

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Micropropagación de *Minthostachys mollis* “muña”.
Ayacucho 2009.

Tesis para optar el Título Profesional de Bióloga
Especialidad de Biotecnología

Presentado por

Bach. TANNIA LIZ ALFARO ASTORMA

AYACUCHO – PERÚ

2011

A mis padres: Marcial y Juana, los que amo y admiro, como muestra del inmenso cariño y amor por su sacrificio y apoyo.

Con cariño a mis hermanos: Rudy, Erich, Diony, Gavi, Miriam; por los ejemplos impartidos y contar siempre con ellos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, institución reconocida como el Alma Máter de Ayacucho, por brindarme su tutela durante mis años de estudiante.

A la Escuela de Biología, a la Especialidad de Biotecnología por formarme académicamente y contribuir en el desarrollo de mi persona, con cada enseñanza impartida.

A la Mg. Paula García Godos Alcázar, mi asesora, por su apoyo y sus valiosas recomendaciones que han permitido el progreso de la presente investigación.

“Gracias amigos” por brindarme su apoyo desinteresado en diversos aspectos y durante el desarrollo de esta investigación.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. <i>Minthostachys mollis</i> "muña"	6
2.2.1 Origen y distribución	6
2.2.2. Taxonomía	7
2.2.3. Morfología	8
2.2.4 Crecimiento	8
2.2.5. Utilización	9
2.2.6. Valor comercial	13
2.3 Micropropagación	17
2.3.1. Medio de cultivo <i>in vitro</i>	19
2.3.2. Reguladores de crecimiento	21
2.3.3. Factores externos del cultivo	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. Obtención del material vegetal	25
3.2. Desinfección e Introducción	25
3.3 Medios de cultivo	26
3.4 Adaptación <i>in vitro</i>	28
3.5. Condiciones de cultivo	28
3.6. Propagación	28
3.7. Enraizamiento	28
3.8. Acimatación	29
3.9. Análisis estadístico	29
IV. RESULTADOS	30
V. DISCUSIONES	45
VI. CONCLUSIONES	53
VII. RECOMENDACIONES	55
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	62

Título: Micropropagación de *Minthostachys mollis* “muña”. Ayacucho 2009.

Autora: Bach. Tannia Liz Alfaro Astorima

Asesora: Mg. Paula García Godos Alcázar

RESUMEN

La investigación se realizó con la finalidad de micropropagar *Minthostachys mollis* “muña” tomando en cuenta los principales factores que influyen en todo el proceso, los objetivos fueron estandarizar el proceso de desinfección, determinar el medio de cultivo adecuado y evaluar el crecimiento *in vitro* de *Minthostachys mollis* “muña”. Los explantes se obtuvieron de ejemplares silvestres del distrito de Quinua (3 396 m.s.n.m.) y se desinfectaron con NaClO (1.5%) durante 20 minutos lo que permitió obtener el porcentaje más alto de explantes viables (60%). Para controlar la oxidación, se utilizaron diferentes antioxidantes (ácido ascórbico, ácido cítrico y carbón activado), logrando obtener un 90% de explantes sin oxidación en el medio MS con ácido cítrico (100mg/l) en condiciones de oscuridad. La germinación de semillas se realizó en placas con algodón humedecido logrando obtener un 76.4% de germinación, frente a un 29.9% en frascos con medio de cultivo. Se probaron distintos medios de cultivo para la etapa de propagación, los resultados óptimos se lograron en los medios MS suplementados con 1.0 mg/l de BAP y agua de coco (AC) o jugo de tomate, mientras que el tratamiento con el medio con 1.0 mg/l de ANA produjo un 88% de formación de callos. Los medios de cultivo con suplementos orgánicos (agua de coco, jugo de tomate) estimularon el desarrollo de los explantes. La etapa de enraizamiento logró un 85% de formación de raíces, en los tratamientos con la auxina AIB o suplementado con AC y la longitud de las raíces fue mayor con AIB + jugo de tomate. El mayor porcentaje de supervivencia en la aclimatación fue de 87.5% en plántulas enraizadas con AIB y jugo de tomate.

Palabras clave: *Micropropagación, muña, antioxidantes.*

I. INTRODUCCIÓN

Minthostachys mollis “muña” es una planta arbustiva silvestre que crece en forma natural en lugares escarpados y en los bordes de los campos de cultivo de las zonas alto andinas del país, esta especie está provista de principios activos, los aceites esenciales (AE) son productos naturales de gran valor e importancia económica. La “muña” es utilizada de forma empírica en el cuidado y restauración de la salud; por sus bondades nutricionales y aromáticas se emplea en la preparación de alimentos, así mismo, en la agricultura se usa como repelente natural.

