

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**Introducción *in vitro* de *Caesalpinia spinosa* "tara"
Ayacucho - 2008**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
BIÓLOGA
CON MENCIÓN EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:
BACH. SALAS RIPAS, Raquel Eva**

**AYACUCHO- PERÚ
2013**

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso.

A mi padre Víctor.

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga “Alma Mater” que imparte cultura, ciencia y tecnología, en gratitud a las enseñanzas aprendidas durante mi carrera universitaria.
- A los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas por brindarme sus conocimientos y compartir sus experiencias para formarme profesionalmente y ser útil para la sociedad.
- Mi más sincero agradecimiento, a la Mg. Paula García Godos Alcázar, por su asesoramiento y orientación constante en la ejecución y redacción del presente trabajo de investigación.
- A aquellas personas que directa e indirectamente han contribuido incondicionalmente en la materialización del presente trabajo.

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
RESUMEN	v
I.INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. <i>Caesalpinia spinosa</i> "tara"	4
2.3. Características botánica	5
2.4. Importancia	7
2.5. Cultivo de tejidos	9
2.6. Medio de cultivo	10
2.7. pH	17
2.8. Asepsia	18
2.9. El explante	19
2.10. Factores físicos	20
2.11. Micropropagación	22
2.12. Otros componentes del medio	23
2.13. Propagación y mejoramiento de forestales	25
2.14. Limitaciones de especies forestales	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Lugar de ejecución material	28
3.2. Material vegetal	28
3.3. Diseño metodológico para recolección de datos	28
3.3. Condiciones de incubación.	32
3.4. Evaluación	32
3.5. Análisis estadístico	32
IV. RESULTADOS	34
V. DISCUSIONES	46
VI. CONCLUSIONES	52
VII. RECOMENDACIONES	53
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXOS	57

Título: Introducción *in vitro* de *Caesalpinia spinosa* "tara" Ayacucho - 2008.

Autora: Bach. Raquel Eva Salas Ripas

Asesora: Mg. Paula García Godos Alcázar

RESUMEN

La presente investigación se desarrolló, con la finalidad de identificar protocolos para la propagación *in vitro* de *Caesalpinia spinosa* "tara". Los objetivos fueron los siguientes: Optimizar los métodos de desinfección, estandarizar el medio de cultivo *in vitro* y desarrollar un protocolo de micropropagación.

Las semillas procedentes de la localidad de Ocopa (distrito de Pacaicasa) a 2 530 m.s.n.m, fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1,0 % y dos gotas de tween 20 durante diez minutos, las semillas fueron germinadas en placas petri con algodón y ácido giberélico al 1,0 ppm, obteniéndose un 95 % de germinación.

En la fase de establecimiento de los hipocotilos se utilizó los constituyentes del medio de Murashige y Skoog (1962), suplementado con mio- inositol (0,1 g/l), carbón al 2 %, agua de coco al 15 % y ácido ascórbico (100 mg/l) lo que alcanzó un 75 % de explante sin oxidación.

En la etapa de multiplicación de las yemas laterales, nudos y entrenudos, se obtuvo éxito utilizando el medio Murashige y Skoog suplementado con ANA (1,5 ppm), BAP (0,25 ppm) y agua de coco al 15 %, logrando un 85 % de brotación y mayor número de hojas.

La etapa de enraizamiento se trabajó con el medio Murashige y Skoog a la mitad de su concentración adicionado con ANA (1,0 ppm) y agua de coco al 15 %, logrando un 76,5 % de plántulas con formación de raicillas.

Lográndose establecer los métodos de desinfección, estandarización del medio de cultivo y la micropropagación de *Caesalpinia spinosa*.

Palabras claves: *Micropropagación de tara, medio de cultivo, enraizamiento.*

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente el éxito obtenido en la regeneración de plantas libres de virus, partiendo de los trabajos de Morel en 1952, que han producido comercialmente un centenar de especies herbáceas, no han sido posible más que en contadas especies de frutales y forestales. Entre las especies rebeldes, más recientemente llamadas "recalcitrantes", están el duraznero (*Prunus pérsica*) y numerosos cítricos (Mosella y Ascui, 1991).

En este sentido, la biotecnología ha cumplido un papel importante en el desarrollo de técnicas de propagación clonal por cultivo *in vitro* o la micropropagación, constituyéndose así como uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado en especies que no eran posible propagarse por técnicas convencionales (estacas, acodos, injertos y otros); incentivando a procesos de conservación y preservación de especies nativas con alto valor económico que se encuentran amenazadas y/o en vías de extinción (Sharry, 2001).

La *Caesalpinia spinosa* "tara", es una especie forestal nativa no maderable considerada como un extraordinario producto de exportación por su alto contenido de taninos. Estos taninos son utilizados para la producción de gomas,

polvo de tara y ácido gálico, que son utilizados por diversas industrias para la generación de numerosos productos de interés.

La prioridad de la presente investigación fue desarrollar métodos de propagación (introducción y micropropagar) a fin de obtener líneas utilizables en programas de selección de cultivares promisorios.

Si se tuvieran estandarizados los métodos para el cultivo *in vitro* de esta especie podríamos ofrecer un banco de germoplasma, semillas sintéticas, producción de nuevos híbridos y producción de haploides.

Por tanto, el cultivo *in vitro* se presenta como una excelente alternativa para propagar y conservar una amplia gama de especies reproduciendo clones de alto valor y calidad genética. En este sentido se planteó los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL:

Introducir y micropopagar plantas de *Caesalpinia spinosa* "tara".

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Optimizar los métodos de desinfección para la introducción *in vitro* de *Caesalpinia spinosa* "tara".
2. Estandarizar el medio del cultivo *in vitro* de la "tara".
3. Desarrollar un protocolo de micropropagación de *Caesalpinia spinosa* "tara".

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

La utilización de la técnica de propagación *in vitro* de especies vegetales se inició hace más de 130 años, cuando Sacks y Knops , observaron que los principales nutrientes de las plantas superiores eran sustancias inorgánicas, logrando preparar una solución nutritiva que los contenía, eventos que permitieron el desarrollo de una de las técnicas que actualmente forma parte de una actividad multidisciplinaria (Biotecnología Vegetal) que recientemente sirve de apoyo a los principales programas de mejoramiento genético en plantas tanto nacional como mundial (CIRGEBV, 1994).

Sánchez (2006), identificó protocolos de propagación de *Caesalpinia spinosa* "tara", el método de desinfección fue con formol al 37 % por un tiempo de 40 minutos logrando reducir la contaminación en un 26 %; en la fase de establecimiento utilizó Murashige y Skoog de 1962, suplementado con 50 mg/l de tocoferol, 3 % de carbón activo, 2 % de sacarosa, 0,5 mg/l de BA y 2,3 gr de phytigel, favoreciendo un 63 % de brotación y sólo un 11% de explantes oxidados. El mejor medio de multiplicación fue con Murashige y Skoog de 1962,

más 0,5 mg/l de BA, 0,5 mg de TDZ y 0,5 mg/l de AG₃ que dio como resultado el desarrollo de 3 brotes laterales por explantes en 28 días.

Lozano (2011), menciona que la desinfección de plántulas de “tara” más efectiva se logró con hipoclorito de sodio al 1,5 % por 15 minutos alcanzando un 66,67 % de sobrevivencia; para la oxidación la estrategia más efectiva fue con carbón activado y controlando la oscuridad; el medio de establecimiento fue Murashige y Skoog de 1962, completo y a media concentración adicionado con 6-bencilaminopurina; para la multiplicación se utilizó los medios basales adicionado con 6-bencilaminopurina sólo y combinado con kinetina, ambas resultaron más eficientes; el medio de enraizamiento Murashige y Skoog de 1962, a la mitad adicionado con AIA 1,0 mg/l y 0,5 mg/l de la misma la cual se logró un 40 % de enraizamiento y una longitud de raíz principal de 1,73 cm.

De la Cruz (2009), realizó investigaciones muy importantes sobre la “tara” y su mercado.

Como parte de esta investigación abarco un amplio campo de estudio de obtención de taninos, ácido gálico y de gomas o hidrocaloides de *Caesalpinia spinosa*; con el fin de propiciar un aprovechamiento integral y racional de esta especie.

Los estudios realizados en *Caesalpinia spinosa* “tara”, son escasos en cultivo *in vitro*, en general son relativos a manejos de viveros, obtención de ácido gálico, actividad fitoquímica, etc.

2.2. *Caesalpinia spinosa* “tara”

2.2.1. Clasificación taxonómica

Describen la taxonomía de la tara Engler y Prantl en 1954, citado por Mostacero y Mejía (1993).

División : Antophyta
Clase : Dicotiledóneae
Subclase : Archyclamídeas
Orden : Leguminales
Familia : Caesalpinaceae
Género : *Caesalpinia*
Especie : *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze.

Nombre Común: "tara", "taya" (Perú), "dividivi de tierra fría", "guarango", "cuica", "serrano", " tara" (Colombia), "vinillo", "guarango" (Ecuador); " tara" (Bolivia, Chile, Venezuela).

Sinónimos: *Caesalpinia tinctoria* (H.B.K) Bentham ex Reiche

Poinciana spinosa Molina

Caesalpinia pectinata Cavanilles

Coulteria tinctoria HBK.

Tara spinosa (Molina) Britt & Rose

2.3. Caracterización botánica:

Según Araujo (1998) la especie evaluada posee las siguientes características:

Es un árbol pequeño en sus inicios, de dos a tres metros de altura; pero puede llegar a medir hasta 12 m., en su vejez; con un diámetro a la altura de pecho (DAP) de 20 - 40 cm de fuste.

La raíz posee un sistema radicular circular que le permite afrontar la sequedad del suelo; sin embargo, es muy susceptible al frío intenso. Se caracteriza por tener una raíz pivotante y raíces secundarias que se desarrollan alrededor de la planta en forma circular, con diversas modificaciones, que en zonas áridas le permiten alcanzar las fuentes de agua relativamente distantes.

El tallo tiene un sólo eje central, con ramificaciones laterales desde el medio hasta la parte superior, con un grosor de 20 a 40 cm. Es de consistencia leñosa y su color varía de claro a oscuro.

Las hojas son compuestas, bipinnadas, alternas, sin estípulas y dispuestas en espiral, con seis a ocho pares de folíolos opuestos. Los folíolos son oblongos, lisos, glabros, de color verde y borde entero. Las hojas miden de ocho a 15 cm de largo y presentan espinas tanto en el raquis como en el peciolo.

Según ALNICOLSA (2008) describe las flores y el fruto de *Caesalpinia spinosa* "tara" como sigue:

Inflorescencia con racimos terminales de 15 a 20 cm de longitud, con flores ubicadas en la mitad distal, heteroclamídeas, pentámeras, zigomorfas, cáliz con cinco pétalos verdes, corola con cinco pétalos libres de color amarillo estambre libre en número de diez, ovario súpero, unilocular y multiseminado.

Los frutos son de tipo legumbre o vaina explanadas, encorvadas e indehiscentes de color naranja rojizo de ocho cm a diez cm de largo y dos cm de ancho aproximadamente. En estado no maduro la vaina es de color verde y cuando madura se torna de un color naranja y/o roja y de textura coriácea que contienen de cuatro a siete granos de semilla; el fruto contiene un mesocarpio esponjoso, arenoso y rico en proteínas.

Tabla N° 01: Característica del fruto de *Caesalpinia spinosa* "tara"

Peso	Diámetro	Largo	Espesor	Color
1,0 a 2,5 g	2,0 a 2,5 cm	8,0 a 10,0	0,5 a 0,8	Naranja rojizo

Fuente: ALNICOLSA, 2008.

Tabla N° 02: Porcentaje de las partes principales del fruto de *Caesalpinia spinosa* “tara”

Epicarpio	Mesocarpio	Endocarpio	Semilla
1,58%	60,83%	3,97%	33,62%

Fuente: ALNICOLSA, 2008.

Las semillas son redondeadas, ovoides, ligeramente aplanadas de 0,6 a 0,7 cm de diámetro, presentan un 44 % de cáscara (testa) que se utiliza como combustible, un 28 % de germen (cotilidón) que es utilizado en la alimentación del ganado y un 24 % del endospermo (goma) es utilizado en la industria de alimentos.

2.4. Importancia

Actualmente la “tara” es considerada una planta con enorme potencial médico, alimenticio e industrial. Su carácter deseado como materia prima a nivel mundial es por poseer un inmenso potencial para la producción de hidrocoloides o gomas, taninos y ácido gálico, entre otros. Además de ser especie forestal, tiene una importancia ambiental y económica (IDESI, 2008).

En este sentido, debemos señalar que el significado del término “tara” no está relacionado a un área geográfica o lugar determinado, sino más bien ésta planta es producida en varias zonas del país, estando cultivada en terrenos situados entre los 1 000 y 2 900 m.s.n.m., siendo sus principales productores las Regiones de Cajamarca, La Libertad, Ayacucho, Huancavelica, Apurímac, Ancash y Huánuco (ALNICOLSA, 2008).

Es un cultivo que el 97 % de la producción mundial proviene de los bosques naturales y algunas áreas sembradas principalmente en el Perú; además cada

árbol de "tara" puede rendir un promedio de 20 kg a 40 kg de vaina cosechándolos dos veces al año. Generalmente un árbol de "tara" da frutos a los tres años, y si es silvestre a los cuatro años, los costos de plagas y enfermedades no son aún muy significativos. Su promedio de vida es de cien años y el área que ocupa cada árbol es de 10 metros cuadrados (ALNICOLSA, 2008).

El mercado mundial en estos últimos años ha experimentado un cambio gradual y significativo del hábito de consumo orientado al consumo de productos naturales u orgánicos, además de los resultados negativos de adaptación del cultivo de "tara" en el continente Asiático, ha motivado un creciente interés en los inversionistas europeos y asiáticos por el establecimiento comercial del cultivo en América del Sur. Últimamente en el mercado nacional comercializa caramelos de tara con muy buena aceptación por el público por lo novedoso y funcional de la golosina. Esta planta nativa del Perú es uno de los cultivos más sorprendentes por el uso intensivo de sus derivados en varios campos de la industria mundial (MINCETUR, 2005).

La producción y productividad tanto en volumen y contenidos de taninos, siempre serán bajas e insuficientes para satisfacer las demandas de las industrias tánicas y de hidrocoloides. Con estas características de las poblaciones de "tara" el Perú actualmente es el principal productor de vainas de esta especie, exporta aproximadamente sólo 6 600 TM por año, que representa el 80 % de la exportación total mundial; y el 20 % es cubierta por otros países.

La demanda actual mundial de productos de la vaina de "tara" es de 42 300 TM y se oferta solamente 8 300 TM, quedando una brecha por satisfacer esta demanda, de 34 000 TM /año hasta el 2005.

La goma de "tara" es un producto orgánico aprobado por la Unión Europea y MERCOSUR, como aditivo alimenticio (E417).

La vaina separada de la pepa se muele y es un extraordinario producto de exportación como materia prima para la obtención del ácido tánico muy usado en las industrias peleteras de alta calidad farmacéutica, química, de pinturas, entre otras.

Estamos entrando en la era de oro de la fitoquímica, y debemos de hacer los esfuerzos para que, este oro verde del Perú, sea en provecho de todos los peruanos (ALNICOLSA, 2008).

2.5. Cultivo de tejidos vegetales

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

Como técnica se fundamenta en la posibilidad de cultivar *in vitro*: células, tejidos u órganos vegetales y regenerar, a partir de ellos obtendremos plantas completos (Quintero, 1990).

Si el proceso de cultivo es muy eficiente obtendremos miles de individuos clonales (García y Quintero, 1993).

Es necesario además adoptar un procedimiento de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana (Li-Chun y Col., 1988).

Por otra parte, el conocimiento del manejo *in vitro* de estas especies, es una etapa previa indispensable para el desarrollo de sistemas de selección y manipulación genética con fines de mejoramiento genético (García y Quintero, 1993).

La aplicación biotecnológica más factible para el sector de especies forestales en el corto plazo es la micropropagación, además facilita estudios básicos de

fisiología, genética, bioquímica, obtención de plantas libres de patógenos a partir de meristemas, conservación e intercambio de gemoplasma (Góngora y Col., 1994).

