúan como marcadores moleculares para distinguir entre cultivos embriogénicos y no embriogénicos.

El desarrollo de un sistema de regeneración de plantas a través de la embriogénesis somática incluye los siguientes pasos: inducción, desarrollo de los embriones somáticos, maduración de los embriones somáticos, germinación y conversión de los embriones somáticos en planta.

a. Inducción de la embriogénesis somática

Todas las células somáticas dentro de la planta contienen la información genética necesaria para crear una planta completa y funcional. La inducción de la embriogénesis somática consiste en la terminación del patrón de expresión de los genes presentes en el tejido del explante, siendo estos reemplazados con un programa de expresión de genes o gen de la embriogénesis somática en aquellas células del tejido del explante, las cuales pudieran dar lugar a embriones somáticos (Gómez, 1998).

Si en el explante aislado sólo existen células diferenciadas, es necesario producir una desdiferenciación, antes de que tenga lugar la división celular, siendo las células parenquimáticas las que generalmente pueden sufrir este proceso. Cualquier tipo de órgano (raíz, tallo, hoja, flor, etc.) o tejido puede ser utilizada como material inicial para la inducción de callo. Si esta resulta difícil o se precisa un callo juvenil, se utiliza embriones inmaduros o fragmentos de plántulas (Pierik, 1990).

Para iniciar la formación de callos a partir de un explante, se recomienda frecuentemente el suministro de reguladores exógenos. Las exigencias de regulador exógeno (tipo de regulador, concentración, proporción auxina/citoquinina), dependen del genotipo y del contenido de hormonas endógenas (Pierik, 1990). 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), destacando el 2,4-D y en menor proporción el AIA y ANA. También se han empleado citoquininas como BAP y TDZ.

El tejido calloso procedente de diferentes especies vegetales, puede presentar diferencias en estructura y hábito de crecimiento, puede ser: blanco o coloreado, libre (que se separa fácilmente) o fijo, blando (acuoso) o duro, fácil o difícil para dividirse en células o agregados en medio líquido (Pierik, 1990).

Durante la inducción de la embriogénesis somática pueden ocurrir dos sucesos diferentes: que un estímulo de la división celular sea suficiente para la formación de un embrión somático a partir del tejido del explante sin la formación de callo (embriogénesis somática directa) o que los embriones somáticos se formen a partir de suspensiones celulares o que medie la formación de un callo (embriogénesis somática indirecta).

b. Formación de embriones somáticos

Para inducir la formación del embrión somático a partir de los proembriones es necesario adicionar al medio de cultivo bajas concentraciones de auxinas o auxinas menos fuertes e incluso no adicionar auxinas, especialmente cuando se trabaja con plantas monocotiledóneas. En algunas especies es necesario adicionar una citoquinina (Freire, 2003).

Algunos aspectos que influyen en la asincronía de los embriones somáticos: cantidad de nutrientes que un embrión somático puede tomar del medio de cultivo, la posible interacción entre los embriones y la concentración en que se encuentren los elementos de acondicionamiento liberados por los propios embriones somáticos al medio de cultivo (De Jong *et al.*, 1992).

La asincronía de los embriones somáticos es un aspecto muy importante a resolver debido a que solo los embriones que se encuentran en etapas más avanzadas del proceso de histodiferenciación son capaces de germinar y dar lugar a plantas completas.

c. Maduración de embriones somáticos

Durante la maduración, los embriones somáticos experimentan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos, entre los que se destacan el equilibrio hormonal, el almacenamiento de sustancias de reserva y la adquisición de la tolerancia a la desecación (Von Arnold *et al.*, 2002).

Esta fase es la que muestra el desarrollo normal del embrión somático, destacado por la secuencia de cambios morfológicos: globular, acorazonado, torpedo y cotiledonar. Asimismo, esta etapa juega un papel fundamental la presencia de nitrógeno en el medio de cultivo, siendo necesario el suplemento con nitratos, amonio, aminoácidos y caseína hidrolizada.

El aumento de la osmolaridad en el medio se consigue disminuyendo el potencial hídrico mediante el empleo de agentes osmóticos, es común la aplicación de altas concentraciones de carbohidratos en los medios de maduración, que además de proporcionar una fuente de carbono, actúan como osmóticos a dichas concentraciones. La adición de ABA durante la etapa de maduración del embrión promueve la acumulación de sustancias de reserva; esto, seguido de un apropiado tiempo de secado, puede lograr un mejor crecimiento y desarrollo del embrión somático (Freire, 2003). En esta fase también es habitual utilizar un aditivo de alto peso molecular como el PEG, porque permite mantener el medio experimental a valores predeterminados de potencial hídrico y es capaz de competir con las células por el agua debido a su alto peso molecular, lo cual facilita la retención del líquido y provoca de esta forma un estrés osmótico.

d. Germinación y conversión del embrión somático en planta

La embriogénesis somática es un proceso complejo, en el que la calidad, la supervivencia y el crecimiento de las plantas somáticas regeneradas dependen de las condiciones utilizadas en las fases anteriores. Solamente los embriones somáticos maduros con morfología normal, con suficientes sustancias de reserva acumuladas y que hayan adquirido tolerancia a la desecación, podrán germinar y convertirse en plantas con éxito. La germinación conlleva el desarrollo coordinado del tallo y la raíz, mientras que la conversión se refiere a la supervivencia de las plántulas germinadas en condiciones *ex vitro* (Carneros, 2009).

Ciertos aspectos de las condiciones de cultivo, tales como acumulación de ABA, residuos de los componentes osmóticos utilizados así como el régimen de cultivo durante la maduración, pueden inhibir la germinación de los embriones. Por ello, pueden necesitarse tratamientos post madurativos que promuevan la elongación de la raíz y del brote apical. Ya que uno de los problemas asociados con el desarrollo de los embriones después de la maduración, puede estar relacionado con la ausencia de un régimen de desecación programado, similar a lo requerido por los embriones cigóticos, un tratamiento de desecación parcial de los embriones somáticos puede mejorar la sincronización del crecimiento de la raíz y el tallo (Carneros, 2009).

Se ha comprobado que en muchos casos, en el embrión somático durante la maduración puede artificialmente inducirse dormancia. Para romper la misma se pueden emplear

tratamientos con frío o aplicaciones de ácido giberélico, lo cual provoca una aceleración en la germinación y crecimiento del embrión, así como el tratamiento con otros reguladores de crecimiento como las citoquininas (Gómez, 1998).

2.3. ANTECEDENTES DEL CULTIVO *IN VITRO* EN *PLUKENETIA VOLUBILIS*

Los primeros estudios en la propagación *in vitro* de sachá inchi fueron desarrollados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional de San Martín en convenio con la Estación Experimental “El Porvenir” del Instituto Nacional de Innovación Agraria. En el marco de este convenio Barrera (2004) desarrolló trabajos de investigación con el objetivo de determinar los protocolos adecuados de desinfección para la introducción *in vitro* de segmentos nodales, yemas axilares y ápices terminales de sachá inchi, concluyendo que la exposición de los segmentos nodales a NaOCl al 1,5% durante 30 minutos permite obtener 60% de explantes libres de contaminación, la exposición de yemas axilares a NaOCl al 1,5 por ciento durante 20 minutos presentó 70% de explantes libres de contaminación y para el caso de yemas apicales indicó que la desinfección de estos explantes con NaOCl 1% durante 20 minutos permite obtener 100% de explantes libres de contaminación.

Millones & Vásquez (2008) lograron germinar embriones cigóticos en condiciones *in vitro* a partir de los cuales se obtuvieron segmentos nodales cuyo enraizamiento adecuado se logró cuando se empleó el medio MS modificado (reducción al 50% de NH_4NO_3 y KNO_3) suplementado con dosis de ANA (2 mg/L) y AIB (1 y 2 mg/L), obteniéndose un 57% y 71% de enraizamiento respectivamente.

Bordignon *et al.*, (2012) realizó una evaluación de la relación auxina-citoquinina en diferentes segmentos del epicótilo e hipocótilo de semillas de sachá inchi germinadas *in vitro*. Los segmentos apical, medio y basal se introdujeron a condiciones *in vitro* y después de nueve semanas, el segmento apical presentó la formación de brotes mediante organogénesis directa en medios de cultivo que contenían 0,5 y 1 mg/L de BAP combinados con 0 y 0,1 mg/L de AIB.

Gárate (2009) reportó que obtuvo mayor número de raíces por explante empleando segmentos nodales y 200 ppm de AIB, además la mayor longitud de raíces en ápices se obtuvo empleando una concentración de 50 ppm de AIB y en segmentos nodales empleando

una concentración de 100 ppm, observándose no solo desarrollo de raíces a partir de los explantes sino también a partir de los callos generados sobre los explantes.

Guerrero (2007) logró desarrollar un protocolo para la inducción de la embriogénesis somática de sachá inchi indicando que existe una alta respuesta a la inducción de callos en hojas inmaduras de sachá inchi empleando 2 mg/L de 2,4-D. Se consiguió obtener embriones del estadio globular en un medio MS modificado y suplementado con vitaminas DKW, 20 g/L de glucosa, 0,25 mg/L de glutamina, 2 mg/L de 2,4-D y 0,005 mg/L de TDZ bajo siete días de inducción. Luego de este periodo los explantes fueron transferidos a un nuevo medio, al cual se le retiró la glutamina y el TDZ y a cambio se le añadió 0,14 mg/L de kinetina y 50 ml/L de agua de coco.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina y del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (LCTV) de la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto.

3.1. ORGANOGÉNESIS

3.1.1. Material biológico

Para desarrollar los estudios de propagación *in vitro* vía organogénesis se emplearon yemas apicales procedentes de plantas germinadas en el invernadero, correspondientes a la accesión 007 del banco de germoplasma del IIAP - San Martín (**Figura 1**).



Figura 1: Plantas de sachá inchi germinadas en invernadero.

Se colectó las yemas apicales de las plantas que se encuentran en el invernadero con la ayuda de una tijera quirúrgica y una pinza previamente desinfectada con alcohol al 96%. Estas yemas fueron colocadas en frascos de vidrio con una pequeña cantidad de agua destilada para evitar la deshidratación, se sellaron los frascos con papel de aluminio y fueron conducidos al laboratorio.

3.1.2. Desinfección

Las yemas apicales fueron lavadas con abundante agua corriente, tratadas con fungicida (benomilo: 1 g/L) durante 10 minutos, enjuagadas nuevamente con agua corriente y transportadas a la cámara de flujo laminar. El trabajo de desinfección e introducción *in vitro* se desarrolló en la cámara de flujo laminar, evaluándose diferentes tiempos de exposición (30 y 60 segundos) de las yemas apicales al alcohol (70%) y diferentes concentraciones de NaOCl (1% y 1,5%) durante 10 minutos. También se evaluó el efecto del HgCl₂ (1 g/L) durante 3, 4 y 5 minutos en el proceso de desinfección.

Luego de someter las yemas apicales a los distintos desinfectantes, estas fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril. Con la ayuda de un estereoscopio y empleando pinzas y bisturíes esterilizados se extrajeron los ápices meristemáticos de las yemas apicales y se introdujeron en tubos de ensayo que contenían medio de cultivo MS (**Figura 2**). Se emplearon 20 repeticiones por tratamiento y un explante por repetición.

