

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Introducción y propagación *in vitro* de *Plukenetia
volubilis* “sacha inchi”. Ayacucho - 2009.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO
ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTADO POR

Bach. KENY MEYER MARTÍNEZ GÓMEZ

AYACUCHO, PERÚ

2011

*A mis padres Máximo
y Mercedes con inmenso agradecimiento*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, “Alma Máter” de mi formación profesional, que me albergó en sus aulas.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas, forjadores y constructores de hombres al servicio de la sociedad y de la humanidad; quienes me impartieron sus conocimientos, para culminar en forma satisfactoria mi Formación Profesional.

A la Mg. Paula García Godos Alcázar, asesora de la presente investigación, por brindarme sus conocimientos y orientaciones, que permitieron el desarrollo y culminación de la presente investigación.

A todos aquellos que me brindaron su apoyo para la realización de esta investigación.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Antecedentes	4
2.2 Valor comercial de <i>Plukenetia volubilis</i> L.	6
2.3 Ácidos grasos poliinsaturados	8
2.4 <i>Plukenetia volubilis</i> L. "sacha inchi"	9
2.4.1 Origen y distribución	9
2.4.2 Descripción morfológica.....	9
2.4.3 Clasificación taxonómica.....	10
2.4.4 Composición química de la semilla de "sacha inchi"	11
2.4.5 Crecimiento vegetativo y fructificación.....	13
2.4.6 Condiciones edafoclimáticas para su cultivo	14
2.5 Cultivo de tejidos vegetales.....	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1 Ubicación	25
3.2 Obtención y selección del material vegetal.....	25
3.3 Desinfección e introducción del material vegetal.....	26
3.4 Elección de medios de cultivo.....	27
3.5 Establecimiento del material vegetal <i>in vitro</i>	28
3.6 Propagación	29
3.7 Enraizamiento.....	31
3.8 Aclimatación.....	32
3.9 Condiciones de cultivo <i>in vitro</i>	32
3.10 Evaluaciones	32
3.11 Análisis estadístico	33
IV. RESULTADOS	34
V. DISCUSIÓN	44
VI. CONCLUSIONES	57
VII. RECOMENDACIONES	58
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXOS.....	67

**Introducción y propagación *in vitro* de *Plukenetia volubilis* “sacha inchi”.
Ayacucho 2009.**

Autor: Bach. Keny Meyer Martínez Gómez

Asesora: Mg. Paula García Godos Alcázar

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de introducir y propagar *in vitro* *Plukenetia volubilis* “sacha inchi”. Se utilizaron como explantes semillas y segmentos nodales de plantas jóvenes de “sacha inchi” procedentes del distrito de Santa Rosa, provincia de La Mar, departamento de Ayacucho. La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Las semillas se desinfectaron con 1.5%, 2.5% y 3.0% de NaClO durante 10, 15 y 20 minutos, los segmentos nodales se desinfectaron con 1.5%, 2.0%, 2.5% 3.0% y 4.0% de NaClO durante 2, 5 y 10 minutos, se utilizó medio Murashige y Skoog semisólido, para controlar la oxidación en segmentos nodales se utilizaron ácido ascórbico, ácido cítrico y carbón activado individualmente, para promover la brotación en embriones se utilizó MS con BAP, AG₃, agua de coco, jugo de tomate individualmente y en combinaciones, para promover la brotación en segmentos nodales se utilizó MS con ANA, AIB, BAP, AG₃, agua de coco, jugo de tomate individualmente y en combinaciones, para inducir el enraizamiento de segmentos nodales se utilizó MS y MS modificado con AIA, ANA y AIB individualmente, para aclimatar se utilizó un sustrato compuesto por arena, compost y tierra agrícola en una proporción 1:2:7. De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que las semillas que se desinfectaron con 3.0% de NaClO por 20 minutos y los segmentos nodales con 2.5% de NaClO por 5 minutos, obtuvieron 75% y 60% de viabilidad, respectivamente. Los embriones cigóticos se establecieron en MS y los segmentos nodales se establecieron en MS con ácido cítrico (150 mg/L), obteniéndose un 60% de explantes sin oxidación. En la fase de propagación, utilizando medio MS suplementado con 0.1 mg/L de AG₃ se obtuvo un 75% de formación de brotes en embriones cigóticos, mientras utilizando medio MS suplementado con 0.1 mg/L de AIB más 20 ml/L de agua de coco se obtuvo 22.5% de formación de brotes en segmentos nodales. En la fase de enraizamiento, utilizando medio reducido a la mitad en su concentración de sales fuente de nitrógeno (MS/2) suplementado con 2.5 mg/L de AIB se obtuvo un 75% de enraizamiento de segmentos nodales. La aclimatación de las plantas enraizadas *in vitro* se realizó a 25 °C alcanzando un 50% de supervivencia. Se concluye que la propagación *in vitro* de “sacha inchi” se logró a partir de embriones cigóticos por su mayor porcentaje de formación de brotes (75%).

Palabras clave: *in vitro*, *Plukenetia volubilis*, sacha inchi, propagación

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas representan una importante fuente de recursos naturales para el hombre, pues sus diferentes componentes como hojas, tallos y frutos se utilizan en la producción farmacológica y alimentaria principalmente. El "sacha inchi" es una planta arbustiva de la familia Euphorbiaceae que comúnmente se conoce como "maní del monte", "sacha maní" o "maní del inca", se encuentra distribuida desde América Central hasta América del Sur en países como Perú, Bolivia y Brasil.

En el Perú se le encuentra en estado silvestre en diversos lugares de las provincias de San Martín, Ucayali, Huánuco, Amazonas, Madre de Dios y Loreto. Es una planta que se adapta a suelos arcillosos y ácidos, desarrollando mejor en climas cálidos (Manco, 2006), actualmente el "sacha inchi" está siendo forestado de forma tradicional en el departamento de Ayacucho, provincia de La Mar en el valle del río Apurímac y Ene, alcanzando los distritos de LLochegua, San Francisco, Sivia, Santa Rosa y Ayna (Chuchón, 2008). Presenta características muy favorables para la reforestación y crece desde los 100 a 2000 m.s.n.m.; se han registrado plantaciones establecidas desde los 600 m.s.n.m. (Manco, 2003).

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

En el Perú se inicia un auge en la industria farmacéutica y alimentaria a partir de los años 90, desarrollándose diversos ingredientes y productos naturales respaldados en una historia de amplio conocimiento tradicional, largos procesos de domesticación y mejoramiento de cerca de 4400 especies de plantas, las cuales tienen aplicación en la salud y alimentación. El prometedor "sacha inchi", cuya semilla ya está revolucionando la industria de los aceites funcionales y especiales, por presentar ácidos grasos omega 3, 6 y 9 en proporciones que benefician la salud (Pajares y Wachtel, 2008).

Bordignon y Viegas (2009), señalan que la propagación convencional por esquejes el resultado de crecimiento es cero (0%). En la propagación *in vitro*, la desinfección de semilla se realizó con alcohol al 70% por un minuto y en una solución de 2% de hipoclorito de sodio durante 20 minutos, utilizándose medio de cultivo Murashige y Skoog, suplementado con 30 g/L de sacarosa. Se sembraron tres porciones de embrión, una sección basal, una sección intermedia y una sección apical, se evaluaron las emisiones de las raíces, brotes y callo, 30

días después de la siembra, siendo el tratamiento: BAP 1.0 mg/L y AIB 0.1 mg/L el que tuvo una mayor emisión de brotes (100%) en cuanto a la sección apical. Mientras que el tratamiento con AIB 0.5 mg/L mostró mayor crecimiento de las raíces (80%); en cuanto a la sección basal, los tratamientos de interacción de citocinina - auxina, resultaron en la formación de callos friables y con capacidad de regeneración del 91.6% en sección basal.

Guerrero y col., (2008), reportaron en su investigación de introducción y establecimiento *in vitro* de ápices de "sacha inchi", utilizaron el medio de cultivo Murashige y Skoog, prepararon el material donante de campo con aplicaciones de fungicida (Carbendazim) a razón de 1.5 ml/L acompañado del fertilizante foliar (Bayfolan) a razón de 4 ml/L, después de 5 días de la aplicación, se colectaron brotes terminales de "sacha inchi"; seccionando explantes menores a 2.5 cm de longitud, que fueron lavados con detergente comercial a razón de 5 g/L por 10 minutos. Los explantes lavados se pre desinfectaron con alcohol al 70% por 10 segundos y desinfectados con 1.0, 1.5 y 2.0 % de NaOCl en 10, 15 y 20 minutos, concluyen que con estos tratamientos se logró introducir el material vegetal de "sacha inchi" *in vitro*, obteniendo mínimas tasas de contaminación, así como una supervivencia del 100% de los explantes.

Gárate (2009), utilizó ápices y segmentos nodales, de "sacha inchi", y medios de cultivo Murashige y Skoog, con 100mg/L de ácido cítrico, 20g/L de sucrosa, 7 g/L de agar, suplementados con ácido 3 indol butírico (AIB) a pH 5.7, el proceso de desinfección de los explantes fue realizado con alcohol al 70% por 10 segundos y solución de hipoclorito de sodio al 0.5 %, con enjuagues de agua destilada estéril, los explantes fueron cultivados e incubados a una temperatura promedio de 24°C, intensidad luminosa 700 lux y un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de

oscuridad. Para la fase de enraizamiento se utilizaron 4 tratamientos (25, 50, 100 y 200 mg/L) de ácido 3 indol butírico (AIB), fueron analizadas para evaluar el enraizamiento *in vitro*, siendo la concentración (AIB 200 mg/L) la que mostró mejor respuesta de enraizamiento, para el explante segmento nodal tanto para explantes extraídos *in vitro* y *ex vitro*.

2.2. Valor comercial de *Plukenetia volubilis* L.

Stocker y Gutiérrez (2009), realizaron un análisis de los principales actores, públicos y privados para conocer las acciones emprendidas del sector exportador para los próximos años, identificando al “sacha inchi” en las regiones priorizadas, como un producto con potencial para ser incluido en una cadena de valor. El “sacha inchi” dentro del análisis de mercado, tiene una demanda local fuerte, también de interés para exportación, en sus diferentes formas disponibles. En el Perú ya se han desarrollado diferentes formas para obtener un buen precio de venta, que podría ser vinculado a mercados en Europa, Suiza, Francia, India, Bélgica y Japón (Pajares y Wachtel, 2008).

La prospección económica a futuro fue presentada por la Corporación Andina de Fomento (CAF) y la Comisión para la Promoción de Exportaciones del Perú (PROMPEX). En su informe de mercado para productos e ingredientes naturales para la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria, los productos resaltantes fueron el “camu camu” y “sacha inchi”. La propuesta de estos productos fue tomada en base a las investigaciones y análisis que se hicieron en la fase de diagnóstico de los sectores priorizados por biocomercio (Bueno y Nieto, 2006).

Tabla N° 01.- Producción, oferta y precio de “sacha inchi” en el mercado internacional

Proyección de producción nacional con crecimiento conservador y optimista años 2005-2015:		
	Crecimiento conservador	Crecimiento optimista
Año	Volumen (t)	Volumen (t)
2005	1 837.500	1 837.500
2015	2 788.700	4.766.030

Oferta de producción proyectada de 2005 – 2015:		
Producción	% Oferta	Oferta en toneladas
Crecimiento conservador	51.76 %	951.20 t.
Crecimiento optimista	159.37 %	2 928.53 t.

Precios estimados para productores:		
Moneda	Precio de Producción/ Kg	Precios de Venta / Kg
Nuevos soles (S/.)	1.20	3.00- 5.00
Dolares americanos (US \$)	0.40	0.93- 1.54

Fuente: Bueno y Nieto (2006).

Bueno y Nieto (2006), recomiendan que el “sacha inchi”: 1) Se norme y reglamente técnicamente por tratarse de una planta con uno de los mayores contenidos de aceites grasos poli insaturados (omega 3 y omega 6) y con un alto contenido de proteínas necesarias para la alimentación y la salud, asimismo con cualidades nutraceúticas, alimenticias y otras. 2) Es de importancia para los productores, exportadores y demás miembros de la cadena, contar con una base genética validada del “sacha inchi”, por lo que se sugiere articularse y establecer un convenio marco con una entidad de investigación seria como el Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) o universidades.

2.3. Ácidos Grasos Poliinsaturados

Son moléculas orgánicas de naturaleza lipídica, que poseen más de un doble enlace entre sus carbonos, se clasifican como omega según el lugar que ocupa el primer doble enlace carbono con respecto al grupo metilo. Los ácidos grasos esenciales son indispensables para la buena salud. Existen dos grupos de ácidos grasos esenciales (AGP) que el cuerpo no puede producir: el ácido linoleico, y el ácido linolénico, deben obtenerse de la dieta, ambos producen procesos químicos fundamentales para el funcionamiento del organismo. En el cuerpo estos se pueden convertir en otros ácidos grasos esenciales como el ácido araquidónico, ácido eicosapentanoico (EPA) y el ácido docosahexanoico (DHA) (Reardon y Troxler, 2006).

En el cuerpo, los AGP son importantes para mantener las membranas de todas las células, para producir las prostaglandinas que regulan muchos procesos corporales, como la inflamación y la agregación plaquetaria protegiendo al cuerpo del exceso de coagulación, son necesarias para que las vitaminas liposolubles de los alimentos (A, D, E y K) puedan ser absorbidas, reducen la inflamación del cuerpo (Simopoulos, 2002) y ayudan a prevenir ciertas enfermedades crónicas como la artritis y la artero esclerosis, reduciendo la producción de citocinas (Calder, 2006), ayuda a prevenir enfermedades al corazón disminuyendo la circulación de colesterol y triglicéridos en la sangre, reducen el riesgo de obesidad al estimular la producción de leptina una hormona de las células grasas que regula el apetito, inhibe el adelgazamiento de las arterias, ayuda a relajar y dilatar las arterias, ayuda a la respuesta de insulina del organismo, ayuda a prevenir el desarrollo de células cancerosas, interviene en el desarrollo de la columna vertebral del feto, formación de tejido nervioso en la mielinización y formación del tejido ocular (Larque y col., 2002).

2.4. *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”

2.4.1. Origen y distribución

Valles (1993), menciona que el “sacha inchi” está distribuido en el trópico latinoamericano desde el Sur de México, Indias Occidentales, la Amazonía y el Acre en Bolivia. En nuestro país se ha recolectado en Madre de Dios, Huánuco, Oxapampa, San Martín, Rodríguez de Mendoza, Ucayali (Pucallpa, Contamina y Requena), el Putumayo, alrededores de Iquitos y Caballococha. En San Martín se encuentra en toda la cuenca del Huallaga hasta Yurimaguas, en el Alto Mayo, Bajo Mayo, el Valle de Sisa y áreas de la cuenca Lamas-Sihuas.

Distribución Geográfica en Perú: Cusco, Junín, Huánuco, Loreto, Madre de Dios, Pasco, San Martín y Ucayali (Pajares y Wachtel, 2008).

Distribución en Ayacucho: Provincia de la Mar en los distritos de Santa Rosa, San Francisco, Sivia y Llochegua (Chuchón, 2008).

2.4.2. Descripción morfológica

El “sacha inchi” es una planta trepadora (Valles, 1992).

Tallo: Voluble semileñoso y perenne, de altura indeterminada superior a 2 metros (Manco, 2006).

Hojas: Alternas simples, aserradas y pinninervadas, de 9 a 16 cm. de largo y 6 a 10 cm. de ancho. El ápice es puntiagudo y la base es plana o semi arrañada (Manco, 2006), con pecíolos de 2 a 6 cm. de largo. Las nervaduras nacen en la base y la nervadura central orientándose al ápice (Valles, 1990).

Flores: Hermafroditas, monoicas, deciduas; las flores masculinas son pequeñas subgloboseas, blanquecinas y dispuestas en racimos. Estambres de 16 a 30, con filamentos conspicuos, cónicos de 0,5 mm de largo (Dostert y col., 2009). En la base del racimo y lateralmente se encuentra una sola flor femenina; otros indican

hasta dos a tres flores femeninas (Arévalo, 1996). La columna estilar es parcial o totalmente connada, de 15 a 30 mm de largo (Dostert y col., 2009).

Fruto: Es una cápsula dehiscente de 3.5 a 4.5 cm. de diámetro conformada por 4 lóbulos aristados generalmente, dentro de los cuales se encuentran 4 semillas (Manco, 2006); excepcionalmente algunos ecotipos presentan hasta cinco a siete lóbulos (Arévalo, 1996).

Semillas: Son marrones de forma ovalada de 1.5 a 2 cm. de diámetro; ligeramente abultadas en el centro y aplastadas hacia los bordes (2.01 x 0.85 cm) (Rodríguez y col., 2010), al abrir las semillas se encuentran los cotiledones a manera de almendras cubiertas de una película blanquecina (Juárez, 2007).

2.4.3. Clasificación taxonómica

La clasificación botánica de la planta realizada por (Mcbride, 1951); es la siguiente:

DIVISIÓN	: Spermatophyta
SUB DIVISIÓN	: Angiospermae
CLASE	: Dicotiledonea
ORDEN	: Euphorbiales
FAMILIA	: Euphorbiaceae
GÉNERO	: Plukenetia
ESPECIE	: <i>Plukenetia volubilis</i> L.
NOMBRE COMÚN	: “sacha inchi”, “maní del monte”, “maní del inca”, “sacha maní”, “inca peanut” (Manco, 2006).

2.4.4. Composición química de la semilla de “sacha inchi”

2.4.4.1 Aminoácidos y proteínas

Tabla N° 02.- Perfil de aminoácidos de la proteína de *Plukenetia Volubilis* L. comparado con otras proteínas de semillas oleaginosas

Proteína y sus aminoácidos	Semilla (1)					WHO (4)
	Sacha inchi (3)	Soya (2)	Maní (2)	Algodón (2)	Girasol (2)	
Proteína(%)	27	28	23	23	24	
Esenciales	mg/g proteína					
Histidina	26	25	24	27	23	19
Isoleucina	50	45	34	33	43	28
Leucina	64	78	64	59	64	66
Lisina	43	54	35	44	36	58
Metionina	12	13	12	13	15	
Cisteína	25	13	13	16	15	
Metionina y cisteína	37	26	25	29	34	25
Fenilalanina	24	49	50	52	45	
Tirosina	55	31	39	29	19	
Fenilalanina y tirosina	79	80	89	81	54	53
Treonina	43	39	26	33	37	34
Triptófano	29	13	10	13	14	11
Valina	40	48	42	46	51	35
No esenciales	mg/g proteína					
Alanina	36	43	39	41	42	
Arginina	55	72	112	112	80	
Asparagina	111	117	114	94	93	
Glutamina	133	187	183	200	218	
Glicina	118	42	56	42	54	
Bolina	48	55	44	38	45	
Serina	64	51	48	44	43	
TEEA	411	418	349	365	368	
TAA	976	985	945	936	941	

TEEA: Total de aminoácidos esenciales **TAA:** Total de aminoácidos

- 1) Los valores están indicados en mg/g de proteína.
- 2) Información de "soya", "maní", "algodón" y "girasol" obtenida de Bodwell y Hopkins (1985).
- 3) Información de "sacha inchi" obtenida de Hammacker y col., (1992).
- 4) Niveles recomendados para niños de 2 a 5 años (World Health Organization-WHO, 1990).

Fuente: Bodwell y Hopkins (1985); Hammacker y col., (1992) y World Health Organization (1990).