Los recursos vegetales no maderables contribuyen a la estabilidad de los agroecosistemas y proporcionan una materia prima fundamental para el desarrollo de los pueblos; tienen un alto valor ecológico, social, económico, científico y cultural, de donde surge la importancia de su conservación, la explotación sostenible de sus componentes y la distribución justa y equitativa de los beneficios que se deriven de su utilización (Bustos y Bonino, 2005).

La escasa información indica que las poblaciones silvestres de la especie se hallan cada vez más presionadas por las prácticas de recolección actuales, no se han

reportado trabajos científicos sobre las técnicas de cultivo para una explotación comercial en Ayacucho, por lo que es necesario un sistema de aprovechamiento que asegure una explotación sostenible de este recurso natural; además, la demanda de productos naturales a nivel mundial surge con más fuerza.

En cumplimiento de la misión de contribuir al sector agropecuario mediante la generación, incorporación y adaptación de conocimiento y tecnología; se hace viable realizar un procedimiento para la selección, producción de plantas, y para la investigación en biología vegetal; pues la “muña” es una de las especies de potencial exportador que se perfila como una alternativa de producción no tradicional.

La propagación vegetativa *in vitro*, generalmente denominada micropropagación, permite clonar un gran número de especies en corto tiempo y en condiciones establecidas, es una técnica de enorme potencial, tanto en investigación como en la producción. Por su parte Thomas y Schiefelbein (2001), destacan otras ventajas como la posibilidad de guardar stocks durante años, sin la pérdida de potencial de multiplicación con una serie de subcultivos y el retorno de plantas normales al campo con características de adulto.

Por las consideraciones expuestas, se estudió la aplicación de técnicas de cultivo de tejidos vegetales para desarrollar el proceso de micropropagación en la especie seleccionada, tomando en cuenta la investigación sobre los principales factores que deberán ser controlados para el desarrollo *in vitro* del explante, traducándose en una óptima cantidad de ejemplares de *Minthostachys mollis* con características deseables, libres de contaminación, acelerando el proceso de crecimiento y obtenerlas de manera permanente.

En la investigación, se plantearon los siguientes objetivos:

GENERAL:

Realizar la micropropagación de *Minthostachys mollis* .

ESPECÍFICOS:

1. Estandarizar el proceso de desinfección para introducir *in vitro* los explantes de *Minthostachys mollis*.
2. Determinar el medio de cultivo adecuado para la introducción y adaptación *in vitro* de *Minthostachys mollis*.
3. Evaluar el crecimiento *in vitro* de *Minthostachys mollis* "muña".
4. Lograr el enraizamiento *in vitro* de *Minthostachys mollis* "muña".

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

En los 80, se establecieron las bases químicas de la nutrición de las plantas y se comprobó la importancia de los elementos procedentes del aire, agua y suelo (Kolmans y Vásquez, 1999). En el año 1950, se reveló que casi todas las plantas podían crecer en un medio compuesto por una mezcla equilibrada de sales, los cultivos hidropónicos formaban parte importante de la biotecnología, desarrollada con fines de investigación y aplicación práctica (Serrano y Piñol, 1991).

Castillo y Jordan (1997), mencionan que para la regeneración *in vitro* de *Minthostachys andina* (brett); se utilizó el medio MS Murashige y Skoog 1962, complementado con 4.4 o 8.8 mg/l de BA (benciladenina) y 0.54 mg/l de ANA (ácido indol-butírico). Los cultivos en el medio NN (Nitsch y Nitsch 1969), obtuvieron las raíces en presencia de ANA (concentraciones de 1.6, 2.7 y 5.3 mg/l) o conjuntamente con AIB (9.8 mg/l) y las plantas regeneradas fueron aclimatadas posteriormente en el invernadero satisfactoriamente.

Chebel *et al.*, (1998), establecieron cultivos de *Minthostachys mollis* en medio MS conteniendo BA y/o ANA a partir segmentos nodales, la brotación óptima se logró en los medios conteniendo 0,05 mg/l de ANA y 2.2 mg/l de BA, puesto que las concentraciones mayores causaron hiperhidricidad y menor elongación. El enraizamiento se obtuvo en el medio MS con 5.5 mg/l de ANA. También realizaron el estudio del aceite esencial de las plantas clonadas donde la composición se determinó por cromatografía de gases y espectrometría de masa, se encontraron pequeñas diferencias con el aceite esencial de la planta que crece en la naturaleza.