Se determinó el porcentaje de explantes contaminados, necrosados y porcentaje de supervivencia. Los tratamientos evaluados son:

T1: Alcohol 70% (30 segundos) + NaOCl 1% (10 minutos)

T2: Alcohol 70% (60 segundos) + NaOCl 1% (10 minutos)

T3: Alcohol 70% (30 segundos) + NaOCl 1,5% (10 minutos)

T4: Alcohol 70% (60 segundos) + NaOCl 1,5% (10 minutos)

T5: HgCl₂ (1 g/L) durante 3 minutos.

T6: HgCl₂ (1 g/L) durante 4 minutos.

T7: HgCl₂ (1 g/L) durante 5 minutos.



Figura 2: Ápice meristemático de *sacha inchi* sembrado en medio de cultivo MS.

Las unidades experimentales fueron incubadas en condiciones de luz con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, temperatura promedio de 24 °C, humedad relativa de 46% y una intensidad luminosa de 2000 lux.

3.1.3. Establecimiento *in vitro*

En esta fase el objetivo fue determinar la mejor concentración de citoquininas (BAP) y auxinas (ANA) para el establecimiento *in vitro* de los ápices meristemáticos. Se empleó el medio de cultivo MS suplementado con tres concentraciones de BAP (0; 0,05 y 0,1 mg/L) y tres concentraciones de ANA (0; 0,01 y 0,05 mg/L), 30 gr/L de sacarosa y 8 gr/L de agar como agente gelificante. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,7. Se empleó un diseño completamente al azar con un total de nueve tratamientos y 20 repeticiones por tratamiento (**Tabla 1**). Las variables evaluadas fueron: altura de plántula y número de brotes.

Tabla 1: Niveles de concentración hormonal (BAP y ANA) empleadas en la introducción *in vitro* de ápices meristemáticos de sachá inchi.

Tratamiento	Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de ANA (mg/L)
T1	0	0
T2	0	0,01
T3	0	0,05
T4	0,05	0
T5	0,05	0,01
T6	0,05	0,05
T7	0,1	0
T8	0,1	0,01
T9	0,1	0,05

Los explantes fueron cultivados en un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura aproximada de 24 °C y una humedad relativa de 46%.

3.1.4. Multiplicación

En la fase de multiplicación se realizaron dos ensayos. En ambos ensayos se empleó el medio de cultivo MS, 30 gr/L de sacarosa, 8 gr/L de agar y distintas concentraciones de reguladores de crecimiento. En el primer ensayo se evaluó el efecto de tres concentraciones de BAP (0,1; 0,25 y 0,5 mg/L) y tres concentraciones de ANA (0; 0,1 y 0,25 mg/L). En el segundo ensayo se evaluó el efecto de tres concentraciones de kinetina (0,1; 0,25 y 0,5 mg/L) y 3 concentraciones de ANA (0; 0,1 y 0,25 mg/L). Las concentraciones de BAP y ANA se determinaron en base a estudios preliminares. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,7. Se

empleó un diseño completamente al azar, con un total de nueve tratamientos por ensayo y 20 repeticiones por tratamiento (**Tabla 2** y **Tabla 3**). Se realizaron dos sub cultivos y las variables evaluadas fueron: altura de plántula, número de brotes y número de nudos por brote.

Tabla 2: Niveles de concentración hormonal (BAP y ANA) empleadas en la multiplicación *in vitro* de sachá inchi.

Tratamiento	Concentración de BAP (mg/L)	Concentración de ANA (mg/L)
T1	0,1	0
T2	0,1	0,1
T3	0,1	0,25
T4	0,25	0
T5	0,25	0,1
T6	0,25	0,25
T7	0,5	0
T8	0,5	0,1
T9	0,5	0,25

Tabla 3: Niveles de concentración hormonal (kinetina y ANA) empleadas en la multiplicación *in vitro* de sachá inchi.

Tratamiento	Concentración de kinetina (mg/L)	Concentración de ANA (mg/L)
T1	0,1	0
T2	0,1	0,1
T3	0,1	0,25
T4	0,25	0
T5	0,25	0,1
T6	0,25	0,25
T7	0,5	0
T8	0,5	0,1
T9	0,5	0,25

Los explantes fueron cultivados en un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura aproximada de 24 °C y una humedad relativa de 46%.

3.1.5. Enraizamiento

Millones & Vásquez (2008) refirieron que para la fase de enraizamiento, el medio de cultivo contiene sales MS modificado: reducción de Nitrato de Amonio y Nitrato de Potasio en 50%, vitaminas MS, 30 g/L de sacarosa, 2 concentraciones de ANA (0,5 y 2 mg/L), 3 concentraciones de IBA (0,5; 1 y 2 mg/L) y 8 gr/L de agar como agente gelificante. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,7. Se empleó un diseño completamente al azar, con un

total de seis tratamientos y 15 repeticiones por tratamiento (**Tabla 4**). Se evaluaron las siguientes variables: porcentaje de enraizamiento, número y longitud de raíces.

Tabla 4: Niveles de concentración hormonal (ANA e IBA) empleadas en el enraizamiento *in vitro* de sachá inchi.

Tratamiento	Concentración de ANA (mg/L)	Concentración de IBA (mg/L)
T1	0,5	0,5
T2	0,5	1
T3	0,5	2
T4	2	0,5
T5	2	1
T6	2	2

3.2. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

3.2.1. Material biológico

Para realizar los estudios de propagación *in vitro* vía embriogénesis somática se emplearon embriones cigóticos de sachá inchi, procedentes del banco de germoplasma del IIAP - San Martín.

También se empleó callos con estructuras embriogénicas obtenidas a partir de hojas inmaduras de sachá inchi, procedentes del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto.

3.2.2. Preparación del material biológico

Se escarificaron las cápsulas hasta obtener las semillas de color marrón, estas semillas fueron lavadas con detergente y desinfectadas con NaOCl (1,5%) por un periodo de 10 minutos, luego las semillas se enjuagaron tres veces con agua corriente. Finalmente, las semillas se acondicionaron en una cámara húmeda por un periodo de 24 horas, con el fin de hidratar los endospermos y facilitar los cortes.

Transcurridas las 24 horas las semillas se lavaron con agua destilada y se colocaron en una placa Petri y con la ayuda de la pinza se retiró la testa de las semillas con la finalidad de obtener las almendras de color blanquecino (**Figura 3**).



Figura 3: Granos de sachá inchi.

3.2.3. Desinfección

Para extraer los embriones, primero se sumergieron los granos en una solución de alcohol 70%, evaluándose diferentes tiempos de exposición (30 y 60 segundos) y luego se enjuagaron con agua destilada estéril. Luego fueron expuestos a diferentes concentraciones de NaOCl (1% y 1,5%) durante 10 minutos y se enjuagaron nuevamente tres veces con agua destilada estéril. También se evaluó el efecto del HgCl₂ durante 3, 4 y 5 minutos en el proceso de desinfección y luego se enjuagó cinco veces con agua destilada estéril.

Los tratamientos evaluados son:

T1: Alcohol 70% (30 segundos) + NaOCl 1% (10 minutos)

T2: Alcohol 70% (60 segundos) + NaOCl 1% (10 minutos)

T3: Alcohol 70% (30 segundos) + NaOCl 1,5% (10 minutos)

T4: Alcohol 70% (60 segundos) + NaOCl 1,5% (10 minutos)

T5: HgCl₂ (1 g/L) durante 3 minutos

T6: HgCl₂ (1 g/L) durante 4 minutos

T7: HgCl₂ (1 g/L) durante 5 minutos

Luego, con la ayuda de dos bisturís se realizaron 3 cortes: 2 laterales y 1 superior, teniendo como referencia el punto de crecimiento de la raíz ubicado en la parte inferior de la almendra, después se retiró un cotiledón con la ayuda de una pinza y un bisturí. Seguidamente se levantó el embrión con cuidado y se colocó sobre la lámina de agua destilada estéril

contenida en una placa Petri (**Figura 4**). Con la ayuda de una pinza se sembró el embrión acondicionándolo suavemente sobre la superficie del medio de cultivo MS. Se incubó en condiciones oscuras a 25 °C, con una humedad relativa de 46%.



Figura 4: Embriones cigóticos de sachá inchi.

3.2.4. Inducción de la embriogénesis somática

Guerrero (2007) reportó que en esta fase se determinó las concentraciones hormonales (2,4-D y TDZ) adecuados para la inducción de callos en un periodo de siete días de inducción. Asimismo, la fórmula base del medio de cultivo empleado fue: sales MS, vitaminas DKW, 0,25 g/L de glutamina, al que se le adicionó 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar, diferentes concentraciones de 2,4-D (0; 1; 2 y 4 mg/L) y diferentes concentraciones de thidiazurón (0,05; 0,1; 0,5 y 1); todo esto ajustado a un pH de 5,7 para todos los tratamientos (**Tabla 5**). Se sembró cuatro embriones por frasco y seis frascos por tratamiento. Se incubó en condiciones oscuras, a una temperatura aproximada de 24 °C y una humedad relativa de 46%.

Transcurridos los siete días del ensayo de inducción de callos, los explantes fueron transferidos a un medio de cultivo de crecimiento secundario de callos (MCSC) empleado por Guerrero en la inducción de callos embriogénicos a partir de hojas inmaduras de sachá inchi. El MCSC está constituido por sales minerales MS suplementado con vitaminas Gamborg (1966), 20 g/L de glucosa, 2 mg/L de 2,4-D, 0,14 mg/L de kinetina, 50 ml/L de agua de coco y agar como agente gelificante (Guerrero, 2007).

Los callos con estructuras embriónicas globulares obtenidas a partir de hojas inmaduras y proporcionadas por el Laboratorio de Cultivo de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional de San Martín fueron sub-cultivados en el MCSC.

Tabla 5: Niveles de concentración hormonal (2,4-D y TDZ) empleadas en la inducción de la embriogénesis somática de sachá inchi.

Tratamiento	Concentración de 2,4-D (mg/L)	Concentración de TDZ (mg/L)
T1	0	0,05
T2	0	0,1
T3	0	0,5
T4	0	1
T5	1	0,05
T6	1	0,1
T7	1	0,5
T8	1	1
T9	2	0,05
T10	2	0,1
T11	2	0,5
T12	2	1
T13	4	0,05
T14	4	0,1
T15	4	0,5
T16	4	1

3.2.5. Formación de embriones somáticos

Guerrero (2007) indicó que para la formación de embriones somáticos se siguió la metodología desarrollada por él. Para esto, los explantes fueron sometidos a 14 días de oscuridad y luego fueron expuestos a la luz, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, en un medio de desarrollo embrionario (MDE) constituido por sales y vitaminas MS suplementado con 1 mg/L de ácido nicotínico, 2 mg/L de tiamina, 2 mg/L de glicina, 100 mg/L de myo-inositol, 1 g/L de glucosa, 30 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar como agente gelificante.

3.2.6. Maduración de embriones somáticos

Los callos que presentan formación de embriones somáticos obtenidos a partir de hojas inmaduras y proporcionadas por el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional de San Martín y los callos obtenidos a partir de embriones cigóticos fueron sembrados en el medio de maduración de embriones somáticos (MMES).