Tabla N° 03.- Perfiles de Ácidos Grasos del aceite del “maní del inca” comparado con el aceite de otras semillas aceiteras

Ácidos Grasos	Sacha inchi	Soya	Maní	Algodón	Girasol
Aceite total (%)	54.0	19.0	45.0	16.0	48.0
Saturados(%)					
Mirístico	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Palmitico	4.5	10.5	12.0	18.7	7.5
Esteárico	3.2	3.2	2.2	2.4	5.3
Insaturados (%)					
Palmitoleico	0.0	0.0	0.3	0.6	0.0
Oleico (Omega 9)	9.6	22.3	41.3	18.7	29.3
Linoleico (Omega 6)	36.8	54.5	36.8	57.5	57.9
Linolénico (Omega 3)	45.2	8.3	0.0	0.5	0.0
Gadoleico	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0

Fuente: Hamacker y col., (1992).

Otros análisis realizados en la almendra dan como resultados cantidades de grasas y proteínas similar o ligeramente superior a la soya, maní, girasol y algodón (Hamacker y col., 1992).

2.4.4.2 Aceites

Bondioli y col., (2006) en un estudio realizado señalan que las semillas de *Plukenetia volubilis* L. mostraron un contenido de humedad de 8.68% y un contenido de aceite de 34.42% y 37.69% en base seca. La composición de este aceite es interesante dentro del punto de vista nutricional, por su alto contenido en ácido linoleico (ω -6) y ácido linolénico (ω -3); estos ácidos grasos que representan más de 80% de ácidos grasos totales.

Tabla N° 04.- Composición de ácidos grasos de aceite de *Plukenetia volubilis* L.

Ácidos Grasos	%
Ácido Palmítico	3.79
Ácido Palmitoleico	0.06
Ácido Estearico	2.65
Ácido Oleico	8.77
Ácido Linoleico	33.67
Ácido Linolénico	50.73
Acido Eicosanoico	0.07
Ácido Eicosenoico	0.26

Fuente: Bondioli y col., (2006)

2.4.5. Crecimiento vegetativo y fructificación

El "sacha inchi" a diferencia de otras especies de oleaginosas, tiene una actividad de crecimiento vegetativo y fructificación continuada durante todo el año. Esto a pesar de las variaciones limitantes que puedan presentarse en uno o varios de los factores relacionados con las características del clima (Arévalo, 1996). Las plantas alcanzan edades hasta de 10 años (Dostert y col., 2009). La cosecha de los frutos secos y maduros se realiza 6.5 a 8 meses después del trasplante definitivo. Desde esta primera cosecha, la planta no deja de producir, por ello, las cosechas se realizan cada 20 a 25 días, la cosecha se realiza recogiendo sólo las cápsulas que se encuentran de color marrón y que aún permanecen en la planta (Manco, 2006).

Tabla N° 05.- Crecimiento vegetativo de *Plukenetia volubilis* L.

En almácigo	N° de días	Después del trasplante	N° de días
Días de germinación:	11 a 14	Inicio de emisión de guía	20 a 41
Días de emergencia de hojas verdaderas		Inicio de floración	86 a 139
1er par de hojas	16 a 20	Inicio de fructificación	119 a 182
2do par de hojas	28 a 42	Inicio de cosecha	202 a 249
3er par de hojas	45 a 59		

Fuente: Manco (2006).

2.4.6. Condiciones edafoclimáticas para su cultivo

2.4.6.1 Clima

Manco (2003), menciona que los parámetros de temperaturas adaptables al "sacha inchi" están entre 10 y 36 °C, sin embargo las temperaturas altas son desfavorables porque ocasionan el aborto en flores y la conformación de semillas pequeñas. Arévalo (1996), señala una t° máxima de 32.2 °C, una t° mínima de 20.4 °C y una t° media de 26.6 °C, observándose un buen desarrollo en general.

2.4.6.2 Luz

La luz es otro factor ecológico importante en esta especie, mientras más luz reciba la cubierta vegetal, mayor es la población de brotes, flores y frutos (Guerrero, 2006).

2.4.6.3 Suelo

Arévalo (1996), señala que este cultivo prospera en suelos arcillosos (más de 50% de arcilla), franco arenosos (más de 60% de arena), indicando que es una planta versátil, que se adapta muy fácilmente a diferentes tipos de suelos, mientras Valles (1993), menciona que el "sacha inchi" es una planta agronómicamente rústica, que crece en suelos ácidos y con alta concentración de aluminio. Juárez y Egoavil (1995), reportan su adaptabilidad a condiciones de suelos con aluminio (pH 4.5 a 5.0 y >70 % de aluminio). Dostert y col., (2009) señalan que crece en suelos ácidos (pH 5.5 - 7.8).

2.4.6.4 Altitud

El "sacha inchi" se adapta desde los 100 a 2000 m.s.n.m. (Manco, 2003); registrándose así mismo las mejores semillas en plantaciones establecidas

desde los 600 m.s.n.m. Por su parte Arévalo (2005), dice que el “sacha inchi” crece desde los 100 m.s.n.m. en la selva baja y 1500 m.s.n.m. en la selva alta.

2.4.6.5 Agua

El “sacha inchi” es una planta que requiere de disponibilidad permanente de agua para tener un crecimiento sostenido; siendo mejor si las lluvias se distribuyen en forma uniforme durante los doce meses (850 a 1000 mm³). El riego es indispensable en los meses secos. Períodos relativamente prolongados de sequía o de baja temperatura, causan un crecimiento lento y dificultoso. El exceso de agua ocasiona daños a las plantas (Manco, 2006). La influencia de la lluvia es notoria en la polinización y fertilización (Arévalo, 1995).

2.5. Cultivo de tejidos vegetales

2.5.1. Generalidades

El cultivo de tejidos es un grupo heterogéneo de técnicas que consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. La investigación en cultivos de tejidos vegetales incluye un rango amplio, desde la investigación básica sobre los procesos fisiológicos ocurridos *in vitro*, hasta las investigaciones aplicadas y al desarrollo de tecnologías en la propagación clonal o en el mejoramiento genético de plantas (Roca y Mroginski, 1993). La propagación vegetativa *in vitro*, generalmente denominada micropropagación, permite clonar en corto tiempo, en condiciones bien establecidas, un gran número de especies, potencialmente todas las plantas superiores (Serrano y Piñol, 1991).

2.5.2. Explante

Es la parte de un tejido u órgano que se aísla del resto de la planta y que se utiliza como material inicial para el cultivo *in vitro*. Se debe tomar en cuenta para elección del explante, el objetivo del cultivo (en aplicaciones para estudios básicos, micropropagación, obtención de plantas con sanidad controlada, cultivos celulares, etc.) la calidad de la planta donante (Villalobos y Thorpe, 1991), la edad fisiológica del explante, como es necesario tener en cuenta que existe un tamaño mínimo del explante, que depende de la especie, del material vegetal y la época del año (Echenique y col., 2002).

2.5.3. Asepsia

El principal problema que se presenta cuando se trata de establecer los cultivos en condiciones de asepsia, es la contaminación con microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus). El ambiente generado por el medio de cultivo y las condiciones físicas de incubación, es propicio para la proliferación de estos microorganismos que provocan la destrucción de los cultivos, por competencia con el explante o modificación de nutrientes del medio de cultivo (Thorpe, 1980). Para evitar la contaminación de los cultivos con microorganismos es necesario conocer el material vegetal con que se trabaja y los posibles contaminantes específicos, desinfectar los explantes mediante el uso de compuestos químicos para eliminar los microorganismos sin causar daño al explante (Echenique y col., 2002), en la actualidad se usa etanol (70%v/v), hipoclorito de sodio NaClO de 1 a 3% (Roca y Mroginski, 1993).

2.5.4. Medios de cultivo

En la actualidad existen innumerables formulaciones, cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran: carbono,

nutrientes minerales, vitaminas, agente gelificante, sustancias reguladoras de crecimiento y otros compuestos; el medio más usado es la formulación Murashige y Skoog (1962).

Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono, la sacarosa (2% a 5%). Los medios de cultivo aportan los mismos elementos (macro y micronutrientes) que se consideran esenciales para el crecimiento de plantas enteras. El nitrógeno es suministrado en forma de nitrato y amonio, otras fuentes de nitrógeno incluyen glutamina, urea y caseína hidrolizada (CH), los medios de cultivo contienen fósforo, calcio, magnesio y azufre en concentraciones de 1 a 3 mM. La adición de hierro conjuntamente con un agente quelante (Na_2 EDTA) lo hace disponible en un amplio rango de pH; en los medios semisólidos comúnmente se adiciona agar (0.6% a 1.0 %), las concentraciones de agar pueden alterar las respuestas *in vitro* de los cultivos (Debergh, 1982).

Muchas sustancias agregadas al medio base son de variada composición química, el carbón activado suele ser incorporado al medio de 0.1 a 5.0%, porque se le atribuye la absorción de metabolitos tóxicos para los cultivos. Aún hoy se siguen utilizando ciertas sustancias de composición química indefinida como el agua de coco de 5 a 15%, jugo de tomate y puré de banana. También en ocasiones es necesaria la incorporación de agentes antioxidantes (L-cisteína, ácido ascórbico, polivinilpirrolidona, ácido cítrico) para prevenir el ennegrecimiento tisular causado por la oxidación de polifenoles presentes en los explantes que puede causar la muerte de los mismos (Echenique y col., 2002).

2.5.5. Reguladores de crecimiento

En la mayoría de los casos los medios utilizados para el establecimiento de los cultivos contienen auxinas (ANA, 2,4-D, AIA, IBA, NOA, Dicamba, Picloram) y/o citocininas (BA, CIN, ZEA, 2iP, Thidiazurón). Las giberelinas (especialmente AG₃) son requeridas en algunas ocasiones para el cultivo de meristemas o para la elongación de brotes y el ABA (Echenique y col., 2002).

Por tratamiento hormonal, las células inician una ruta de desarrollo específico o bien las células que responden a la hormona están ya determinadas. También es posible que las hormonas actúen en ambos modos, según el sistema experimental en cada caso (Serrano y Piñol, 1991). De la variedad de factores que actúan sobre la regeneración por organogénesis (formación de órganos, normalmente tallos) en los cultivos *in vitro*, las fitohormonas son especialmente importantes (Harms, 1982), en particular la relación auxina - citoquinina (Skoog y Miller, 1957).

2.5.5.1 Auxinas

Se sintetizan principalmente en el ápice del tallo y las ramas jóvenes, en las yemas y hojas jóvenes, y en general en los meristemas (Roca y Mroginski, 1993). Tienen 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. Frecuentemente fomentan el desarrollo de callos y generalmente ejercen el control primario en el crecimiento de tallos y raíces (Hurtado y Merino, 1987).

Las auxinas son los únicos reguladores de crecimiento que aumentan consistentemente la formación de primordios radiculares, pero menos en tejidos

que naturalmente presentan cierta predisposición al enraizamiento (Haissig, 1974). Además, las auxinas intervienen en el crecimiento del tallo, inhibición de yemas laterales, abscisión de hojas y de frutos, activación de las células del cambium y otras (Salisbury y Ross, 1994). Todas las formas de crecimiento de la raíz inicial, se desarrollan por un tratamiento hormonal apropiado. Muchas especies requieren auxinas fuertes como ANA y AIB, para estimular la formación de raíces (Rost y col., 2006).

2.5.5.2 Citocininas

Tienen su ubicación principalmente en el citosol de las células de meristemas apicales de raíz, y también en embriones jóvenes de maíz y hojas jóvenes en desarrollo. Se las encuentra en tejido vascular, sobre todo en el xilema, en puntas de raíces, en frutos en desarrollo, en semillas en germinación, en nódulos de raíces de leguminosas (Taiz y Zeiger, 2006).

Las citocininas promueven la división celular, promueven la formación y crecimiento de brotes laterales (axilares) venciendo la dominancia apical, promueven la movilización de nutrientes hacia las hojas, también promueven la germinación de las semillas y el desarrollo de brotes, la maduración de los cloroplastos, participan en la síntesis de pigmentos fotosintéticos y proteínas enzimáticas junto con otros factores tales como la luz o los nutrientes, promueven la expansión celular en hojas y cotiledones, retrasan la senescencia de las hojas, la senescencia foliar está regulada por un balance hormonal dado por los niveles de citocininas y de etileno, es por ello que las citocininas se usan comercialmente para mantener más tiempo el color verde de las hojas de hortalizas hasta que se consuman (Soberón y col., 2005).

2.5.5.3 Giberelinas

Todas son ácidos carboxílicos diterpenoides tetracíclicos, se las denomina ácidos giberélicos, una planta puede producir varias giberelinas aunque no todas ellas sean activas. Se forman en ápices de tallos y raíces, en hojas jóvenes, partes florales, semillas inmaduras, embriones en germinación. En general las partes vegetativas contienen menos ácido giberélico que las partes reproductivas, así las semillas inmaduras son ricas en ácidos giberélicos, aunque dichos niveles disminuyen a medida que estas maduran. Generalmente se movilizan a tejidos jóvenes en crecimiento tales como puntas de tallos, raíces y hojas inmaduras. No exhiben una polaridad en el transporte como en el caso de las auxinas (Taiz y Zeiger, 2006).

Las giberelinas son esencialmente hormonas estimulantes del crecimiento al igual que las auxinas, coincidiendo con estas en algunos de sus efectos biológicos, como la estimulación para la elongación de los tallos debido al alargamiento de las células, más que a un incremento de la división celular, es decir que incrementan la extensibilidad de la pared, este efecto lo consiguen con un mecanismo diferente al de las auxinas, también estimulan la germinación de semillas en numerosas especies, en cereales movilizan reservas para crecimiento inicial de la plántula, inducen la partenocarpia y la floración en otras especies (Soberón y col., 2005).

2.5.5.4 Otras sustancias

En 1957 se demostró que la expresión morfogénica de los tejidos en cultivo, dependía de la presencia de citoquinina como de auxina y por supuesto de las proporciones entre ambas. Parecía natural que otros extractos vegetales tuviesen las mismas propiedades del agua de coco (Letham, 1974). Se

efectuaron ensayos con diferentes extractos de frutos y semillas, de tomate, albúmenes de maíz, cariósides de trigo, avena, centeno (Steward y Caplin, 1952).

2.5.6. Propagación *in vitro*

La micropropagación permite la multiplicación vegetativa durante todo el año, evitando los largos periodos letárgicos, pero su aplicación requiere que el crecimiento *in vitro* sea lo suficientemente vigoroso. Un pobre crecimiento *in vitro* puede deberse a la falta o deficiencia de nutrientes y/o metabolitos necesarios en el medio de cultivo o a la constitución genética de la planta, en el primero de los casos existe la posibilidad de corregir la deficiencia por métodos empíricos, en el segundo la deficiencia puede no ser reversible por la adición al medio de reguladores de crecimiento o la aplicación de otros factores (Serrano y Piñol, 1991).

2.5.7. Enraizamiento del cultivo *in vitro*

Los tallos o segmentos pueden desarrollar raíces, si son subcultivados en un medio carente de citoquinina, con o sin hormona de enraizamiento, o tratados como esquejes convencionales, después de separados del cultivo estéril. Todas las citoquininas inhiben el enraizamiento, particularmente 6-BAP (6-bencilaminopurina) muy utilizada en la multiplicación de tallos, el uso de 2iP (2-isopenteniladenina) o de quinina (6-furfuril-aminopurina) en lugar de 6-BAP, en los estados finales de la multiplicación, mejora frecuentemente el subsiguiente enraizamiento. En muchas especies leñosas y herbáceas se puede facilitar el enraizamiento disminuyendo la concentración de las sales mayoritarias y la sacarosa de 2 ó 3 % a 0.5 ó 1% (Hussey, 1986). Todas las formas de crecimiento de la raíz: inicial en longitud, o en la forma de raíces cortas y

gruesas, se desarrollan por un tratamiento hormonal apropiado. Muchas especies requieren las auxinas más fuertes como AIB (ácido indol-3-butírico) o ANA (ácido α -naftalenacético) para estimular la formación de raíz. El enraizamiento y establecimiento en el suelo de tallos foliados se realiza mejor si las hojas reciben los niveles lumínicos y de CO₂ necesarios para efectuar fotosíntesis autosuficiente. Una alta humedad mantenida por nebulización o mediante cubiertas protectoras de polietileno, para evitar la desecación, es esencial para conseguir el enraizamiento (Serrano y Piñol, 1991).

2.5.8. Factores físicos

Aún cuando muchos factores pueden influir en la micropropagación, los factores físicos juegan un papel determinante, la luz y la temperatura han sido los factores físicos más extensivamente estudiados (Chee y Pool, 1982). La notable similitud entre los diversos factores, concentración de sustancias de crecimiento, azúcares, macro y micronutrientes del medio nutritivo, luz, temperatura, medio gaseoso, etc., que actúan sobre la diferenciación morfogénica en órganos, tejidos, células y protoplastos en cultivo, denota una escasa especificidad, y consecuentemente una dificultad para investigar y determinar los mecanismos que regulan la morfogénesis (Serrano y Piñol, 1991).

2.5.8.1 Fotoperíodo

Investigaciones han comprobado que la luz es un factor fundamental en la morfogénesis (Villalobos y col., 1982). Al respecto se ha observado en el caso de *Pinus radiata* que la luz interacciona con una citocinina durante la diferenciación de los brotes adventicios y que la morfogénesis no ocurre cuando falta uno de esos dos componentes. El papel de la luz en la diferenciación involucra varios

componentes como son la intensidad, el fotoperíodo y la calidad (Villalobos y Thorpe, 1991).

La luz influye sobre las funciones de los tejidos heterótrofos tan importantes para su organización como división celular y orientación de las microfibrillas (Roberts, 1976), y la activación enzimática (Zucker, 1972). La intensidad y la longitud de onda de la luz que percibe una célula estará, en parte, determinada por su posición en el tejido (o masa celular), cuya organización afectará también a la respuesta de la célula al estímulo (Serrano y Piñol, 1991). La necesidad de luz y carbohidratos exógenos de los órganos y tejidos verdes *in vitro* difieren esencialmente. La necesidad de luz se puede reducir si al cultivo se le proporciona una osmolaridad equivalente de una mezcla de sacarosa y glucosa (Serrano y Piñol, 1991).

2.5.8.2 Temperatura

La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre 24 y 28 °C. Se han variado los regímenes de temperatura en el día y la noche, se han encontrado que únicamente en un reducido número de especies tal variación es ventajosa (Chee y Pool, 1982). Las temperaturas *in vitro* se mantienen casi estables, es importante señalar que cuanto más se asemejen las condiciones *in vitro* a las óptimas de crecimiento de la especie estudiada mayor será la respuesta esperada (Radice, 2000).

2.5.8.3 Atmósfera gaseosa

Es un factor determinante en los procesos morfogénicos y está condicionado por el tipo y tamaño de envase, así como el sistema de cobertura del mismo. En condiciones *in vivo* la atmósfera contiene 78% de nitrógeno; 21 % de oxígeno y

0.035% de dióxido de carbono. En cultivos *in vitro* se han encontrado además, etileno y compuestos hidrocarbonados. El nivel de oxígeno disponible para el explante condiciona el crecimiento y los procesos morfogénicos. La concentración de dióxido de carbono en la atmósfera gaseosa *in vitro* varía según la respiración y actividad fotosintética de las plantas, en trabajos realizados en *Ficus lyrata* se han encontrado concentraciones variables que van del 0.5 al 8.5%, según el tipo de sello o tapa empleados, estas concentraciones superiores a 1% generalmente tóxicas para las condiciones *in vivo*, probablemente no son limitantes para la actividad fotosintética (Duddendorf Joosten y Woltering, 1994).