Bima *et al.*, (2006), resumen que la propagación *in vitro* de *Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb, se realizó mediante la desinfección con la inmersión de los explantes en NaClO (1.5%) y Twen20 durante 20 minutos lo que permitió obtener el porcentaje más alto (90% sin contaminación). Los explantes apicales eran los más eficientes para arraigar, las raíces más gruesas y numerosas fueron observadas en el 80% de las plantas con tratamientos de 1 a 1.5 mg/l de AIB (ácido indolbutírico) como regulador de crecimiento, se señala también que la especie requiere un medio de enraizamiento sin citoquininas y mayor concentración de auxinas.

Los estudios realizados sobre la especie *Minthostachys mollis* son escasos o son de tipo descriptivo, en general relativos a la fitoquímica, actividad antimicrobiana o a su domesticación productiva (Ojeda *et al.*, 2000).

INTA (2004), en los avances sobre la domesticación de se utilizaron plantas de distintas procedencias, donde establecieron que algunas poblaciones son muy poco adaptadas a la multiplicación por estacas, también se probó el cultivo bajo riego y en seco, donde se encontró buena respuesta de su cultivo bajo riego, siendo mayor la producción medida tanto como materia fresca y como materia seca por planta.

Ojeda *et al.*, (2004), determinaron la respuesta a cortes productivos efectuados en el cultivo de distintas poblaciones nativas, se evaluó la producción y la persistencia de las plantas en respuesta a los tratamientos, habiendo gran variación en rendimiento tanto de materia seca como de aceites esenciales entre las poblaciones evaluadas y una fuerte interacción genotipo por ambiente generado por las distintas modalidades de corte, el ensayo se ubicó en las serranías de la provincia de Córdoba.

Algunos estudios en el Perú, se enfocan en estudios sobre la explotación comercial; al respecto Maquera *et al.*, (2007), investigaron la influencia de diferentes densidades de distanciamiento entre plantas (1.0; 1.25 y 1.5 metros), en el desarrollo de la y el rendimiento foliar a la cosecha. Los resultados indicaron que el crecimiento de la planta, número de tallos, rendimiento foliar de peso en fresco y seco evaluados en los diferentes momentos, son similares en cada uno de los tratamientos estudiados, bajo las condiciones ecológicas de la zona (localidad de Mitotambo, distrito de Quichki, provincia de Huánuco, a 2 800 msnm.)

2.2. *Minthostachys mollis* “muña”

2.2.1. Origen y distribución

Esta especie es oriunda de Sudamérica, se encuentra en los países de Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú, y Venezuela (Scandaliaris *et al.*, 2007).

Schmidt-Lebuhn (2009), indica que el género se distribuye desde los estados venezolanos de Monagas y Sucre pasando por los Andes de Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia hasta los alrededores de Córdoba en Argentina, en elevaciones de 500 a 4 200 m.s.n.m., se encuentra preferiblemente en áreas abiertas o disturbadas,

a menudo en derrumbes, bajo condiciones hidrológicas muy diversas, algunas especies crecen predominantemente en bosques nublados o ambientes húmedos similares, mientras que otras se encuentran en pendientes secos, arenosos o rocosos.

En su hábitat natural de crecimiento la especie se distribuye en parches (“demos”) asociados a sitios favorables, estos parches son agrupamientos de individuos nacidos de semillas, de tamaño variado (Encamación, 2009).

2.2.2. Taxonomía

Cano (2007), clasificó la especie en el museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

DIVISIÓN	: Angiospermae
CLASE	: Dicotyledoneae
SUB CLASE	: Simpetaleae
ORDEN	: Tubiflorales
FAMILIA	: Lamiaceae
GÉNERO	: <i>Minthostachys</i>
ESPECIE	: <i>Minthostachys mollis</i> (Kunt/Griseb)
NOMBRE COMUN	: “muña”, “coa”, “huayco”

En Argentina, es conocida como “peperina”, en Ecuador como “poleo” y “tipo” (Schmidt-Lebuhn, 2009).

2.2.3. Morfología

Scandaliaris *et al.*, 2007, describen la especie *Minthostachys mollis* como una planta arbustiva, perenne, aromática, de hasta 2 m de altura de hojas opuestas, con pecíolos de 0,5-1 cm de largo y láminas de 1-5 por 1-3 cm, aovadas, agudas, con bordes enteros o irregularmente aserrados en la mitad superior, señalan también que las flores son numerosas verticiladas, pediceladas, dispuestas en cimas pedunculadas axilares, con brácteas foliosas, con cáliz levemente cigomorfo con 5 dientes agudos, cara externa vellosa con numerosas glándulas esféricas y cara interna con carpostegio, la corola blanco-amarillenta, de 3-3,5 mm de largo, levemente cigomorfa, pubescente en la cara interior y en el dorso de los labios.