2.6. Medios de cultivo

El medio de cultivo es un soporte que contiene los nutrientes orgánicos e inorgánicos (Hurtado y Merino, 1987). Los nutrientes son esencialmente para el crecimiento y desarrollo de la planta, sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir *in vitro* o *in vivo* (Pierik, 1990).

Los medios de cultivo empleados para los tejidos aislados de plantas tienen diversas composiciones y se emplean como líquidos o geles (Roca y Mroginsk, 1991).

Los constituyentes básicos incluyen todos los elementos minerales esenciales para el desarrollo de la planta; azúcar usualmente sucrosa y algunas veces como la glucosa (Li-Chun y Col, 1988).

Se agregan frecuentemente: aminoácidos, adenina, derivados fenólicos, otros metabolitos y complejos como agua de coco, caseína hidrolizada, extracto de malta y extracto de levadura, jugo de plátano, jugo de tomate, etc. (Roca y Mroginsk, 1991).

Los requerimientos nutritivos, para el crecimiento *in vitro* óptimo, varían con la especie e incluso son específicos de acuerdo a la parte de la planta, que se está cultivando y a la respuesta que se desee obtener (CIAT, 1995). Debido a estas necesidades específicas se han desarrollado muchas formulaciones para los medios de cultivo.

El medio Murashige y Skoog de 1962, es muy usado particularmente si el objetivo es generar plantas. Existen numerosas variaciones comerciales de este

medio. En general, los componentes del medio de cultivo pueden agruparse en dos categorías:

- a) Los componentes inorgánicos, donde se incluyen el agua y las sales minerales (macronutrientes y micronutrientes).
- b) Los componentes orgánicos, donde se incluyen vitaminas, carbohidratos, aditivos orgánicos complejos, reguladores de crecimiento y agar (Delgado y Rojas, 2001).

2.6.1. Componentes inorgánicos

a) Agua

El agua es el mayor componente utilizado en la preparación del medio de cultivo. Su potabilización no elimina las impurezas que a menudo afectan el normal crecimiento de los cultivos, de allí la necesidad de su destilación y deionización o desmineralización, la bidestilación reduce aún más la posibilidad de encontrar impurezas (Delgado y Rojas, 2001).

b) Sales minerales

En general, los vegetales requieren de elementos minerales para su desarrollo bajo la forma de macronutrientes y micronutrientes (CIRGEBV, 1994).

Los macronutrientes incluyen al C, H, O, P, K, N, S, Ca y Mg, los que son incluidos en la forma de sales inorgánicas, aún cuando el nitrógeno y el azufre pueden también ser incorporados en compuestos orgánicos. El término macronutriente está referido para los casos en que su incorporación al medio este en una concentración mayor de 30 ppm (mg/l) (Delgado y Rojas, 2001).

Los micronutrientes que deben ser incorporados al medio basal son: B, Zn, Mn, Cu, Mo, Co, Cl, I y recientemente se ha destacado el rol de Niquel. El término micronutriente está referido para los casos en que su concentración es menor de 30 ppm (mg/l) (Delgado y Rojas, 2001).

2.6.2. Componentes orgánicos

a) Carbohidratos

Normalmente para el cultivo *in vitro* de células, tejidos u órganos es necesario adicionar una fuente de carbono en el medio, ya que el crecimiento *in vitro* tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis o incluso en oscuridad. La sacarosa es la más utilizada para propósitos de micropropagación. Generalmente se usan en concentraciones de 1 - 5 % de sacarosa en el medio. El azúcar blanca refinada que se vende en los supermercados puede resultar apropiados para la micropropagación en muchos casos (Pierik, 1990).

b) Vitaminas

Las vitaminas más usadas es la tiamina (de 0,1 a 1 mg/l), el ácido nicotínico (0,5 mg/l) y la piridoxina (0,5 mg/l) son necesarios para algunos tejidos vegetales y se les puede añadir de modo rutinario (Hudson y Hartmann, 1986). Otras vitaminas (ácido pantoténico, biotina, rivo flavina y colina) pueden ser útiles pero no absolutamente necesarias (Krikorian, 1991).

A veces se utilizan altas concentraciones de ácido ascórbicos que varia de (1-100 mg l⁻¹), lo que no quiere decir exactamente que la planta tenga unas necesidades elevadas. La vitamina C, se utiliza en estas concentraciones elevadas como antioxidante (Pierik, 1990).

c) Mio-Inositol

Agrupado frecuentemente en las vitaminas, este compuesto es en verdad un hexitol o compuesto ciclico de 6 carbonos saturados con un grupo -OH. Desde la época de White ha sido utilizado casi componente obligado en todo medio de cultivo y a una concentración inusualmente alta como 100 mg/l a más, en relación a las concentraciones de las vitaminas y hormonas vegetales.

El mio-inositol es un componente esencial para el crecimiento y la diferenciación de los callos (Peña, 2002).

También participa en la conjugación de las auxinas, donde mediante una reacción enzimática se forma el compuesto auxina- inositol que no es activo como hormona vegetal, pero la auxina recupera dicha actividad cuando por otra reacción enzimática es liberada del inositol. Asimismo, el mio-inositol interviene en la síntesis de las paredes celulares, en células cultivadas y protoplastos (Delgado y Rojas, 2001).

d) Aminoácidos

Se agregan también frecuentemente aminoácidos como la adenina y derivados fenólicos. Aunque las células cultivadas son capaces de sintetizar todos los aminoácidos necesarios. La adición de L-glutamina (2 – 8 mM) o una mezcla de aminoácidos es a menudo beneficiosa. Esto particularmente importante en cultivo de células y protoplastos (Peña, 2002).

e) Sustancias complejas y otros aditivos orgánicos

Entre las muchas sustancias usadas en cultivo de tejidos y que son consideradas complejas, como por ejemplo: el extracto de levadura (incluida en el grupo de los aminoácidos), la de mayor utilización es, sin duda, el agua de coco o endospermo líquida de coco y complementariamente las purinas y pirimidinas (Delgado y Rojas, 2001).

f) Material Inerte

El agente tradicionalmente utilizado para la preparación de los medios sólidos (gel) es el agar. Más recientemente se encuentra el gelrite que se produce en fermentación más puro y de calidad más consistente y se utiliza en concentraciones menores (Villegas, 1990).

El agar es el material de soporte más ampliamente usado en el cultivo de tejido, pues provee al medio de un excelente gel húmedo que sirve como soporte al inóculo, sin embargo, fisiológicamente no es inerte, pues que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulante de crecimiento.

Otros gelificante usados algunas veces en lugar del agar son la poliacrilamida y la silicagel (Hurtado y Merino, 1987).

2.6.3. Reguladores de crecimiento

Las hormonas son por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores. El regulador del crecimiento vegetal, se define a los compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas (Margara, 1998).

Las fitohormonas u hormonas vegetales son sustancias químicas que son producidas por ciertas células vegetales en sitios estratégicos de la planta y estas hormonas son capaces de regular de manera predominante los fenómenos fisiológicos de las plantas. Las fitohormonas se producen en pequeñas cantidades en tejidos vegetales, a diferencia de las hormonas animales, sintetizadas en glándulas. Pueden actuar en el propio tejido donde se generan largas distancias, mediante transporte a través de los vasos xilemáticos y floemáticos. Las hormonas vegetales controlan un gran número de sucesos, entre ellos el crecimiento de las plantas, la caída de las hojas, la floración, la formación del fruto y la germinación. Una fitohormona interviene en varios procesos, y del mismo modo todo proceso está regulado por la acción de varias fitohormonas. Las características compartidas de este grupo de reguladores del desarrollo consisten en que son sintetizados por la planta, se encuentran en muy bajas concentraciones en el interior de los tejidos, y pueden actuar en el lugar

que fueron sintetizados o en otro lugar, de lo cual concluimos que estos reguladores son transportados en el interior de la planta.

Los efectos fisiológicos producidos no dependen de una sola fitohormona, sino más bien de la interacción de muchas de estas sobre el tejido en el cual coinciden.

Actualmente como otras hormonas vegetales conocidas están:

a) Auxinas

Las auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; sin embargo, se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos.

Existen varias auxinas llamadas "naturales", que incluyen AIA, indol-3-acetonitrilo, etilindol-3-acetato, y otras; es probable, que a medida que se realicen más investigaciones, se descubran más sustancias de esta naturaleza. De las auxinas "naturales", el AIA es el compuesto de mayor utilización (Krikorian, 1991).

También se utiliza ampliamente un gran número de sustancias que provocan un efecto fisiológico similar y que se han producido sintéticamente, son las llamadas "auxina sintéticas" entre las cuales el 2,4-D, el ANA y el AIB, se encuentran ampliamente disponibles y se utilizan comúnmente (Hurtado y Merino, 1987).

En la práctica, el uso de las auxinas es un arte. No es posible establecer una concentración particular de las auxinas que se debe utilizar en un solo caso. Sin embargo, en general se utiliza el AIA en concentraciones que varían de 0.001 a 10 mg/l, con un punto óptimo de 0,1 a 1 mg/l; el 2,4-D, se utiliza en concentraciones que varía de 0,1 a 10 mg/l, con un punto óptimo que

frecuentemente se encuentra de 1 a 5 mg/l; el ANA generalmente se utiliza en concentraciones mayores (1 a 10 mg/l), con un punto óptimo de 2 mg/l (Peña, 2002).

b) Citoquininas

Skoog propuso el nombre cinina como un nombre genérico para sustancias naturales y sintéticas que presentaban los mismos tipos de actividad biológicas que la KIN (6-FurfuriL-aminopurina). Con el fin de evitar confusión con el término cinina, según se utilizaba en los sistemas animales, un poco más tarde se adoptó la palabra citocinina para designar las sustancias de división celular.

La KIN ha recibido mucha atención como una sustancia estimuladora de la división celular; no se ha demostrado que esté presente como un compuesto natural.

La ZEA (6-[4-hidroxi-ε-metilbuti-trans-2-enilamino]purina) se considera generalmente como el prototipo de las adenilcitoscininas que ocurren naturalmente, es diez veces más potente que la KIN.

Otra citocinina sintética, es BAP, se utiliza actualmente más que la KIN o la ZEA. Es un compuesto muy activo y se encuentra disponible fácilmente, a un costo razonable (Hurtado y Merino, 1987).

c) Giberelinas

Las giberelinas se sintetizan, principalmente, en las hojas jóvenes y en las semillas, en cuyo endospermo se ha encontrado un receptor no identificado. El nivel del ácido giberélico aumenta conforme se desarrolla el embrión y luego decrece cuando la semilla madura. La primera giberelina purificada y aislada fue el AG₃ (la más empleada al igual que AG₁, AG₄ y AG₇) y hasta ahora se conoce un gran número de ellas, llegando más allá del AG₉₀; pero no todas aparecen en

las plantas superiores y muchas de ellas no son activas, posiblemente, por carecer de receptor. El ácido giberélico alarga los tallos de las plantas en roseta y en otras formas enanas, mientras que el efecto de plantas normales es mucho menor. En general, las giberelinas inducen la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemas o yemas *in vitro*; rompe la dormancia de las semillas, nudos, comos y bulbos; promueve la degradación de reservas en semillas y causa la elongación del tallo. Otros investigadores señalan que las giberelinas inhiben la formación de raíces adventicias y la formación de vástagos (Peña, 2002).

2.7. El pH

En cultivo de tejidos, el pH es por lo general ajustado con HCl y NaOH o KOH (0,1 – 1,0 M), después de adicionar todos los constituyentes del medio de cultivo con excepción del agente gelatinizador (Delgado y Rojas, 2001).

Se supone que el pH en el rango 5,0 – 6,5 es apto para el crecimiento, con un máximo alrededor de 6,0. Un pH bajo (menor de 4,5), o alto (mayor que 7), generalmente frena el crecimiento y desarrollo *in vitro*.

Si el pH es demasiado bajo, pueden presentarse las siguientes complicaciones:

1. La auxina AIA y el ácido giberélico se hacen menos estables.
2. El agar pierde su rigidez.
3. Algunas sales (fosfato o hierro) pueden precipitar.
4. La vitamina B1 y el ácido pantoténico se hacen menos estables.
5. Se retarda la absorción de iones amonio.

El pH varía con el autoclavado, si se parte de un pH en el rango 5,0 – 7,0, generalmente sufre un descenso de 0,3 - 0,5 unidades (Pierik, 1990).

Una vez ajustado el pH del medio, este sufrirá una ligera acidificación durante el proceso de esterilización en autoclave, para después evolucionar nuevamente durante el curso del cultivo, de forma que habitualmente se va acidificando progresivamente como resultado de la absorción diferencial de algunos componentes del medio de cultivo, así como de la excreción de exudados por parte del explante (en caso de material contaminado) (Peña, 2002).

2.8. La asepsia

Para establecer cultivos asépticos es conveniente o necesario:

- a) Trabajar en ambientes adecuados.
- b) Esterilizar los medios de cultivos.
- c) Desinfectar superficialmente los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos; y
- d) Realizar los cultivos respetando ciertas normas de asepsia (Roca y Mroginsk, 1991).

La cámara de flujo laminar es necesario para garantizar la asepsia dentro del área de trabajo, en donde se realiza el cultivo *in vitro* propiamente dicha, y es donde se deben tomar las precauciones necesarias para evitar la contaminación.

La cámara de flujo laminar se debe encender 15 minutos antes de su uso, evitando la interrupción o inversión del flujo de aire, colocar los instrumentos utilizados directamente en alcohol de 96 %, o en el esterilizador seco (incinerador bacteriológico), y finalmente evitar introducir la cabeza (cabello) en el interior de la cámara. En algunos laboratorios se conectan lámparas ultravioletas durante la noche para desinfectar el aire (Pierik, 1990).

La asociación explante – medio de cultivo y las condiciones en que se incuban los explantes conforman un ambiente propicio al desarrollo y la proliferación de microorganismos, como bacterias y hongos, principalmente; los cuales pueden

destruir los cultivos, compitiendo con el explante por el medio de cultivo. La contaminación puede originarse de varias fuentes del tejido vegetal, medio de cultivo, área de trabajo, ambiente de los cuartos de cultivos y el operador (Peña, 2002).

En algunos casos resulta útil el agregar agente tensoactivo (por ejemplo, Tween 20, del 0,01 % al 0,1 %). Asimismo, es conveniente agitar (80 - 150 rpm) el explante conjuntamente con la solución desinfectante; y realizar un mínimo de tres enjuagues sucesivos con agua destilada estéril (Roca y Mroginsk, 1991).

2.9. El explante

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento del cultivo *in vitro* (Roca y Mroginsk, 1991).

Todos los cultivos se inician a partir de un explante que puede ser un fragmento de tejido u órgano de cualquier parte de la planta (tallo, hoja, raíz, semilla, yemas, meristemas, anteras, etc).

Los explantes se tratan con alcohol e hipoclorito de sodio o calcio y se lavan exhaustivamente con agua estéril para eliminar los microorganismos que se encuentran en su superficie. Una vez desinfectados se incuban en un frasco de cultivo adecuado (tubo de ensayo, matraz de Erlenmeyer, caja de Petri, frasco Gerber, caja magenta, etc), que contiene el medio de cultivo líquido o semisólido (adicionado con agar) del que se nutrirán las células. A partir de este momento las células o tejidos se comportarán de diferente forma, dependiendo de los factores físicos, pero, principalmente, del tipo de nutrientes y de las concentraciones de los reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas) presentes en el medio (Serrano y Piñol, 1991).

2.10. Factores físicos

Los factores físicos influyen sobre el desarrollo y crecimiento de las plántulas *in vitro* y muchas veces tienen un efecto determinante. La luz y la temperatura han sido los factores físicos más extensivamente estudiados. La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre 24 y 28 °C (Villalobos y Thorpe, 1991).

El papel de la luz en la diferenciación involucra varios componentes como son: la intensidad, el fotoperíodo y la calidad. Es importante que los cultivos sean incubados en condiciones controladas, por lo menos en lo que se refiere a la luz y temperatura.

a) Luz

La influencia de la luz en la diferenciación involucra varios componentes como son: la intensidad, el fotoperíodo y la calidad de la luz. Las necesidades de luz deben ser divididas en tres partes: la intensidad (W/m^2), la duración (fotoperíodo) y la calidad (longitud de onda - espectro luminosa).