El MMES estuvo formulado por: sales MS en donde el nitrato de sodio y el nitrato de potasio fueron reducidos a la mitad de concentración (Millones & Vásquez, 2008), 1 mg/L de ácido nicotínico, 2 mg/L de tiamina, 2 mg/L de glicina y 100 mg/L de myo-inositol (Guerrero, 2007), al que se le añadió diferentes concentraciones de maltosa (30, 60 y 90 g/L) y ABA (0,01; 0,1 y 1 mg/L) y 8 g/L de agar como agente gelificante (Tabla 6). Se sembró 5 explantes por placa Petri y 4 repeticiones por tratamiento.

Tabla 6: Niveles de concentración de maltosa y ABA empleadas en la maduración de embriones somáticos de sachá inchi.

Tratamiento	Concentración de maltosa (g/L)	Concentración de ABA (mg/L)
T1	30	0,01
T2	30	0,1
T3	30	1
T4	60	0,01
T5	60	0,1
T6	60	1
T7	90	0,01
T8	90	0,1
T9	90	1



Figura 5: Propagación de callos embriogénicos para la regeneración de plántulas.

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Hurtado & Merino (1994) indicaron que en investigaciones donde se emplea la técnica de cultivo de tejidos, generalmente se emplea el diseño completamente al azar (DCA), puesto que el material experimental es homogéneo. Por ejemplo, se puede determinar cuál es el mejor medio de cultivo para meristemos, callos, anteras, hojas, embriones, óvulos, etc.

El diseño utilizado en el trabajo experimental fue completamente al azar, realizándose el análisis de varianza.

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

$$i = 1, 2, \dots, t$$

$$j = 1, 2, \dots, r$$

Donde:

Y_{ij} : variable respuesta correspondiente al *i*-ésimo tratamiento y a la *j*-ésima repetición.

μ : Media general

t_i : Efecto del *i*-ésimo tratamiento.

e_{ij} : Error experimental

Los datos fueron procesados empleando el software estadístico SAS 8,1. Este software nos permitió realizar el análisis de varianza y la prueba de Tukey con una significación de 0,05%.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ORGANOGÉNESIS

4.1.1. Desinfección

Un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito del establecimiento *in vitro* de los cultivos es evitar la contaminación. Al evaluar el efecto de los diferentes tratamientos se observa que el tratamiento T2 (alcohol 70% durante 60 segundos y NaOCl 1% durante 10 minutos) presenta 15% de contaminación y 5% de explantes necrosados consiguiéndose introducir con éxito a condiciones *in vitro* 80% de ápices meristemáticos (Figura 6).

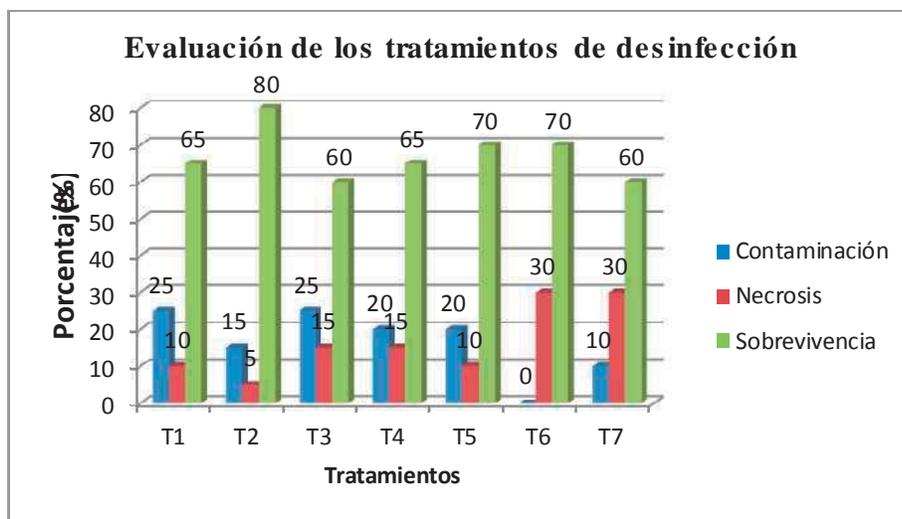


Figura 6: Efecto de diferentes tratamientos de desinfección en la introducción *in vitro* de ápices meristemáticos de sachá inchi.

En estudios preliminares realizados por Barrera (2004) con tres tipos de explantes de sachá inchi se observó que la exposición de los segmentos nodales a NaOCl al 1,5% durante 30 minutos presentó 40% de contaminación, la exposición de yemas axilares a NaOCl al 1,5% durante 20 minutos presentó 30% de contaminación y para el caso de yemas apicales indicó que la desinfección de estos explantes con NaOCl 1% durante 20 minutos permite obtener 0% de contaminación, estos resultados difieren con los obtenidos en el presente trabajo ya que la exposición de las yemas apicales a NaOCl 1% por 10 minutos permite obtener 15%

de contaminación y 5% de necrosis de explantes. La contaminación de los explantes en todos los tratamientos fue por bacterias y no por hongos.

Roca & Mroginski (1991) reportaron que la solución de NaOCl en concentraciones de 1% a 3% es una de las preparaciones más útiles como germicida y agente oxidante. Sirve para la esterilización superficial siempre y cuando no se produzcan lesiones debido a su acción blanqueadora. La sumersión de los brotes en alcohol (70%) previo a la desinfección con NaOCl provocó quemaduras en los ápices pero disminuyó la tensión superficial del tejido, propiciando mejor acción del NaOCl, resultados congruentes a los obtenidos en el establecimiento *in vitro* de ápices del híbrido de papaya IBP 42-99 (Posada *et al.*, 2004).

Jiménez (1998) indicó que el HgCl₂ es el desinfectante de mayor toxicidad y debe emplearse en dosis bajas y por corto tiempo. Debe utilizarse con mucha cautela, con una solución acuosa entre 0,1% a 1,5% y una exposición de 3 a 10 minutos (Roca & Mroginski, 1991). En los tratamientos T5, T6 y T7 las yemas apicales fueron tratadas con HgCl₂ por 3, 4 y 5 minutos respectivamente. A mayor tiempo de exposición de los ápices meristemáticos al HgCl₂ disminuye la incidencia de microorganismos contaminantes pero se obtiene mayor porcentaje de explantes necrosados. El tratamiento T6 permitió disminuir a cero la incidencia de microorganismos contaminantes pero el porcentaje de explantes necrosados incrementó con respecto a las yemas apicales tratados con alcohol y NaOCl.

Considerando que el tratamiento T2 presentó mayor porcentaje de explantes sobrevivientes y que además el HgCl₂ es más tóxico y más costoso se decidió trabajar con el OH y el NaOCl.

4.1.2. Establecimiento *in vitro*

Al realizar el análisis de varianza para las variables altura de plántula y número de brotes, mediante el software estadístico SAS 8,1 (**Anexo I**), se observa un efecto altamente significativo entre los tratamientos, lo que nos indica que en las evaluaciones realizadas al menos uno de los tratamientos difiere de otro. Para detallar con mayor precisión, en la tabla 7 se muestra la prueba estadística de Tukey con un nivel de significancia de 0,05. Las medias con diferentes letras indican que existen diferencias significativas entre los tratamientos, mientras que aquellas que presentan la misma letra no son significativamente diferentes.

Es necesario un balance adecuado entre citoquininas y auxinas en el medio de cultivo para la formación de plántulas a partir de yemas, ápices o meristemas. Este balance está determinado por la concentración endógena de estas fitohormonas presentes en el explante, los cuales dependen de la especie y del tipo de explante. Los explantes tomados de plantas jóvenes tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas y que a medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración (Jiménez, 1998).

La brotación de los ápices meristemáticos de sachá inchi se inició a los 14 días y el uso de 0,1 mg/L de BAP resultó más efectivo, siendo el tratamiento T9 donde se empleó 0,1 mg/L de BAP y 0,05 mg/L de ANA, en el que se obtuvieron mejores resultados, estadísticamente superiores frente al resto de los tratamientos en las dos variables evaluadas luego de 35 días de cultivo (**Tabla 7**). El tratamiento T1, que no presenta fitohormonas en la formulación del medio de cultivo presentó plántulas muy pequeñas, con menor número de brotes y número de nudos por brote, evidenciando que es necesario la adición exógena de fitohormonas para el establecimiento *in vitro* de sachá inchi.

Tabla 7: Influencia de diferentes concentraciones de BAP y ANA en el establecimiento *in vitro* de ápices de sachá inchi.

Tratamiento	BAP (mg/L)	ANA (mg/L)	Altura (mm)	Número de brotes
1	0	0	5,25 e	1 b
2	0	0,01	6,25 e	1,1 ab
3	0	0,05	8,55 d	1,15 ab
4	0,05	0	8,30 d	1,2 ab
5	0,05	0,01	10,70 c	1,4 a
6	0,05	0,05	11 c	1,25 ab
7	0,1	0	10,45 c	1,25 ab
8	0,1	0,01	13,15 b	1,3 ab
9	0,1	0,05	14,55 a	1,4 a

* Medias con diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0,05$ (Notación Tukey).

Podemos observar en la **Tabla 7** que los ápices son áreas de síntesis de auxinas y la concentración endógena es alta en estos tejidos y normalmente no se adicionan auxinas al medio de cultivo aunque estas pueden estimular el crecimiento (Jiménez, 1998). En el caso del sachá inchi la adición de ANA al medio de cultivo estimula la elongación de los brotes y al incrementar la concentración de 0,01 a 0,05 mg/L se lograron plántulas con mejores características para ser empleados en la siguiente fase de propagación.

Hu & Wang (1983) reportaron que en el 85% de los medios de establecimiento se emplean citoquininas, siendo el BAP el más utilizado.

Solis *et al.*, (2011) obtuvieron mejor diferenciación de meristemas de papaya mientras que Salas *et al.*, (2004) lograron la brotación de yemas apicales de *Morus alba* con la adición de 0,5 mg/L de BAP. En el caso de sachá inchi la adición de 0,1 mg/L de BAP al medio de cultivo permitió obtener plántulas de mayor tamaño y mayor número de brotes debido a que se inició la inducción de la brotación de yemas axilares (**Figura 7**). Es importante indicar que al incrementarse la concentración de BAP en el medio de cultivo se observa el desarrollo de pequeñas masas callosas en la base de los explantes.

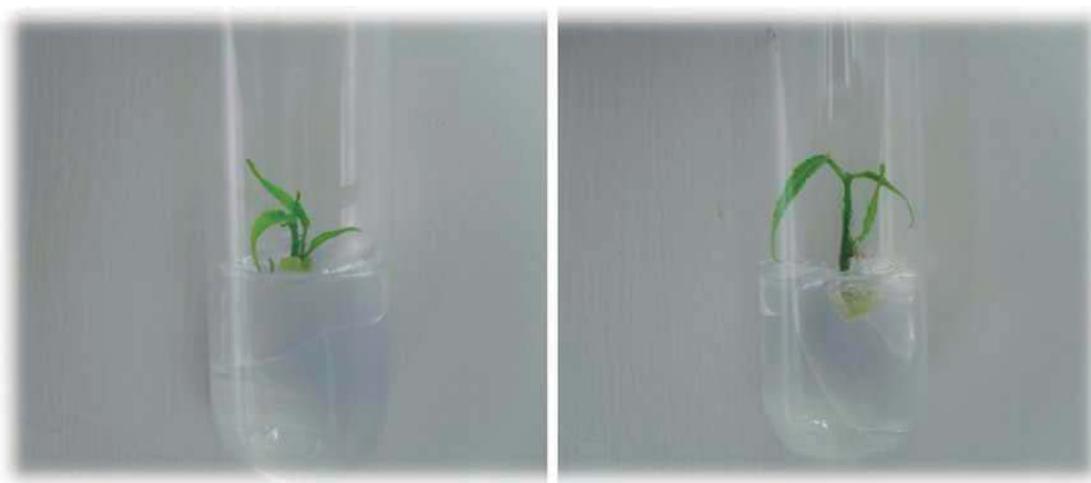


Figura 7: Plántulas de sachá inchi obtenidas a partir de ápices meristemáticos en el medio de cultivo de establecimiento T9.