2.5.8.4 La humedad relativa

Como medida de la cantidad de vapor de agua contenida en la atmósfera gaseosa, es otro de los parámetros físicos a tener en cuenta. La humedad relativa dependerá de la cobertura del envase empleado. Si este cierre es hermético, la humedad interior será del 100%, si existe la posibilidad de un intercambio gaseoso, la humedad interna puede descender a niveles cercanos al 50%, este importante descenso del contenido de humedad relativa puede promover una pérdida veloz de agua del medio de cultivo, variando la concentración de sus compuestos hasta llegar a niveles tóxicos (Debergh, 1982).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Distrito de Ayacucho, Provincia de Huamanga, Departamento de Ayacucho a 2761 m.s.n.m., entre los meses de octubre 2009 y noviembre 2010.

La investigación comprendió las siguientes etapas:

3.2 Obtención y selección del material vegetal

Las plantas de *Plukenetia volubilis* L. seleccionadas para la investigación procedieron del distrito de Santa Rosa (a una altitud de 330 m.s.n.m.) en la Provincia de La Mar, departamento de Ayacucho; estas plantas de aproximadamente 7 días de germinadas fueron recolectadas en diciembre de 2009, siendo trasladadas a la ciudad de Ayacucho a un vivero casero con fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, en el cual se controlaron la humedad y temperatura (Anexo N° 07); asimismo se obtuvieron semillas recién cosechadas, estas se conservaron en frascos de polipropileno a condiciones ambientales en un lugar fresco y seco, para su posterior traslado al laboratorio.

Se utilizaron como explantes en el desarrollo de la investigación los nuevos brotes, segmentos nodales jóvenes de las plantas, así como los embriones cigóticos de semillas frescas.

3.3 Desinfección e introducción del material vegetal

El proceso de desinfección fue realizado en el área de transferencia aséptica, en una cámara de flujo laminar bajo condiciones de asepsia con materiales limpios y estériles, tomando en cuenta las recomendaciones de Hurtado y Merino (1987).

a.- Desinfección de semillas:

1. Las semillas fueron lavadas con agua y detergente (10 g/L), eliminándose la suciedad con una escobilla de la superficie de la cáscara.
2. Se realizaron enjuagues con agua corriente, posteriormente con una tijera prensadora se procedió a abrir la testa de las semillas, sin lastimar las almendras; estas se colocaron en un frasco de vidrio limpio y esterilizado.
3. En la cámara de flujo laminar, estas almendras fueron sometidas a desinfección previa con alcohol al 70% durante 15 segundos.
4. Se trató con solución de hipoclorito de sodio a concentraciones de 1.5%, 2.5 % y 3.0%; durante 10, 15 y 20 minutos, el procedimiento se realizó en constante agitación.
5. Cumplido el tiempo de inmersión en el desinfectante, se realizó enjuagues sucesivos con abundante agua destilada estéril.
6. Posteriormente a la desinfección en una placa de Petri estéril, se procedió a abrir cuidadosamente los cotiledones de la semilla, y extraer el embrión cigótico para su siembra en el medio de cultivo sólido Murashige y Skoog.

b.- Desinfección de segmentos nodales:

1. Los segmentos nodales fueron previamente lavados con agua y detergente (10 g/L), enjuagados con abundante agua corriente; luego se trasladaron los explantes en un frasco de vidrio limpio y esterilizado.
2. En la cámara de flujo laminar el material vegetal fue previamente desinfectado con alcohol al 70% durante 10 segundos.
3. Se sumergieron los segmentos nodales en solución de hipoclorito de sodio a concentraciones de 1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0%, 4.0% por 2, 5 y 10 minutos.
4. Cumplido el tiempo de inmersión en el desinfectante, los explantes se enjuagaron sucesivamente con abundante agua destilada estéril.
5. Se procedió a la disección de los segmentos nodales de aproximadamente 1.0 a 1.5 cm, para su siembra en los medios de cultivo sólido Murashige y Skoog.

Los embriones y segmentos nodales cultivados *in vitro* se mantuvieron en incubación con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, a 25°C aproximadamente (Anexo N° 06). La evaluación de desinfección se realizó después de 7 días.

3.4 Elección de medios de cultivo

El medio de cultivo base utilizado, fue Murashige y Skoog (1962) (Anexo N° 01). El pH final del medio fue de ± 5.6 ; que fue ajustado con hidróxido de sodio 0.1 N y ácido clorhídrico 0.1 N; para subir o bajar el pH respectivamente.

Los explantes procedentes de condiciones *in vitro* e *in vivo* (vivero) fueron sembrados en el medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con sacarosa (20 g/L), pantotenato de calcio (2 mg/L), myo-inositol (100 mg/L), con agar (7g/L), así como se adicionaron diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento aisladamente y en combinaciones, detalladas según las Tablas N° 07, 08 y 09; se utilizó 6 aminobencilpurina (BAP), ácido naftil acético (ANA), ácido indol butírico (AIB), ácido indol acético (AIA), ácido giberélico (AG₃), así como agua de coco y jugo de tomate (Anexo N° 02).

3.5 Establecimiento del material vegetal *in vitro*

Se seleccionaron los embriones cigóticos y segmentos nodales que permanecieron viables en los medios de cultivo Murashige y Skoog, libres de contaminación y oxidación, evaluándose el establecimiento después de 14 días.

a.- Establecimiento de cultivo por embriones cigóticos: Los embriones cigóticos procedentes de semilla se establecieron en medio base MS sin antioxidante.

b.- Establecimiento de cultivo por segmentos nodales: Los segmentos nodales se establecieron en medio base MS con antioxidantes como ácido ascórbico, ácido cítrico y carbón activo, para reducir la oxidación de los mismos, según Tabla N° 06.

Tabla N° 06.- Composición de los tratamientos antioxidantes en la etapa de establecimiento *in vitro* en segmentos nodales

Tratamiento	Ácido ascórbico (mg/L)	Ácido cítrico (mg/L)	Carbón activado (%)
AS1	50	-	-
AS2	100	-	-
AS3	150	-	-
AS4	-	50	-
AS5	-	100	-
AS6	-	150	-
AS7	-	-	1.0
AS8	-	-	2.5
AS9	-	-	4.0
Control	-	-	-

3.6 Propagación

Las plántulas que lograron ser establecidas *in vitro* en los medios iniciales Murashige y Skoog, procedentes de embriones cigóticos y segmentos nodales de plantas tiernas, se sembraron en los diferentes medios Murashige y Skoog suplementados. La evaluación de propagación se realizó después de 30 días.

a.- Propagación en embriones cigóticos

Los embriones cigóticos desarrollados y establecidos *in vitro*, se propagaron transfiriéndolos a medios Murashige y Skoog suplementados con diferentes concentraciones de citocinina, giberelina y compuestos orgánicos, en forma aislada y en combinaciones.

Tabla N° 07.- Composición de los tratamientos para la etapa de propagación en embriones cigóticos

Tratamiento	BAP (mg/L)	AG ₃ (mg/L)	Jugo tomate (ml/L)	Agua coco (ml/L)
ME1	-	0.10	-	-
ME2	-	0.25	-	-
ME3	-	0.50	-	-
ME4	2.00	-	-	-
ME5	-	-	20.0	-
ME6	-	-	-	20.0
ME7	-	0.10	20.0	-
ME8	-	0.10	-	20.0
Control	-	-	-	-

b.- Propagación de segmentos nodales

Los segmentos nodales establecidos *in vitro*, se transfirieron a los medios Murashige y Skoog suplementados, que contenían diferentes concentraciones hormonales, de citocininas, auxinas, giberelinas y compuestos orgánicos, en forma aislada y en combinaciones.

Tabla N° 08.- Composición de los tratamientos para la etapa de propagación de segmentos nodales

Tratamiento	ANA (mg/L)	AIB (mg/L)	BAP (mg/L)	AG ₃ (mg/L)	Jugo tomate (ml/L)	Agua coco (ml/L)
MS1	-	-	1.00	-	-	-
MS2	-	-	2.00	-	-	-
MS3	-	0.10	-	-	-	20.0
MS4	0.10	-	-	-	-	20.0
MS5	0.50	-	2.00	-	-	-
MS6	-	-	2.00	0.10	-	-
MS7	-	-	-	0.10	20.0	-
MS8	-	-	-	0.10	-	20.0
Control	-	-	-	-	-	-

3.7 Enraizamiento

Se sembraron los segmentos nodales de las plántulas desarrolladas en los medios de propagación, en los diferentes medios de cultivo Murashige y Skoog, sin y con modificación; el medio MS modificado fue reducido a la mitad en su concentración de fuente de nitrógeno, asimismo estos contenían diferentes concentraciones hormonales de auxinas. Se evaluó el enraizamiento de los segmentos nodales después de 30 días.

Tabla N° 09.- Composición de los tratamientos para la etapa de enraizamiento de segmentos nodales

Tratamiento	Medio Basal	ANA (mg/L)	AIB (mg/L)	AIA (mg/L)
E1	MS	1.0	-	-
E2	MS	2.5	-	-
E3	MS	-	1.0	-
E4	MS	-	2.5	-
E5	MS	-	-	1.0
E6	MS	-	-	2.5
E7	MS/2	1.0	-	-
E8	MS/2	2.5	-	-
E9	MS/2	-	1.0	-
E10	MS/2	-	2.5	-
E11	MS/2	-	-	1.0
E12	MS/2	-	-	2.5
Control	MS	-	-	-

- MS/2 : Medio base MS reducido a la mitad en su concentración de fuente de nitrógeno (sales-stock A)
- Todos los medios contenían ácido cítrico (150 mg/L)

3.8 Aclimatación

Obteniéndose plántulas con raíces y hojas, estas fueron gradualmente aclimatadas, primero quitando el parafilm de los frascos y así reduciendo la humedad relativa (Pierik, 1990), transcurridos siete días, se retiró cuidadosamente el agar de las raíces de las plántulas mediante un lavado con agua corriente y se colocaron en bolsas de almácigo con una mezcla de sustrato (Anexo N° 08), las plantas fueron cubiertas con material de polipropileno traslucido perforado y fueron trasladados a vivero (Anexo N° 07), se aplicó riego una vez al día con un aspersor manual, finalmente se evaluó la tasa de sobrevivencia después de siete días.

3.9 Condiciones de cultivo *in vitro*

Los explantes sembrados en el medio MS con y sin modificaciones se establecieron bajo condiciones de luz baja (1000 lux) con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad y una temperatura entre 20 a 25°C (Seibert y Kadkade, 1980; Hughes, 1981 y Krikorian, 1991).

Los frascos conteniendo los explantes por tanto fueron mantenidos en el banco de germoplasma bajo condiciones controladas, el sello utilizado fue papel aluminio con bolsa de polietileno y parafilm, la humedad relativa relacionada a las condiciones de sellado del envase es cercana al 100% (Murphy y col., 1998).

3.10 Evaluaciones

Las evaluaciones se realizaron el séptimo y decimocuarto día después de la siembra en las fases de desinfección y establecimiento respectivamente, mientras para las fases de propagación y enraizamiento, el cultivo se evaluó cada séptimo, decimocuarto, vigésimo primer, y trigésimo día, poniendo atención en procesos como la oxidación y/o necrosis del explante; contaminación del

medio por microorganismos; elongación del tallo de la planta; formación de brotes; formación y crecimiento de hojas y raíces; formación de callos y vitrificación.

3.11 Análisis estadístico

Los explantes se asignaron en cada tratamiento de forma aleatoria y los diferentes tratamientos se realizaron con un diseño completamente aleatorio.

En cuanto a la primera etapa de desinfección e introducción los resultados se analizaron con el modelo Logit, por la naturaleza cualitativa de los datos (paquete estadístico *EViews* versión 7.0).

Los resultados fueron sometidos al análisis estadístico bajo el diseño unifactorial, según sea el caso, se realizó el análisis de varianza usando la prueba de significancia utilizando la prueba F. Los resultados de los diferentes tratamientos de las fases de propagación y enraizamiento se sometieron a un análisis de varianza dentro y entre tratamientos, se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Rango Múltiple de Duncan para determinar interacciones significativas entre los diferentes tratamientos.

Los análisis se realizaron con el programa estadístico *SPSS* versión 15.0, considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

IV. RESULTADOS

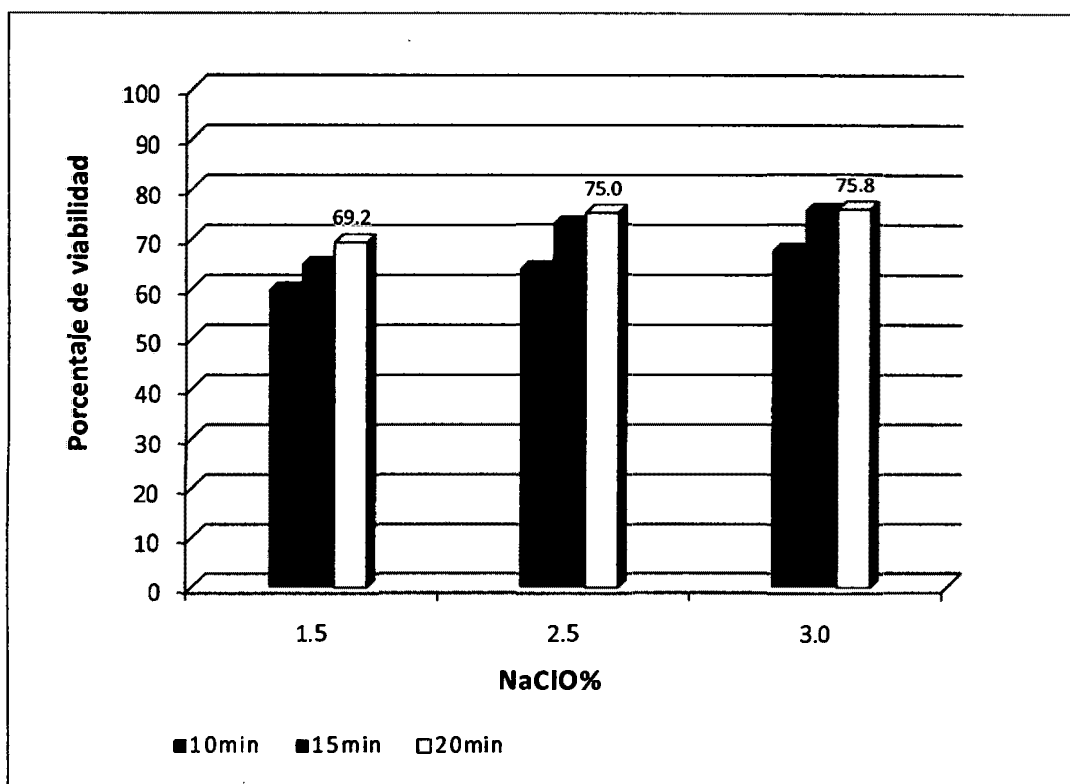


Gráfico N° 01.- Evaluación de viabilidad de embriones cigóticos de "sacha inchi" en diferentes tratamientos de desinfección de semilla después de 7 días de cultivo

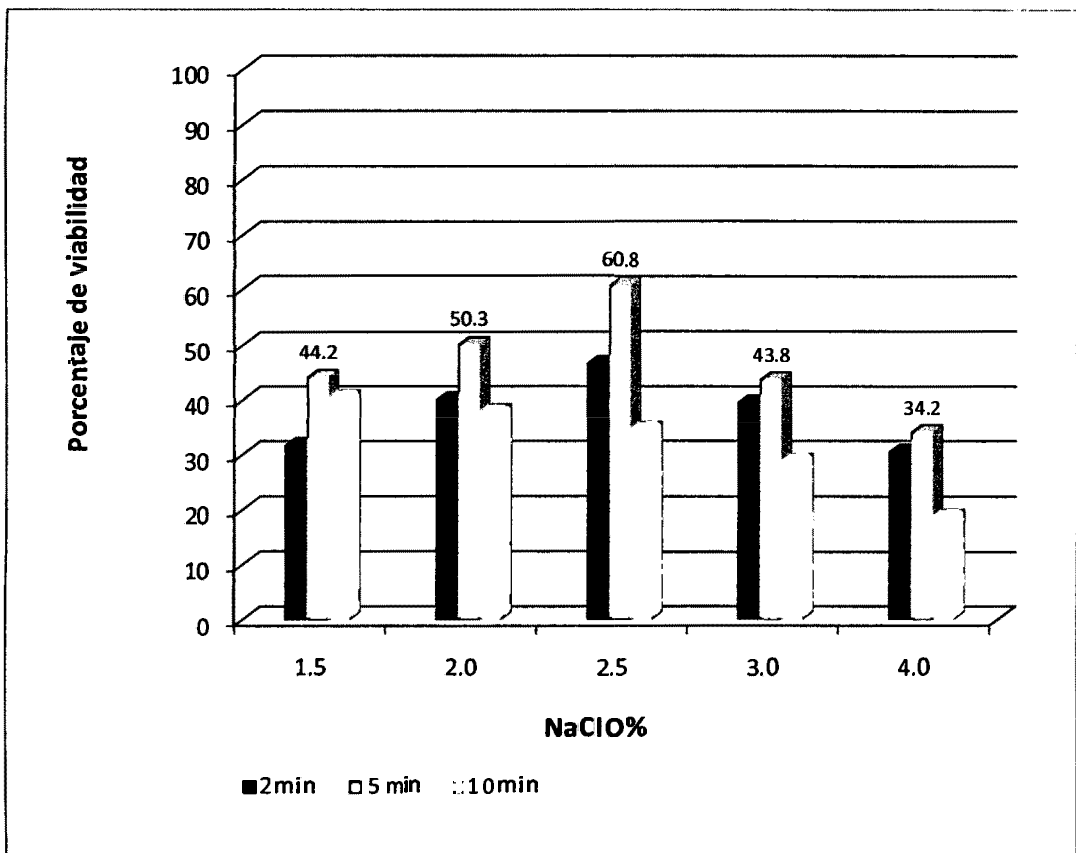


Gráfico N° 02.- Evaluación de viabilidad de segmentos nodales de “sacha inchi” en diferentes tratamientos de desinfección después de 7 días de cultivo

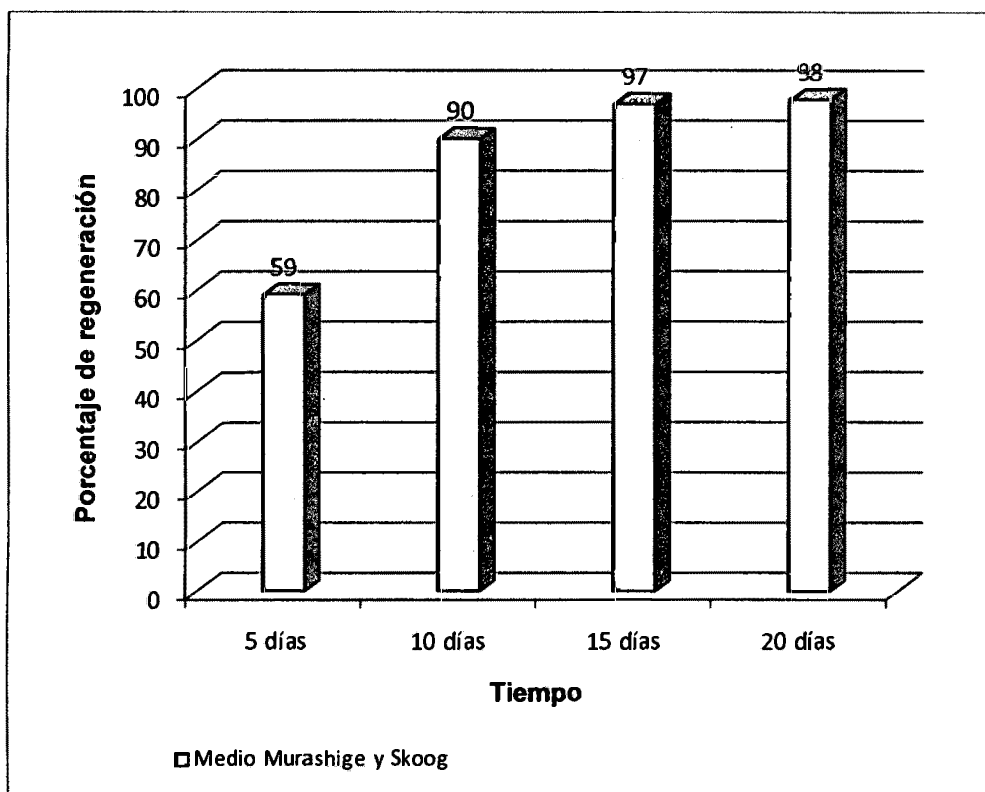


Gráfico Nº 03.- Evaluación de la regeneración de plantas a partir de embriones cigóticos de "sacha inchi" en la fase de establecimiento de cultivo