Estos requerimientos son distintos para los tejidos mantenidos *in vivo* donde tiene un comportamiento autótrofo. Como fuente de energía se adiciona sucrosa, a pesar de ello, los procesos fotosintéticos se dan a este nivel aunque en una tasa muy reducida. Este nivel de fotosíntesis puede inducir o favorecer en la organogénesis. Además como consecuencia de variaciones en el fotoperíodo se puede activar receptores que estén involucrados en los procesos de diferenciación (Medina, 1990).

En algunas especies se ha encontrado que se puede inducir la organogénesis al transferir explantes a la luz, luego de haber sido sometidos a un período de oscuridad por varias semanas (Villalobos y Thorpe, 1991).

b) Temperatura

La temperatura es un factor muy importante que influye en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Así, en condiciones de cultivo *in vitro*, también afecta al explante en la mayoría de los procesos fisiológicos y, por consiguiente, es un factor fundamental a controlar.

Las variaciones de temperatura puede alterar los niveles hormonales de las plantas y de esta manera afectar los procesos organogénicos (Krikorian, 1991).

Determinar la temperatura óptima de crecimiento para cada cultivo *in vitro* puede ser un proceso muy laborioso que, además, exige gran cantidad de cámaras de cultivo reguladoras de forma diferente. Afortunadamente, y para la mayoría de situaciones, se pueden obtener resultados satisfactorios con temperaturas de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre 24 y 28 °C.

Así, temperaturas bajas (del orden de 4 a 5 °C) permiten superar los períodos de dormancia de algunas leñosas y la conservación prolongada de determinados cultivos *in vitro*; mientras que una temperatura constante de 20 °C induce la formación de raíces en la mayoría de las coníferas.

c) Atmósfera gaseosa

Los distintos gases encontrados que afectan el crecimiento y organogénesis *in vitro* son: etileno, oxígeno, polifenoles, dióxido de carbono y acetaldehído. Los niveles de estos compuestos volátiles dentro de los envases de cultivo, están influenciados por el tipo de sellado que se da al envase para prevenir la contaminación y deshidratación (Peña, 2002).

La acumulación de etileno y dióxido de carbono, asociados con una pobre oxigenación debido al excesivo sellado del envase, tiene un efecto tóxico en

muchas especies. El uso de envases de mayor tamaño puede discriminar la presión parcial de estos gases y así reducir su efecto tóxico en muchas especies. Se ha encontrado que los tubos al ser sellados con "parafilm", como manera preventiva de contaminación, almacenan mayor concentración de gases debido a la mayor cantidad de la humedad relativa, la cual puede conducir a la vitrificación dependiendo de la especie y el tipo de explante (Villalobos y Thorpe, 1991).

2.11. Micropropagación

El proceso de multiplicación vegetativa *in vitro* recibe el nombre de micropropagación. La micropropagación es multiplicar con eficacia una planta produciendo individuos con un fenotipo fiel al del individuo parental (Serrano y Piñol, 1991).

Los procesos más comúnmente empleados son:

1. El cultivo de meristemas seguido de multiplicación por brotes adventicios.
2. La embriogénesis directa a partir de algún tejido somático.

En ambos casos se obtienen frecuencias de multiplicaciones elevadas que hacen muy eficiente el proceso y con una gran estabilidad genética ya que se evita el paso por fases con tejidos desorganizados o diferenciados "callo" (Peña, 2002).

Las fases de micropropagación

La micropropagación según Serrano y Piñol (1991) puede dividirse en estadios o fases:

Fase 0: Corresponde a la pre-adaptación del material parental a condiciones homogéneas que favorezcan la multiplicación vegetativa *in vitro*.

Fase I (Inducción): Es la primera etapa del cultivo durante la cual se induce el desarrollo de los meristemas o la embriogénesis por medio del empleo de citoninas.

Fase II (Multiplicación): Los tallos inducidos en la primera fase son multiplicados por medio de la inducción de brotes adventicios para aumentar el número de plantas que se deriven de una sola planta madre.

Fase III (Enraizamiento): Los tallos producto de las fases I y II son ahora tratados para inducir la formación de raíces y producir plántulas completas.

Fase IV (Transplante): Esta es la etapa más difícil de cultivo, cuando las plántulas salen del ambiente estéril y rico en nutrientes del tubo de ensayo para iniciar su desarrollo en tierra. Esta fase requiere de condiciones adecuadas y grandes cuidados para que las plántulas no mueran por pérdida excesiva de agua o por el ataque de microorganismos.

2.12. Otros componentes del medio

2.12.1. Agua de coco

El lugar de origen del cocotero es un tema discutido, mientras muchos consideran que proviene de Asia del Sur, concretamente de la delta del Ganges, algunos dicen que proviene del Noroeste de América del Sur.

El agua de coco es el líquido que se encuentra de forma natural en el hueco interior del coco. Tiene un color transparente, a veces un poco opaco, y se encuentra en el hueco interior, rodeado por la pulpa del coco, en la nuez del coco. Posee un sabor característico que puede variar por la especie hasta por el estado del coco (seco o fresco), también el sabor puede depender del terreno donde se encuentra la palma coco (Delgado y Rojas, 2001).

La cosecha del coco varía según el tipo de producción, sobre todo de febrero a julio. Si se comercializa como fruta fresca o se destina a la industria con fines de envasar agua, la cosecha se efectúa cuando el coco tiene entre cinco y siete meses. En esta época el contenido de azúcar y agua es muy elevado y el sabor es más intenso. De todas formas, el coco seco o coco maduro tiene una capacidad de gran duración mayor sin necesidad de ningún tipo de refrigeración, a diferencia de los cocos frescos, que duran varios días (o un mes), antes de madurarse (o hacerse secos).

El agua de coco fue por primera vez utilizada en 1942 por Van Overbeek y Col., en el cultivo de embriones de zanahoria. Desde entonces se ha suplementado al medio de cultivo de numerosas especies y en diferentes sistemas para estimular el crecimiento de callos de tabaco, el incremento de embriones somáticos en zanahoria y la división de granos de polen (Delgado y Rojas, 2001).

Un paso importante en el desarrollo de las técnicas actuales para estimular la división celular de explantes fue la observación de que el agua de coco, a niveles relativamente bajos (5 % - 10 % v/v), podía interactuar con las auxinas y promover el crecimiento, en situaciones en que por sí solo era ineficiente.

El agua de coco (AC) es un medio muy complejo, con una amplia gama de componentes orgánicos e inorgánicos; tiene buena capacidad de amortiguación (buffer) y no es raro encontrar sales en ella. Aunque el AC es muy rica en magnesio y fosfato, no todos los elementos minerales que contiene son indispensables, y se pueden reemplazar por un medio salino basal. El contenido de azúcar, de alrededor de 2,5 %, no es algo fuera de lo común y se puede reemplazar (se han identificado sustitutos como glucosa, fructosa, sacarosa y otros azúcares). Adicionalmente, se encuentra en ella nitrógeno no proteico soluble en

forma de aminoácidos. Es el líquido que se halla en el interior de la pulpa; cuanto menos maduro esté el fruto más abundante será y también más rico en nutrientes.

2.12.2. El jugo de tomate

El jugo de tomate es una fuente importante de ciertos minerales (como el potasio y el magnesio). De su contenido en vitaminas destacan la B1, B2, B5 y la vitamina C. Presenta también carotenoides como el licopeno (pigmento que da el color rojo característico al tomate). La vitamina C y el licopeno son antioxidantes con una función protectora de nuestro organismo. Durante los meses de verano, el tomate es una de las fuentes principales de vitamina C (Infoagro, 2003).

2.13. Cultivo de tejidos para la propagación y mejoramiento de especies forestales

El cultivo de tejidos vegetales se ha desarrollado como un grupo de herramientas tecnológicas asociadas con la producción vegetal. En forestales estas técnicas ofrecen un gran potencial de apoyo a los métodos tradicionales de propagación y mejoramiento genético, al incrementar la posibilidad de propagar individuos genéticamente superiores, provenientes de la selección de "ecotipos" naturales, del mejoramiento convencional o de un número limitado de semillas de polinización controlada (Peña, 2002).

Las técnicas tradicionales de cultivo, presentan un conjunto de limitaciones como baja tasa de multiplicación, problemas fitopatológicos que deteriora el material genético. A diferencia, de esta técnica el cultivo de tejidos vegetales permite la propagación de grandes cantidades de plantas en menor tiempo, así como el mismo en espacios reducidos. Por otro lado, la técnica es de gran utilidad en la

obtención de plantas libres de patógenos, plantas homocigotas (Aceves y Hernández, 1991).

2.14. Limitaciones para el manejo *in vitro* de especie forestales

Las especies forestales como pino, eucalipto, etc., aún presentan varias limitaciones, como la contaminación interna de los explantes, la necrosis apical, la vitrificación, la oxidación, el enraizamiento y la aclimatación en campo; que impiden el uso extensivo del cultivo de tejidos vegetales. Sin embargo, el principal objetivo está asociado a la producción vegetal y mejoramiento genético (Peña, 2002).

La propagación y mejoramiento genético de árboles por sistemas biotecnológicos tiene como potencial limitante la dificultad del manejo *in vitro* de material vegetal adulto por las complicaciones que se derivan de las características inherentes a los árboles y/o al órgano donador del explante las cuales influyen en la capacidad de respuesta morfogénica asociadas con aspectos fisiológicos y fitosanitarios.

La selección y manejo adecuado del explante constituyen la clave del éxito para el desarrollo o adaptación de sistemas de cultivo *in vitro*. A medida que las células embrionarias se diferencian de acuerdo a un patrón de desarrollo determinado se reduce la capacidad de expresar su totipotencialidad y se adquiere un estado fisiológico especializado. Por tal razón, explante juveniles cuyas células no poseen aún una vía de desarrollo definida, responde con versatilidad, mientras que los tejidos maduros presentan con frecuencias un comportamiento recalcitrante, lo cual ha sido atribuido a diversos factores como: la pérdida de juvenilidad representada en la disminución de la capacidad morfogénica de los tejidos proveniente de material maduro acompañado de

una tasa de crecimiento reducido, la presencia aparente de inhibidores del enraizamiento y los indeseables desarrollos plagiotrópicos (Carrizosa y Col.,1994).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (Ayacucho - Perú), durante el periodo de enero a diciembre del 2008.

3.2. Material vegetal

El material vegetal empleado fueron las semillas de "tara" que se obtuvieron de los frutos con madurez de cosecha, provenientes de plantas madres, recolectadas en el Anexo de Ocopa, distrito de Pacaicasa, ubicado en provincia de Huamanga del departamento de Ayacucho (Anexo N° 01).

3.3. Diseño metodológico para la recolección de datos

La investigación comprendió tres etapas:

Fase I : La selección y germinación de las semillas *in vitro*.

Fase II : Establecimiento del medio de cultivo y micropropagación.

Fase III : El enraizamiento.

3.3.1. La selección y germinación de las semillas *in vitro*

Se recolecto un kilogramo de vainas de *Caesalpinia spinosa* "tara", y se extrajo las semillas; luego se procedió a la desinfección de la cámara de flujo laminar con alcohol al 70 %. Además los instrumentos de trabajos fueron autoclavados por 15 minutos a una presión de 15 lb a una temperatura de 120 °C, para asegurar una buena esterilización.

Se tomó como muestra 50 semillas de tara, la mitad de las semillas de "tara" fueron sometidas a un tratamiento pre-germinativo, que consistió en la técnica "picado de semilla" (IDESI, 2008); y la otra mitad sin un pre tratamiento.

En la cámara de flujo laminar se procedió a la desinfección de todas las semillas con hipoclorito de sodio (NaOCl) a concentraciones de 0,5, 1,0 y 1,5 % + dos gotas de tween 20, por tratamiento se estableció tiempos de sumergimiento de 10, 15 y 20 minutos para cada caso; luego se procedió a enjuagar de tres a cuatro veces con agua destilada estéril.

Estas semillas desinfectadas se sembraron en placas petri estériles con algodón en la base y ácido giberélico a (0,5, 1,0 y 1,5 ppm) como se muestra en el Anexo N° 02; manteniéndolos en el cuarto de conservación con poca iluminación para ayudar a la germinación (Anexo N° 03). Luego se utilizó 50 semillas para repetir la prueba que se había obtenido un buen porcentaje de germinación.

3.3.2. Establecimiento del medio de cultivo y micropropagación.

Una vez concluida la etapa preliminar de desinfección, se realizaron 35 ensayos de establecimientos en la que se utilizó el medio Murashige y Skoog modificado (Anexo N° 04), adicionado con agua de coco y se probó diferentes tratamientos para controlar la oxidación de los explantes como se detalla en el Anexo N° 05.

Los niveles de oxidación considerados para la evaluación de los tratamientos se especifican a continuación:

- Leve : 0 - 25 %.
- Moderado : 25 - 50 %.
- Fuerte : 50 - 75 %.

Tabla N° 03: Medios de cultivo para la regeneración y desarrollo de hipocótilos de *Caesalpinia spinosa* "tara".

Tratamientos	Medio		Antioxidantes		
	Medio Basal	Agua de coco (ml)	Ac. Cítrico (mg/l)	Ac. Ascórbico (mg/l)	Carbón activado (%)
M ₁	MS	-	-	-	2
M ₂	MS	-	100	-	-
M ₃	MS	-	-	100	-
M ₄	MS	150	-	100	2
M ₅	MS	150	100	-	2

Las plántulas *in vitro* que alcanzaron un buen desarrollo en los medios de introducción Murashige y Skoog modificado que se detalla en la Tabla N° 03; transcurrido 60 días se propagaron utilizando entrenudos como explantes en medios modificados de Murashige y Skoog, los mismos que difieren en las concentraciones de los reguladores de crecimiento como el ácido naftalenacético (ANA), 6-benzilaminopurina (BAP), ácido indolacético (AIA); asimismo, se evaluaron aisladamente y en combinación suplementos naturales: agua de coco y jugo de tomate, como se muestra en la Tabla N° 04; y la adición de otros compuestos carbón activado, ácido ascórbico y ácido cítrico; se utilizaron ocho explantes para cada tratamiento (Anexo N° 06).

Tabla N° 04: Medios de cultivo para la fase de micropropagación en *Caesalpinia spinosa* "tara".

Medios	Medio Basal	ANA (ppm)	BAP (ppm)	AIA (ppm)	Agua de coco (ml)	Tomate (mi)
MM1	MS	1,0	-	-	-	-
MM2	MS	-	1,0	-	-	1,0
MM3	MS	1,0	1,0	-	-	-
MM4	MS	1,5	0,25	-	150	-
MM5	MS	0,25	1,5	-	100	-
MM6	MS	-	0,5	1,0	-	1,0

3.3.3. El Enraizamiento

Las plántulas *in vitro* que alcanzaron un buen desarrollo en los medios de micropropagación, fueron transferidas a medios de enraizamiento.

Para esta fase se estableció ocho medios diferentes (Anexo N° 07), siempre guiándonos del medio Murashige y Skoog modificado una concentración y a media concentración; donde agregamos, ANA, AIA, solidificando con agar al 0,7 %; como se muestra en la Tabla N° 05, luego se incubaron en el cuarto de cultivo.

Tabla N° 05: Medios de cultivo para la etapa de enraizamiento en *Caesalpinia spinosa* "tara".

Medios	Medio Basal	ANA (ppm)	AIA (ppm)	Agua de coco (mi)	Tomate (%)
ME ₁	MS	1,0	-	-	1,0
ME ₂	MS	1,0	1,0	-	-
ME ₃	MS	1,0	-	150	-
ME ₄	MS	1,0	1,0	-	1,0
ME ₅	MS/2	1,0	-	-	1,0
ME ₆	MS/2	1,0	1,0	-	-
ME ₇	MS/2	1,0	-	150	-
ME ₈	MS/2	1,0	1,0	-	1,0

3.4. Condiciones de incubación de cultivo

Los explantes fueron incubados a una temperatura de 24 ± 2 °C con 16 horas de luz y ocho horas de oscuridad, las cuales son controladas con el timer.