4.1.3. Multiplicación

La proliferación de los diferentes explantes en el cultivo *in vitro* puede lograrse con el uso de sustancias reguladoras de crecimiento como componentes principales de un medio de cultivo previamente establecido y un adecuado manejo del proceso *in vitro*. Al ser divididos los explantes en condiciones estériles y cultivados nuevamente en el medio fresco inducen nuevos brotes, operación que se repite hasta lograr la cantidad de explantes deseados para la fase de enraizamiento (Orellana, 1998).

La proliferación de brotes axilares se logra con la adición de citoquininas al medio de cultivo para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas.

Las respuestas de los explantes a los diferentes tratamientos en el primer y segundo sub cultivo fueron similares presentándose los resultados del análisis de varianza realizado a los datos del segundo sub cultivo. Los resultados del análisis de varianza realizado mediante el software SAS 8,1 para los tratamientos en los que se evalúa la influencia del BAP y el ANA en la multiplicación *in vitro* de brotes de sachá inchi se muestran en el **Anexo 2**, mientras que los resultados del análisis de varianza para los tratamientos en los que se evalúa la influencia del kinetina y el ANA se muestran en el **Anexo 3**.

Las variables evaluadas fueron: altura de plántula (mm), número de brotes y número de nudos por brote. En la evaluación de las tres variables se aprecia un efecto altamente significativo entre los tratamientos, lo que nos indica que al menos uno de los tratamientos difiere del otro. Para detallar con mayor precisión se muestran la **Tabla 8** y **Tabla 9**, con la respectiva prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0,05.

Tabla 8: Influencia de diferentes concentraciones de BAP y ANA en la multiplicación *in vitro* de brotes de sachá inchi.

Tratamiento	BAP (mg/L)	ANA (mg/L)	Altura	Número de brotes	Número de nudos por brote
1	0	0	15,1 bcd	1,75 ab	2,1 ab
2	0	0,1	16,4 b	1,9 ab	2,2 ab
3	0	0,25	18,35 a	2,25 a	2,35 a
4	0,25	0	15,15 bcd	2 ab	2,1 ab
5	0,25	0,1	16,05 b	2,1 ab	2,4 a
6	0,25	0,25	15,75 bc	1,95 ab	2,25 ab
7	0,5	0	14,7 cd	1,75 ab	1,9 b
8	0,5	0,1	14,7 cd	1,6 b	2,12 ab
9	0,5	0,25	14,4 d	1,85 ab	2,05 ab

* Medias con diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0,05$ (Notación Tukey).

Tabla 9: Influencia de diferentes concentraciones de kinetina y ANA en la multiplicación *in vitro* de brotes de sachá inchi.

Tratamiento	kinetina (mg/L)	ANA (mg/L)	Altura	Número de brotes	Número de nudos por brote
1	0,1	0	13,65 ab	1,4 b	1,75 b
2	0,1	0,1	13,8 ab	1,6 ab	2,07 ab
3	0,1	0,25	13,9 ab	1,5 ab	2,18 a
4	0,25	0	14,1 ab	1,7 ab	2,18 a
5	0,25	0,1	14,25 a	1,75 ab	2,28 a
6	0,25	0,25	13,85 ab	1,95 a	2,23 a
7	0,5	0	13,25 b	1,65 ab	2,08 ab
8	0,5	0,1	13,45 ab	1,6 ab	2,1 ab
9	0,5	0,25	13,55 ab	1,9 a	2,13 ab

Asimismo, en la **Tabla 8** al comparar el efecto de diferentes concentraciones de BAP y ANA en la multiplicación de brotes originados a partir de ápices meristemáticos se observaron diferencias significativas en las distintas variables. Los mejores resultados estuvieron asociados a las concentraciones más bajas de citoquinina y el mejor tratamiento observado fue al combinar 0,1 mg/L de BAP y 0,25 mg/L ANA, con diferencias significativas y numéricamente superior frente a los demás tratamientos.

En la **Figura 8** observamos que este tratamiento permitió obtener plántulas con mejores características para iniciar la fase de enraizamiento.



Figura 8: Plántulas de sachá inchi obtenidas en el medio de cultivo de multiplicación T3, que contiene BAP como fuente de citoquinina.

Al incrementar la concentración de BAP a 0,25 mg/L se observa plántulas con menor altura y menor número de brotes, estadísticamente inferior a los tratamientos que contienen 0,1 mg/L de BAP en su formulación. Además hay mayor desarrollo de callos en la base de los explantes debido a la alta concentración de citoquinina y en esas condiciones se pueden desarrollar vástagos adventicios, existiendo la posibilidad de que se produzcan mutaciones. En los tratamientos que contienen 0,5 mg/L de BAP en su formulación se observan plántulas aún más pequeñas, estadísticamente inferior al resto de tratamientos de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey. En la **Figura 9** se observan dos plántulas obtenidas en el tratamiento T9 en el cual se puede apreciar abundante desarrollo de callos en la base de los explantes, menor tamaño y menor desarrollo de follaje.

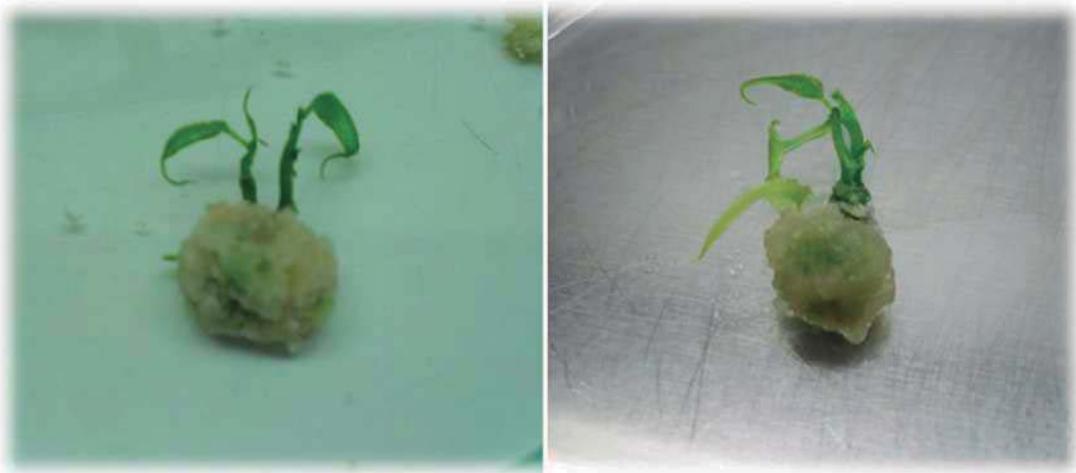


Figura 9: Plántulas de sachá inchi obtenidas en el medio de cultivo de multiplicación T9, que contiene BAP como fuente de citoquinina.

En los tratamientos T1, T2 y T3 que contienen 0,1 mg/L de BAP, se observa que al incrementarse la concentración de ANA se obtienen mejores resultados. Así la adición de 0,25 mg/L de ANA permitió obtener plántulas de mayor tamaño, mayor número de brotes y mayor número de nudos por brote. Mientras que las plántulas obtenidas en el tratamiento que no contiene ANA en su formulación son más pequeñas, con un menor número de brotes y nudos por brote. Esto evidencia que es necesario adicionar bajas concentraciones de ANA para estimular el crecimiento de los brotes.

La obtención de plantas *in vitro* con mayor tamaño es importante porque está relacionado con su mayor capacidad fotosintética. Es necesario que las plantas logren un buen tamaño y mayor cantidad de follaje para que luego de ser enraizados puedan sobrevivir en la etapa de aclimatación dentro de los invernaderos. El número de brotes es una variable importante, ya que a mayor número de brotes se tendrá un mayor coeficiente de multiplicación.

Al evaluar el efecto de diferentes concentraciones de kinetina y ANA, se observa que todos los tratamientos presentan resultados con bajas diferencias significativas entre ellas, con plántulas de menor tamaño, menor número de brotes y nudos por brote que los explantes sometidos a BAP como fuente de citoquinina (**Tabla 9, Figura 10**). En estos tratamientos se observa que a mayor concentración de kinetina hay mayor desarrollo de callo en la base de los explantes.

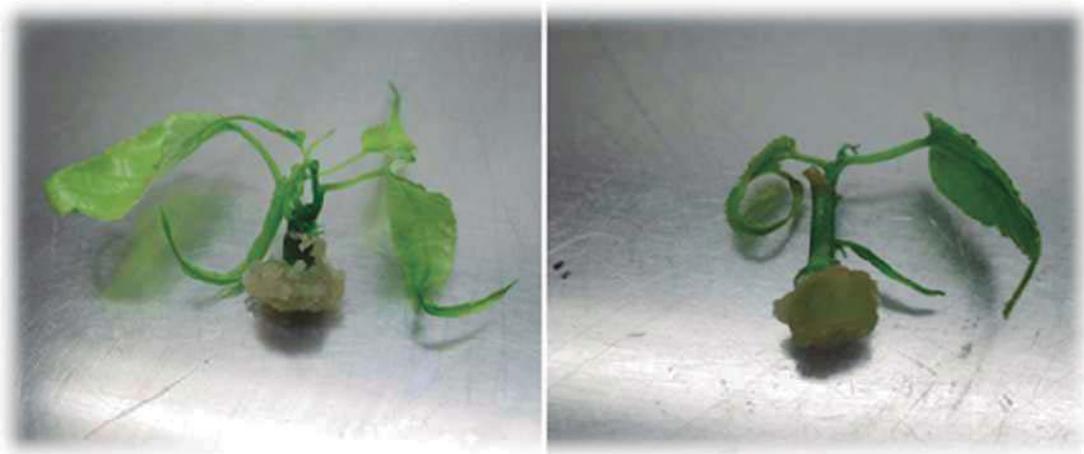


Figura 10: Plántulas de sachá inchi obtenidas en el medio de cultivo de multiplicación T3, que contiene kinetina como fuente de citoquinina.

* Medias con diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0,05$ (Notación Tukey).

De esto se deduce que la citoquinina más efectiva para la multiplicación *in vitro* de sachá inchi es el BAP. Resultados similares obtuvieron Salas *et al.*, (2004), quienes reportaron que el BAP les permitió obtener mejores resultados que la kinetina en el establecimiento *in vitro* de *Morus alba*.

De acuerdo a Hu & Wang (1983) la citoquinina más efectiva en la inducción de yemas axilares en los medios de proliferación es el BAP (74,6%), seguida en orden decreciente por la kinetina (19,4%), el 2-ip (3%) y la zeatina (3%).