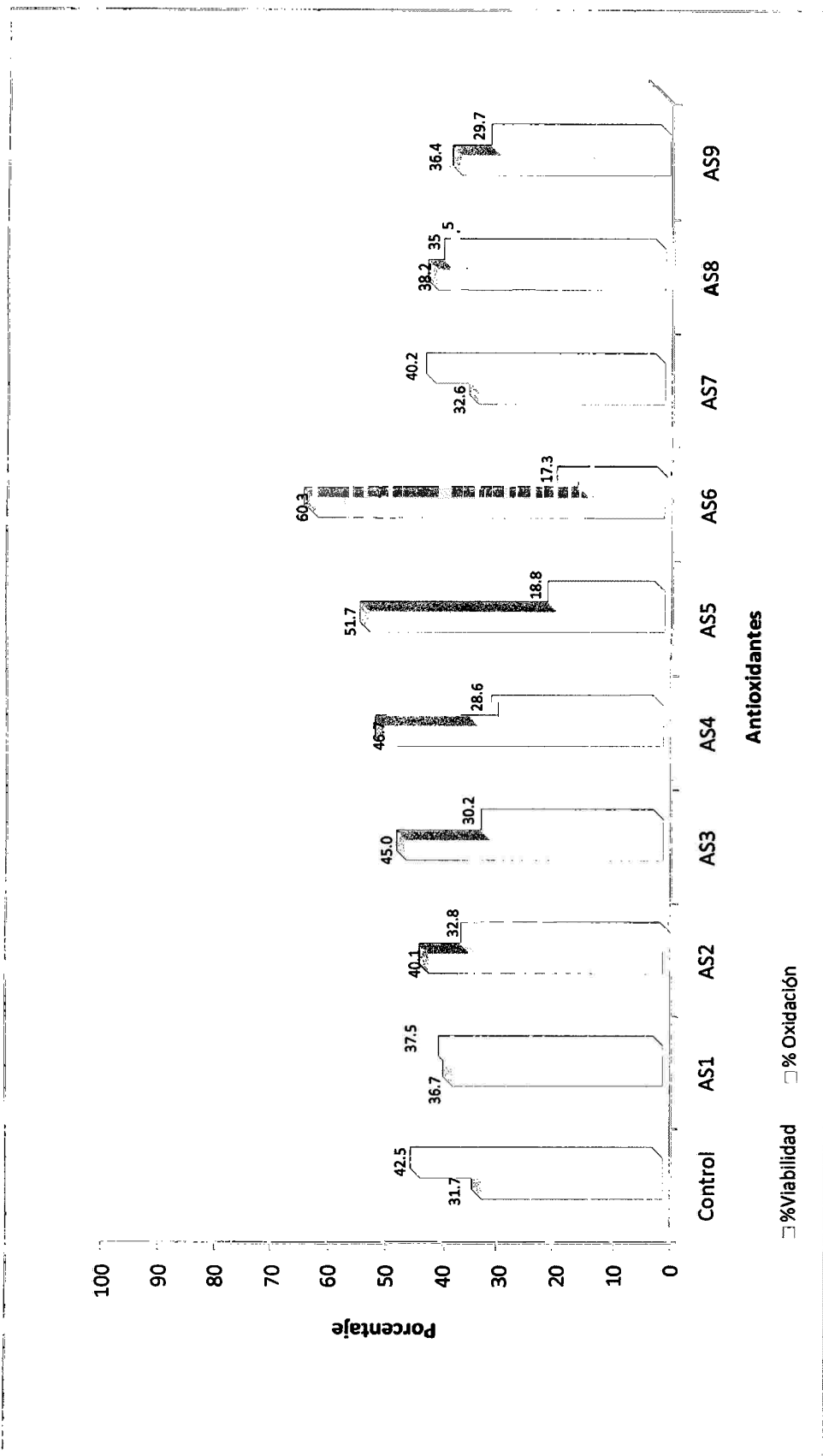


Gráfico N° 04.- Evaluación del efecto de antioxidantes en la viabilidad y oxidación para el establecimiento de segmentos nodales de "sacha inchi" después de 14 días de cultivo

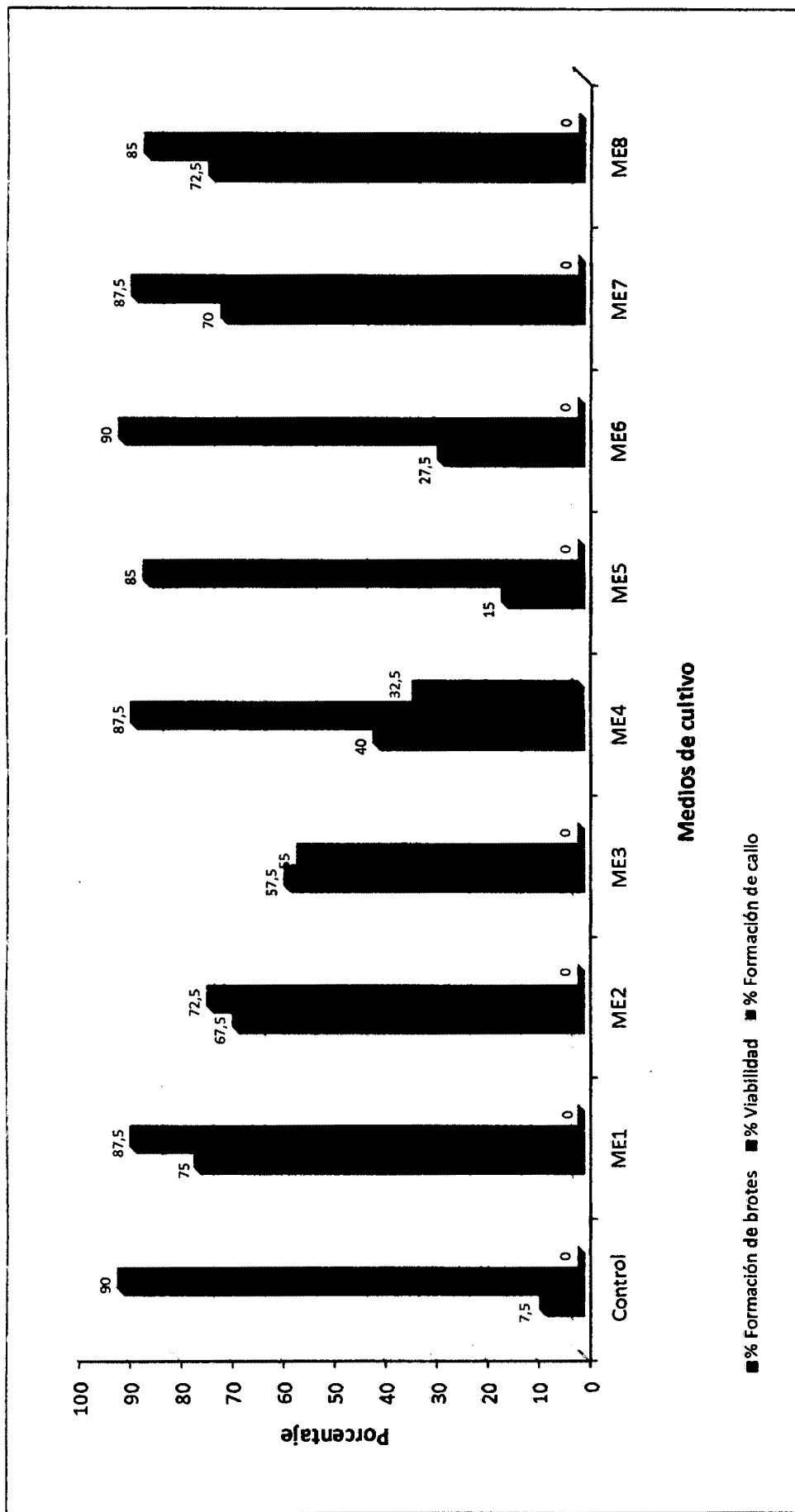


Gráfico Nº 05.- Evaluación de la formación de brotes, viabilidad y formación de callos en la propagación de embriones cigóticos de "sacha inchi" después de 30 días de siembra

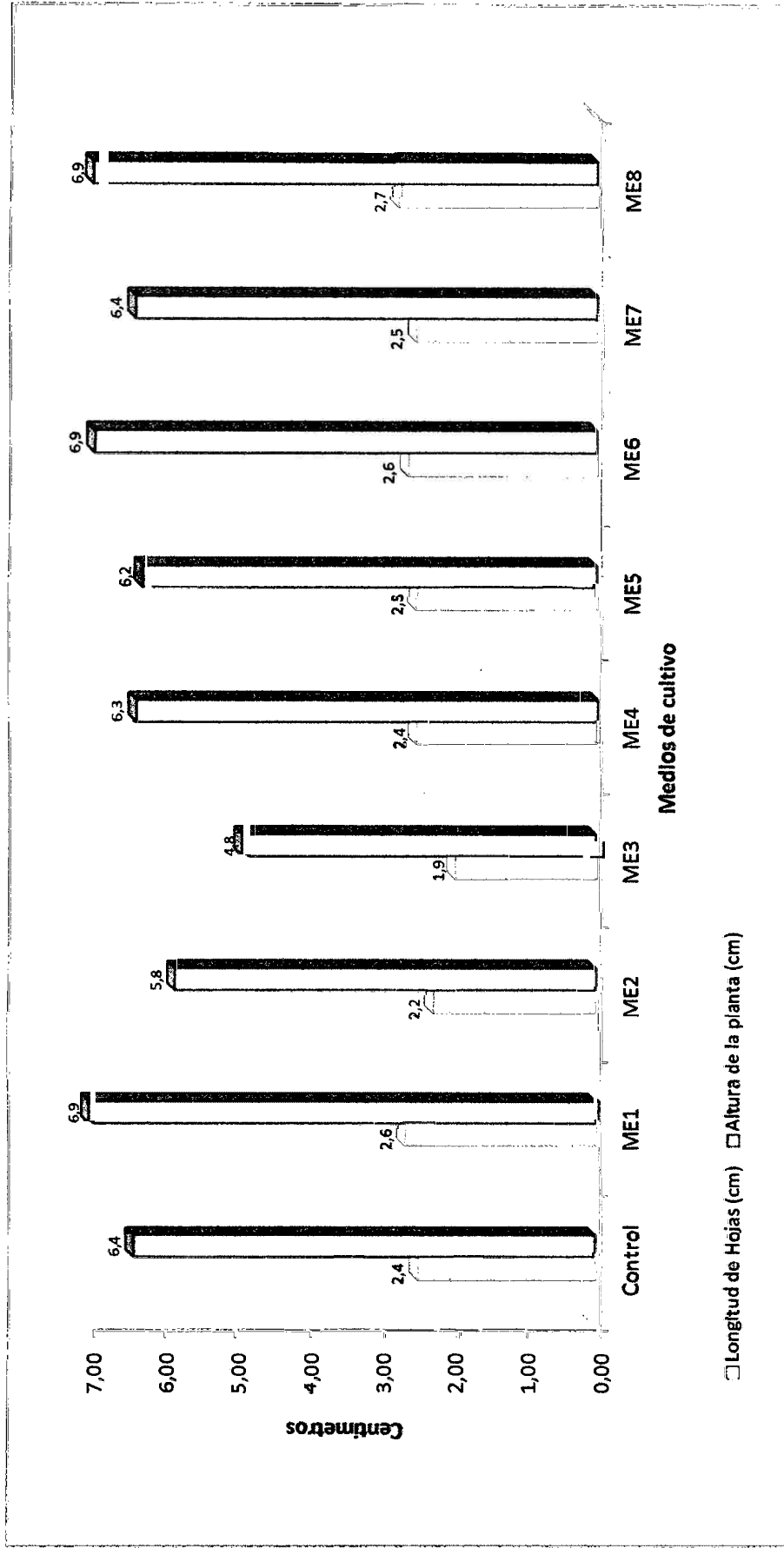


Gráfico N° 06.- Evaluación de la longitud de hojas y altura de las plantas en la propagación de embriones cigóticos de "sacha inchi" después de 30 días de siembra

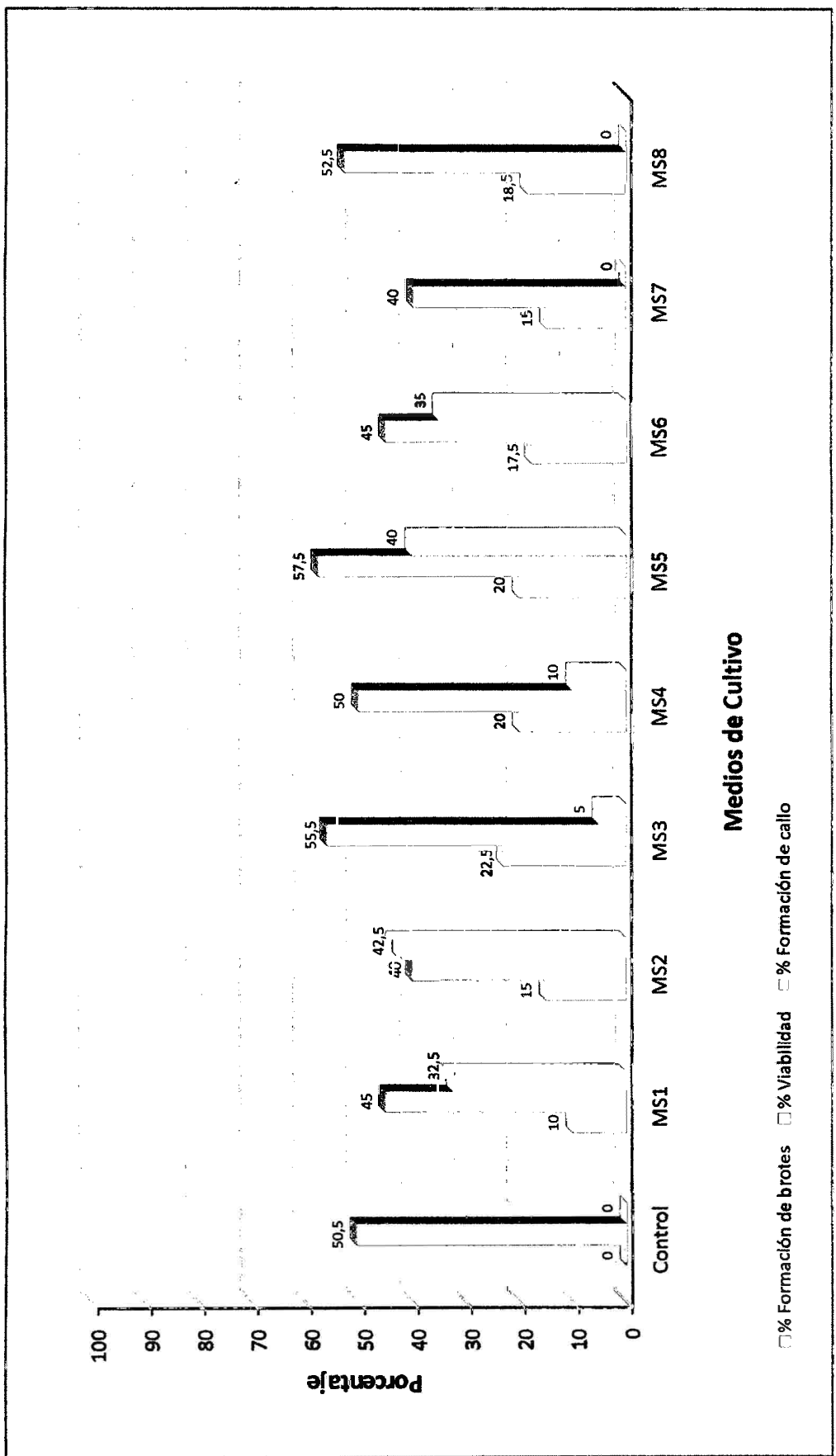


Gráfico N° 07.- Evaluación de la formación de brotes en la propagación de segmentos nodales de "sacha inchi" en los medios de cultivo después de 30 días de siembra

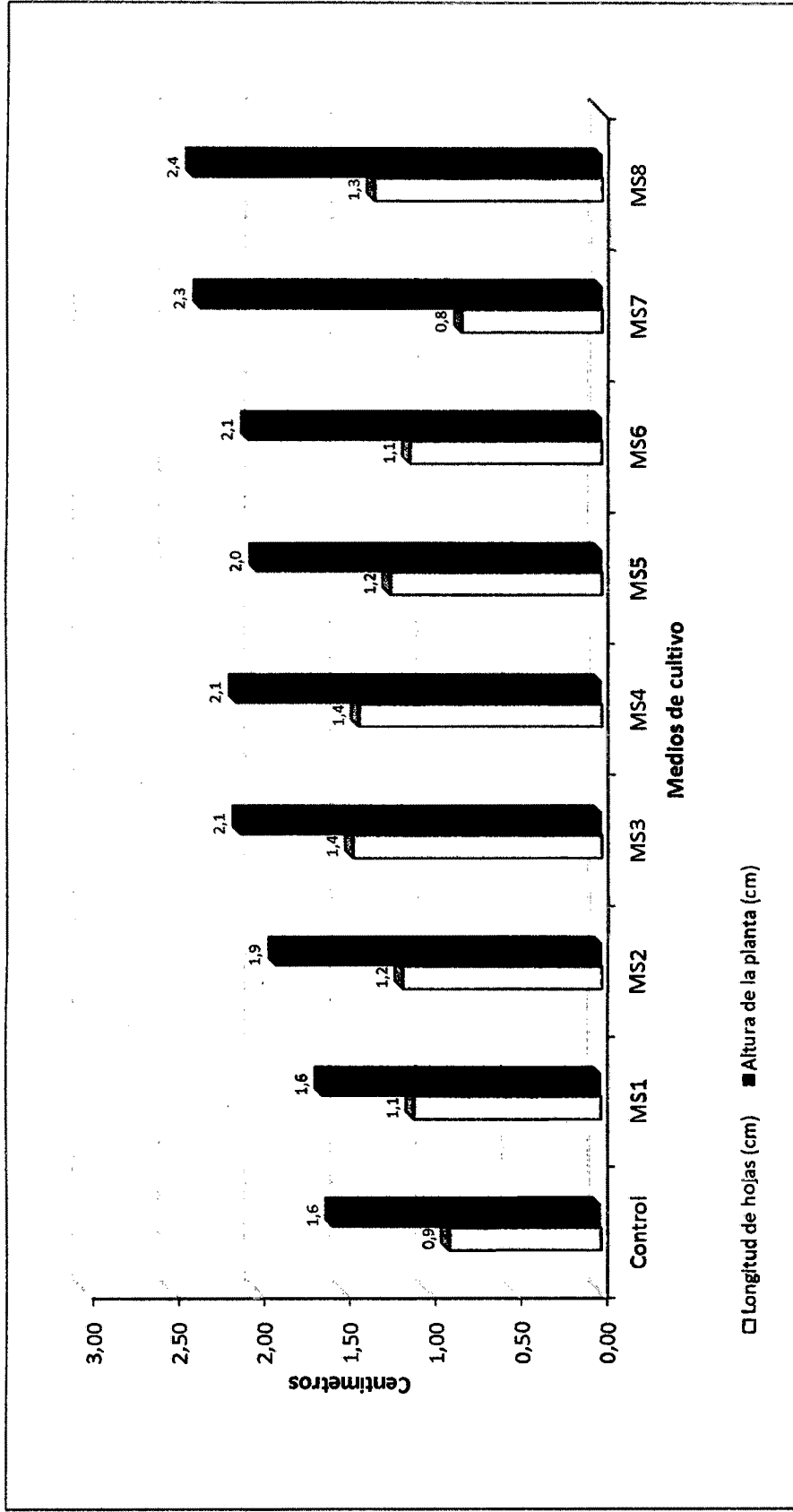


Gráfico N° 08.- Evaluación de la longitud de hojas y altura de las plantas en la propagación de segmentos nodales de "sacha Inchi" después de 30 días de siembra