3.5. Evaluaciones

Las semillas introducidas fueron evaluadas después de siete a 14 días después de la introducción y la micropropagación y enraizamiento después de cuatro semanas de haber sido micropropagadas.

Los parámetros fueron:

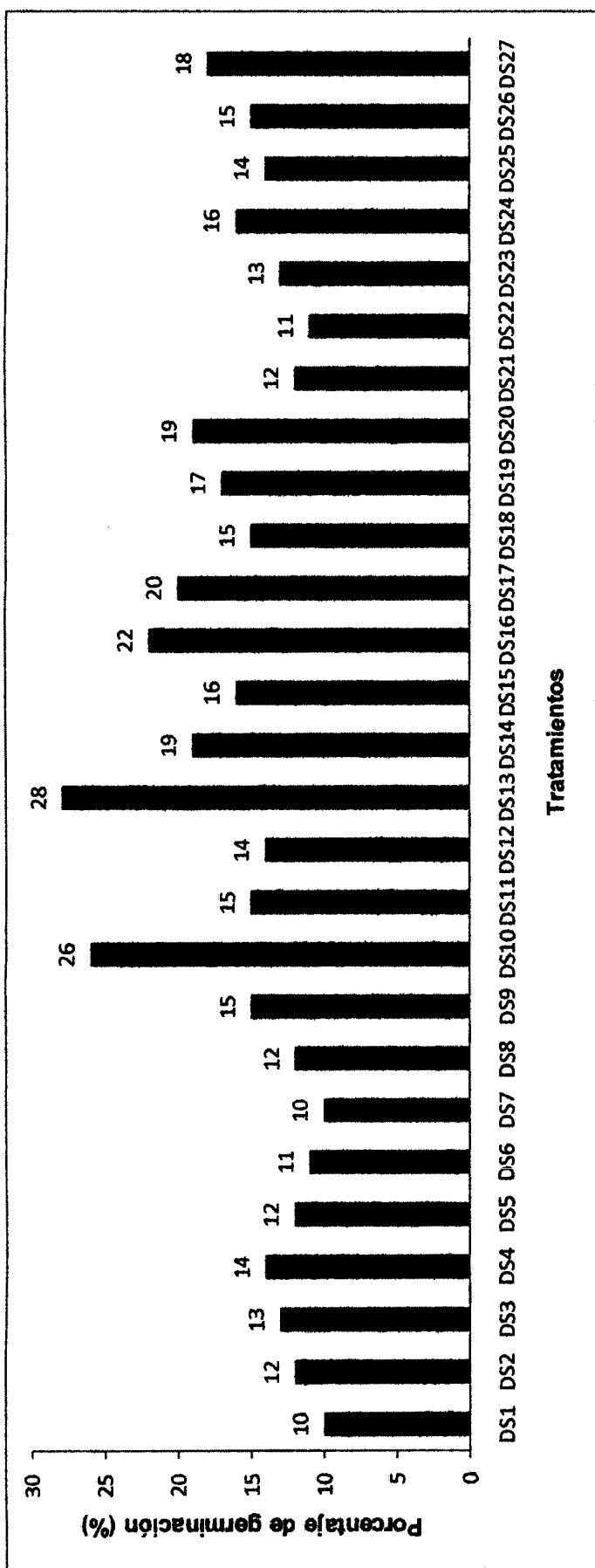
- La germinación
- La contaminación
- El porcentaje de brotamiento
- Oxidación
- Número de hojas
- Número de nudos
- Tamaño de la plántula
- Número de raíces
- Formación de raicillas
- Tamaño de raíces

3.6. Análisis Estadístico

Los resultados fueron sometidos al análisis estadístico, se realizó el análisis de varianza (ANVA) y la prueba de Duncan con un error permisible de 5 % con la finalidad de determinar si la diferencia es significativa en cada uno de los

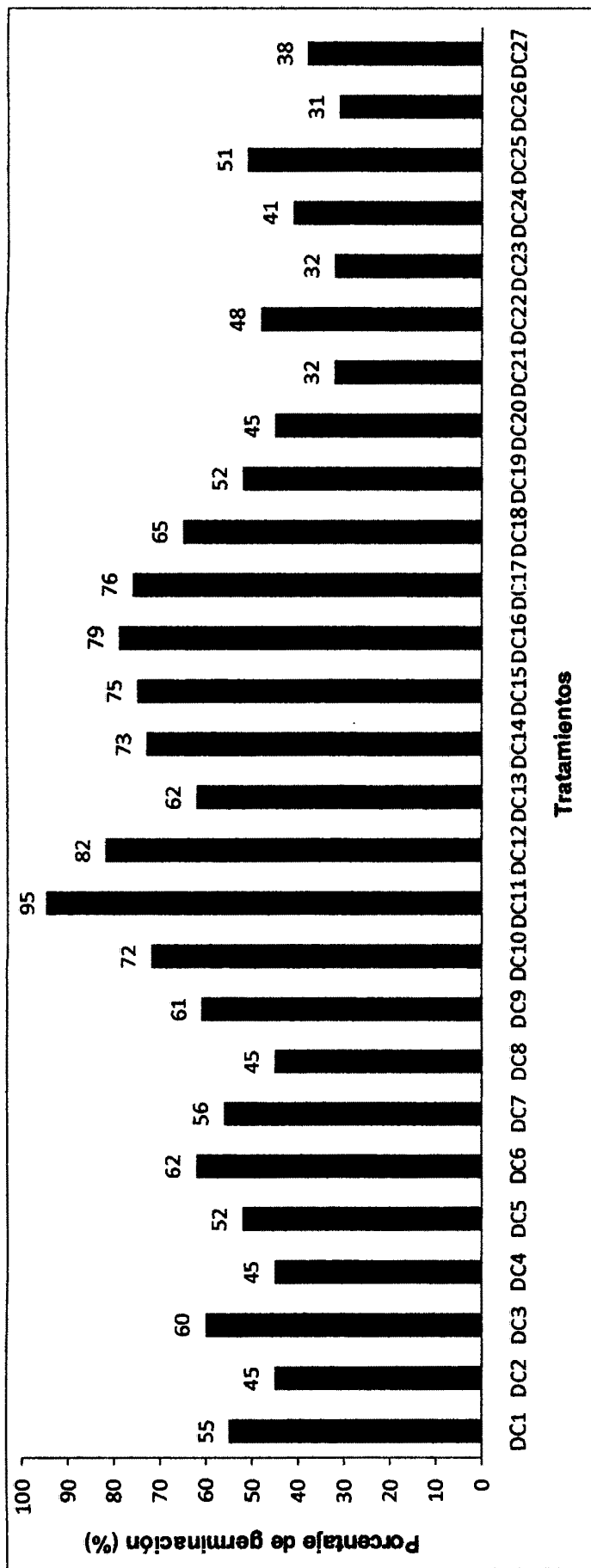
tratamientos realizados; como son: desinfección de las semillas, medio de cultivo, micropropagación y el enraizamiento.

IV. RESULTADOS



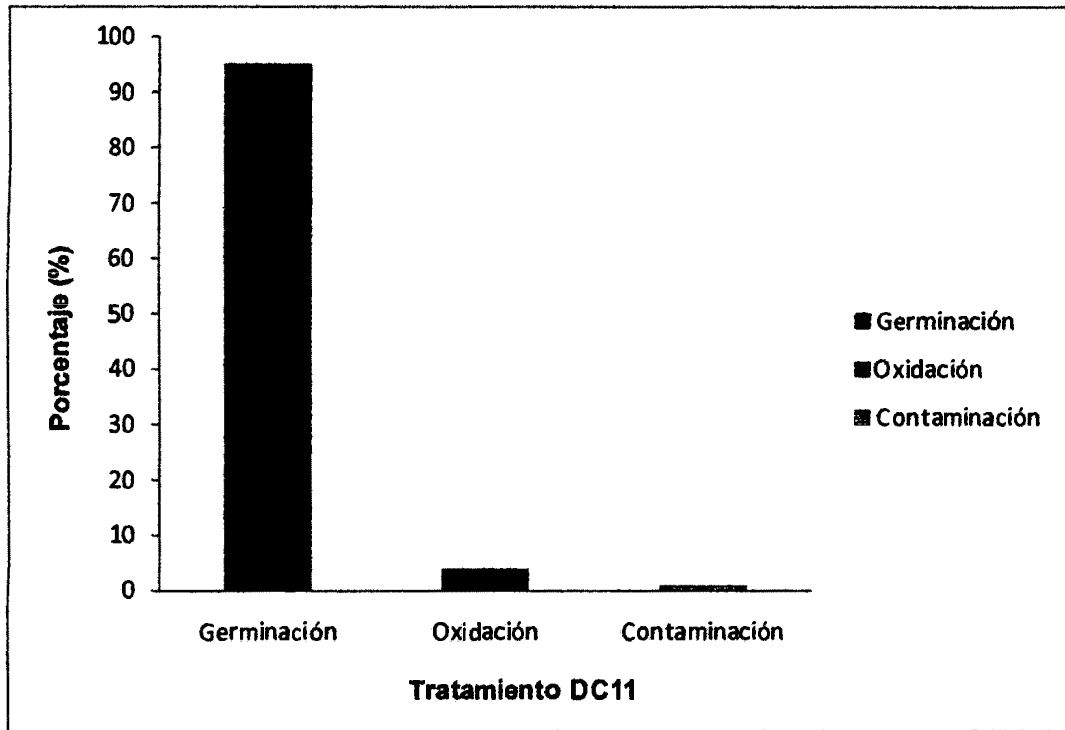
CÓDIGO	DS 1	DS 2	DS 3	DS 4	DS 5	DS 6	DS 7	DS 8	DS 9	DS 10	DS 11	DS 12	DS 13	DS 14	DS 15	DS 16	DS 17	DS 18	DS 19	DS 20	DS 21	DS 22	DS 23	DS 24	DS 25	DS 26	DS 27
NaOCl (%)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Tiempo(min)	10	10	10	15	15	15	20	20	20	10	10	10	15	15	15	20	20	20	10	10	10	15	15	15	20	20	20
AG ₃ (ppm)	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5

Gráfico Nº 01: Porcentaje de germinación de semillas de "tara" sin corte, según tratamientos.



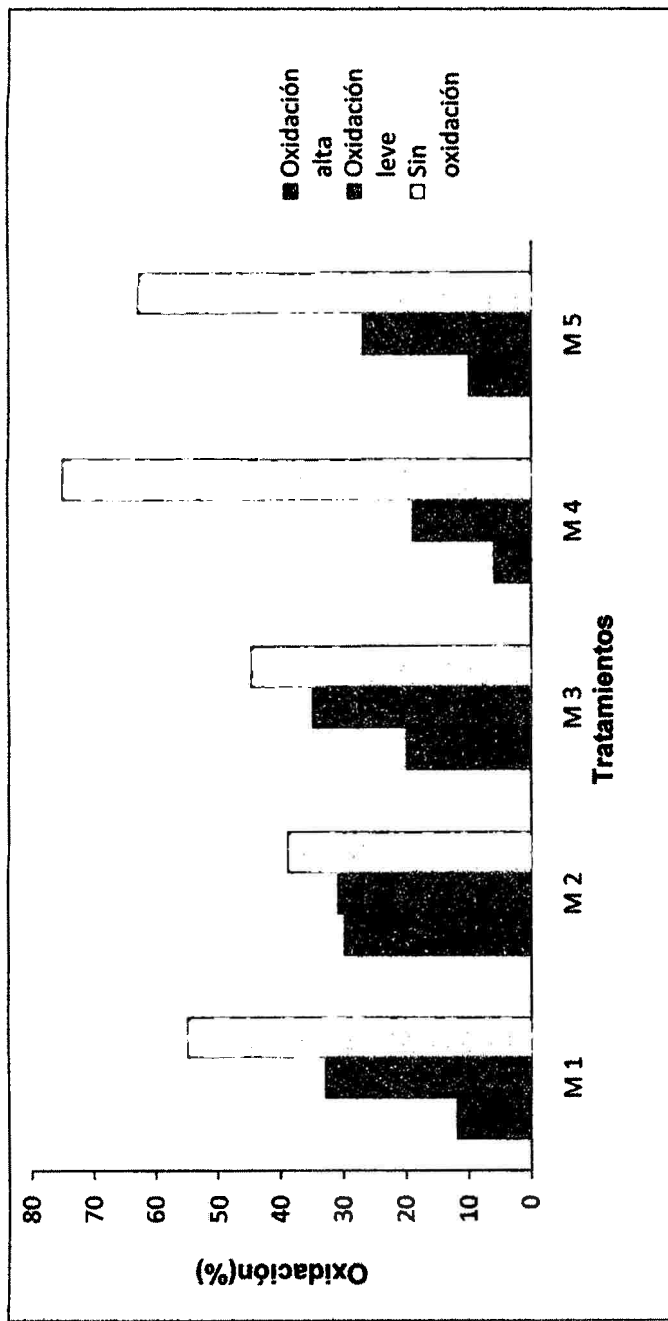
CÓDIGO	DC 1	DC 2	DC 3	DC 4	DC 5	DC 6	DC 7	DC 8	DC 9	DC 10	DC 11	DC 12	DC 13	DC 14	DC 15	DC 16	DC 17	DC 18	DC 19	DC 20	DC 21	DC 22	DC 23	DC 24	DC 25	DC 26	DC 27
NaOCl (%)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Tiempo(min)	10	10	10	15	15	15	20	20	20	10	10	10	15	15	15	20	20	20	10	10	10	15	15	15	20	20	20
AG ₂ (ppm)	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5

Gráfico Nº 02: Porcentaje de germinación de semillas de "tara" con corte de testa según tratamientos.



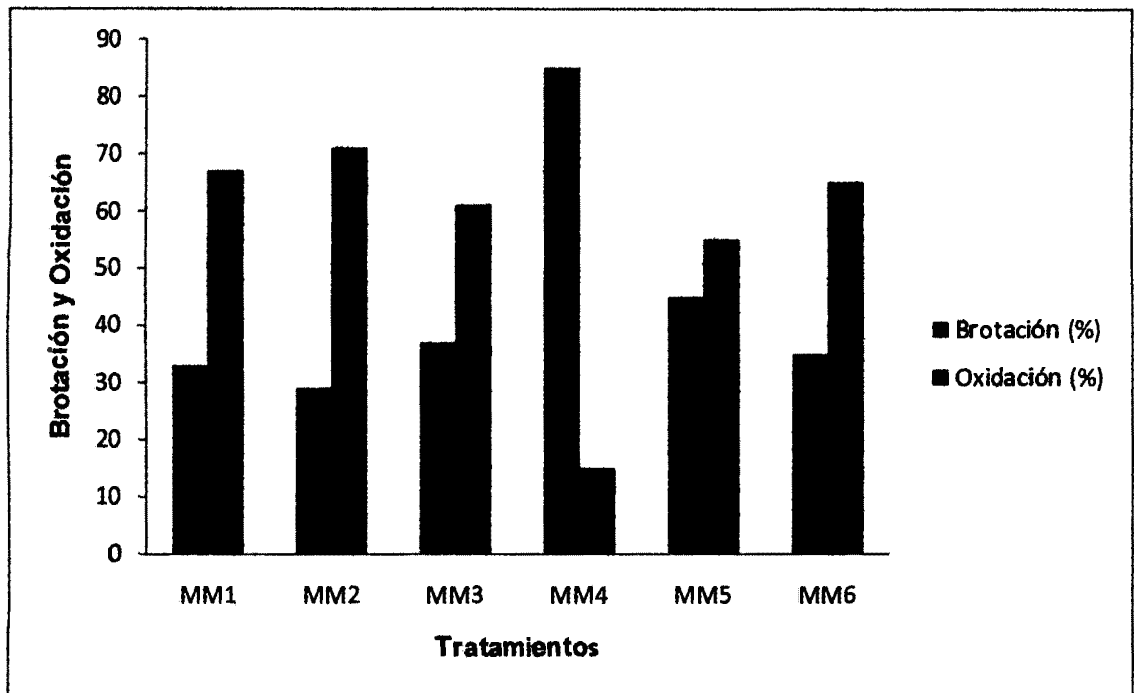
Tratamiento DC 11	
NaOCl (%)	1
Tiempo (min)	10
AG ₃ ppm	1

Gráfico N° 03: Respuesta de la introducción de *Caesalpinia spinosa* "tara" al tratamiento DC11.