En otras especies de la familia Euphorbiaceae, tales como *Excoecaria agallocha* (Rao *et al.*, 1998), *Phyllanthus caroliniensis* (Catapan *et al.*, 2000), *Phyllanthus stipulatus* (Catapan *et al.*, 2001), *Phyllanthus urinaria* (Catapan *et al.*, 2002) y *Euphorbia nivulia* (Martin *et al.*, 2005), el uso de las citoquininas también estimuló la proliferación de brotes.

No obstante el papel determinante de las citoquininas en esta fase, fue necesario la adición de auxinas para estimular el crecimiento de los brotes. Uno de los posibles efectos de la auxina en esta fase es anular el efecto depresivo acumulado de las altas concentraciones de citoquininas sobre la brotación de las yemas axilares y restablecer el crecimiento de las mismas Orellana (1998).

4.1.4. Enraizamiento

Durante el cultivo *in vitro* las plantas crecen bajo un ambiente con alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en compuestos orgánicos, especialmente sacarosa. Estas condiciones provocan cambios en la morfología y la fisiología de las plantas, que las hacen diferir de las que crecen en invernaderos o en el campo. Todos estos cambios provocan que una gran parte de las plantas micropropagadas no sobrevivan al trasplante a las condiciones ambientales y para contrarrestar este efecto es necesario obtener plántulas con un buen número y tamaño de raíces.

El enraizamiento es la fase más voluminosa de todo el proceso, pues en ella cada brote debe ser cultivado y manipulado *in vitro* para que, además de crecer, forme y desarrolle varias raíces que le permitan comenzar la absorción de nutrientes al trasplantarse sobre un sustrato enriquecido en el proceso de aclimatación.

En la **Figura 11** podemos observar que la evaluación del porcentaje de enraizamiento se realizó 35 días después de la siembra. También se observó que el tratamiento T3 presentó 73,33% de plántulas enraizadas, mientras que el menor porcentaje de enraizamiento se presentó en el tratamiento T1. Al incrementar la concentración de AIB se obtiene mayor porcentaje de enraizamiento, ya que los tratamientos T1 y T4 que contienen 0,5 mg/L de AIB en su formulación presentan menor porcentaje de enraizamiento (6,67% y 26,67%), mientras que los tratamientos T3 y T6 que contienen 2 mg/L de AIB presentan 73,33% y 60% de enraizamiento respectivamente), siendo el AIB la auxina más efectiva en el enraizamiento *in vitro* de sachá inchi.

Resultados que contrastan con los obtenidos por Millones & Vásquez (2008) en el enraizamiento de explantes de sachá inchi, quienes reportan que al incrementar la concentración de ANA incrementa el porcentaje de enraizamiento.

El número y longitud de raíces son variables muy importantes en la fase de aclimatación, debido a que es necesario que una planta tenga el soporte de las raíces para un mejor desarrollo en el sustrato estéril. Si bien las raíces no son del todo funcionales debido a la escasez de pelos absorbentes que no se desarrollan *in vitro*, un mayor tamaño y un mayor

número de raíces inducen la formación *ex vitro* de nuevas raíces y pelos absorbentes, que extraerán del sustrato los nutrientes necesarios para el desarrollo de la planta.

En el **Anexo 4**, al realizar el análisis de varianza para las variables número y longitud de raíces, mediante el software estadístico SAS 8,1, se observa un efecto altamente significativo entre los tratamientos, lo que nos indica que en las evaluaciones realizadas al menos uno de los tratamientos difiere de otro. Para detallar con mayor precisión, en la tabla 10 se muestra la prueba estadística de Tukey con un nivel de significancia de 0,05, donde las medias con diferentes letras indican que existen diferencias significativas entre los tratamientos, mientras que aquellas que presentan la misma letra no son significativamente diferentes.

De forma general se observa que al incrementar la concentración de AIB se incrementa el número y longitud de raíces. El tratamiento T3 es estadísticamente superior frente al resto de los tratamientos en ambas variables. El empleo de 0,5 y 2 mg/L de ANA combinado con 2 mg/L de AIB permitió obtener mayor número de raíces por plántula (3,37 y 2,73) y mayor longitud de raíces (12,68 y 11,7 mm) respectivamente (**Tabla 10**).

Los tratamientos T6, T5 y T2 presentan resultados similares pero estadísticamente inferiores a T3 en ambas variables. El tratamiento T1 mostró menor respuesta a la inducción de raíces que el resto de los tratamientos. Los tratamientos T1 y T3 presentan la misma concentración de ANA (0,5 mg/L) pero T1 presenta 0,5 mg/l de AIB y T3 presenta 2 mg/L de AIB. Siendo T3 el tratamiento que mejor respuesta presenta en el experimento es claro que el AIB tiene más influencia que el ANA en la inducción del enraizamiento de brotes de sachá inchi.

Millones & Vásquez (2008) obtuvieron mejores resultados al cultivar *in vitro* segmentos nodales y combinar ANA (2 mg/L) y AIB (1,0 y 2 mg/L). Mientras que Gárate (2009) obtuvo mayor número de raíces por explante empleando segmentos nodales y 200 mg/L de AIB, además la mayor longitud de raíces en ápices se obtuvo empleando una concentración de 50 mg/L de AIB y en segmentos nodales empleando una concentración de 100 mg/L, observándose no solo desarrollo de raíces a partir de los explantes sino también a partir de los callos generados sobre los explantes.

En el presente trabajo se utilizaron bajas concentraciones de AIB y solo se observó una ligera formación de callo en la base de algunos brotes. Comparando los resultados obtenidos por Gárate (2009) y en el presente trabajo se concluye que altas concentraciones de AIB induce

el desarrollo de callos en la base de los brotes, los mismos que dificultarán el proceso de aclimatación. Asimismo, el AIB induce la formación de raíces adventicias y se utiliza en concentraciones de 0,001 - 10 mg/L (Pierik, 1990).

El rol de las auxinas en la iniciación y crecimiento de las raíces es bien conocido, recomendándose su empleo en la mayor parte de los medios de enraizamiento (Orellana, 1998). Martin *et al.*, (2005) reporta que la adición de 2,46 μ M de AIB a un medio de cultivo MS (sales diluido a la mitad) permitió obtener 90% de enraizamiento y 5,2 raíces por brote en *Euphorbia nivulia*. En el caso de sachá inchi la combinación de 0,5 mg/L de ANA y 2 mg/L de AIB permitió obtener 73,33% de enraizamiento y 3,37 raíces, con una longitud promedio de 12,68 mm (**Tabla 10**).

En la **Figura 12** se muestran plántulas con 35 días en medio de enraizamiento, mientras que en la **Figura 13** se muestran plántulas de sachá inchi con 70 días en medio de enraizamiento.

Tabla 10: Influencia de diferentes concentraciones de ANA y AIB en el enraizamiento *in vitro* de brotes de sachá inchi.

Tratamiento	ANA (mg/L)	IBA (mg/L)	Número de raíces	Longitud de raíces (mm)
1	0,5	0,5	1 c	1,8 d
2	0,5	1	2,5 abc	8,02 bc
3	0,5	2	3,37 a	12,68 a
4	2	0,5	1,6 bc	6,93 c
5	2	1	2,6 abc	10,13 abc
6	2	2	2,73 ab	11,7 ab

* Medias con diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0,05$ (Notación Tukey).

En algunas especies de la familia Euphorbiaceae no es necesario el empleo de auxinas para el enraizamiento, limitándose en estos casos a la utilización de medios simples. Tal es el caso de *Phyllanthus caroliniensis* (Catapan *et al.*, 2000), *Phyllanthus stipulatus* (Catapan *et al.*, 2001) y *Phyllanthus urinaria* (Catapan *et al.*, 2002); en los cuales se reporta altos porcentajes de enraizamiento en medios de cultivo MS simple sin reguladores de crecimiento.

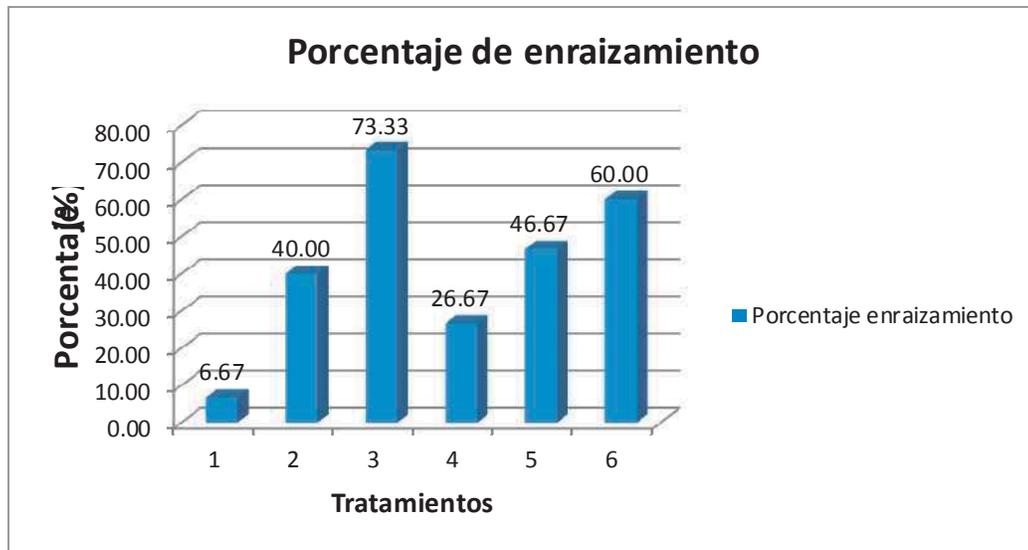


Figura 11: Evaluación de diferentes concentraciones de ANA y AIB en el porcentaje de enraizamiento de brotes de sachá inchi.



Figura 12: Plántulas de sachá inchi con 35 días en el medio de cultivo de enraizamiento.



Figura 13: Plántulas de sachá inchi con 70 días en el medio de cultivo de enraizamiento.

4.2. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

4.2.1. Desinfección

Si la esterilización inicial de los explantes es ineficiente, hongos y bacterias pueden ser introducidas juntamente con el material vegetal a condiciones *in vitro*. Es por esta razón que previo a la inducción de la embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos se desarrolló una metodología de desinfección para el establecimiento *in vitro* en condiciones asépticas del material vegetal.

El tratamiento T4, que consistió en exponer las almendras de sachá inchi a una solución de alcohol al 70% por 60 segundos y luego a una solución de NaOCl al 1,5% por 10 minutos, para luego extraer los embriones cigóticos e introducirlos *in vitro* mostró el valor máximo de sobrevivencia (80%) y más bajos porcentajes de explantes contaminados y necrosados, por lo que se consideró el tratamiento más efectivo en la desinfección (**Figura 14**).

Entre los tratamientos T1 y T4 se observa que a medida que se incrementa el tiempo de exposición de las semillas al alcohol 70% (de 30 a 60 segundos) y la concentración de NaOCl (de 1% a 1,5%), se reduce el porcentaje de contaminación mientras que el porcentaje de

necrosis no presenta gran variación. Esto explica la razón de que T4 presenta los mejores resultados en la desinfección de semillas de sachá inchi.