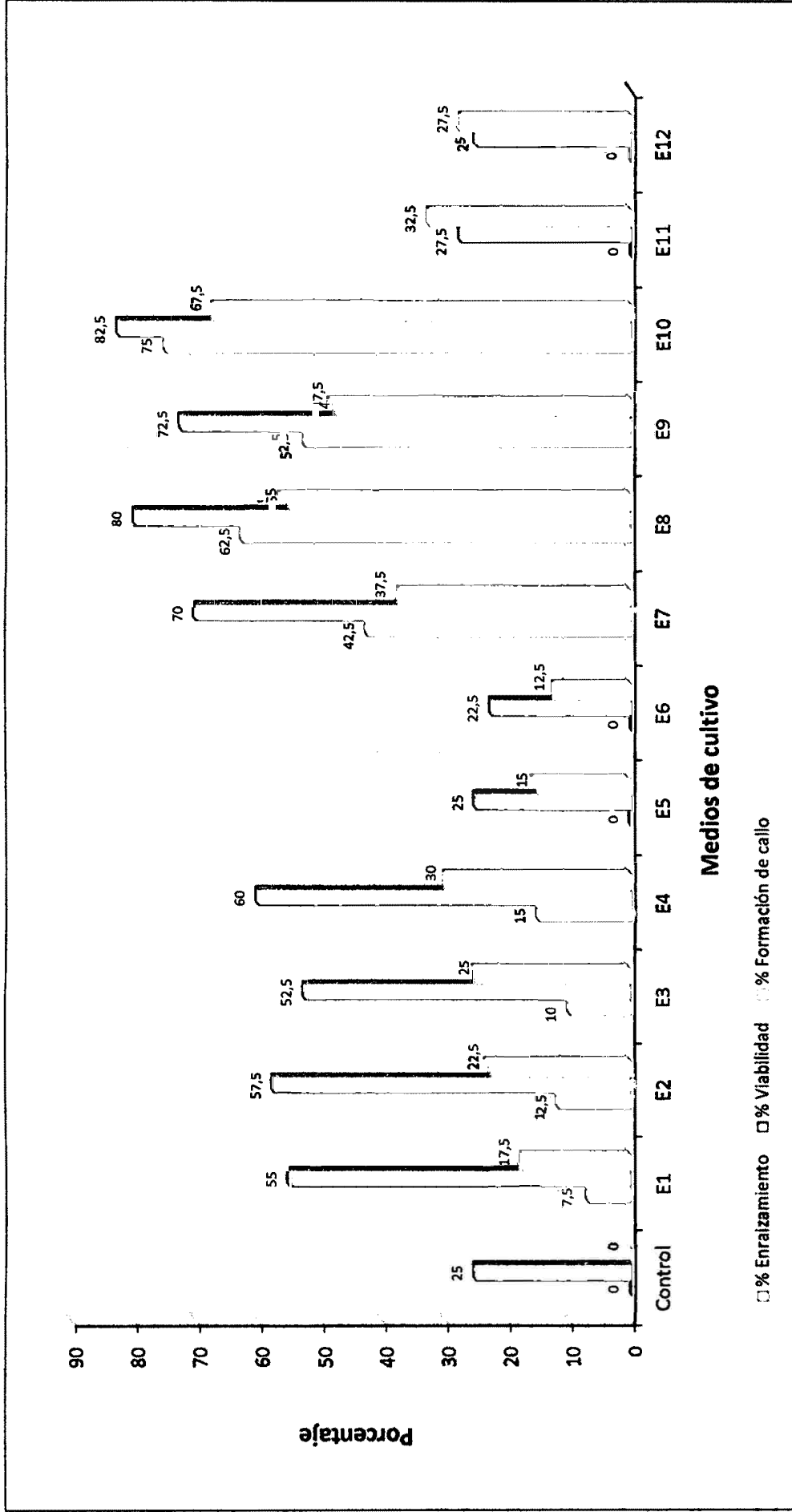


Gráfico N° 09.- Evaluación de la formación de raíces adventicias, viabilidad y formación de callos en el enraizamiento de segmentos nodales de "sacha Inchi" después de 30 días de cultivo

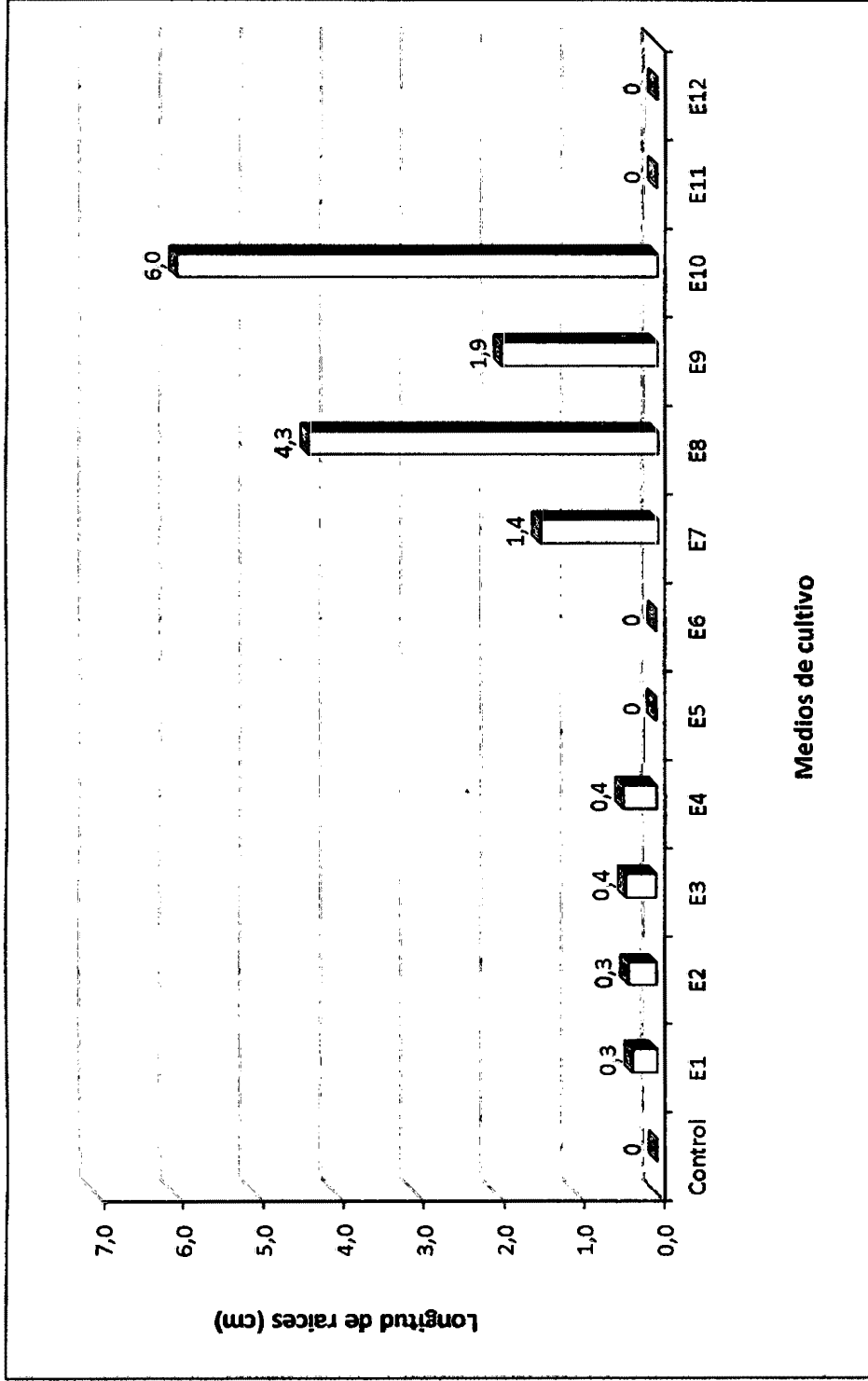


Gráfico N° 10.- Evaluación de la longitud de raíces adventicias en segmentos nodales de "sacha inchi" después de 30 días de cultivo

V. DISCUSIÓN

Desinfección e introducción

En la evaluación de la desinfección de semillas, no se observan diferencias marcadas en los tratamientos realizados, sin embargo hay menores porcentajes de contaminación a mayores concentraciones de desinfectante, así como también no existió necrosamiento, pues el efecto tóxico del agente desinfectante (Bhojwani y Razdan, 1983) sólo entró en contacto con la parte externa de la almendra; y no con los embriones cigóticos que se mantuvieron intactos gracias al endosperma (Salisbury y Ross, 1994); los mayores porcentajes de viabilidad se encontraron en la concentración 2.5 y 3.0 % de NaClO con 20 minutos de inmersión. (Gráfico Nº 01); estos resultados se asemejan a los de Borgindon y Viegas (2009), que también utilizaron hipoclorito de sodio al 2% por 20 minutos para desinfección de semillas de *Plukenetia volubilis*.

En la evaluación de desinfección de segmentos nodales se observó que a medida que aumentaba la concentración del desinfectante y el tiempo de exposición, la contaminación de los explantes disminuyó sin embargo los porcentajes de necrosis se elevan (Gráfico Nº 02); los menores porcentajes de contaminación se obtuvieron con concentraciones de 2.5, 3.0 y 4.0% de NaClO

con 5 y 10 minutos de inmersión, en tanto si se disminuyen las concentraciones de desinfectante y tiempos de inmersión se observa una mayor contaminación y menor necrosis, hecho que afecta los porcentajes de viabilidad del explante. Finalmente el mayor porcentaje de viabilidad se obtuvo con el tratamiento compuesto por 2.5% de NaClO durante 5 minutos de inmersión (Gráfico N° 02), estos datos difieren significativamente de los reportados por Gárate (2009), que utilizó 0.5% de NaClO en ápices y segmentos nodales de "sacha inchi".

Otro factor a tomar en cuenta en los procedimientos de desinfección fueron los tratamientos de pre-desinfección consistentes en los lavados de explante con jabón y detergente, así como la utilización de alcohol al 70% durante 10 a 30 segundos, para romper la tensión superficial; recomendados por Villalobos y Pérez (1979).

Introducción y establecimiento

El establecimiento del cultivo a partir de embriones cigóticos extraídos de semilla fue posible gracias a los altos porcentajes de regeneración en plántulas de hasta 98% (Gráfico N° 03) en medio base Murashige y Skoog, también se puede deducir que existió un porcentaje pequeño de semillas no viables (2%), probablemente relacionado al tiempo de viabilidad óptima de la semilla ya que Aguilar y col., (2008) señalan mejor crecimiento con semillas recién cosechadas, y en la investigación se trabajó con semillas de 1 a 2 meses de cosechadas; así como también se puede atribuir esta no viabilidad *in vitro* al cambio de las condiciones naturales de germinación en campo, pues en la investigación se extrajo el embrión cigótico de la semilla y se introdujo *in vitro*, no se realizó gradualmente el proceso de activación de enzimas por hidratación y temperatura, así como no se controlan las concentraciones de oxígeno e

intensidades lumínicas como lo mencionan Ravent y col. (1992); en último lugar también esta no viabilidad puede atribuirse a daños realizados en el proceso de manipulación y transferencia de los embriones al medio de cultivo (Roca y Mroginski, 1993).

El "sacha inchi" por ser una especie semileñosa, presenta oxidación de sus explantes (segmentos nodales), como lo señala Seemann (1993), el pardeamiento de los explantes es un problema que se presenta con mayor frecuencia en explantes de especies leñosas y se relaciona con la liberación al medio y oxidación de polifenoles, que son tóxicos para el explante. El empleo de sustancias antioxidantes puede ser de utilidad para el cultivo de explantes con alto contenido de polifenoles como lo señala Jordan (1992); antioxidantes como ácido cítrico, ácido ascórbico, que se utilizan entre 10 a 150 mg/L debido a su capacidad de actuar como agente reductor y retrasar la formación de sustancias similares a la melanina (Vacin y Went, 1949 ; Nitsch, 1954; Krikorian, 1991) y carbón activado incorporado de 0.1% a 5% (Roca y Mroginski, 1993), que sirve para remover del medio los compuestos fenólicos inhibidores, así como metabolitos tóxicos (Fridborg y col., 1978). Bajo esta premisa se incorporó ácido ascórbico y cítrico en concentraciones de 50 mg/L, 100 mg/L y 150 mg/L, así como carbón activado en concentraciones de 1%, 2.5% y 4% (Gráfico N° 04).

La aplicación de antioxidantes tuvo un efecto muy marcado en la sobrevivencia de los segmentos nodales, (Gráfico N° 04), los mejores porcentajes de viabilidad se obtienen en las concentraciones de 100 y 150 mg/L de ácido cítrico, siendo menos eficientes el ácido ascórbico y el carbón activado, de esta manera el ácido cítrico permite el establecimiento de segmentos nodales.

Finalmente se incorporó en los medios de propagación de segmentos nodales ácido cítrico a 150 mg/L.

Propagación

Krikorian (1991) señaló que la propagación consiste en el crecimiento del material vegetal introducido, por medio de la multiplicación de brotes de yemas terminales, axilares o laterales. Para la fase de propagación se utilizaron los embriones cigóticos, así como segmentos nodales establecidos *in vitro*.

Los mayores porcentajes de formación de brotes en plantas regeneradas de embriones cigóticos (Gráfico N° 05) fueron 75, 70 y 72.5%, pertenecientes respectivamente a los medios MS con AG₃ 0.1 mg/L; MS con AG₃ 0.1 mg/L más 20 ml/L de jugo de tomate y MS con AG₃ 0.1 mg/L más 20 ml/L de agua de coco, coincidiendo con Steward y col., (1964), que señaló que la giberelina es muy activa y se utiliza en una concentración de entre 0.01 a 1 mg/L con un punto óptimo alrededor de 0.1 mg/L (Schroeder y Spector, 1957). En tanto los medios con concentraciones superiores de ácido giberélico 3, en concentraciones de 0.25 y 0.50 mg/L, mostraron menores porcentajes en la formación de brotes.

Los embriones cigóticos en medio MS (Control), tienen un porcentaje de formación de brotes que llega al 7.5 %; existiendo un marcado contraste entre el medio control y los medios suplementados con AG₃. Asimismo los porcentajes de viabilidad son altos en todos los medios de cultivo probados, valores entre 85 y 90 % (Gráfico N° 05); excepto en los medios ME2 y ME3 (medios MS suplementados con AG₃ en concentraciones de 0.25 y 0.50 mg/L, respectivamente), en los cuales los porcentajes de viabilidad descienden relativamente; probablemente porque estas concentraciones influyen

directamente en la viabilidad de la planta, como lo señala Blakely (1963), afirmando que las concentraciones superiores de AG son tóxicas, finalmente Van Bragt y Pierik (1971), recomiendan que las giberelinas deberían utilizarse en bajos niveles y con cautela.

El medio MS suplementado con 20ml/L de agua de coco tuvo un 27% de porcentaje de formación de brotes (Gráfico N° 05), corroborando lo mencionado por Steward y Caplin (1952), que señalaron su utilidad para inducir la división celular en tejidos diferenciados, esto por estudios realizados por Steward y Shantz (1959), que dividieron los componentes sinérgicos y activos del líquido, de manera que Pollard y col., (1961) aislaron mioinositol, siloinositol, manitol y manitol de la fracción neutra o sinérgica del agua de coco; estos alcoholes de azúcar se identificaron y se encontró que contribuyen de manera apreciable en la promoción de crecimiento.

También se puede afirmar que del agua de coco se han aislado varias purinas (adenina y uracilo), que promueven la división celular; así como se han identificado adenilcitosininas, ZEA y ribosidozeatina (Letham, 1974; Van Staden y Drewes, 1974).

En el Gráfico N° 05, los medios MS con AG₃ suplementados con compuestos orgánicos (jugo de tomate y agua de coco 20 ml/L) no mostraron significativas diferencias en cuanto a porcentaje de formación de brotes (70 y 72.5 %). El medio MS suplementado con 20ml/L de jugo de tomate muestra un 15% de formación de brotes, hecho sustentado por Vacin y Went (1949) y Nitsch (1954), quienes sugirieron que el jugo de tomate tiene efectos estimuladores de crecimiento, pero aclaran que estos efectos no se deban a la presencia de alguna sustancia de división celular (Arditti, 1966).

La bencilamimopurina es una citocinina sintética muy activa (Krikorian, 1991), el medio MS con BAP en una concentración de 2.0 mg/L llega a tener un 40% de formación de brotes, resultados que se asemejan a los reportados por Bordignon y Viegas (2009), en su investigación de propagación de "sacha inchi" señalando la concentración BAP 1.0 mg/L y IBA 0,1 mg/L como la concentración que tuvo una mayor emisión de brotes (100%). Los callos se formaron en la base del tallo de la planta y en la raíz (Gráfico N° 05) (Anexo N° 09). La capacidad de la especie vegetal para producir callo depende en un número de casos de la parte de la planta utilizada y de explantes más jóvenes con mayor actividad fisiológica se obtienen callos usualmente de mayor crecimiento (King, 1980).

En cuanto a la influencia de las concentraciones hormonales en la longitud de las hojas y altura de la planta no se observan diferencias muy marcadas (Gráfico N° 06), sin embargo hay una mayor longitud de hojas y altura de planta en los medios ME6 y ME8, que contenían MS suplementado con 20ml/L de agua de coco, atribuibles a los componentes sinérgicos promotores de crecimiento Pollard y col., (1961). En tanto las menores longitudes de hojas y altura de la planta se observan en los medios ME3 y ME4, medios MS con AG₃ en concentraciones de 0.25 y 0.5 mg/L, hecho que estaría directamente relacionado con los porcentajes de sobrevivencia de la planta (Gráfico N° 05).

En cuanto a la propagación de segmentos nodales, existe una diferencia marcada en los porcentajes de brotación, entre los medios con hormonas y el medio control (Gráfico N° 07), los mayores porcentajes de formación de brotes se encuentran entre 20 y 22.5%.