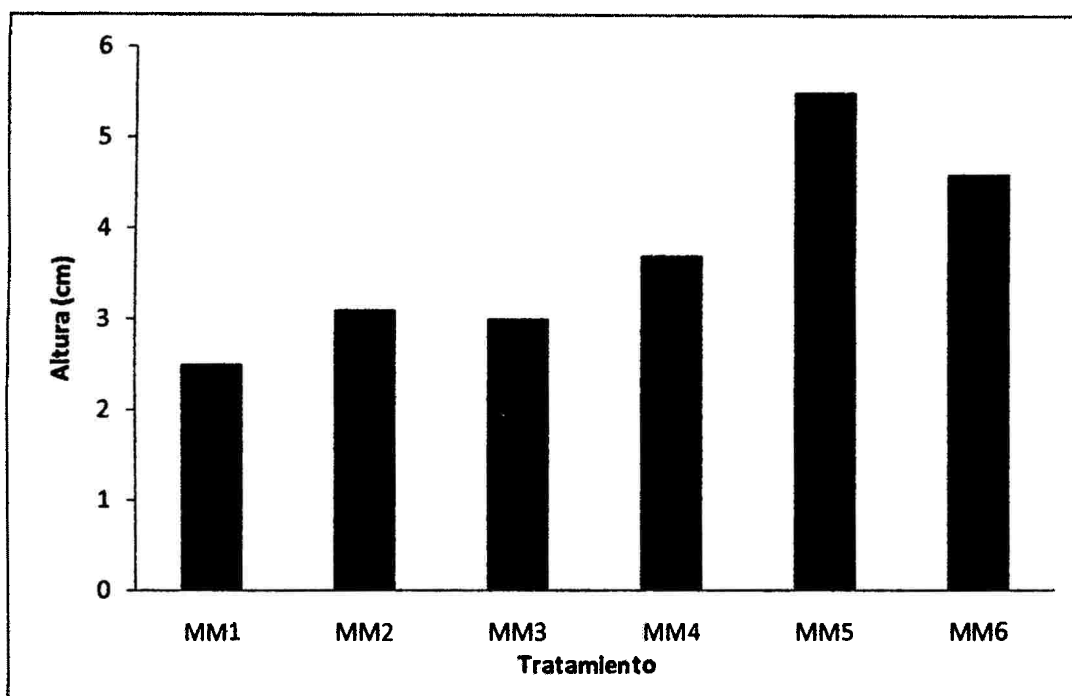
Compuesto	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Carbon (%)	2	-	2	2	2
Ac. Cítrico (mg/l)	-	100	-	-	100
Ac. Ascórbico (mg/l)	-	-	100	100	-
Agua de coco (ml)	-	-	-	150	150

Gráfico N° 04: Oxidación de plántulas *in vitro* de *Caesalpinia spinosa* "lara" según tratamientos.



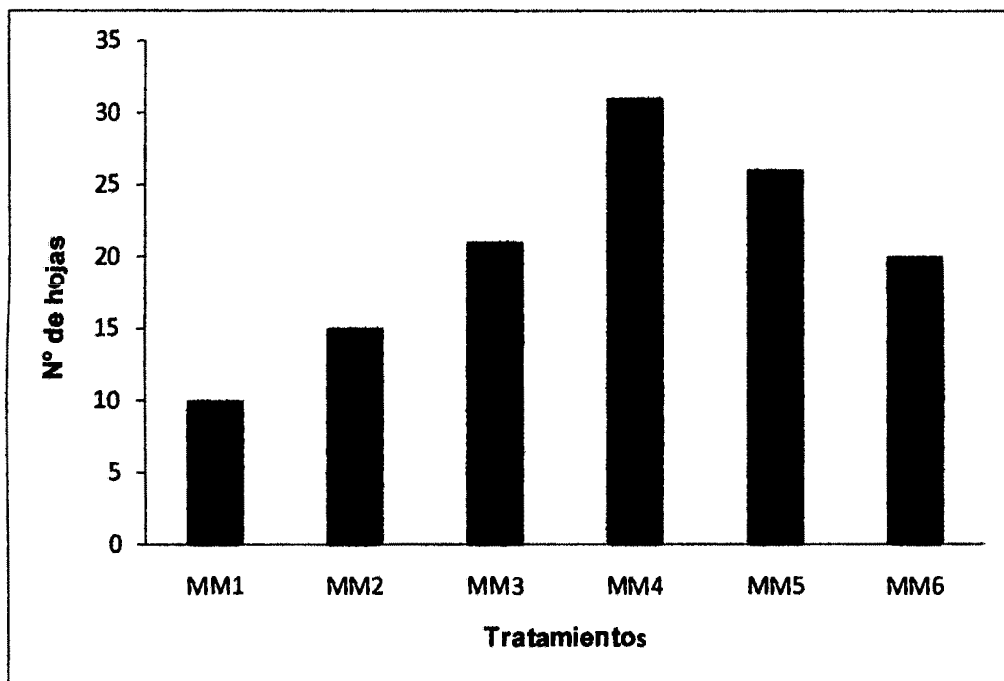
Componente	MM ₁	MM ₂	MM ₃	MM ₄	MM ₅	MM ₆
ANA (ppm)	1	-	1	1,5	0,25	-
BAP (ppm)	-	1	1	0,25	1,5	0,5
AIA (ppm)	-	-	-	-	-	1
Agua de coco(ml)	-	-	-	150	100	
Jugo de tomate(%)	-	1	-	-	-	1

Gráfico Nº 05: Brotación y oxidación de plántulas *in vitro* de *Caesalpinia spinosa* "tara" según tratamientos.



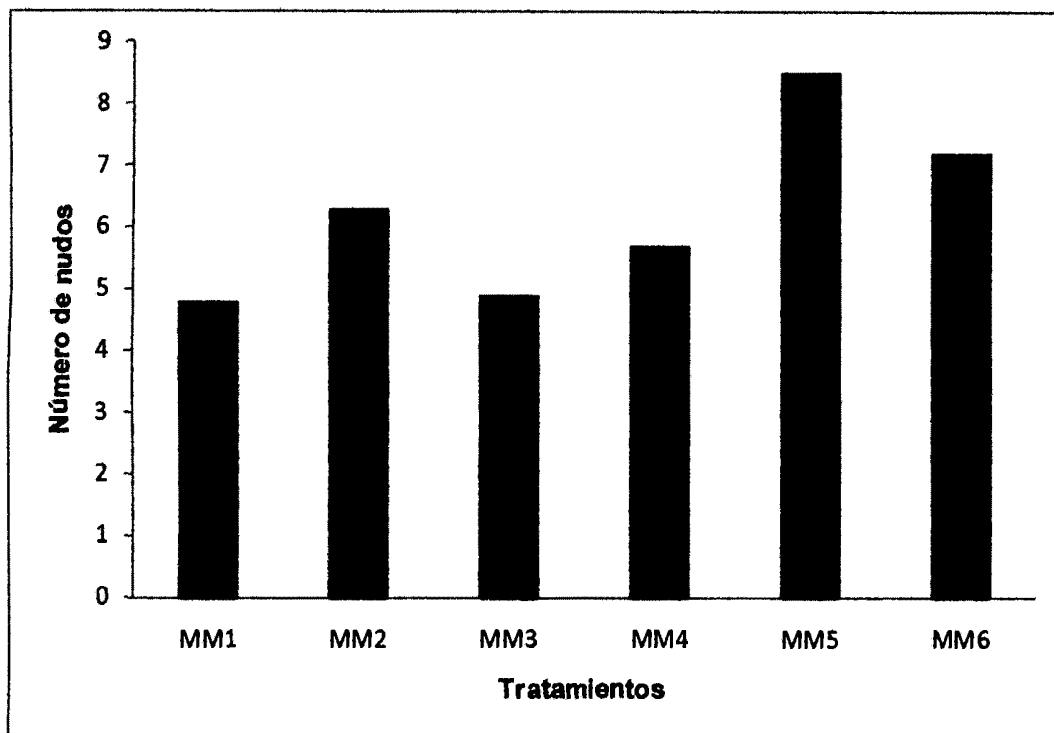
Componente	MM ₁	MM ₂	MM ₃	MM ₄	MM ₅	MM ₆
ANA (ppm)	1	-	1	1,5	0,25	-
BAP (ppm)	-	1	1	0,25	1,5	0,5
AIA (ppm)	-	-	-	-	-	1
Agua de coco(ml)	-	-	-	150	100	-
Jugo de tomate(%)	-	1	-	-	-	1

Gráfico Nº 06: Altura de *Caesalpinia spinosa* "tara" según tratamientos.



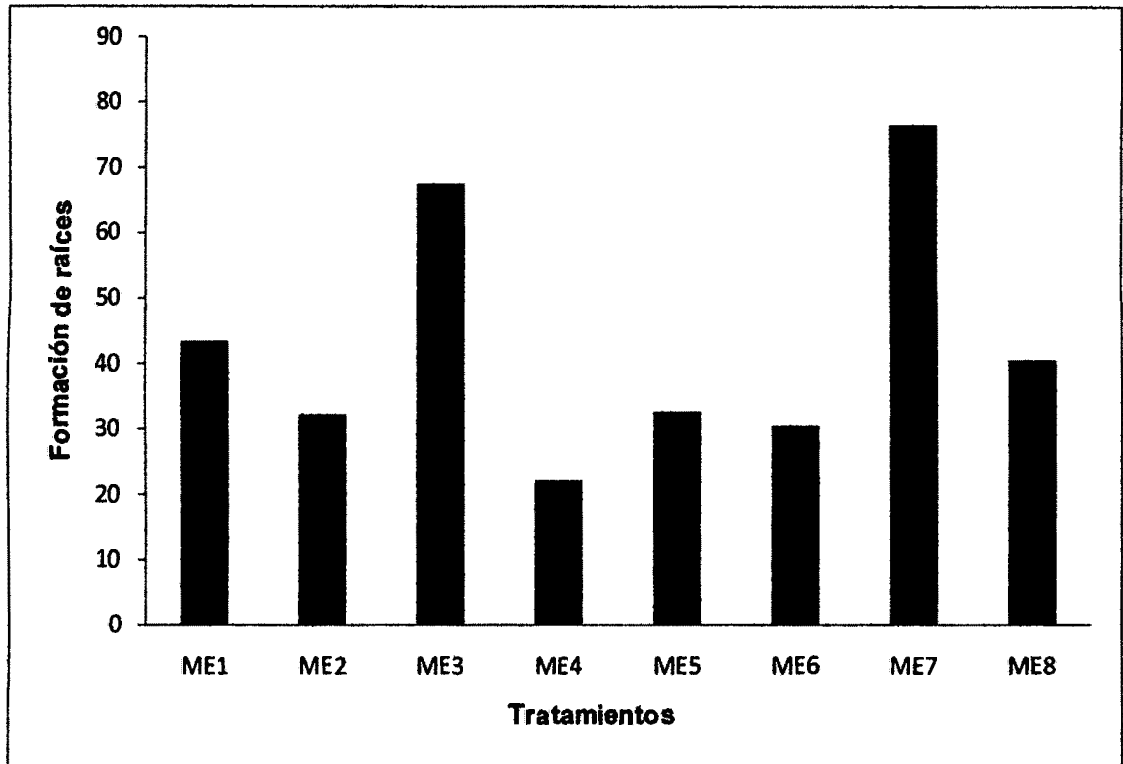
Componente	MM ₁	MM ₂	MM ₃	MM ₄	MM ₅	MM ₆
ANA(ppm)	1	-	1	1,5	0,25	-
BAP (ppm)	-	1	1	0,25	1,5	0,5
AIA (ppm)	-	-	-	-	-	1
Agua de coco(ml)	-	-	-	150	100	
Jugo de tomate(%)	-	1	-	-	-	1

Gráfico N° 07: Número de hojas en los explantes del cultivo *in vitro* de *Caesalpinia spinosa* "tara" según tratamientos.



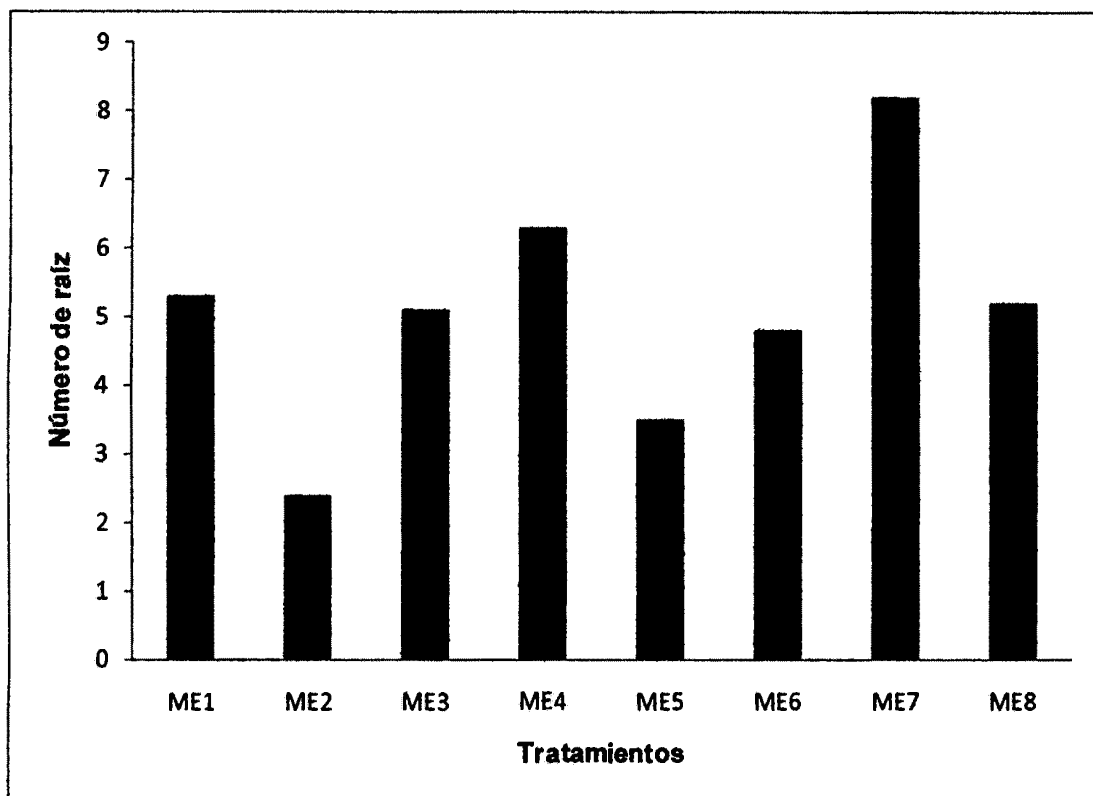
Componente	MM ₁	MM ₂	MM ₃	MM ₄	MM ₅	MM ₆
ANA (ppm)	1	-	1	1,5	0,25	-
BAP (ppm)	-	1	1	0,25	1,5	0,5
AIA (ppm)	-	-	-	-	-	1
Agua de coco(ml)	-	-	-	150	100	
Jugo de tomate(%)	-	1	-	-	-	1

Gráfico N° 08: Número de nudos en plántulas de *Caesalpinia spinosa* "tara" según tratamientos.