En los tratamientos T5, T6 y T7 las almendras fueron tratadas con $HgCl_2$ por 3, 4 y 5 minutos respectivamente. El porcentaje de contaminación es menor con respecto a los explantes tratados con alcohol y $NaOCl$ pero el porcentaje de necrosis con la consecuente muerte del tejido es mayor, teniendo como resultado un menor porcentaje de establecimiento *in vitro* de embriones cigóticos (**Figura 14**).

Estos resultados son similares a los obtenidos en la introducción *in vitro* de ápices meristemáticos de sachá inchi. Además el $HgCl_2$ es el desinfectante de mayor toxicidad y debe emplearse en dosis bajas y por corto tiempo.

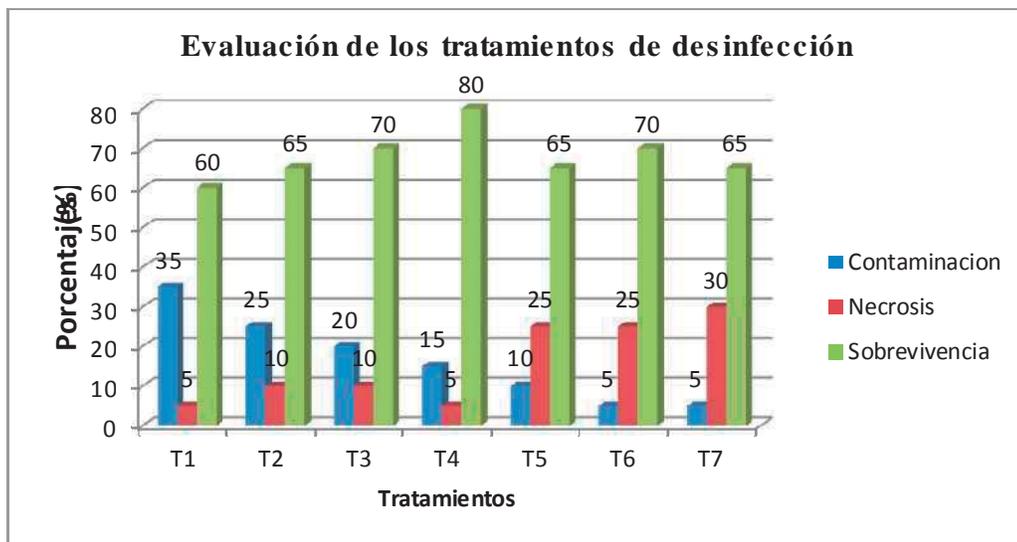


Figura 14: Evaluación de diferentes tratamientos de desinfección en la introducción *in vitro* de embriones cigóticos de sachá inchi.

4.2.2. Inducción de la embriogénesis somática

En la inducción de la embriogénesis somática a partir de hojas inmaduras de sachá inchi, Guerrero (2007) estudió la respuesta éstos a la callogénesis, reportando que el empleo de 0,005 mg/L de TDZ bajo siete días de inducción y en condiciones de oscuridad generó callo embriogénico y la diferenciación del primer estadio globular, asimismo observó el desarrollo de callo no embriogénico.

Respuestas similares han sido obtenidas en algunas especies de la familia Euphorbiaceae, así en *Phyllanthus urinaria* se ha reportado la inducción de callos a partir de segmentos nodales inoculados en posición horizontal sobre un medio MS suplementado con AIB, también el 2,4-D y el ANA cuando son empleados por separado inducen el desarrollo moderado de callogénesis (Catapán *et al.*, 2002). Mientras que en *Euphorbia nivulia* se observó que la adición de 2,4-D y Benzyladenina a un medio basal MS indujo el desarrollo de embriones somáticos a partir de explantes foliares (Martin *et al.*, 2005).

En el presente trabajo, esta fase consistió en la determinación de las concentraciones hormonales (2,4-D y TDZ) adecuados para la inducción de callos en un periodo de siete días de inducción. A pesar que todos los tratamientos indujeron callogénesis a partir de embriones cigóticos, el porcentaje de inducción varió dependiendo de las concentraciones de los reguladores de crecimiento.

Tres semanas después de que los explantes fueron transferidos al medio de crecimiento secundario de callos (MCSC) los embriones cigóticos mostraron un aumento del volumen para luego dar paso a la formación de callos. En algunos explantes los tejidos se necrosaron y luego desarrollaron pequeñas formaciones callosas.

Las observaciones realizadas durante el cultivo permitieron determinar cuatro diferentes estados (E) de desarrollo de callos en los explantes (**Figura 15**). E0 indica ausencia de callos, E1 indica el inicio de pequeñas formaciones de callo, en E2 el callo cubre más de la mitad del explante y en E3 el callo cubre por completo el explante.

Para Freire (2003) el 2,4-D es una auxina muy utilizada en la formación de embriones somáticos y el TDZ es un compuesto sintético que ha sido muy utilizado para la inducción de embriogénesis somática u organogénesis en diversas especies. En altas concentraciones origina callos más voluminosos (Wilhelm, 1999). Las combinaciones de diferentes concentraciones de 2,4-D con TDZ indujo la formación de callos en embriones cigóticos de *sacha inchi*.

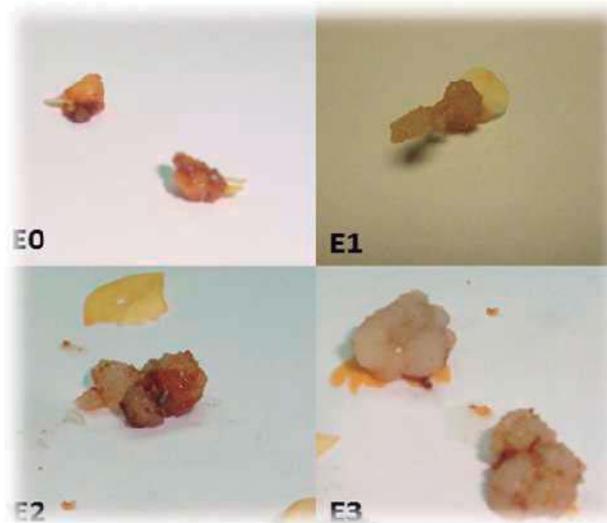


Figura 15: Estados de desarrollo de callo en los explantes: **E0** (Ausencia de callos), **E1** (Inicio de pequeñas formaciones de callo), **E2** (El callo más de la mitad del explante) y **E3** (El callo cubre por completo el explante).

Los cuatro primeros tratamientos que carecen de 2,4-D en su formulación presentan un alto porcentaje de explantes en estado E0 y carecen de explantes en estado E3. Al adicionar 2,4-D al medio de cultivo en diferentes concentraciones hay una reducción de explantes en estado E0 y un incremento de explantes en estado E1, E2 y E3 (**Figura 16**); observándose explantes en estado E2 en mayor porcentaje es decir hay desarrollo de callos en más de la mitad del explante en los distintos tratamientos.

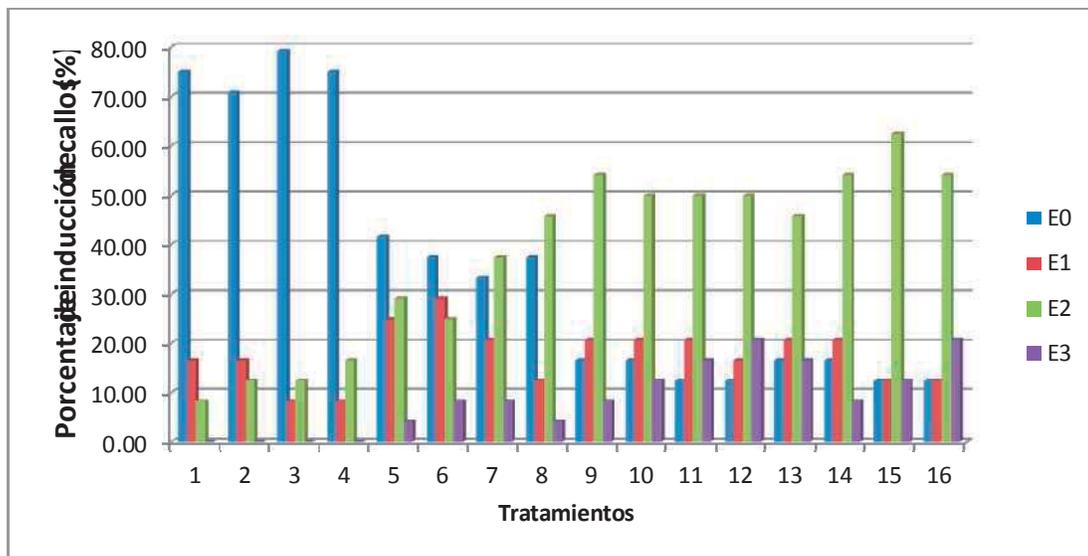


Figura 16: Porcentaje de inducción de los distintos estados de desarrollo de callos en embriones cigóticos de sachá inchi.

Los embriones cigóticos que desarrollaron callos en mayor porcentaje se observó en los tratamientos que contienen 2 mg/L (T9 al T12) y 4 mg/L (T13 al T16) de 2,4-D en su formulación. Los callos generados en estos tratamientos son de consistencia cremosa y cristalina.

A medida que se incrementa la concentración de TDZ los callos son más voluminosos y cubren mayor parte del explante, pero para que pueda mostrar su efecto es necesaria la adición de 2,4-D al medio de cultivo.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que el 2,4-D combinado con TDZ presenta un efecto positivo en la inducción calogénica a partir de embriones cigóticos como explante inicial en sachá inchi, siendo 2 y 4 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de TDZ concentraciones óptimas para lograr este objetivo.

Los callos embriogénicos obtenidos a partir de hojas inmaduras proporcionados por el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional de San Martín y los callos obtenidos a partir de embriones cigóticos fueron sub cultivados durante ocho semanas empleando el medio MCSC (**Figura 17**).



Figura 17: Sub cultivo de callos procedentes de embriones cigóticos inmaduros en el medio de cultivo MCSC.

4.2.3. Formación de embriones somáticos

Los callos embriogénicos obtenidos a partir de hojas inmaduras y embriones cigóticos fueron sembrados en el medio de desarrollo embrionario (MDE) desarrollado por Guerrero (2007). Las hojas inmaduras y embriones cigóticos son explantes que tienen buena respuesta embriogénica y son estructuras capaces de organizarse y formar embriones somáticos dependiendo de las condiciones de cultivo. Luego de 12 semanas de permanecer en el medio de cultivo MDE, los callos desarrollaron embriones somáticos en estadio globular y presentaron aumento de volumen, aspecto friable y color transparente (**Figura 18**).