El medio MS3 (MS con agua de coco 20 ml/L y AIB 0.1 mg/L) tiene un 22.5% de formación de brotes, así como el medio MS4 (MS con agua de coco 20 ml/L y ANA 0.1 mg/L), llega a un 20 % de formación de brotes; ambas combinaciones hormonales, contienen agua de coco a 20 ml/L y proporciones bajas de auxina (Gráfico N° 07); así como también se puede observar las mayores longitudes de hoja alcanzados (Gráfico N° 08), porcentajes que se sustentan por la afirmación de Steward y Caplin (1951), que señalaron, que los niveles relativamente bajos de agua de coco (5% - 10% v/v), podían interactuar con las auxinas y promover el crecimiento. También se puede observar que estas combinaciones son las que poseen niveles relativamente altos de viabilidad y bajos porcentajes de formación de callo (Gráfico N° 07) en contraste con los medios MS1, MS2, MS5 y MS6 que contienen BAP en concentraciones de 1.0 mg/L y 2.0 mg/L. Pudiéndose afirmar que las concentraciones relativamente altas de Bencilaminopurina influyen en la formación de callos. En tanto no se observan callos en los medios MS control y MS con AG₃ (Gráfico N° 07).

Un alto porcentaje de brotación se observa en el medio MS8 (MS con AG₃ 0.1 mg/L y agua de coco a 20 ml/L) llegando a un 18.5 % (Gráfico N° 07), pudiendo afirmar que este comportamiento es análogo al que se obtuvo en la propagación de plantas establecidas a partir embriones cigóticos (Gráfico N° 05). Finalmente los medios que mostraron menores porcentajes de formación de brotes 10 y 15 % (Gráfico N° 07) corresponden a los medios MS1, MS2 que contenían BAP en concentraciones de 1.0 y 2.0 mg/L respectivamente, observándose que el porcentaje de callo aumenta en relación a la concentración (Gráfico N° 07) y el medio MS7 (MS con AG₃ 0.1 mg/L y jugo de tomate 20 ml/L) presenta también un 15 % de formación de brotes, dato que contrasta con el obtenido por el medio

MS8 (MS con AG₃ 0.1 mg/L y agua de coco a 20 ml/L), deduciéndose que existe una mejor sinergia entre estos dos componentes.

Las respuestas positivas obtenidas con la adición de sustancias orgánicas utilizadas en esta investigación, se pueden relacionar con lo mencionado por (Medina, 1991; Roca y Mroginski, 1993), que señalan que las acciones de los extractos vegetales agregados al medio de cultivo para inducir la organogénesis, son un proceso que no está muy dilucidado. Sin embargo se supone que estos compuestos están regulando la concentración endógena de fitohormonas. (Thorpe y col., 1991; Roca y Mroginski, 1993).

Con respecto al efecto de los reguladores de crecimiento en la longitud de hojas, se observa que, todos los medios promueven el crecimiento celular (Gráfico N° 08), pues todos los tratamientos muestran un valor superior al medio control, excepto el medio MS7 (MS con AG₃ 0.1 mg/L y jugo de tomate 20 ml/L) que muestra un similar valor al observado en el medio control; no obstante los mayores valores se encuentran en los medios MS3 y MS4 que contienen agua de coco a 20 ml/L con concentraciones bajas de auxinas AIB 0.1mg/L y ANA 0.1 mg/L.

En cuanto al efecto de los medios de cultivo en la altura de la planta, se observan diferencias, pues todos los medios superan el valor del medio control, siendo los medios con mayores alturas, aquellos medios MS con auxinas AIB 0.1 mg/L y ANA 0.1 mg/L suplementados con agua de coco 20 ml/L (medios MS3 y MS4), así como los medios MS con AG₃ 0.1 mg/L suplementados con agua de coco y jugo de tomate a 20 ml/L respectivamente (medios MS7 y MS8) (Gráfico N° 08). Estos resultados concuerdan con lo afirmado por Thorpe y col., (1991),

sugiriendo que las giberelinas tienen un papel importante en la organogénesis, estimulando la formación de yemas y estimular la brotación (Jarret y col., 1981).

En las pruebas realizadas se puede llegar a reafirmar lo asegurado por Skoog y Miller (1957), que en sus investigaciones demostraron la importancia de las proporciones de auxina: citocinina en la determinación de la respuesta morfogénica *in vitro*. Una proporción alta de auxina comparada con la de citocinina, favorecía la formación de raíces, mientras una proporción baja favorecía la formación de yemas.

En términos generales la propagación de plantas establecidas de embriones cigóticos, tienen una mayor respuesta en cuanto a los parámetros medidos en esta etapa (como son los porcentajes de viabilidad, brotación y longitudes de hojas así como altura de la planta); en comparación con la propagación por segmentos nodales (Gráficos N° 05 – 08). Estos valores de crecimiento fueron tomados después de 30 días de siembra.

Para la evaluación en la etapa de propagación, el número y tamaño de hojas, así como altura de la planta, obtenidas en los medios de cultivo, presentan diferencias estadísticas significativas y subconjuntos homogéneos según la Prueba de Duncan y ANVA, $p > 0.05$ (Anexo N° 12 y 13).

Enraizamiento

Realizada la multiplicación del material vegetal en la anterior etapa, se obtuvieron segmentos nodales que fueron sometidos a pruebas de enraizamiento. En esta etapa se procedió bajo la premisa de Thorpe (1980), quien señaló que la eliminación de citocininas exógenas es suficiente estímulo

para la diferenciación del sistema radical. Por lo tanto, se utilizaron diferentes concentraciones de auxinas.

Se observan marcadas diferencias entre los porcentajes de enraizamiento (Gráfico N° 09) en los medios de cultivo, los mayores porcentajes de enraizamiento se encuentran en los medios MS modificados, reducidos a mitad de concentración de sus sales fuente de nitrógeno, suplementados con ANA y AIB en concentraciones de 1.0 mg/L y 2.5 mg/L (medios E7, E8, E9 y E10). Datos respaldados por lo afirmado por Roca y Mroginski (1993), que señalaron que el proceso de enraizamiento de brotes propagados *in vitro* requiere del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales, siendo el medio más utilizado Murashige y Skoog diluido al 50%, habiendo dado resultados positivos en diferentes especies.

Si se hace una comparación entre los medios con la misma concentración hormonal (Gráfico N° 09), medios MS con ANA 1.0 mg/L y 2.5 mg/L, así como MS con AIB 1.0 mg/L y 2.5 mg/L; (medios E1, E2, E3 y E4 con medios E7, E8, E9 y E10), se observa que existe una marcada diferencia en los porcentajes de enraizamiento, probablemente porque la reducción al 50% de la concentración de las sales fuentes de nitrógeno del medio MS, favorecen la acción de las concentraciones hormonales; resultados similares se obtuvieron en estudios. Entonces se podría asegurar que estas son las concentraciones óptimas para el enraizamiento *in vitro* de "sacha inchi".

Así como también en el Gráfico N° 09 se puede observar que los porcentajes de formación de *callo* aumentan en relación directa al aumento de la concentración de auxinas ANA y AIB 1.0 y 2.5 mg/L, pudiendo relacionarse la formación de

callos en el proceso de enraizamiento bajo el siguiente concepto, señalando que el proceso de rizogénesis sigue un mecanismo de crecimiento en la base de la estaca y esencialmente a partir del cambium, con una proliferación celular intensa que termina con la formación de callo. En el interior de este callo, ciertas células evolucionan a células meristemáticas de tipo primario y después se organizan en meristemas de tipo radical (Rojas y col., 2004).

En el Gráfico N° 10 se observa el mismo comportamiento manifestado en el porcentaje de enraizamiento, en este caso referido al efecto de las concentraciones hormonales en la respuesta de elongación de raíces, obteniéndose las mayores longitudes en los medios E7, E8, E9 y E10 con respecto a los medios E1, E2, E3, E4 y medio control. La emisión de raíces empieza aproximadamente después de 14 días de siembra en los medios.

Asimismo se tiene conocimiento que la diferenciación de órganos a partir de callos estará condicionada a la previa existencia de células llamadas meristemoides (Echenique y col., 2002) que se asemejan a meristemas verdaderos y poseen conexiones vasculares con el tallo o tejido circundante. Bajo condiciones adecuadas de cultivo pueden formar yemas o raíces primarias (Bonnett y Torrey, 1966); esta plasticidad está de acuerdo con las primeras observaciones de Skoog y Miller (1957). Sin embargo en los ensayos realizados en esta investigación para inducir enraizamiento, no todas las raíces provienen de formaciones callosas (Anexo N° 09).

Los resultados óptimos de enraizamiento obtenidos en la presente investigación (MS/2 suplementado con 2.5 mg/L de AIB y MS/2 suplementado con ANA 2.5 mg/L), contrastan enormemente por los reportados por Gárate, (2009).

No existe enraizamiento en los medios que contenían AIA a concentraciones de 1.0 mg/L y 2.5 mg/L con MS en composición completa y MS con reducción de sales fuente de nitrógeno probablemente porque el AIA tiende a ser una hormona fotolábil (Salisbury y Ross, 1994) y/o por no ser estas concentraciones las mejores para inducir enraizamiento en esta especie, aunque en Roca y Mroginski (1993), señalaron concentraciones a utilizar entre los 0.001 a 10 mg/L, los porcentajes de viabilidad están directamente relacionados con la emisión de raíces (Gráfico N° 09) pues en los medios donde no existe formación de raíces, la viabilidad del explante decrece.

Para la evaluación en la etapa de enraizamiento, el número y tamaño de raíces, obtenidas en los medios de cultivo, presentan diferencias estadísticas significativas y subconjuntos homogéneos según la Prueba de Duncan y ANVA, $p > 0.05$ (Anexo N° 14).

Aclimatación

Finalmente las plántulas enraizadas fueron transferidas a suelo, proceso en el cual las plántulas se colocaron en bolsas de almácigo, fueron cubiertas con un envase de polipropileno translúcido agujereado y fueron llevadas a vivero (t° mínima 15 $^{\circ}$ C y t° máxima 30 $^{\circ}$ C, fotoperiodo 12/12h), se retiró el envase después de 14 días. Obteniéndose un 50% de plántulas aclimatadas.

En este caso un porcentaje elevado de plantas micropropagadas se pierde en el proceso de aclimatación y esto limita la aplicación de las técnicas de micropropagación y ha restringido su uso extensivo. Las razones de esta dificultad se debe la alta humedad relativa existente en las condiciones *in vitro* (Roca y Mroginski, 1993), que favorece el pobre desarrollo de la cutícula de las hojas (Sutter y Langhans, 1982), así como la reducida cantidad de cera

epicuticular (Brainerd y Fuchigami, 1981), y el inadecuado funcionamiento de los estomas; que da como resultado la excesiva pérdida de agua (Gribaudo y col., 2001).

Otro factor a tomar en cuenta es el estrés a la luz que pudieron presentar las plantas, hecho sustentado por Pierik (1990), que señaló que las hojas de una planta producida *in vitro*, son frecuentemente finas, blandas y fotosintéticamente poco activas, además tienen las células en empalizada que son las que deben utilizar la luz, más pequeñas y en menor cantidad.

Así también se puede atribuir este 50% de supervivencia a las condiciones de campo óptimas para el desarrollo de la planta, pues esta aclimatación se realizó a 2761 m.s.n.m. con temperaturas (mínima de 15°C, media de 25°C y máxima 30°C) y las investigaciones en la especie hacen referencia que el "sacha inchi" se adapta desde los 100 a 2000 m.s.n.m. (Manco, 2003), a temperatura media óptima de crecimiento de 26,6 °C (Arévalo, 1996).

VI. CONCLUSIONES

1. Se desinfectaron óptimamente las semillas de *Plukenetia volubilis* utilizando 3.0 % de NaClO durante 20 minutos, así como se desinfectaron segmentos nodales utilizando 2.5 % NaClO durante 5 minutos.
2. El establecimiento del cultivo *in vitro* de *Plukenetia volubilis*, se logró en MS base para embriones cigóticos y en MS suplementado con ácido cítrico 150 mg/L para segmentos nodales.
3. En la fase de propagación, utilizando medio MS suplementado con 0.1 mg/L de AG₃ se obtuvo un 75% de formación de brotes en embriones cigóticos, mientras utilizando medio MS suplementado con 0.1 mg/L de AIB más 20 ml/L de agua de coco se obtuvo 22.5% de formación de brotes en segmentos nodales. En la fase de enraizamiento, utilizando medio MS/2 reducido a la mitad en su concentración de sales suplementado con 2.5 mg/L de AIB se obtuvo un 75% de enraizamiento de segmentos nodales.
4. Se aclimató el 50% de las plantas enraizadas *in vitro*, en un sustrato compuesto por arena, compost y tierra agrícola en proporciones de (1:2:7) respectivamente, a una temperatura promedio de 25°C y fotoperíodo de 12/12h.

VII. RECOMENDACIONES

1. Desarrollar un estudio comparativo de respuestas fisiológicas en distintas composiciones nutricionales de medio Murashige y Skoog.
2. Hacer estudios fisiológicos que permitan dilucidar por completo los fenómenos ocurridos *in vitro* que influyen de manera negativa en la aclimatación.
3. Realizar investigaciones que permitan dilucidar las respuestas morfogénicas específicas generadas por cada tipo de hormona vegetal en la especie.
4. Diseñar un estudio de productividad de "sacha inchi" incorporando sus beneficios a cadenas productivas alimenticias y de servicios, en el departamento de Ayacucho.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aguilar, C., Castro, F. y Sotelo, E. (2008).** Protocolo Técnico del Cultivo de sachá inchi (*Plukenetia Volubilis* L.) Centro de Investigación, Educación y Desarrollo (CIED), Innovación y Competitividad para el Agro Peruano (INCAGRO). 92 p.
2. **Arditti, J. (1966).** The effect of tomato juice and its fractions on the germination of orchids seed and on seedling growth. *American Orchid Society Bulletin* 35(3): 175-182.
3. **Arévalo, G. (1995).** Informes de Resultados de Investigación. Programa Nacional de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología. INIA. Estación Experimental El Porvenir. Informe Técnico. Tarapoto, Perú. 20 p.
4. **Arévalo, G. (1996).** Colección, Caracterización y Mantenimiento de Germoplasma de Oleaginosas Nativas. INIA. Estación Experimental El Porvenir. Informe Anual. Tarapoto, Perú.
5. **Arévalo, G. (2005).** El Cultivo de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en la Amazonía. INIA. Estación Experimental El Porvenir. Lima. 68 p.
6. **Bhojwani, S. and Razdan M. (1983).** Plant tissue culture: Theory and practice. Elsevier Scientific, Amsterdam.
7. **Blakely, L. (1963).** Growth and variation of cultured plants cells. Tesis (Ph.D.). Cornell University. Ann Arbor, Michigan. USA.
8. **Bondioli, P., Della Bella, L. and Rettke, P. (2006).** Alpha linolenic acid rich oils composition of *Plukenetia volubilis* (sachá inchi) oil from Perú. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*. Milano, Italia. 83: 120-123.
9. **Bonnett, H. and Torrey, J. (1966).** Comparative anatomy of endogenous bud and lateral root formation in *Convolvulus arvensis* roots cultured *in vitro*. *Amer. Jour. Bot.* 53:496-508.
10. **Bordignon, S. y Viegas, P. (2009).** Propagação convencional e *in vitro* de *Plukenetia volubilis* Linneo para produção de mudas de qualidade. Abstract. In 18º Simposio de Iniciação Científica. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, Brazil. Disponible en URL : www.sistemas.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoObter?numeroInscricaoTrabalho=1128&numeroEdicao=18 Consultado en Enero de 2011.
11. **Bodwell, C. and Hopkins, D. (1985).** Nutritional characteristics of oilseed proteins. In Altschul AA and Wilcke HL (Ed.) *New Protein Foods, Vol 5: Seed Storage Proteins*. Academic Press. Orlando, USA.

12. **Brainerd, K. and Fuchigami, L. (1981).** Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106 (4): 515-518.
13. **Bueno, M. y Nieto, P. (2006).** Consolidación de los Estudios de Mercado para Productos Seleccionados a Nivel Nacional: Proyecto Facilitación de Financiamiento para Negocios Basados en la Biodiversidad y Apoyo a Actividades de Desarrollo de Mercados en la Región Andina. Corporación Andina de Fomento (CAF) - Banco de Desarrollo de América Latina. Informe N° 9. Quito.
14. **Calder, P. (2006).** N-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*; 83:S1505–1519.
15. **Chee, R. and Pool, R. (1982).** The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultures *in vitro*. *Sciencia Hort.* 16: 17-27.
16. **Chuchón, E. (2008).** Instalación del cultivo de “sacha inchi” en la margen izquierda del valle de río Apurímac y Ene. Gobierno Regional de Ayacucho. Consejo Regional. Disponible en URL: <http://www.regionayacucho.gob.pe/gerencias/Econo/Cultivo%20de%20Sacha%20Inchi.html> Consultado en octubre de 2009.
17. **Debergh, P. (1982).** Physical properties of culture media. In: Fujiwara, A. (ed.). *Plant tissue culture 1982.* Jap. Assoc. Plant Tissue Culture. Tokio. pp 135-136.
18. **Dostert, N., Roque, J., Brokamp, G., Cano, M., La Torre, M. y Weigend, M. (2009)** Factsheet: Datos Botánicos de sacha inchi *Plukenetia volubilis* L. Proyecto Perú Biodiverso – PBD. Ministerio de Comercio Exterior y Turismo – MINCETUR. Museo de Historia Natural Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Setiembre. Lima. 11p.
19. **Duddendorf Joosten, M. and Woltering, E. (1994).** Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 15: 1-16.
20. **Echenique, V., Mroginski, L. y Rubinstein, C. (2002).** Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología, Instituto Nacional de Tecnología Agraria. Ediciones INTA. Buenos Aires. pp. 25-172.

21. **Evans, D., Sharp, W., Ammirato, P. and Yamada, Y. (1983).** Handbook of Plant Cell Culture. Techniques for propagation and breeding. Volume 1. USA.
22. **Fridborg, G., Pedersen, M., Landstron, L.E. and Eriksson, T. (1978).** The effect of activated charcoal on tissue cultures: Adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. *Physiol. Plant.* **43:** 104-106.
23. **Gárate, M.A. (2009)** Efecto de cuatro dosis de ácido 3 indol butírico en el enraizamiento de ápices y segmentos nodales de "sacha inchi" (*Plukenetia volubilis* L.). Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de San Martín. Tarapoto, Perú.
24. **Gribaudo, I., Novello, V. and Restagno, M. (2001).** Improved control of water loss from micropropagated grapevines (*Vitis vinifera* cv. Nebbiolo). *Vitis* **40** (3): 137-140.
25. **Guerrero, J. (2006).** Investigaciones Realizadas en sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.), en la Región San Martín. Boletín Técnico, Edit. Universidad Nacional de San Martín - Facultad de Ciencias Agrarias. 20 p.
26. **Guerrero, J., Gárate, M.A., y Cachique, D. (2008).** Introducción y establecimiento *in vitro* de ápices meristemáticos en "sacha inchi" (*Plukenetia volubilis* L.). Memoria institucional. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana: Loreto, Ucayali, San Martín, Madre de Dios, Huánuco (Tingo María) y Amazonas. Disponible en URL: <http://www.iiap.org.pe/Upload/Publicacion/PUBL431.pdf> Consultado en julio de 2010.
27. **Haissig, E. (1974).** Origin of adventitious roots. *New Zealand Journal of Forestry Science* (Nueva Zelanda) **4** (2): 299-310.
28. **Hamaker, B., Valles, C., Gilman, R., Hardmeier, R., Clark, D., Garcia, H., Gonzales, A., Kohlstad, I., Castro, M., Valdivia, R., Rodriguez, T. and Lescano, M. (1992).** Amino acid and fatty acid profiles of the inca peanut (*Plukenetia volubilis*). *Cereal Chem.* **69:** 461-463.
29. **Harms, C.T. (1982).** Maize and cereal protoplasts - facts and perspectives. In. *Maize for Biological Research* (Sheridan. W.F. ed.), pp. 373-448. University of North of Dakota Press, Grand Forks, North Dakota, USA.
30. **Hartmann, H. y Kester, E. (1995).** Propagación de Plantas. Principios y Prácticas. Cuarta edición. Edit. Continental. México. D.F. pp 760.