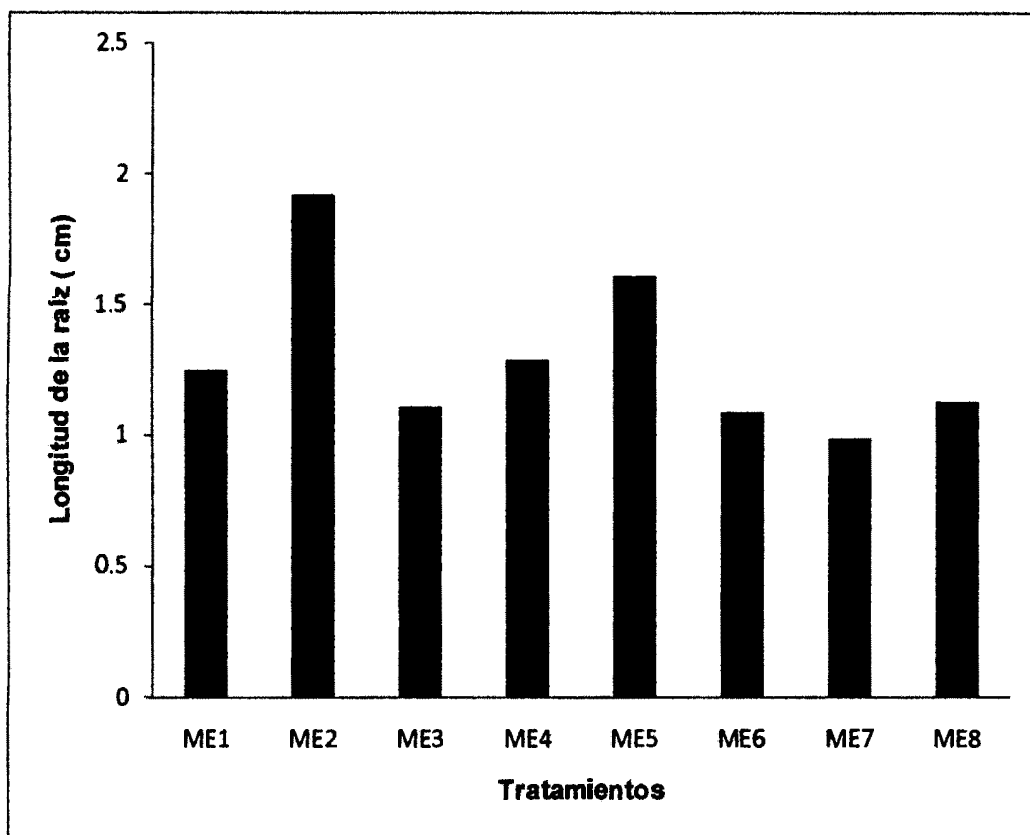
Componente	ME ₁	ME ₂	ME ₃	ME ₄	ME ₅	ME ₆	ME ₇	ME ₈
ANA(ppm)	1	1	1	1	1	1	1	1
AIA (ppm)	-	1	-	1	-	1	-	1
Agua de Coco(ml)	-	-	150	-	-	-	150	-
Jugo de tomate(%)	1	-	-	1	1	-	-	1

Gráfico N° 09: Formación de raíces de las plántulas de "tara", en medios de enraizamiento según tratamientos.



Componente	ME ₁	ME ₂	ME ₃	ME ₄	ME ₅	ME ₆	ME ₇	ME ₈
ANA (ppm)	1	1	1	1	1	1	1	1
AIA (ppm)	-	1	-	1	-	1	-	1
Agua de Coco(mi)	-	-	150	-	-	-	150	-
Jugo de tomate(%)	1	-	-	1	1	-	-	1

Gráfico N° 10: Número de raíces de plántulas *in vitro* de *Caesalpinia spinosa* "tara" según tratamientos.



Componente	ME ₁	ME ₂	ME ₃	ME ₄	ME ₅	ME ₆	ME ₇	ME ₈
ANA (ppm)	1	1	1	1	1	1	1	1
AIA (ppm)	-	1	-	1	-	1	-	1
Agua de Coco(ml)	-	-	150	-	-	-	150	-
Jugo de tomate(%)	1	-	-	1	1	-	-	1

Gráfico N° 11: Longitud de las raíces en plántulas *in vitro* de *Caesalpinia spinosa* "tara" según tratamientos.

V. DISCUSIÓN

En este proceso de desinfección de la semilla, es importante encontrar el equilibrio entre la concentración y el tiempo de acción del desinfectante sobre el microorganismo contaminante, con el efecto fitotóxico que pueda ejercer sobre la semilla; es decir, el objetivo es alcanzar una máxima esterilización como una máxima sobrevivencia de los tejidos (Delgado y Rojas, 2001).

Uno de los métodos físicos más sencillos y directos para aumentar la tasa de germinación es la técnica del "picado de semilla", que consiste en cortar o abrir un pequeño orificio en la cubierta de la testa y/o al costado del micrópilo de cada semilla antes de sembrarla. En Filipinas, este método ha dado buenos resultados con semillas grandes de leguminosas, como las de los géneros de *Afzelia*, *Sindora*, *Intsia*, etc.; este tratamiento es eficaz para aumentar y acelerar la germinación en varias especies de cubierta dura (FAO, 1991).

En este proceso se utilizó la metodología citada por Suárez (1990) quien también utilizó el ácido giberélico para acelerar el tiempo de germinación de *Annona cherimola*, el ácido giberélico interrumpe el período de latencia de las semillas, haciéndolas germinar y movilizar las reservas en azúcares.

En condiciones de cultivo *in vitro*, las semillas de "tara" enteras con corte pre-tratadas con ácido giberélico, tuvieron un 95 % de germinación, frente a las semillas sin corte con un 28 % de germinación; el tratamiento DC11, obtuvo mejor respuesta de germinación a los siete días, la cual se realizó con la técnica del "picado de semilla" y desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1 % por un período de agitación de diez minutos y luego se procedió a la siembra en placas con algodón en la base y sumergidas en ácido giberélico al 1,0 ppm; se observó a los dos días el hinchamiento de la testa y la salida de la raíz por el micrópilo (Anexo N° 08); al cuarto día se observó el crecimiento de la raíz aproximadamente de uno a dos centímetros (Anexo N° 09); al séptimo día se logró el completo rompimiento de testa que cubría al embrión (Anexo N° 10); y posteriormente las plántulas obtenidas fueron subcultivadas en medio Murashige y Skoog modificado (Anexo N° 11).

Los resultados obtenidos de un 95 % de germinación de semillas como se muestra en el Anexo N° 12, fueron similares a los obtenidos por Lozano (2011) utilizando como explante plántulas, logrando un 66,67 % de sobrevivencia, con un tratamiento de hipoclorito de sodio al 1,5 % por un tiempo de inmersión de 15 minutos.

Las semillas de tara sin corte, que obtuvieron mayor viabilidad de 28 %, fue el tratamiento DS13, que se detalla en el Anexo N° 13, debido a que la cáscara de la semilla es muy dura y dificulta el ingreso del AG_3 para su hidratación, también se presentó problemas de oxidación y el tiempo de germinación fue prolongado por 30 días.

Del tratamiento DC11 se realizó diez pruebas donde se observó un 95 % de germinación, un 4 % de oxidación y un 1 % de contaminación (Gráfico N° 03); se obtuvo 4 % de oxidación debido a las enzimas, involucradas en la biosíntesis y la oxidación de fenoles que se incrementan con la luz, por lo que es

conveniente mantener los explantes en la oscuridad unas horas antes de pasarlos al banco de germoplasma para su crecimiento.

Una de las prácticas más comunes para controlar la oxidación de los explantes durante las etapas iniciales del cultivo *in vitro* es agregando antioxidantes en el medio de cultivo. Entre los más empleados se pueden citar el ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido málico y carbón activado (Azofeifa, 2009). Por otro lado, la oxidación de los explantes durante las etapas de cultivo *in vitro*, representa un limitante importante en el éxito de la micropropagación.

De esta manera el resultado que se muestra en el Gráfico N° 05, indican que el Medio M₄, que contiene: agua de coco, ácido ascórbico y carbón activado; fueron exitosas alcanzando un 75 % de explantes sin oxidación como se detalla en el Anexo N° 14, esto demuestra la efectividad del ácido ascórbico en combinación con el carbón activado, ambos son agentes antioxidantes para remover sustancias inhibitorias propias del medio; esto comprueba lo dicho por Lozano (2011), que la estrategia más efectiva para controlar la oxidación fenólica fue la del carbón activado y la oscuridad.

Sánchez (2009), utilizó en el medio de cultivo carbón activado (3 %) suplementado con 50 mg/L de tocoferol; 0,5 mg/L de BA, dando como resultado un 63 % de brotación y un 11 % de explantes oxidados, pero no especifica qué resultado obtuvo el 26 % restante.

Durante la fase de multiplicación, selección y manejo adecuado del explante constituye la clave del éxito para el desarrollo o adaptación de sistemas de cultivo *in vitro* y es importante ya que éste puede verse afectado por diferentes factores físicos y químicos.

La multiplicación se efectuó en seis tratamientos, a partir de segmentos nodales, descartando los extremos basal y apical, cada nudo contenía un meristemo axilar.

En los Gráficos Nº 05 y 07, se muestra que el medio más exitoso fue el MM₄, el que contiene Murashige y Skoog, ANA (1,5 ppm), BAP (0,25 ppm) y agua de coco 15 %; logrando un 85 % de brotación y un mayor número de hojas que es de 31 hojas por explante tratado; se puede afirmar que para el caso de esta especie la concentración alta de auxinas y baja de citoquininas favorece la proliferación de brotes y el mayor número de hojas; también se puede mencionar que el agua de coco promueve la división celular.

La oxidación de los explantes fue en un 15 % , esto se pudo deber a que las células no poseen aun una vía de desarrollo definida, responden con versatilidad, mientras los tejidos maduros dificultan para regenerar presentándose además el problema de oscurecimiento, formación de callo y muchos problemas aparte de esto es la dificultad en el enraizamiento.

Como se muestra en el Anexo Nº 15, el tratamiento MM₅ que contiene agua de coco al 10 % y el ANA (0,25 ppm), BAP (1,5 ppm), ha sido efectivo para estimular el crecimiento de la "tara", como también el mayor número de nudos; la interacción de una elevada concentración de citoquininas en combinación con una menor concentración de auxinas, ayuda al crecimiento y a la proliferación de yemas y hojas (Anexo Nº 16).

Según Lozano (2011), para la etapa de multiplicación, la Kinetina y 6-bencilaminopurina ambas o separadas resultaron poco eficientes para la multiplicación de brotes.

Según Sánchez (2009), el medio de multiplicación enriquecido con 0,5 mg de BA, 0,5 mg/l de TDZ y 0,5 mg/l de AG₃₅; favoreció el desarrollo de tres brotes laterales por explante; lo cual nos lleva a afirmar que la interacción de la auxina y citoquininas genera un balance en el equilibrio tisular.

En cuanto a la mortalidad, aunque disminuye de forma notable en comparación con la etapa de establecimiento, puesto que los explantes ya no se encuentran

sometidos al estrés de la desinfección, aún existe una pequeña tasa de pérdida lo cual puede explicarse como consecuencia de los cortes que se realizan para eliminar los tejidos necrosados de la etapa anterior, e incluso puede ser una respuesta a la concentración de hormonas en el medio.

Las mezclas complejas de nutrientes existentes en el medio de cultivo permite el crecimiento de los explantes; el uso de las auxinas en combinación con la citoquininas y el agua de coco nos dieron buenos resultados para multiplicación de los explantes.

Finalmente para la etapa de enraizamiento se continuó con los medios basales, en el Gráfico N° 09, se puede apreciar como el ME₇, que contenía medio de Murashige y Skoog a la mitad de su concentración con la mayor concentración de ANA (1 ppm) y agua de coco a 15 % es considerablemente más efectivo con respecto al medio completo; con un 76,5 % de formación de raíces. Esto nos lleva afirmar que existe una inhibición de la rizogénesis en medio Murashige y Skoog completo.

Respecto al número de raíces como se demuestra en el Gráfico N° 10, el medio ME₇ logró un máximo valor promedio de 8,2 raíces por explante tratado, con el que se demuestra que el medio Murashige y Skoog a la mitad de su concentración con la mayor concentración de ANA (1 ppm) y agua de coco a 15% es considerablemente más efectivo con respecto al medio completo para inducción de las raíces secundarias de los explantes.

Los resultados de la longitud promedio de la raíz principal fue de 1,92 cm, como se puede observar más claramente en el Anexo N° 17, en la que se aprecia que el Medio de enraizamiento (ME₂) que contiene: medio Murashige y Skoog (1962) completo y adicionado con ANA (1 ppm), AIA (1 ppm) y jugo de tomate al 1 %, es el que presenta mayor longitud de la raíz.

El ácido indolbutírico y el ácido naftalenacético han demostrado ser de gran utilidad para la rizogénesis de la "tara", como también cabe mencionar que el jugo de tomate influye en la proliferación de raíces; y el agua de coco induce a la formación de raicillas secundarias.

Los tratamientos cuyos resultados se expresen en porcentajes se analizaron solo en gráficos y los resultados de las variables se presentan mediante valores de centralización (promedio), las que están complementadas con gráficos.

Para la evaluación de la etapa de micropropagación, el número de hojas obtenidas en los medios de cultivo son diferentes entre cada tratamiento, presentan diferencias significativas; de manera similar en la longitud y el número de brotes, se encontraron diferencias significativas en los tratamientos (ANVA, Prueba de Du"tara" ncan, $p > 0,05$), como se detallan en el Anexo N° 18.

En la etapa de enraizamiento la prueba de Duncan, nos dice que la diferencia significativa entre los tratamientos es altamente significativa; esto con respecto a la variable número de raíces como se muestra en el Anexo N° 19.

Por tanto, la micropropagación y enraizamiento de *Caesalpinia spinosa* "tara" involucra una serie de condiciones y parámetros que se evaluaron a nivel del crecimiento de los explantes; se afirma en protocolos desarrollados de la presente investigación que se detallan en los Anexos N° 20 y 21.

VI. CONCLUSIONES

1. Se realizó la introducción y micropropagación de *Caesalpinia spinosa* "tara", encontrando un respuesta favorable, empleando el medio Murashige y Skoog, con reguladores de crecimiento y suplementos orgánicos como el agua de coco y el jugo de tomate.
2. Se logró optimizar el método de desinfección con hipoclorito de sodio al 1% por tiempo de inmersión de diez minutos.
3. Se estandarizó el medio de cultivo *in vitro* para la fase de establecimiento con el medio Murashige y Skoog modificado, suplementado con carbón activado al 2 %, agua de coco al 15 % y ácido ascórbico (100 mg/l).
4. Se desarrolló un protocolo de micropropagación de *Caesalpinia spinosa* "tara" obteniéndose el mejor número de brotes en medio Murashige y Skoog, enriquecido con ANA (1,5 ppm), BAP (0,25 ppm) y agua de coco al 15%.
5. El mejor medio de enraizamiento fue el medio Murashige y Skoog a la mitad de su concentración adicionado con ANA (1,0 ppm) y agua de coco al 15%.

VII. RECOMENDACIONES

1. Para los trabajos de cultivo *in vitro* se debe emplear la técnica del "picado de semilla" en especies cuya cáscara es dura (testa).
2. Para disminuir la oxidación de los explantes se sugiere probar menor intensidad de luz durante la etapa de incubación.
3. Debido a la importancia social y económica de la "tara" se sugiere explorar otras líneas de investigación como es la embriogénesis somática.
4. En la etapa de micropropagación se debe realizar estudios incrementado el porcentaje de agua de coco al 30 %, y también realizar combinaciones del incremento de auxinas y disminución de citoquininas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aceves, J. y Hernández, J.** 1991. Propagación comercial de plantas ornamentales. Colegio Profesional de Biólogos del Estado Veracruz - México. Disponible en: <http://www.uv.mx/iiesca/revista2/aceves2.html>
2. **ALNICOLSA DEL PERU. SAC.** 2008. Productos agroindustriales de exportación barbasco en polvo, tara en polvo cochinilla ratania todo sobre la tara (*Caesalpinia spinosa*). Perú. Disponible en: <http://tripod.com/caesalpiniaspinosa>
3. **Araujo, P.** 1998. La tara alternativa para el desarrollo de la sierra. I Seminario regional del sur *Caesalpinia spinosa* "tara", La industrialización y exportación al siglo XXI. Ministerio de Agricultura. Universidad Católica Santa María. Arequipa - Perú.
4. **Azofeifa, A.** 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Centro para la investigación en granos y semillas (CIGRAS). Universidad de Costa Rica, San José - Costa Rica. Disponible en: <http://www.fao.org/DOCREP/006/AD232S/AD232S00.htm>
5. **Carrizosa, M., Ramírez, C., Guerrero, E., Santamaria, M y Hodson, E.** 1994. Cultivos de tejidos para la propagación y mejoramiento de especies forestales. Libro de resúmenes. III Congreso. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. Tomo II.
6. **CIAT.** 1995. Cultivos de tejidos en la agricultura. fundamentos y aplicaciones. Centro internacional de agricultura tropical. (Roca, W y Mrogínsky, L.; Eds.). Cali - Colombia.
7. **CIRGEBV.** 1994. Segundo curso de propagación *in vitro* de plantas ornamentales. Centro de investigación en recursos genéticos y biotecnología vegetal. Universidad Nacional Agraria. La Molina. Perú.
8. **De La Cruz, P.** 2009. Aprovechamiento integral y racional de la tara. Revista del Instituto de investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
9. **Delgado, G. y Rojas, C.** 2001. Cultivos de tejidos vegetales: fundamentos y aplicaciones. Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo. Lambayeque - Perú.