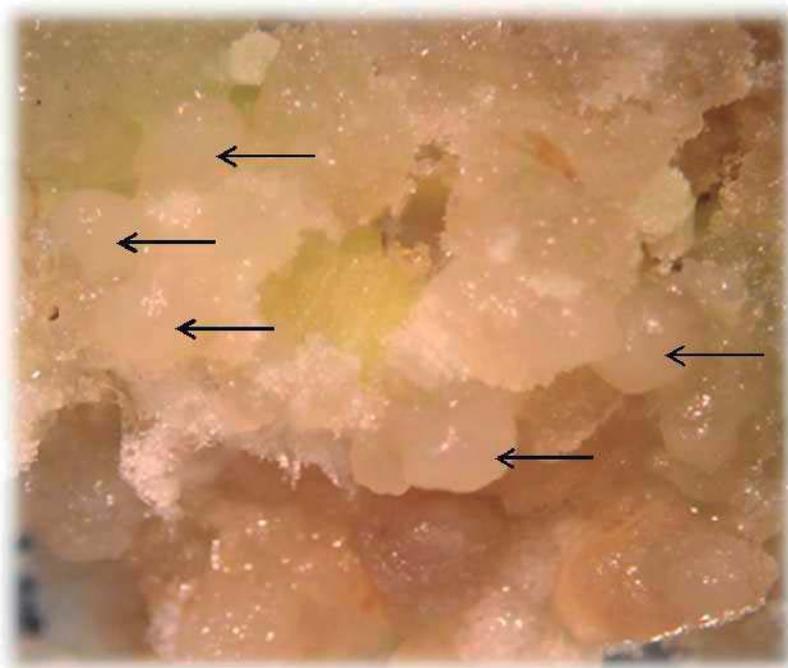


Figura 18: Embriones somáticos globulares en el medio de cultivo MDE obtenidos en callos procedentes de hojas inmaduras de sachá inchi.

Al evaluar la respuesta de los tipos de explantes (hojas inmaduras y embriones cigóticos) de los que provienen los callos se encontró diferencias significativas a los 35 días de cultivo en el número de embriones somáticos globulares (**Anexo 5**). Los callos procedentes de las hojas inmaduras presentaron mayor número de embriones somáticos globulares que los callos procedentes de los embriones cigóticos (**Tabla 11**).

Ammirato (1983) citado por Posada *et al.*, (2007) reporta que los embriones cigóticos inmaduros de varias especies de plantas pueden ser inducidos a la embriogénesis somática.

Vegas *et al.*, (1992) citado por Posada *et al.*, (2007) resaltan la superioridad de los embriones cigóticos sobre los peciolos de hojas en cuanto a la frecuencia de aparición de embriones somáticos en papaya. Datos que no concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo ya que la fuente de explantes que permitió obtener mayor número de embriones somáticos globulares fueron las hojas inmaduras y no los embriones cigóticos.

Tabla 11: Número de embriones somáticos globulares en callos de sachá inchi a los 35 días de cultivo en medio el medio de cultivo MDE.

Tratamientos	Número de embriones somáticos globulares
Hojas inmaduras	7 a
Embriones cigóticos	3,22 b

* Medias con diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0,05$ (Notación Duncan).

4.2.4. Maduración de embriones somáticos

Para Freire (2003) la fase de maduración es el periodo en el desarrollo del embrión somático en el cual ocurre la expansión de la célula, la acumulación de sustancias de reserva y se adquiere la tolerancia a la desecación. La correcta acumulación de reservas conlleva a un incremento en la masa seca de los embriones somáticos lo que indica una alta calidad en el vigor e influye positivamente en su posterior germinación (Fuji *et al.*, 1990).

En general, en el desarrollo de la embriogénesis somática se manifiestan los estadios de desarrollo globular, corazonado, torpedo y cotiledonar. En el desarrollo del trabajo fue posible diferenciar embriones en estadio globular y corazonado.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la existencia de una respuesta positiva del callo embriogénico a la adición de ABA y maltosa. En los tratamientos T4, T5, T7 y T8 se observa el desarrollo de embriones somáticos y regeneración de plantas (**Tabla 12**).

Luego de nueve semanas de la siembra de los callos en medio de MMES se observó que en el tratamiento T8 hay desarrollo de embriones somáticos en estadio corazonado (**Figura 19**) y seis semanas después se observó el desarrollo de plántulas regeneradas (**Figura 20**). Los callos sembrados en los tratamientos T4, T5 y T7 también presentaron desarrollo de embriones somáticos aunque en menor porcentaje que en T8. A las 15 semanas de siembra se observó que en T4 los callos desarrollaron pequeñas plántulas con desarrollo irregular de las hojas (**Figura 21**). En el resto de los tratamientos, luego de 15 semanas de cultivo no se observó el desarrollo de estructuras embrionarias ni organogénicas.

Tabla 12: Influencia de diferentes concentraciones de maltosa y ABA en el desarrollo de embriones somáticos y plántulas regeneradas de sachá inchi.

Tratamiento	Maltosa (g/L)	ABA (mg/L)	Número de embriones somáticos	Número de plántulas regeneradas
T1	30	0,01	0 b	0 b
T2	30	0,1	0 b	0 b
T3	30	1	0 b	0 b
T4	60	0,01	0,5 ab	0 b
T5	60	0,1	0,75 ab	0,5 a
T6	60	1	0 b	0 b
T7	90	0,01	0,5 ab	0 b
T8	90	0,1	1,5 a	0,5 a
T9	90	1	0 b	0 b

* Medias con diferentes letras en la misma columna difieren para $p < 0,05$ (Notación Duncan).



Figura 19: Embriones somáticos en estadio acorazonado en T8, 9 semanas después de la siembra en el medio de cultivo MMES.



Figura 20: Plántula regenerada en T8, 15 semanas después de la siembra en el medio de cultivo MMES.



Figura 21: Plántulas regeneradas en T4, 15 semanas después de la siembra en el medio de cultivo MMES.

Los tratamientos que contienen 60 y 90 g/L de maltosa en su formulación favorecieron un bajo porcentaje de desarrollo de embriones somáticos y regeneración de plántulas. Para Freire (2003) en términos de nutrición es fundamental tener en cuenta los suplementos del medio de cultivo como los carbohidratos ya que estos permiten una total maduración y evitan la germinación precoz. Guerrero (2007) realizó estudios empleando sacarosa pero no obtuvo regeneración de plántulas en la embriogénesis somática en *sacha inchi* a partir de hojas inmaduras. Blanc *et al.*, (1999) reemplazaron la sacarosa por glucosa, fructuosa y maltosa en los estudios sobre embriogénesis somática en *Hevea brasiliensis* y obtuvo mejor respuesta en el medio de cultivo que contenía maltosa.

Estudios realizados en diversas especies indican que esta fase se puede activar con el uso de PEG y ABA (Linossier *et al.*, 1997; Stasolla *et al.*, 2002; Pullman *et al.*, 2003). Los tratamientos que contienen 0,01 y 0,1 mg/L de ABA desarrollaron embriones somáticos mientras que los tratamientos que contenían 1 mg/L no los desarrollaron. La adición de ABA durante la etapa de maduración del embrión promueve la acumulación de sustancias de reserva; esto, seguido de un apropiado tiempo de secado puede lograr un mejor crecimiento y desarrollo del embrión somático (Freire, 2003) y promover la maduración (Stasolla *et al.*, 2002). Bell *et al.*, (1993) señalan que altas concentraciones de ABA producen la inhibición de la embriogénesis somática, esto puede explicar la razón por la que los tratamientos que contienen 1 mg/L de ABA en su formulación no presentaron desarrollo de embriones somáticos ni siquiera en un bajo porcentaje.

V. CONCLUSIONES

1. La mejor desinfección para las yemas apicales se obtuvo con alcohol (70%) durante 60 segundos y NaOCl 1% durante 10 minutos y para los embriones cigóticos se obtuvo con alcohol (70 %) durante 60 segundos y NaOCl 1,5% durante 10 minutos.
2. En los estudios sobre organogénesis, la combinación de 0,1 mg/L de BAP y 0,05 mg/L de ANA permitió la mejor diferenciación de los ápices meristemáticos. El medio de cultivo MS suplementado con 0,1 mg/L de BAP y 0,25 mg/L ANA permitió obtener explantes con mayor altura, mayor número de brotes y mayor número de nudos por brote en la fase de multiplicación. El mayor porcentaje de enraizamiento (73,33%) se obtuvo con la interacción de 0,5 mg/L de ANA y 2 mg/L de AIB.
3. En los estudios sobre embriogénesis somática, la combinación del 2,4-D (2 y 4 mg/L) y TDZ (0,5 y 1 mg/L) presentan un efecto positivo en la inducción callogénica a partir de embriones cigóticos. Los tratamientos que contienen 60 y 90 g/L de maltosa y 0,1 mg/L de ABA permitieron la regeneración de plántulas.

VI. RECOMENDACIONES

1. Utilizar los tratamientos que dieron lugar a los mejores resultados y emplearlos para realizar nuevos estudios planteando modificaciones en las concentraciones de sales minerales y reguladores de crecimiento.
2. Realizar estudios citológicos para que nos permita obtener un mayor conocimiento sobre los procesos de la embriogénesis somática y ampliar el entendimiento de este proceso.
3. Realizar estudios moleculares de las plántulas obtenidas para evaluar la estabilidad genética.
4. Continuar con los estudios de investigación de modo tal que se pueda lograr un protocolo eficiente para la propagación *in vitro* de sachá inchi.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barbón R. 2003. Aspectos relacionados con el ambiente físico y la caracterización molecular de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*. 3(4): 211-221.
2. Barrera O. 2004. Actividades para la introducción a condición *in vitro* de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.), realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales - UNSM/INIA. Informe de prácticas pre-profesionales. Universidad Nacional de San Martín. Tarapoto, Perú.
3. Bell L., Trigiano R. & Conger B. 1993. Relationship of abscisic acid to somatic embryogenesis in *Dactylis glomerata*. *Environmental and Experimental Botany*. 33:495-499.
4. Blanc G., Michaux-Ferrière N., Teisson C., Lardet L. & Carron M. 1999. Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 59:103-112.
5. Bordignon S., Bovi-Ambrosano G. & Viegas-Rodrigues P. 2012. Propagação *in vitro* de sachá inchi. *Ciência Rural*. 42(7):1168-1172.
6. Brack A. 1999. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. Lima, Perú. 550 p.
7. Bussman R., Paniagua N. & Tellez C. 2013. *Plukenetia carolis-vegae* (Euphorbiaceae) - A new useful species from Northern Peru. *Economic Botany*. 67(4):387-392.
8. Bussman R., Téllez C. & Glenn A. 2009. *Plukenetia huayllabambana* sp. nov. (Euphorbiaceae) from the upper Amazon of Peru. *Nordic Journal of Botany*. 27:313-315.
9. Cachique D. 2006. Estudio de la biología floral y reproductiva en el cultivo de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). Tesis Ing. Agrónomo. Universidad Nacional de San Martín. Tarapoto, Perú. 70 p.
10. Cachique D. 2007. Avances del sub proyecto “Obtención de líneas mejoradas de sachá Inchi en San Martín”. Tarapoto, Perú. Programa de Ecosistemas Terrestres. IIAP. 7 p.