31. **Hughes, K. (1981).** *In vitro* ecology, exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. *Env. Exp. Bot* 21: 281-288.
32. **Hurtado, D. y Merino, M. (1987).** Cultivo de Tejidos Vegetales. Edit. Trillas. México.
33. **Hussey, G. (1986).** Vegetative propagation of plants by tissue culture. En *Plant Cell Culture Technology Botanical Monograph*. Blackwell Cientific Publications Vol 23, Oxford, USA. pp 29-66.
34. **Jarret, R., Hasegawa, P. and Bressan R. (1981).** Gibberellic acid regulation of adventitious shoot formation from tuber discs of potato. *In vitro* 17: 825-830.
35. **Jordan, M. (1992).** Micropropagation of papaya. *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol 18 High Tech and micropropagation II*. Ed. By Y.P.S Bajaj. Springer – Verlag Berlin pp. 441-505.
36. **Juárez, E. y Egoavil, C. (1995).** Cultivos para Suelos Ácidos: Paquetes tecnológicos y avances de Investigación. Fundación para el Desarrollo Agrario del Alto Mayo. Informe Técnico. Subprograma de Recuperación de Suelos Ácidos. Calzada, Perú p 21.
37. **Juárez, E. (2007).** Estudio Sobre Sistematización de Avances de Investigación y Propuesta de un Modelo Productivo Competitivo para la Producción de sachá inchi en la Región San Martín. Informe de Consultoría. Gobierno Regional de San Martín - DIRCETUR, Moyobamba, Perú. 51 p.
38. **King, P. (1980).** Cell proliferation and growth in suspension cultures. *Int. Rev. Cytol., Suppl* 11A: 25-53.
39. **Krikorian, A. (1991).** Cloning higher plants from aseptically cultured tissues and cells. *Biol. Rev.* 57: 151-218.
40. **Larque, E., Demmelmair, H. and Koletzko, B. (2002).** Perinatal supply and metabolism of long-chain polyunsaturated fatty acids: importance for the early development of the nervous system. *Ann N Y Acad Sci*; 967:299–310.
41. **Letham, D. (1974).** Regulators of cell division in plant tissues. The cytokinins of coconut milk. *Physiol. Plant.* 32: 67-70.
42. **Macbride, J. (1951).** Euphorbiaceae, Flora of Peru. Field Museum of Natural History, Botanical Series 13(3A/1): 3-200.
43. **Manco, E. (2003).** Informes de Resultados de Investigación del sachá inchi. Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria. Dirección de

- Investigación Agraria (INIA). Subdirección de Recursos Genéticos y Biotecnología Estación Experimental El Porvenir. San Martín, Perú.
44. **Manco, E. (2006).** Cultivo de sacha inchi. Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIA). Estación Experimental el Porvenir. Junio. San Martín, Perú. p 8.
 45. **Medina, L. (1991).** Organogénesis *in vitro* a partir de entrenudos, raíces y hojas de nueve cultivares de *Ipomoea batatas* Lam. Aspectos hormonales e histológicos. Tesis Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima. pp.13-20.
 46. **Murphy, K., Santamaría, J., Davies, W. and Lumsden, P. (1998).** Ventilation of cultured vessels: I. Increased growth *in vitro* and survival *ex vitro* *Delphinium*. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 73 (6): 725-729.
 47. **Nitsch, J. (1954).** Action du jus de tomate sur la croissance de certains tissus et organs vegetaux. Bulletin Société Botanique France 101: 433-440.
 48. **Pajares, P. y Wachtel, G. (2008).** Perú Natural Products. Secretaria Técnica del Programa Nacional de Biocomercio. Comisión de Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo (PROMPERÚ). Segunda edición, Lima.
 49. **Peña, G. (1997).** Cultivo *in vitro* de *Annona cherimola* Mill "chirimoya" Tesis para optar el título profesional de Biólogo. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú.
 50. **Pierik, R. (1990).** Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Edit. Mundi-Prensa. Madrid. 326 p.
 51. **Pollard, J., Shantz, E. and Steward, F. (1961).** Hexitols in coconut milk: Their role in nurture of dividing cells. Plant Physiol. 36: 492-501.
 52. **Radice, S. (2000).** Herramientas Básicas: Morfogénesis *in vitro*. En. Echenique, V., Mroginski, L., Rubinstein, C. (eds.) Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Ediciones INTA. Buenos Aires. pp. 25-33.
 53. **Ravent, P., Evert, R. y Eichhorn, S. (1992).** Biología de las plantas. Cuarta edición. Edit. Reverté, Barcelona, España. pp. 31-755.
 54. **Reardon, J. and Troxler, S. (2006).** Essential Fatty Acids, North Carolina Department of Agriculture and Consumer Services, Food and Drug Protection Division, North Carolina, USA.
 55. **Roberts, L.W. (1976).** Cytodifferentiation in plants: Xylogenesis as a model system, Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.

56. **Roca, W. y Mroginski, L. (1993).** Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Segunda edición. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Ediciones CIAT. Cali, Colombia. pp. 20-171.
57. **Rodríguez, Á., Corazon Guivin, M., Cachique, D., Mejía, K., Del Castillo, D., Renno, J.F. y 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. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM). *Rev. Peruana Biol.* 17(3): 325- 330.
58. **Rojas, S., García, J. y Alarcón, M. (2004).** Propagación Asexual de Plantas: Conceptos Básicos y Experiencias con Especies Amazónicas. Edit. Produmedios. Bogotá, pp. 55-57.
59. **Rost, T., Barbour, M., Stocking, R. and Murphy, T. (2006).** *Plant Biology*. 2nd edition. Thomson Brooks/Cole Publishing, Belmont, CA, USA.
60. **Salisbury, F. y Ross, W. (1994).** *Fisiología Vegetal*. Tercera edición. Grupo Editorial Iberoamericana. México. pp. 134- 450.
61. **Schroeder, C. and Spector, C. (1957).** Effect of gibberellic acid and indoleacetic acid on growth of excised fruit tissue. *Science* 126: 701-702.
62. **Seemann, P. (1993).** Utilización de Técnicas de Micropropagación. In Barriga, P. y Neira M. (eds) *Avances en Producción y Sanidad Vegetal. Cultivos No Tradicionales*. Universidad Austral de Chile. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. Valdivia, Chile. pp. 87-109.
63. **Seibert, M. and Kadkade, P. (1980).** Environmental factors; A: Light. Em: Staba, E. J. (ed.). *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA. pp. 123-141.
64. **Serrano, M. y Piñol, T. (1991).** *Bioteología Vegetal*. Segunda Edición. Edit. Síntesis. Madrid. pp.15-74.
65. **Simopoulos, A. (2002).** Omega-3 Fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr*; 21:495–505.
66. **Skoog, F. and Miller C.D. (1957).** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. In. *The Biological Action of Growth Substances* (H.K. Porter, ed.). pp. 118-131. *Symposia of the Society for Experimental Biology* Nº 1. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.

67. **Steward F. and Caplin S. (1951).** A tissue culture from potato tuber: The synergistic action of 2,4-D and coconut milk. *Science* 113: 518-520.
68. **Steward F. and Caplin S. (1952).** Investigation on growth of metabolism of plant cells. IV. Evidence in the role of the coconut milk factor development. *Ann. Bot.* 16: 491-504.
69. **Steward F. and Shantz E. (1959).** The chemical induction of growth: Some substances and extracts which induce growth and morphogenesis. *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 10: 379 -404.
70. **Steward, F., Shantz, E., Mapes, M., Kent, A. and Holsten, R. (1964).** The growth promotion substances from de environmental of the embryo; 1: The criteria and measurements of growth.promoting activity and the responses induced. In. Nisch, J.P. (ed.). *Les régulateurs naturels de la croissance végétale.* CNRS Colloque International 123. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, p. 45-48.
71. **Stocker, M. y Gutiérrez, J. (2009).** Resultados Preliminares Consultoría SECO, Fase III PCC Perú, Programa Cooperación Comercial Perú 2009-2012. Stocker Group S.A. [Diapositiva], 33 diapositivas. Lima. Disponible en URL : www.deza.admin.ch/ressources/ressourcees176528.pdf. Consultado en mayo de 2010.
72. **Soberón, J., Quiroga N., Sampietro A., Vattuone M. (2005).** Resúmenes de Cátedra de Fitoquímica. Instituto de Estudios Vegetales "Dr. A.R. Sampietro". Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán - Argentina.
73. **Sutter, E. and Langhans, R. (1982).** Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. *Can. J. Bot.* 60:2896-2092.
74. **Taiz, L. y Zeiger, E. (2006).** *Fisiología Vegetal.* Tercera edición. Publicacion de la Universitat Jaume I, Castelló de la Plana, España. pp. 24-719.
75. **Thorpe, T. (1980).** Organogenesis *in vitro*. Structural physiological and biochemical aspects. *International Review of Cytology, Supplement 11A.* Academic Press, Nueva York. pp 71-111.
76. **Thorpe, T., Harry, I. and Kumar, P. (1991).** Aplicacion of micropropagation to forestry. In *Micropropagation: Technology and applications* Debergh P.C. y Zimmerman R.H. (eds). Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, Netherlands. pp 311- 336.

77. **Vacin, E. and Went, F. (1949).** Use of tomato juice in the asymbiotic germination of orchids sedes. *Botan. Gaz*, 111: 175-183.
78. **Valles, C. (1990).** El "sacha inchi" planta nativa de importancia proteica y aceitera promisorio para la selva alta". INIA, Separata 2 p Lima.
79. **Valles, C. (1992).** Sacha inchi, importante oleaginosa selvática. *Revista Pura Selva*, Tingo María, Perú. p.40-41.
80. **Valles, C. (1993).** Sacha inchi bautizado como "maní del inca". Oportunidades Comerciales. *Boletín Informativo de la Cámara de Comercio Industria y Turismo de San Martín, Perú*. 12 p.
81. **Van Bragt, J. and Pierik, L. (1971).** The effect autoclaving on the gibberellin activity of aqueous solutions containing gibberellin A3. *Misc. Papers Landbouwhogeschool Wageningen*. 9: 133-137.
82. **Van Staden, J. and Drewes, S. (1974).** Identification of cell division inducing compounds from coconut milk. *Physiol. Plant*. 32: 347-352.
83. **Villalobos V. y Pérez. M. (1979).** Alta producción de plantas de fresa libres de virus a partir del cultivo de meristemos. *Proc. Tropical Región ASHS* 23: 70-72.
84. **Villalobos, V., Thorpe, T. y Yeung, E. (1982).** El papel del cultivo de tejidos en especies forestales. México. *Ciencia y Desarrollo, CONACYT*. 51: 43-59.
85. **Villalobos, V. y Thorpe, T. (1991).** Cultivo de Tejidos en la Agricultura Micropropagación: Conceptos, Metodología y Resultados. México p.128-134.
86. **World Health Organization (1990).** Protein and amino acid requirements in human nutrition: Report of a joint FAO/WHO/ONU expert consultation. **WHO Technical Report Series No. 935**.
87. **Zucker, M. (1972).** Light and enzymes *Annu. Rev. Plant Physiol*, 23: 133-56.

ANEXOS

Anexo Nº 01. Composición de stocks de Medio Murashige y Skoog, según protocolo utilizado en el Laboratorio de Recursos Genéticos y Biotecnología - Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Stock A (Sales)

REACTIVO	PESO MOLECULAR	g/ 1000 ml H ₂ O
KNO ₃	101.10	19.0000
NH ₄ NO ₃	80.04	16.5000
CaCl ₂ .2H ₂ O	147.00	4.4000
KH ₂ PO ₄	136.10	1.7000
MnSO ₄ .4H ₂ O	169.10	0.1690
ZnSO ₄ .7H ₂ O	179.45	0.0614
H ₃ BO ₃	61.83	0.0620
KI	166.01	0.0083
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241.95	0.0025
CoSO ₄ .6H ₂ O *	237.93	0.0025
CuSO ₄ .6H ₂ O *	249.70	0.0025

En el caso de los reactivos (*) se debe preparar un pre-stock. Disolviendo 5 mg de c/u en 10 ml de agua destilada estéril. De esta manera, tomar 0.5 ml para una solución de 1000 ml

Stock B (Magnesio)

REACTIVO	PESO MOLECULAR	g/ 100 ml H ₂ O
MgSO ₄ .7H ₂ O	246.5	3.7

Stock C (Hierro)

REACTIVO	PESO MOLECULAR	g/ 100 ml H ₂ O
FeSO ₄ .5H ₂ O	336.2	0.746
Na ₂ EDTA	278.0	0.556

Cada uno de los reactivos se disuelve por separado en 20 ml y luego se enraza a 100 ml con agua destilada

Stock D (Vitaminas)

REACTIVO	mg/50 ml H ₂ O
Tiamina HCl	0.1
Piridoxina	0.5
Ácido nicotínico	0.5
Glicina	2.0

* Todos los stocks (A,B,C y D) preparados se deben conservar en refrigeración

Fuente: Peña (1997).

Anexo Nº 02. Cantidad de Compuestos utilizados para preparar 1 litro de Medio de Cultivo Murashige y Skoog (1962).

5. Stocks	Cantidad
A. Sales	100 (ml)
B. Magnesio	10 (ml)
C. Hierro	5 (ml)
D. Vitaminas	1 (ml)
6. Pantotenato de calcio	2 (ml)
7. Sacarosa (sucrosa)	20 (g)
8. Myo-inositol	100 (mg)
<ul style="list-style-type: none"> • Enrasar a 1 litro de con H₂O destilada • Luego ajustar el pH 5.6 con NaOH 0.1 N y HCl 0.1 N 	
9. Agar	7 (g)
<ul style="list-style-type: none"> • Anadir al medio y disolverlo en calentamiento • Esterilizar el medio en autoclave a 121 °C, 15 libras de presión por 15 minutos • Posteriormente mantener los medios en refrigeración 	

6.- Reguladores de crecimiento

Preparación de la Solución madre: Pesar 0.1 gr del regulador de crecimiento (BAP, ANA, AIB, AIA, AG₃) y disolverlo en ± 5 gotas de NaOH 1N, en caso de no disolverse completamente someterlo a un ligero calentamiento, luego enrasar con agua destilada estéril a 100 ml, esta concentración es correspondiente a 1000 ppm. Conservar en frasco oscuro, en refrigeración, alejada de luz. Tomar la cantidad requerida de acuerdo a la concentración y volumen de medio a preparar.

* Los reguladores de crecimiento se agregan al medio antes de medir el pH y añadir el gelificante.

Fuente: Peña (1997).

Constituyentes básicos del medio Murashige y Skoog (1962)

CONSTITUYENTES	mM	mg/L
MACRONUTRIENTES		
KNO ₃	18.80	1900
NH ₄ NO ₃	20.60	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	3.00	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.50	370
KH ₂ PO ₄	1.25	170
MICRONUTRIENTES		
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.1000	22.300
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0300	8.600
H ₃ BO ₃	0.1000	6.300
KI	0.0050	0.830
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.0010	0.250
CoSO ₄ .6H ₂ O	0.0001	0.025
CuSO ₄ .6H ₂ O	0.0001	0.025
FeSO ₄ .5H ₂ O	0.1000	27.800
Na ₂ EDTA	0.1000	37.300

Fuente: Evans y col., (1983)

Anexo N° 03. Efecto de diferentes concentraciones de desinfectante en la mortalidad y viabilidad de embriones cigóticos de “sacha inchi”

% NaClO	Tiempo de exposición a desinfectante								
	10 minutos			15 minutos			20 minutos		
	% C	% NV	% V	% C	% NV	% V	% C	% NV	% V
1.5	31.33	8.84	59.83	27.33	7.67	65	21.67	9.1	69.23
2.5	28.67	7.33	64	17.67	9.33	73	16.33	8.67	75
3.0	23.33	9	67.67	15.83	8.5	75.67	14.34	9.83	75.83
% C = Contaminación, % NV = No Viabilidad, % V = Viabilidad									
• Datos tomados después de 7 días de siembra									

Anexo N° 04. Efecto de diferentes concentraciones de desinfectante en la mortalidad y viabilidad de segmentos nodales de “sacha inchi”

% NaClO	Tiempo de exposición a desinfectante											
	2 minutos				5 minutos				10 minutos			
	% C	% N	% O	% V	% C	% N	% O	% V	% C	% N	% O	% V
1.5	59.33	5.32	3.51	31.83	43.33	8.65	3.85	44.17	38.33	15.18	5.92	40.57
2.0	46.50	9.01	4.32	40.17	33.83	12.22	3.61	50.33	29.50	27.77	4.65	38.08
2.5	37.40	12.39	3.44	46.77	20.27	15.07	3.83	60.83	17.00	42.74	5.43	34.83
3.0	34.92	20.64	4.78	39.66	18.17	33.32	4.68	43.83	12.00	54.19	4.81	29.00
4.0	30.67	33.82	4.85	30.66	14.82	46.72	4.29	34.17	10.00	66.62	4.38	19.00
% C = Contaminación, % N = Necrosis, % O = Oxidación, % V = Viabilidad												
• Datos tomados después de 7 días de siembra												

Anexo N° 05. Fotografías de las diferentes etapas en la introducción y propagación *in vitro* de “sacha inchi”

a. Planta madre



b. Plantas jóvenes en vivero y semillas



c. Introducción de embriones cigóticos y segmentos nodales



d. Establecimiento *in vitro* de plántulas regeneradas a partir de embriones y de segmentos nodales



e. Propagación de plántulas establecidas de embriones cigóticos y segmentos nodales



f. Obtención de brotes y segmentos nodales para enraizamiento



g. Enraizamiento de segmentos nodales



h. Aclimatación de plántulas de "sacha inchi"



* Planta aclimatada de "sacha inchi"

Anexo N° 06. Banco de germoplasma del Área Académica de Biotecnología - Facultad de Ciencias Biológicas



Temperatura (prom)	Fotoperiodo
25 °C	16/8 h

Anexo N° 07. Condiciones ambientales del vivero para aclimatación y permanencia de plántulas de “sacha inchi”

Altitud (m.s.n.m.)	Temperatura Mínima (prom)	Temperatura Media (prom)	Temperatura Máxima (prom)	Fotoperiodo
2761	15 - 18°C	25°C	30 °C	12/12 h



Fotografías del interior del vivero



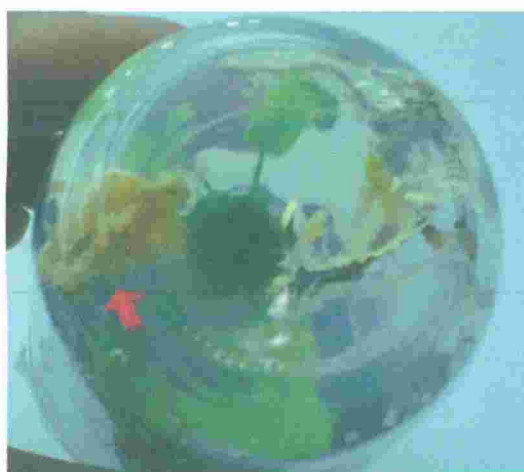
Fotografías del exterior del vivero

Anexo N° 08. Composición de sustrato utilizado para el proceso de aclimatación de plántulas de “sacha inchi”

Componente de sustrato	(%)
Arena	10
Compost	20
Tierra agrícola (negra)	70

Anexo N° 09. Fotografías de procesos inesperados en la introducción y propagación *in vitro* de “sacha inchi”

a. Formación de callos en raíces de “sacha inchi” en propagación de plántulas provenientes de embriones cigóticos