10. **FAO.** 1991. Guía para la manipulación de semillas forestales. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación Disponible en:<http://www.fao.org/DOCREP/006/AD232S/AD232S00.HTM>
11. **García, M. y Quintero, R.** 1993. Biotecnología alimentario. Edit. Limusa, México.
12. **Góngora, G., Cancino, G. y Hondson, E.** 1994. Programa de biotecnología en especies frutales promisorias. Libro de resúmenes III Congreso Pontificia Universidad Javeriana. Santa Fé de Bogotá. Colombia. Tomo II.
13. **Hudson, T. y Hartmann, H.** 1986. Propagación de plantas. Principios y prácticas. Compañía Editorial Continental. Cuarta edición. México. D.F.
14. **Hurtado, D. y Merino, M.** 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial. Trillas. México.
15. **Infoagro.** 2003. Generalidades, taxonomía y morfología. Disponible en: <http://www.infoagro.com/hortalizas/tomate.htm>. Accesado en junio del 2003.
16. **IDESI.** 2008. Manual de desarrollo, sostenibilidad de la "tara" en Ayacucho. Instituto de desarrollo del sector informal de Ayacucho - Perú.
17. **Krikorian, A.** 1991. Medio de cultivo: generalidades, composición y preparación. Centro internacional de agricultura tropical. Cali - Colombia.
18. **Li-ChunH., Van Giundi, R. y Murashige, J.** 1988. Fundamentos y aplicaciones de cultivo de tejidos vegetales. I Curso de cultivo de tejidos vegetales aplicados a la producción agrícola. Venezuela.
19. **Lozano, Z.** 2011. Establecimiento de un protocolo para la propagación *in vitro* de "guarango" *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, a partir de plántulas como herramienta para la preservación de esta especie. Tesis para optar el título de Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí - Ecuador. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/3695>
20. **Margara, J.** 1998. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Editorial. Mundi - Prensa. España.
21. **Medina, I.** 1990. Organogénesis *in vitro* a partir de entrenudos, raíces y hojas de nuevos cultivares. Tesis Universidad Peruana Cayetano Heredia. Perú.
22. **MINCETUR.** 2005. Planes Operativos de productos. Tara región Ayacucho. Ministerio de Comercio Exterior y Turismo. Perú.
23. **Mosella, Ch. y Ascui, L.** 1991. Cultivo de tejidos vegetales. Frutales libres de virus partiendo de ápices meristemáticos. In: W. Roca y L. Mroginski

- (Eds), Cultivo de tejidos vegetales. Centro Internacional de Agricultura Tropical.
24. **Mostacero, J., y Mejía, F.** 1993. Taxonomía de fanerógamas Peruanas. 1ra. Ediciones. Editoriales. CONCYTEC. Perú.
 25. **Peña, G.** 2002. Biotecnología, clonación e ingeniería genética. Principios básicos y aplicaciones al alcance de todos. Auspiciado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Perú.
 26. **Pierik, R.** 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Editorial Mundi - Prensa. Segunda Edición. España.
 27. **Quintero, R.** 1990. Prospectivas de la biotecnología en México-Fundador Javier Barrios Sierra. Centro de Investigación Prospectiva.
 28. **Roca, W. y Mroginsk, L.** 1991. Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali- Colombia.
 29. **Sánchez, C.** 2006. Estudio Preliminar para la propagación *in vitro* de "tara" *Caesalpinia spinosa* (Molina Kuntze). Tesis de Grado para obtener el título de Ingeniero Forestal. Disponible en: http://www.esfor.umss.edu.bo/biblioefor/resol_datos_biblio_esfor.php?...
 30. **Sharry, S.** 2001. Problemas asociados al cultivo de tejidos de especies Leñosos. Centro experimental de propagación vegetativa. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
 31. **Serrano, M. y Piñol, T.** 1991. Biotecnología vegetal. Editorial Síntesis S.A. Segunda Edición. España.
 32. **Suárez, E.** 1990. Cultivo *in vitro* de Segmentos de *Amnona cherimola* Mill. Tesis. Universidad Nacional Agraria. La Molina. Perú.
 33. **Villalobos, V y Thorpe, T.** 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali-Colombia.
 34. **Villegas, L.** 1990. Mejoramiento de la producción de forestales a partir de plantas producidas *in vitro*. Programa andino de biotecnología. Venezuela.

ANEXO

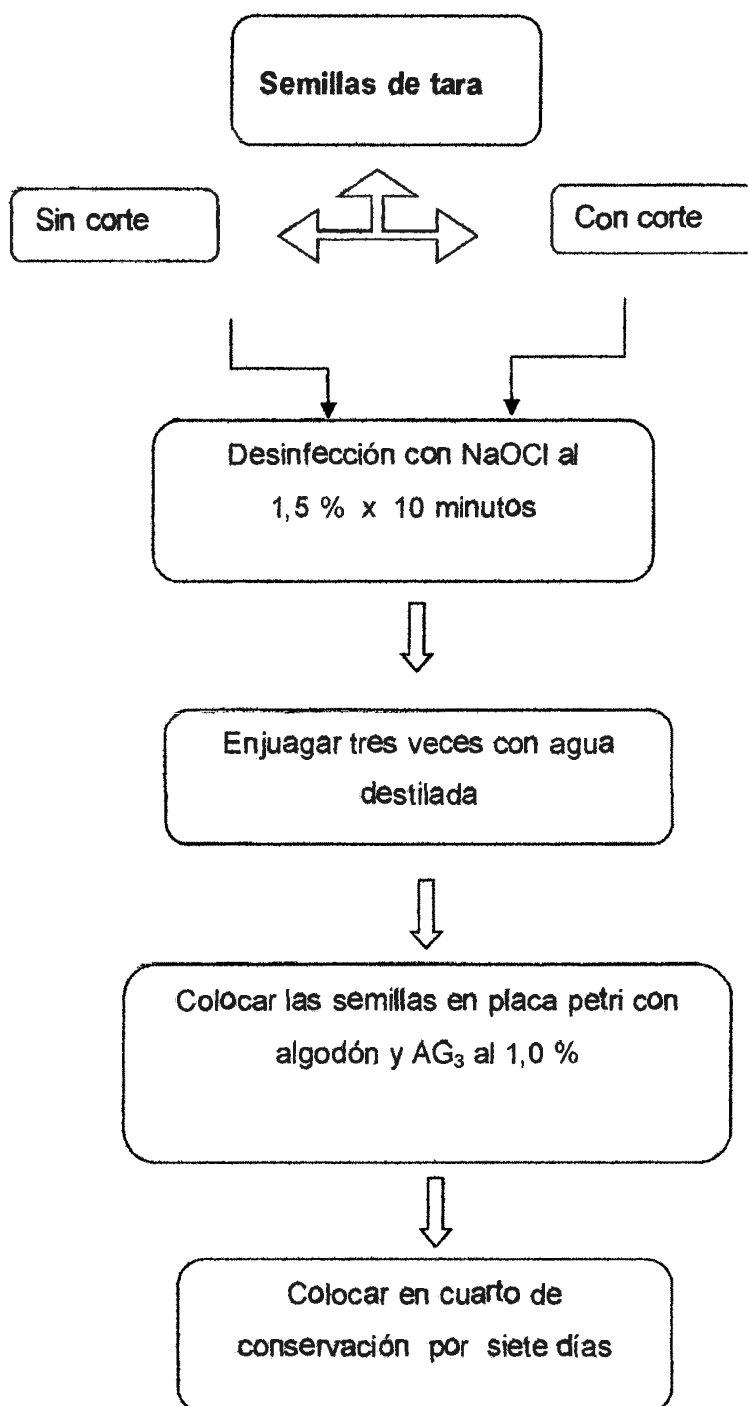
ANEXO N°01

Selección de la planta madre de *Caesalpinia spinosa* "tara" de aproximadamente 8 años.



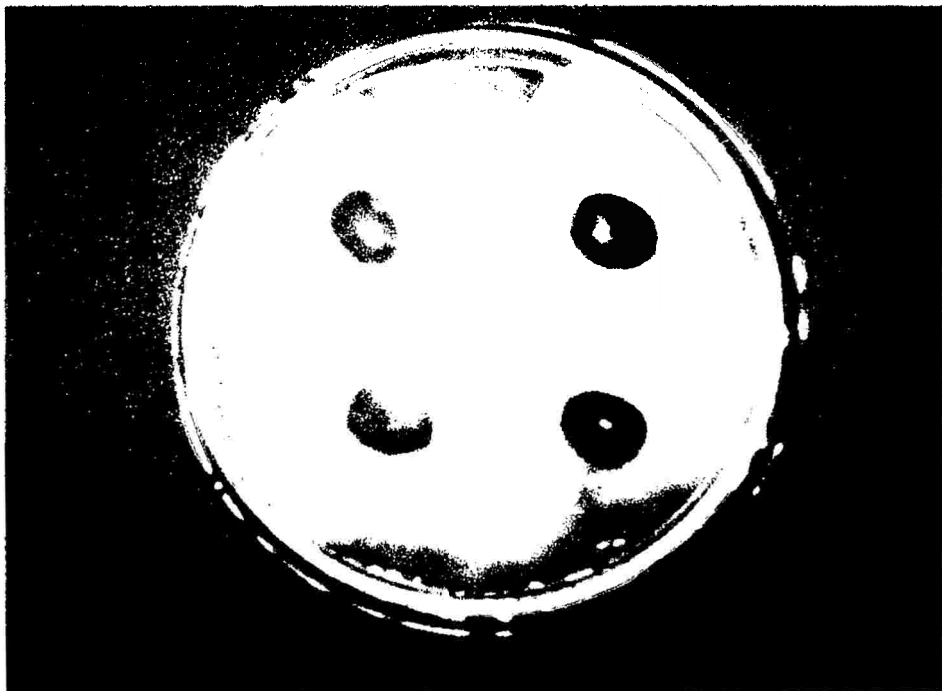
ANEXON°02

Metodología de la germinación *in vitro* de las semillas de *Caesalpinia spinosa* "tara".



ANEXO N°03

Introducción *in vitro* de semillas de *Caesalpinia spinosa* "tara", en placa petri con algodón en la base y ácido giberélico.



ANEXON°04

Preparación de soluciones stock para medio de (Murashige y Skoog modificado).

Stock A: Macroelementos.

Concentración 10 X

Tomar 100 ml

	Para Preparar Stock de :		
	500 ml	1 litro	2 litros
MgSO ₄ x7H ₂ O	1.85 gr	3.7 gr	7.4 gr
MgSO ₄	0.9035 gr	1.807 gr	3.61 gr
KNO ₃	9.50 gr	19 gr	38 gr
CaCl ₂ x2H ₂ O	2.20 gr	4.4 gr	8.8 gr
KH ₂ PO ₄	0.85 gr	1.7gr	3.4 gr
NH ₄ NO ₃	8.25 gr	16.5 gr	33gr

Disolver las sales por separado, mezclar y enrasar al volumen indicado

Stock B: Microelementos

Concentración 100 X

Tomar 10 ml

	Para Preparar Stock de :		
	250 ml	500 ml	1 litro
H ₃ BO ₃	155 mg	3.7 mg	7.4 mg
MnSO ₄ xH ₂ O	472.5 mg	1.807 mg	3.61 mg
ZnSO ₄ x7H ₂ O	215 mg	19 mg	38 mg
KI	2.20 mg	4.4 mg	8.8 mg
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0.85 mg	1.7 mg	3.4 mg
CoCl ₂ x6H ₂ O **	8.25 mg	16.5 mg	33 mg
CuSO ₂ x5H ₂ O **	0.625 mg	1.25 mg	2.5 mg

**Para CoCl₂x6H₂O y CuSO₂x5H₂O preparar primero una Solución concentrada de estas sales: pesar 5 mg de cada sal y diluirlas juntas en 10 ml de H₂O.

Obteniéndose una solución (A) de 500 mg /litro.

Tomar de la solución (a) una alcuota de:	1.25 ml	2.5 ml	5 ml
--	---------	--------	------

Stock C: EDTA-Fe

Concentración 100 X

Tomar 5ml

	Para Preparar Stock de :		
	100 ml	250 ml	500 ml
Na ₂ EDTA *	0.746gr	1.865gr	3.730gr
Fe ₂ SO ₄ x 7H ₂ O**	0.556 gr	1.390 gr	2.780 gr

*Diluir en 20 ml de H₂O a medida que se calienta

**Diluir en 20 ml de agua;

Mezclar bien ambas soluciones(* y**), dejar enfriar y luego enrasar.

Stock D: Constituyentes orgánicos:

Concentración 100 X

	Para Preparar Stock de :		
	50 ml	100 ml	500 ml
Tiamina HCl	0.1 mg	0.2 mg	1 mg
Piridoxina HCl	0.5 mg	1.0 mg	5 mg
Acido nicotínico	0.5 mg	1.0 mg	5 mg
Glicina	2.0 mg	4.0 mg	20 mg

Disolver las vitaminas con agua destilada.

Los Stock A, B, C y D conservar en refrigeración.

Enrasar a 1000 ml

ANEXO N°05

Componentes de los medios de cultivo para el establecimiento de *Caesalpinia spinosa* "tara"

Componentes	MEDIO 1 (M ₁)	MEDIO2 (M ₂)	MEDIO3 (M ₃)	MEDIO4 (M ₄)	MEDIO5 (M ₅)
Stock A(ml)	100	100	100	100	100
Stock B(ml)	10	10	10	10	10
Stock C(ml)	5	5	5	5	5
Stock D(ml)	1	1	1	1	1
Mio-inositol(gr)	0,1	-	0,1	-	0,1
Azúcar(gr/l)	30	30	30	30	30
	↓	↓	↓	↓	↓
pH	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6
Agar (gr)	7	7	7	7	7
Carbón(%)	2	-	2	2	2
Ac. Cítrico(mg/l)	-	100	-	-	100
Ac. Ascórbico(mg/l)	-	-	100	100	-
Agua de coco(ml)	-	-	-	150	150

ANEXON°06

Componentes de los medios de cultivo para la fase de micropropagación de *Caesalpinia spinosa* "tara".