11. Carneros E. 2009. Embriogénesis somática en pino piñonero (*Pinus pinea* L.). Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá. España. 274 p.
12. Catapan E., Luis M., Da Silva B., Moreno F. & Viana A. 2002. Micropropagation, callus and root culture of *Phyllanthus urinaria* (Euphorbiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 70:301-309.
13. Catapan E., Otuki M. & Viana A. 2000. *In vitro* culture of *Phyllanthus caroliniensis* (Euphorbiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 62:195-202.
14. Catapan E., Otuki M. & Viana A. 2001. *In vitro* culture of *Phyllanthus stipulatus* (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*. 24(1):25-34.
15. De Jong A. Cordewener J.; Lo Schiavo, F., Terzi M., Vandekerckhove J., Van Kammen A. & De Vries S. 1992. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell*. 4:425-433.
16. Evans D. & Sharp W., Flick C. 1981. Growth and behaviour of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. In T. Thorpe (Ed), *Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture* Academic Press. New York. 45-113 p.
17. Freire M. 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*. 3(4):195-209.
18. Fuji J. Slade D., Olsen R., Ruzin S. & Redenbaugh K. 1990. Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. *Plant Science*. 72: 93-101.
19. Gárate M. 2009. Efecto de cuatro dosis de ácido-3-indolbutírico en el enraizamiento de ápices y segmentos nodales de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). Tesis Ing. eniero Agrónomo. Universidad Nacional de San Martín. Tarapoto, Perú. 80 p.
20. Gómez R. 1998. Embriogénesis somática. In Pérez, J. *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Cuba. Ediciones GEO. 57-59 p.
21. Guerrero J. 2007. Inducción de la embriogénesis somática en hojas inmaduras de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). Tesis Ing. Agrónomo. Universidad Nacional de San Martín. Tarapoto, Perú. 81 p.
22. Guillén M., Ruiz A., Cabo N., Chirinos R. & Pascual G. 2003. Characterization of sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil by FTIR Spectroscopy and H NMR. Comparison with linseed oil. *Journal of the American Oil Chemistry Society*. 80(8):755-762.

23. Gutiérrez L., Rosada L. & Jiménez A. 2011. Chemical composition of sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seed and characteristics of their lipid fraction. *Grasas y aceites*. 62(1):76-83.
24. Hamaker B., Valles C., Gilman R., Hardmeier R., Clark D., García H., Gonzales A., Kohlsted I., Castro M., Valdivia R., Rodríguez T. & Lescano M. 1992. Amino acid and fatty acid profiles of the inca peanut (*Plukenetia volubilis*). *Cereal Chemistry*. 69:461-463.
25. Hu C. & Wang J. 1983. Meristem, shoot tip and bud culture. En Evans, D.A; Ammirato, P.V; Yameda, Y. (Eds). *Handbook of plant cell culture*. MacMillan Publishing, Nueva York. 177-227 p.
26. Hurtado D. & Merino M. 1994. *Cultivo de tejidos vegetales*. Editorial Trillas S.A. México. 232 p.
27. Jiménez E. 1998. Cultivo de ápices y meristemas. En J. Pérez (Ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Cuba. Ediciones GEO. 45-56 p.
28. Linossier L., Veisseire P., Cailloux F. & Coudret A. 1997. Effects of abscisic acid and high concentrations of PEG on *Hevea brasiliensis* somatic embryos development. *Plant Science*. 124:183-191.
29. Manco E. 2006. *Cultivo de sachá inchi*. Sub Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología. Estación Experimental El Porvenir - INIA. Tarapoto, Perú. 11 p.
30. Martin K., Sunandakumari C., Chithra M., Madhusoodanan P. 2005. Influence of auxins in direct *in vitro* morphogenesis of *Euphorbia nivulia*, a lectinaceous medicinal plant. *In vitro Cellular and Development Biology*. 41:314-319.
31. Mc-Bride J. 1951. *Flora of Peru: Euphorbiaceae*. Botanical series vol. 13. Field Museum Natural History. 115-118 p.
32. Millones C. & Vásquez E. 2008. Micropropagación de plantas de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) provenientes de la provincia de Rodríguez de Mendoza, región Amazonas. *Investigaciones Amazonenses*. 2(1):7-11.
33. Murashige T. & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology plantarum*. 15:473-497.
34. Orellana P. 1998. Propagación vía organogénesis. En J. Pérez (Ed.), *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Cuba. Ediciones GEO. 151-178 p.

35. Pierik R. 1990. Cultivo *in vitro* de Plantas Superiores. Ediciones Mundi Prensa. España. 326 p.
36. Posada L., Gómez R., Gallardo J., Reyes M. & Herrera I. 2004. Establecimiento *in vitro* de ápices de plantas de campo del híbrido cubano de papaya IBP 42-99. *Biotecnología Vegetal*. 4(3):153-158.
37. Posada L., Gómez R. & Reyes M. 2007. Embriogénesis somática en *Carica papaya* L. var. Maradol rojo. *Biotecnología Vegetal*. 7(3):131-138.
38. Proyecto PERUBIODIVERSO. 2013. La cadena de valor del sachá inchi en la región San Martín. Análisis y lineamientos estratégicos para su desarrollo. Cooperación Alemana al Desarrollo – Agencia de la GIZ en el Perú. 58 p.
39. Pullman G., Johnson S., Peter G., Cairney J. & Xu N. 2003. Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. *Plant Cell Reports*. 21:747-758.
40. Rao C., Eganathan P., Anand A., Balakrishna P. & Reddy T. 1998. Protocol for *in vitro* propagation of *Excoecaria agallocha* L., a medicinally important mangrove species. *Plant Cell Reports*. 17:861-865.
41. Reinert J. 1958. Untersuchungen über die morphogenese in gewebeulturen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. 71:15-24.
42. Roca W. & Mroginski L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicación. Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT. Cali, Colombia. 969 p.
43. Rodríguez A., Corazón-Guivin M., Cachique D., Mejía K., Del Castillo D., Renno, J. & García-Dávila C. 2010. Diferenciación morfológica y por ISSR (inter simple sequence repeats) de especies del género *Plukenetia* (Euphorbiaceae) de la Amazonía Peruana: Propuesta de una nueva especie. *Revista Peruana de Biología*. 17(3):325-330.
44. Ruiz-Solsol H. & Mesén F. 2010. Efecto del ácido indolbutírico y tipo de estacilla en el enraizamiento de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Agronomía Costarricense*. 34(2):259-267.
45. Salas E., Agramonte D., Barbón R., Jiménez F., Collado R., Pérez M., Gutiérrez O. & Ramírez D. 2004. Establecimiento *in vitro* de morera. *Biotecnología Vegetal*. 4(1):15-19.

46. Serrano M. & Piñol M. 1991. *Biotecnología Vegetal*. Editorial síntesis. Madrid, España. 285 p.
47. Solis R., Olivera J. & La Rosa R. 2011. Propagación *in vitro* de *Carica papaya* L. var. PTM-331 a partir de meristemos apicales. *Revista Peruana de Biología*. 18(3):343-347.
48. Stasolla C., Kong L., Yeung E. & Thorpe T. 2002. Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 38(2):93-105.
49. Steward F., Mapes M. & Mears K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. *American Journal of Botany*. 45:705-708.
50. Tiserrat B., Esan E. & Murashige T. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. *Horticultural Reviews*. 1:1-78.
51. Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J. & Filonova L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69(3):233-249.
52. Wilhelm E. 1999. Micropropagation of juvenile sycamore maple via adventitious shoot formation by use of thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 57:57-60.
53. Yeung E., Rahman H. & Thorpe T. 1996. Comparative development of zygotic and microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. CV Topas. *Histodifferentiation*. *International Journal of Plant Science*. 157(1):27-39.

ANEXOS

ANEXO 1: Análisis de varianza para la fase de establecimiento: Altura de plántula (mm) y número de brotes.

ANVA 1: Altura de plántula (mm)

Fuente de variación	G. L.	S. C.	C. M.	F calc
Tratamientos	8	367,88	45,98	124,24 **
Error	36	13,33	0,37	
Total	44	381,20		
C.V.	6,21			
Promedio	9,80			

ANVA 2: Número de brotes

Fuente de variación	G. L.	S. C.	C. M.	F calc
Tratamientos	8	0,7	0,09	3,51 **
Error	36	0,9	0,03	
Total	44	1,6		
C.V.	12,88			
Promedio	1,23			

ANEXO 2: Análisis de varianza para la fase de multiplicación empleando BAP como fuente de citoquinina: Altura de plántula (mm), número de brotes y número de nudos por brote.

ANVA 1: Altura de plántula (mm)

Fuente de variación	G. L.	S. C.	C. M.	F calc
Tratamientos	8	59,68	7,46	18,98 **
Error	36	14,15	0,39	
Total	44	73,83		
C.V.	4,01			
Promedio	15,62			

ANVA 2: Número de brotes

Fuente de variación	G. L.	S. C.	C. M.	F calc
Tratamientos	8	1,56	0,19	2,58 *
Error	36	2,75	0,08	
Total	44	4,29		
C.V.	14,44			
Promedio	1,91			

ANVA 3: Número de nudos por brote

Fuente de variación	G. L.	S. C.	C. M.	F calc
Tratamientos	8	0,96	0,12	3,43 **
Error	36	1,23	0,03	
Total	44	2,21		
C.V.	8,63			
Promedio	2,16			

ANEXO 3: Análisis de varianza para la fase de multiplicación empleando kinetina como fuente de citoquinina: Altura de plántula (mm), número de brotes y número de nudos por brote.

ANVA 1: Altura de plántula (mm)

Fuente de variación	G. L.	S. C.	C. M.	F calc
Tratamientos	8	3,99	0,49	2,73 *
Error	36	6,58	0,18	
Total	44	10,56		
C.V.	3,1			
Promedio	13,76			

ANVA 2: Número de brotes

Fuente de variación	G. L.	S. C.	C. M.	F calc
Tratamientos	8	1,25	0,16	3,27 **
Error	36	1,73	0,05	
Total	44	2,98		
C.V.	13,09			
Promedio	1,67			

ANVA 3: Número de nudos por brote

Fuente de variación	G. L.	S. C.	C. M.	F calc
Tratamientos	8	0,91	0,11	2,86 *
Error	36	1,43	0,04	
Total	44	2,33		
C.V.	9,44			
Promedio	2,11			

ANEXO 4: Análisis de varianza para la fase de enraizamiento: número de raíces y longitud de raíces (mm).

ANVA 1: Número de raíces

Fuente de variación	G. L.	S. C.	C. M.	F calc
Tratamientos	5	18,19	3,63	2,84 *
Error	24	30,78	1,28	
Total	29	48,98		
C.V.	49,24			
Promedio	2,30			

ANVA 2: Longitud de raíces (mm)

Fuente de variación	G. L.	S. C.	C. M.	F calc
Tratamientos	5	389,89	77,98	8,77 **
Error	24	213,43	8,89	
Total	29	603,32		
C.V.	34,90			
Promedio	8,55			

ANEXO 5: Análisis de varianza para número de estructuras embrionarias globulares en callos de sachá inchi obtenidos a partir de hojas inmaduras y embriones cigóticos.

ANVA 1: Número de embriones somáticos globulares

Fuente de variación	G. L.	S. C.	C. M.	F calc
Tratamientos	1	21,39	21,39	42,22**
Error	4	2,02	0,51	
Total	5	23,41		
C.V.	13,93			
Promedio	5,11			

ANEXO 6: Análisis de varianza para número de estructuras embrionarias acorazonadas en fase de maduración de embriones somáticos.

ANVA 1: Número de embriones somáticos corazados

Fuente de variación	G. L.	S. C.	C. M.	F calc
Tratamientos	8	8,55	1,06	2,96*
Error	27	9,75	0,36	
Total	35	1,3		
C.V.	166,41			
Promedio	0,36			

ANVA 2: Número de plántulas regeneradas

Fuente de variación	G. L.	S. C.	C. M.	F calc
Tratamientos	8	1,55	0,19	2,63*
Error	27	2	0,07	
Total	35	3,55		
C.V.	44,94			
Promedio	0,36			