MS + BAP 2.0 mg/L



MS + BAP 2.0 mg/L

b. Inducción de enraizamiento



(MS + ANA 2.5 mg/L)



(MS + AIB 2.5 mg/L)

Raíces adventicias inducidas en segmentos nodales sin formación callosa

b. Inducción de enraizamiento



Formación previa de callo, las raíces adventicias no tienen origen en el callo (MS/2 + ANA 2.5 mg/L)

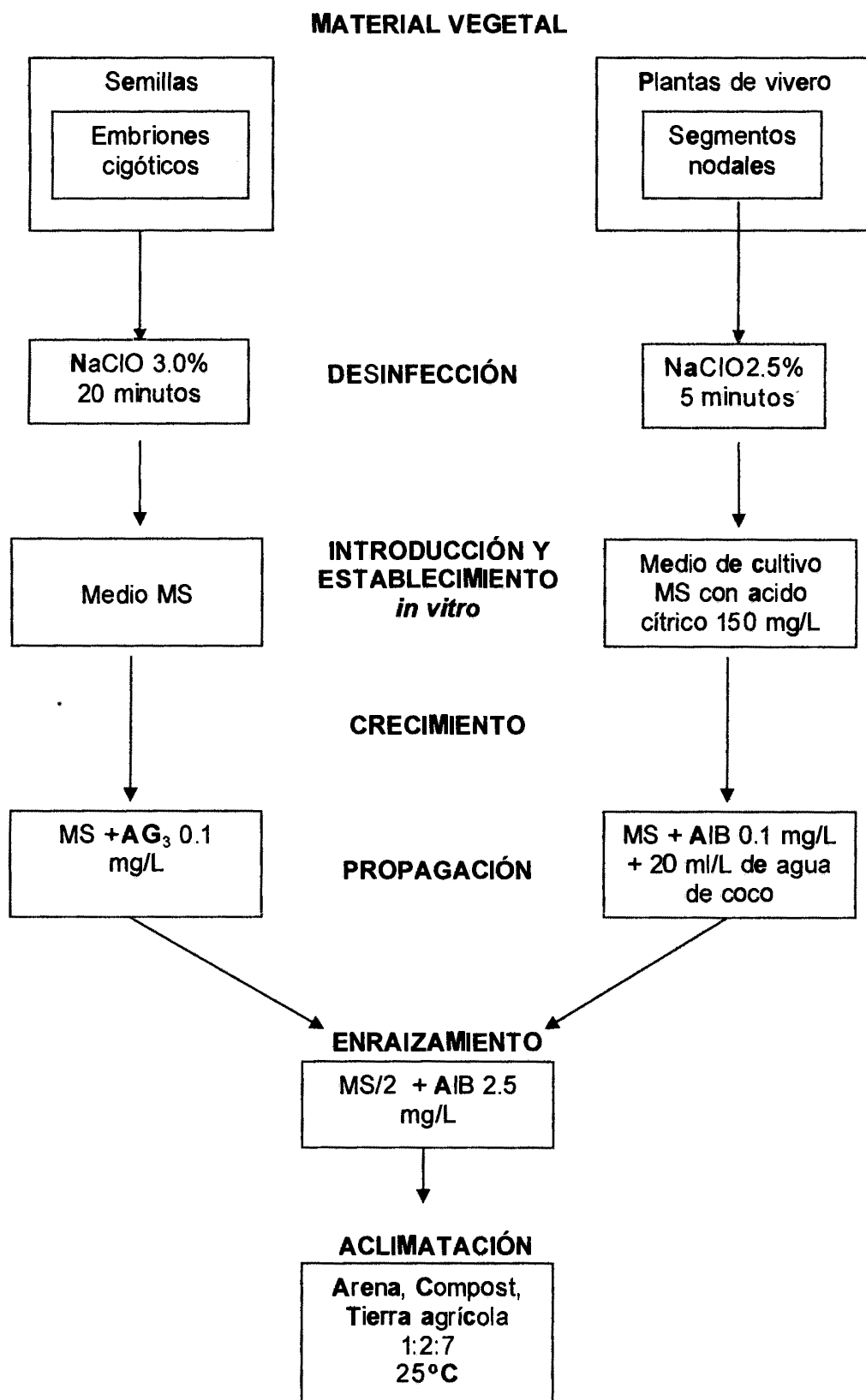


Las raíces adventicias formadas sin presencia de callo (MS/2 + AIB 2.5 mg/L)



Las raíces adventicias tienen su origen en el callo (MS/2 + AIB 2.5 mg/L)

Anexo N° 10. Protocolo general de introducción y propagación *in vitro* de *Plukenetia volubilis* L "sacha inchi"



Anexo Nº 11

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA DESINFECCIÓN

Tabla Nº 10.-Análisis estadístico de desinfección de semilla

Dependent Variable: VIABILIDAD

Method: ML - Binary Logit

Date: 09/28/11 Time: 13:26

Sample: 1 180

Included observations: 180

Convergence achieved after 4 iterations

Covariance matrix computed using second derivatives

Variable	Coefficient	Std. Error	z-Statistic	Prob.
NACLO	0.320437	0.261561	1.225095	0.2205
TIEMPO	0.048821	0.040575	1.203230	0.2289
%	-0.590007	0.866278	-0.681083	0.4958
Mean dependent var	0.705556	S.D. dependent var		0.457064
S.E. of regression	0.455861	Akaike info criterion		1.229129
Sum squared resid	36.78218	Schwarz criterion		1.282345
Log likelihood	-107.6216	Hannan-Quinn criter.		1.250706
Restr. log likelihood	-109.0950	Avg. log likelihood		-0.597898
LR statistic (2 df)	2.946811	McFadden R-squared		0.013506
Probability(LR stat)	0.229144			
Obs with Dep=0	53	Total obs		180
Obs with Dep=1	127			

Tabla Nº 11.- Análisis estadístico de desinfección de segmentos nodales

Dependent Variable: VIABILIDAD

Method: ML - Binary Logit

Date: 09/28/11 Time: 13:34

Sample: 1 240

Included observations: 240

Convergence achieved after 3 iterations

Covariance matrix computed using second derivatives

Variable	Coefficient	Std. Error	z-Statistic	Prob.
NACLO	0.027468	0.234393	0.117189	0.9067
TIEMPO	-0.023152	0.039799	-0.581740	0.5607
%	-0.267594	0.587885	-0.455182	0.6490
Mean dependent var	0.416667	S.D. dependent var		0.494037
S.E. of regression	0.495759	Akaike info criterion		1.381916
Sum squared resid	58.24906	Schwarz criterion		1.425424
Log likelihood	-162.8299	Hannan-Quinn criter.		1.399446
Restr. log likelihood	-163.0064	Avg. log likelihood		-0.678458
LR statistic (2 df)	0.352944	McFadden R-squared		0.001083
Probability(LR stat)	0.838222			
Obs with Dep=0	140	Total obs		240
Obs with Dep=1	100			

Tabla Nº 16.- Prueba de Duncan para la variable Altura de las plántulas procedentes de embriones cigóticos

Duncan		Altura_Planta			
Tto	N	Subconjunto para alfa = .05			
	1	2	3	1	
ME3	40	4.1954			
ME2	40	4.9339	4.9339		
Control	40		5.9208	5.9208	
ME4	40		5.9456	5.9456	
ME7	40		5.9985	5.9985	
ME1	40		6.0344	6.0344	
ME5	40		6.1484	6.1484	
ME8	40			6.6999	
ME6	40			6.7539	
Sig.		.200	.064	.220	

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
 a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 40.000.

Tabla Nº 17.- Análisis de Varianza para la variable Número de Hojas de las plántulas procedentes de embriones cigóticos en los diferentes tratamientos

Nro_Hojas		ANVA			
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	402.984	8	50.373	7.792	.000
Intra-grupos	2269.141	351	6.465		
Total	2672.125	359			

Tabla Nº 18.- Prueba de Duncan para la variable Número de Hojas

Duncan		Nro_Hojas				
Tto	N	Subconjunto para alfa = .05				
	1	2	3	4	5	1
ME3	40	3.4942				
Control	40	4.2823	4.2823			
ME2	40		5.0513	5.0513		
ME4	40		5.3031	5.3031	5.3031	
ME5	40			5.6671	5.6671	
ME7	40			5.7955	5.7955	
ME6	40			6.2354	6.2354	6.2354
ME1	40				6.4444	6.4444
ME8	40					7.1676
Sig.		.167	.090	.063	.074	.123

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
 a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 40.000.

Anexo Nº 14

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO PARA LA ETAPA DE ENRAIZAMIENTO DE SEGMENTOS NODALES

Tabla Nº 26.- Prueba de normalidad para las variables Longitud de raíces, altura de la planta y Número de raíces

Pruebas de normalidad

Tto	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk				
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.		
Long.Raices	E1	.217	6	.200(*)	.923	6	.530	
	E2	.188	8	.200(*)	.958	8	.788	
	E3	.202	12	.190	.922	12	.304	
	E4	.132	12	.200(*)	.949	12	.618	
	E7	.153	26	.120	.855	26	.002	
	E8	.095	32	.200(*)	.962	32	.310	
	E9	.114	26	.200(*)	.969	26	.610	
	E10	.110	35	.200(*)	.980	35	.753	
	Nº_Raices	E1	.164	6	.200(*)	.933	6	.600
		E2	.204	8	.200(*)	.958	8	.789
E3		.195	12	.200(*)	.962	12	.806	
E4		.216	12	.128	.912	12	.228	
E7		.116	26	.200(*)	.905	26	.020	
E8		.103	32	.200(*)	.975	32	.639	
E9		.144	26	.176	.922	26	.050	
E10		.078	35	.200(*)	.987	35	.954	

* Este es un limite inferior de la significación verdadera.
a Corrección de la significación de Lilliefors

Tabla Nº 27.- Análisis de Varianza para la variable Longitud de Raíces de segmentos nodales en los diferentes tratamientos

Long.Raices		ANVA			
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	637.864	7	91.123	166.887	.000
Intra-grupos	82.449	151	.546		
Total	720.313	158			

Tabla Nº 28.- Prueba de Duncan para la variable Longitud de raíces

Duncan		Long.Raices				
Tto	N	Subconjunto para alfa = .05				
		2	3	4	5	1
E1	6	1.5333				
E2	9	1.7611	1.7611			
E4	13	1.9462	1.9462			
E3	12	2.0250	2.0250			
E7	26		2.2223			
E9	26			2.9558		
E8	32				5.4181	
E10	35					6.8334
Sig.		.112	.136	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 13.918.

b Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Tabla Nº 29.- Análisis de Varianza para la variable Número de Raíces de segmentos nodales en los diferentes tratamientos

Nº Raices		ANVA			
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	297.555	7	42.508	30.932	.000
Intra-grupos	204.764	149	1.374		
Total	502.318	156			

Tabla Nº 30.- Prueba de Duncan para la variable Número de Raíces

Duncan		Nº Raices	
Tto	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
E1	6	.6799	
E2	8	.7603	
E4	12	.9504	
E7	26	1.1104	
E3	12	1.2069	
E9	26	1.4329	
E8	32		3.7025
E10	35		4.0515
Sig.		.150	.441

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 13.444.

b Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

TEMA: Introducción y propagación *in vitro* de *Plukenetia volubilis* "sacha inchi".

ASESORA: Mg. Paula García Godos Alcázar

AUTOR: Bach. Keny Meyer Martínez Gómez

Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Marco teórico	Metodología
<p>¿Cuáles serán las condiciones adecuadas que permitan la introducción y propagación <i>in vitro</i> de <i>Plukenetia volubilis</i> "sacha inchi"?</p>	<p>OBJETIVOS GENERAL Introducir y propagar <i>in vitro</i> de <i>Plukenetia volubilis</i> "sacha inchi".</p> <p>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 Optimizar la metodología de desinfección de <i>Plukenetia volubilis</i> "sacha inchi". 2 Obtener el medio de cultivo para la introducción y establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Plukenetia volubilis</i> "sacha inchi". 3 Obtener los medios de cultivo que permitan la propagación y enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Plukenetia volubilis</i> "sacha inchi". 4 Aclimatar las plantas enraizadas <i>in vitro</i> de <i>Plukenetia volubilis</i> "sacha inchi". 	<p>HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN</p> <p>Las condiciones <i>in vitro</i> adecuadas permiten la introducción y propagación de "sacha inchi".</p> <p>HIPÓTESIS NULA (H₀)</p> <p>Las condiciones <i>in vitro</i> afectan por igual la introducción y propagación de "sacha inchi".</p> <p>HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H_a)</p> <p>Las condiciones <i>in vitro</i> tienen diferentes efectos en la introducción y propagación de "sacha inchi".</p>	<p>VARIABLE INDEPENDIENTE</p> <p>Condiciones <i>in vitro</i></p> <p>VARIABLE DEPENDIENTE</p> <p>Introducción y propagación (cultivo <i>in vitro</i>) de <i>Plukenetia volubilis</i> "sacha inchi"</p>	<p>Debido al creciente interés por conservación y multiplicación de recursos genéticos se han venido utilizando diferentes tecnologías como el cultivo de tejidos vegetales, que permite la introducción y propagación <i>in vitro</i> de plantas, que permite conservar y multiplicar una especie vegetal; mediante aplicación de la fisiología vegetal, modificación de brotes y raíces, así como inducción de crecimiento de brotes y raíces, con la adición de reguladores hormonales; sin embargo cada especie responde de manera diferente al proceso de desarrollo, porque dentro de este proceso existen interacciones entre características de la especie vegetal (fisiológicas, bioquímicas) y las heterogéneas condiciones <i>in vitro</i>.</p> <p>En el proceso de micropropagación o propagación vegetativa <i>in vitro</i>, los factores tomados en cuenta son el explante, denominada como la parte de un tejido u órgano que se aisla del resto de la planta y que se utiliza como material inicial para el cultivo <i>in vitro</i> (Villalobos y Thorpe, 1991); la asepsia o desinfección superficial de los explantes mediante el uso de compuestos químicos; los medios de cultivo, cada uno de los cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran: carbono, nutrientes minerales, vitaminas, agente gelificante, sustancias reguladoras de crecimiento, otros compuestos que pueden alterar las respuestas <i>in vitro</i> de los cultivos (Debergh, 1982); muchas sustancias, suelen ser adicionadas a los medios básicos de composición química indefinida como el agua de coco, jugo de tomate (Echenique y col., 2002) y reguladores de crecimiento como auxinas (ANA, 2,4-D, AIA, IBA, NOA, Dicamba, Picloram) y/o citoquininas (BA, CIN, ZEA, 2iP, Thidiazuron), las giberelinas (especialmente AG₃). El ABA, es usado en algunos casos (Echenique y col., 2002).</p> <p>Aún cuando muchos factores pueden influir en la micropropagación, los factores físicos como, la luz, la temperatura (Chee y Pool, 1982), atmósfera gaseosa y humedad relativa (Debergh, 1982), juegan un papel determinante actúan sobre la diferenciación morfo genética en órganos, tejidos, células en cultivo</p>	<p>Para el desarrollo de la investigación "Introducción y propagación <i>in vitro</i> de <i>Plukenetia volubilis</i> "sacha inchi". Se utilizará el método científico como método general de investigación y como métodos auxiliares recurriremos al método experimental</p> <p>Como unidad de muestra se tomará de manera no probabilística 50 plantas y 1000 semillas de "sacha inchi", las cuales se obtendrán bajo un criterio de disponibilidad estacional</p> <p>Se realizará la desinfección de los explantes, (Hurtado y Merino, 1987) para permitir la introducción y establecimiento <i>in vitro</i> de la planta. Así posteriormente pasar a la fase de elección de medio de cultivo para el proceso de multiplicación o propagación <i>in vitro</i>, posteriormente pasar a la fase de enraizamiento, endurecimiento y aclimatación.</p> <p>La viabilidad de los explantes será evaluada tomando en cuenta previamente factores como contaminación, oxidación, necrosis, formación de callos, altura de la planta, número y/o desarrollo de yemas, número y tamaño de hojas y raíces. Finalmente se someterá a las plántulas regeneradas a endurecimiento o aclimatación</p> <p>Se plantea el diseño factorial, en el cual los datos serán sometidos a un Análisis de Varianza (ANVA) y la Prueba de Duncan.</p>

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS


R.D. N° 423 -2011-FCB-D

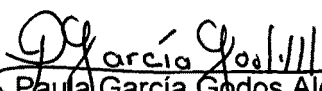
Bach. Keny Meyer Martínez Gómez


En la ciudad de Ayacucho, a los veinte tres días del mes de diciembre del año dos mil once, se reunieron en el Auditorium de la Facultad de Ciencias Biológicas, los miembros del Jurado de sustentación de Tesis del Bach. Keny Meyer Martínez Gómez titulada: Introducción y propagación *in vitro* de *Plukenetia volubilis* "sacha inchi". Ayacucho - 2009. Siendo a las diez y catorce minutos se inició el acto de sustentación, la misma que estuvo presidida por el Dr. Víctor H. Alegría Valeriano - Decano (e), e integrada por los siguientes docentes: Mg. César Magallanes Magallanes, Mg. Paula García Godos Alcázar (asesora), Mg. Gilmar Peña Rojas y Mg. Fidel Mujica Lengua (miembro). Como primer acto el presidente indicó al secretario docente (e) Mg. Gilmar Peña Rojas dar lectura a la documentación pertinente, a continuación indicó al sustentante que inicie con su exposición en un tiempo no mayor de 45 minutos. El sustentante utilizó un tiempo de 40 minutos. Acto seguido el presidente aperturó la segunda etapa, indicando a los miembros del Jurado a fin de que puedan realizar las preguntas, correcciones y aclaraciones que consideren pertinentes. Culminado esta etapa el Decano (e) invitó al sustentante y público asistente a abandonar el Auditorium a fin de que el Jurado Calificador pueda deliberar y emitir la calificación correspondiente, el cual es como sigue:

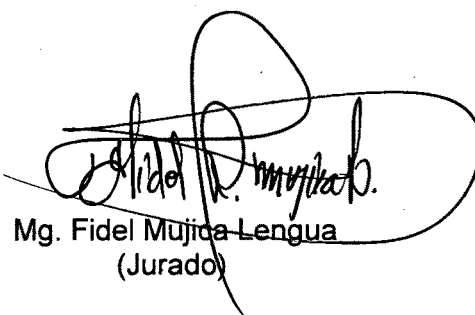
JURADO CALIFICADOR	EXPOSICIÓN	RPTA. PREGUNTAS	PROMEDIO
Mg. César Magallanes Magallanes	17	17	17
Mg. Paula García Godos Alcázar	19	19	19
Mg. Gilmar Peña Rojas	17	16	17
Mg. Fidel Mujica Lengua	18	18	18
		PROMEDIO	18

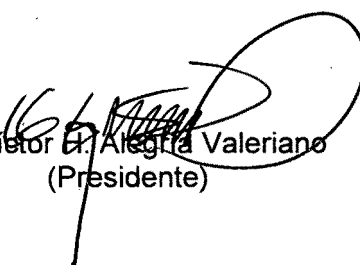
De la evaluación efectuada, el sustentante obtuvo la calificación promedio de DIECIOCHO (18) de lo cual dan fe los miembros del Jurado Calificador, estampando su firma al pie del presente, culminado el acto de Sustentación de Tesis siendo las doce con treinta minutos.


Mg. César Magallanes Magallanes
(Jurado)


Mg. Paula García Godos Alcázar
(Asesora)


Mg. Gilmar Peña Rojas
Jurado -secretario (e)


Mg. Fidel Mujica Lengua
(Jurado)


Dr. Víctor H. Alegria Valeriano
(Presidente)