Componente	Medios					
	MM ₁	MM ₂	MM ₃	MM ₄	MM ₅	MM ₆
Macronutrientes	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Micronutrientes	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
EDTA	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Vitaminas	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Mio- inositol	0,1 gr	0,1 gr	0,1 gr	0,1 gr	0,1 gr	0,1 gr
Azúcar	3,0 gr	3,0 gr	3,0 gr	3,0 gr	3,0 gr	3,0 gr
ANA(ppm)	1	-	1	1,5	0,25	-
BAP (ppm)	-	1	1	0,25	1,5	0,5
AIA (ppm)	-	-	-	-	-	1
Agua de Coco(ml)	-	-	-	150	100	
Jugo de tomate(%)	-	1	-	-	-	1

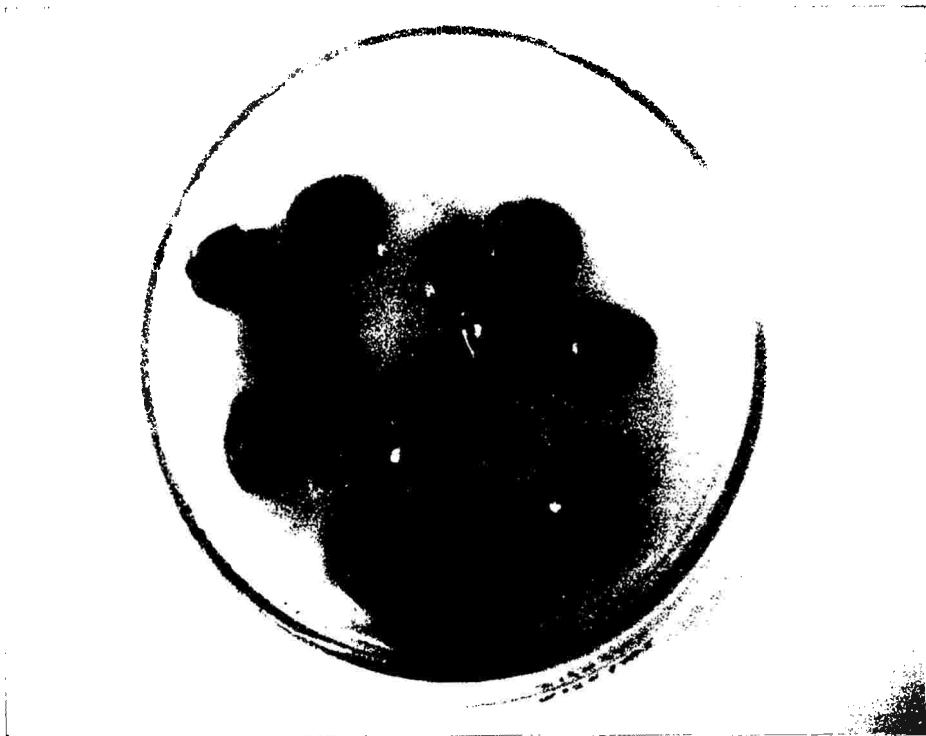
ANEXON°07

Componentes de los medios de cultivo para la etapa de enraizamiento de *Caesalpinia spinosa* "tara".

Componente	Medios							
	MM ₁	MM ₂	MM ₃	MM ₄	MM ₅	MM ₆	MM ₇	MM ₈
Macronutriente	10ml	10ml	10ml	10ml	5 ml	5ml	5ml	5ml
Micronutriente	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml
EDTA	0,5ml	0,5ml	0,5 ml	0,5 ml	0,25ml	0,25ml	0,25ml	0,25ml
Vitaminas	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1ml	0,05ml	0,05ml	0,05ml	0,05ml
Mio- inositol	0,1 gr	0,1 gr	0,1 gr	0,1 gr	0,1 gr	0,1 gr	0,1 gr	0,1 gr
Azúcar	3,0 gr	3,0 gr	3,0 gr	3,0 gr	3,0gr	3,0 gr	3,0gr	3,0 gr
ANA (ppm)	1	1	1	1	1	1	1	1
AIA (ppm)	-	1	-	1	-	1		1
Agua de Coco(ml)	-	-	150	-	-	-	150	-
Jugo de tomate(%)	1		-	1	1	-	-	1

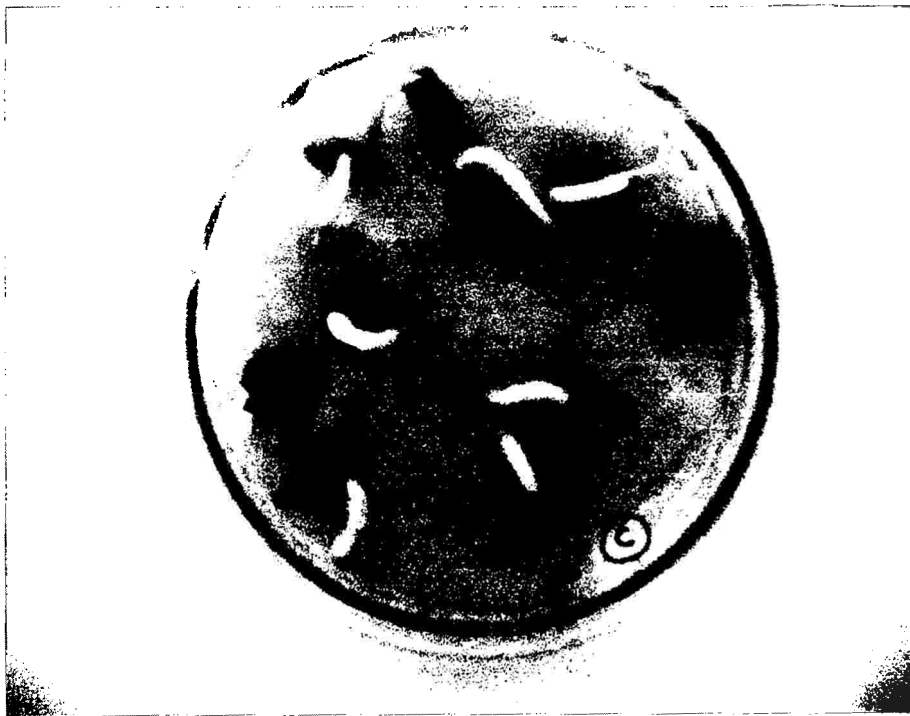
ANEXON°08

Germinación y desarrollo *in vitro* de semillas pre-tratadas con ácido gibérelico dos días después de la introducción.



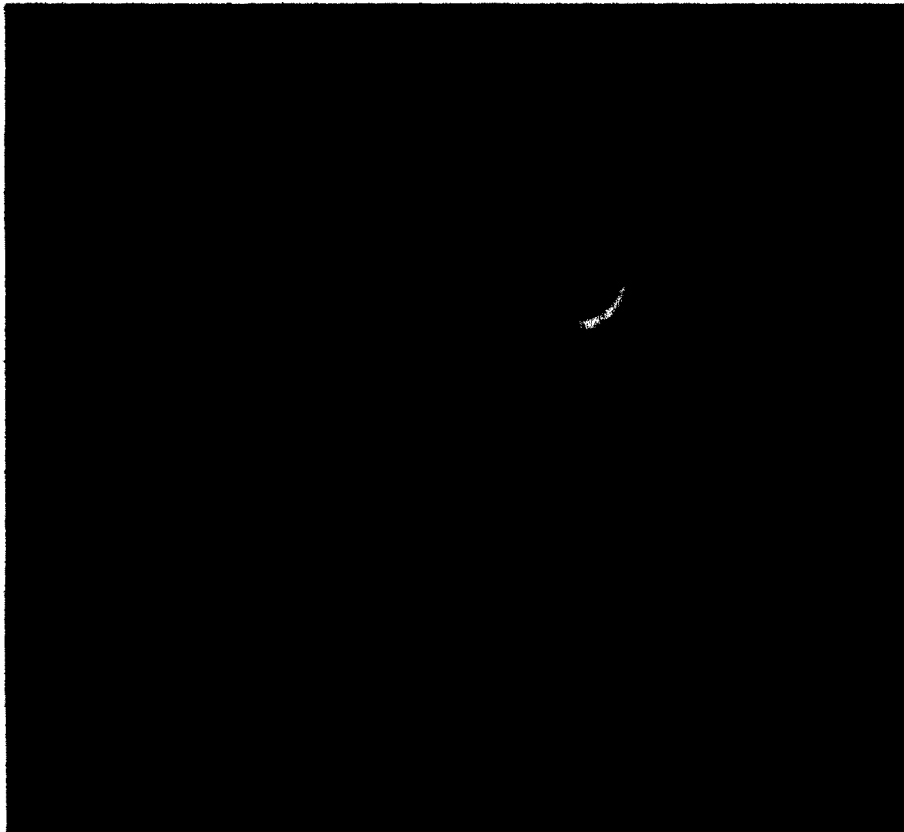
ANEXO N° 09

Germinación y desarrollo *in vitro* de semillas pre-tratadas con ácido gibérelico cuatro días después de la introducción.



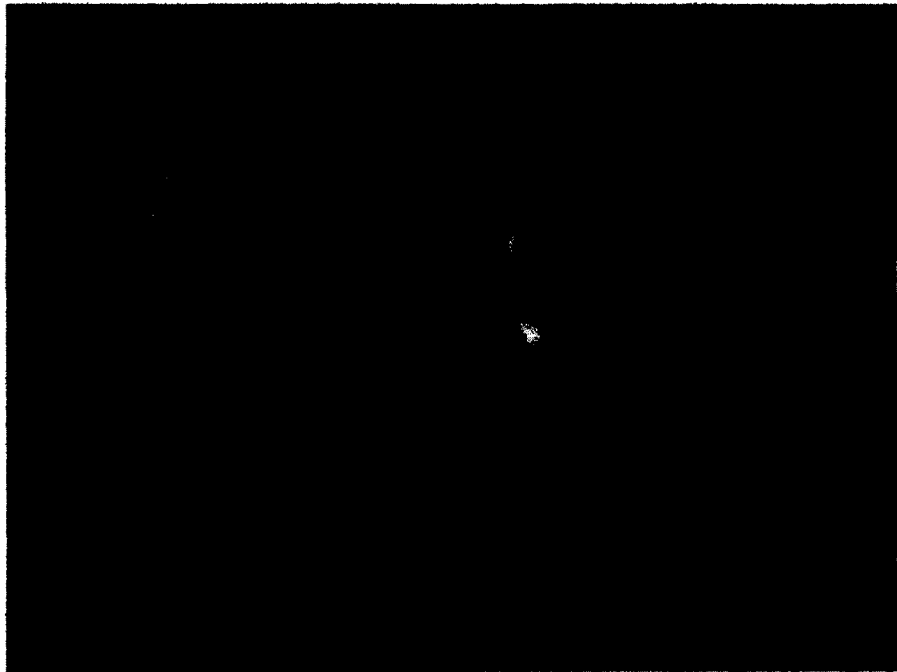
ANEXO N° 10

Germinación y desarrollo *in vitro* de semillas pre-tratadas con ácido gibérelico siete días después de la introducción en placas.



ANEXO N° 11

Explante de tara después de la germinación con ácido gibérelico, para ser subcultivada en medio Murashige y Skoog modificado.



ANEXON°12

Porcentaje de germinación de semillas de "tara" *in vitro* sin corte, en diferentes tratamientos, a los 30 días

Desinfección e introducción de semilla				
Código de tratamiento	NaOCl(%)	Tiempo en minutos	AG ₂ (ppm)	Germinación (%)
DS1	0.5	10	0,5	10
DS2			1	12
DS3			1,5	13
DS4		15	0,5	14
DS5			1	12
DS6			1,5	11
DS7		20	0,5	10
DS8			1	12
DS9			1,5	15
DS10	1	10	0,5	26
DS11			1	15
DS12			1,5	14
DS13		15	0,5	28
DS14			1	19
DS15			1,5	16
DS16		20	0,5	22
DS17			1	20
DS18			1,5	15
DS19	1.5	10	0,5	17
DS20			1	19
DS21			1,5	12
DS22		15	0,5	11
DS23			1	13
DS24			1,5	16
DS25		20	0,5	14
DS26			1	15
DS27			1,5	18

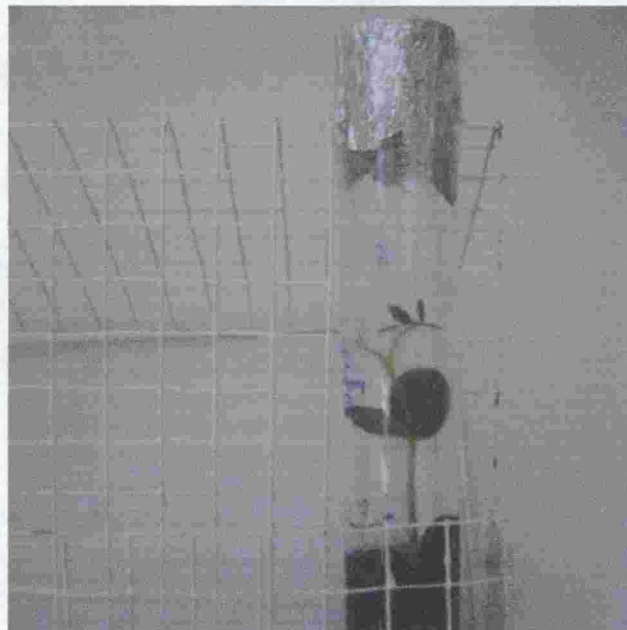
ANEXO N° 13

Porcentaje de germinación de semillas de "tara" *in vitro* con corte, en diferentes tratamientos, a los 7 días

Desinfección e introducción de semilla					
Código de tratamiento	NaOCl (%)	Tiempo en minutos	AG ₃ (ppm)	Germinación (%)	
DC1	0.5	10	0,5	55	
DC2			1	45	
DC3			1,5	60	
DC4		15	15	0,5	45
DC5				1	52
DC6				1,5	62
DC7		20	20	0,5	56
DC8				1	45
DC9				1,5	61
DC10	1	10	0,5	72	
DC11			1	95	
DC12			1,5	82	
DC13		15	15	0,5	62
DC14				1	73
DC15				1,5	75
DC16		20	20	0,5	79
DC17				1	76
DC18				1,5	65
DC19	1.5	10	0,5	52	
DC20			1	45	
DC21			1,5	32	
DC22		15	15	0,5	48
DC23				1	32
DC24				1,5	41
DC25		20	20	0,5	51
DC26				1	31
DC27				1,5	38

ANEXO N° 14

Desarrollo *in vitro* de las plántulas en medio de establecimiento a los 35 días después de la introducción.



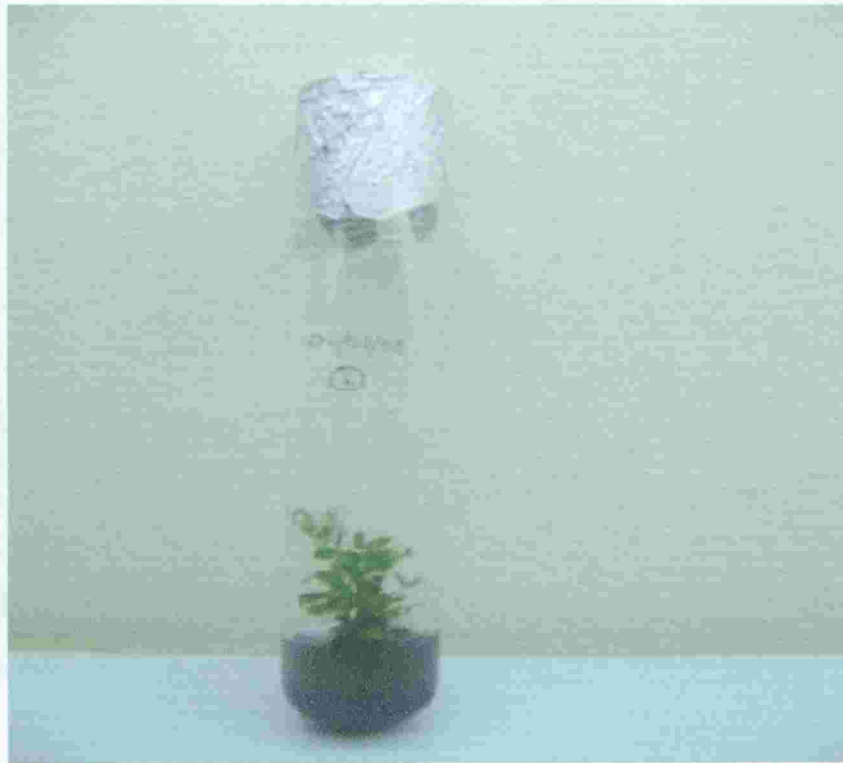
ANEXO N° 15

Formación de yemas de "tara", en la etapa de micropropagación utilizando el medio Murashige y Skoog modificado.



ANEXO N° 16

Micropropagación de tara" utilizando el medio Murashige y Skoog modificado, a los 35 días después de la siembra.



ANEXO N° 17

Enraizamiento de *Caesalpinia spinosa* "tara" a los 45 días después de la siembra.