Díaz (2005), menciona que el androceo está constituido por 2 estambres concrecentes por sus filamentos al labio inferior en su parte central e interna, en cada estambre sus conectivos se han desarrollado llevando hacia la parte superior de la corola una teca fértil de cada uno y hacia la parte interna las otras 2 tecas infértiles y concrecentes formando el sistema de palanca que facilita la polinización entomógama. El gineceo es completo de ovario súpero, sentado sobre un rodete nectarífero que tiene una glándula nectárea desarrollada a un extremo, tetracarpelar, tetralocular y tetraovular. El fruto está formado por 4 clusas elipsoides, pardas y finamente reticuladas (Scandaliaris *et al.*, 2007).

2.2.4. Crecimiento

La especie *Minthostachys mollis* presenta marcados estados de foliación, floración y fructificación (Encamación, 2009).

- a. Foliación: Se inicia desde diciembre a marzo, es el estado en el que se desarrollan brotes en las yemas terminales de la planta para iniciar la nueva hoja.
- b. Floración: Desarrollo de las flores desde el capullo hasta la caída de la flor, muestran una flor en verano, ocurre entre los meses de abril a mayo.
- c. Fructificación: Se inicia con la caída de los pétalos hasta que el fruto madure o abra. En esta especie el fruto como tal está dentro de la flor que es muy pequeña, es por esto que se habla de ramas fructificadas que aparecen al final del ciclo vegetativo, esto ocurre entre los meses junio a septiembre.

Las plantas de *Minthostachys* no son cultivares fáciles porque pueden ser matados fácilmente con drenaje insuficiente del suelo, para el cultivo se debe hacer los almácigos anticipadamente para ser trasplantados (Schmidt-Lebuhn, 2009).

Minthostachys se ha desarrollado bajo un clima en el cual las oscilaciones principales de la temperatura ocurren entre el día y la noche, como en un clima templado (Schmidt-Lebuhn, 2009). También para Muñoz (1990), esto explicaría que los aceites esenciales son usualmente un mecanismo de defensa de la especie, ante el estrés hídrico al que las somete el hábitat natural.

El clima más apropiado es aquel con abundante lluvias y elevada luminosidad. Los fertilizantes más recomendados son los ricos en contenido de potasio y fosfato, siendo fundamental el abono orgánico ya que influyen favorablemente en la síntesis de la esencia (Cano, 2007).

2.2.5. Utilización

Minthostachys mollis "muña" se ha reportado como especie poseedora de características antimicrobianas, antifúngicas y fitoterapéuticas, las cuales la hacen

una especie promisorio para su uso en actividades farmacéuticas, control de plagas en el sector agrícola y la preservación de los alimentos para evitar la proliferación de microorganismos causantes de enfermedades (Gúiza y Rincón, 2007).

Desde tiempos milenarios, sus hojas son utilizadas como saborizantes en platos típicos de la región, en la medicina natural para aliviar los cólicos menstruales, resfríos, dolor de estómago y aerofagia (Herbotecnia, 2010); los aceites esenciales de la “muña” se usan como fijador de fragancias en la industria de perfumería y farmacéutica, cualidad que le da la mejor opción comercial en el mercado internacional (Mamatas, 1983).

Los usos más importantes que se le asigna a esta especie, son los siguientes:

- **Propiedades medicinales**

Las hojas y flores de esta hierba se toman como infusión o mate, para dolores estomacales, en casos de mal de altura ayuda a liberar los bronquios y disipa el mareo. Rivarola (2008), refiere que los médicos de una sociedad ágrafa como la Inca, las utilizaron, por que contribuye a eliminar los parásitos intestinales y las hojas se emplean en la curación de fracturas, luxaciones y tumores ocasionados por golpes.

Las diversas investigaciones se enfocan sobre las propiedades del aceite esencial y evaluar su capacidad antimicrobiana. Los estudios de Bravo *et al.*, (2003) demostraron que *Minthostachys mollis* contiene flavonoides, y flavonas (diosmetina) en escasa concentración; en cuanto a la actividad antimicrobiana, las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* fueron inhibidas en distintos grados por los extractos de esta especie, mostrando *Escherichia coli* tiene mayor sensibilidad

respecto a *Staphylococcus aureus*. La actividad antimicrobiana se debe a la presencia de flavonoides en el extracto total.

Cano (2007), en estudios sobre la actividad antimicótica, afirma que el aceite esencial de presenta efectos antimicóticos frente a cepas de *Candida albicans* y frente a los dermatofitos: (*Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, y *Trichophyton tonsurans*) son sensibles en los volúmenes de: 5 y 50 µL.

Villar y Villavicencio (1992), realizaron un estudio retrospectivo sobre pacientes con asma bronquial tratados con plantas medicinales en el Instituto Peruano de Investigaciones Fitoterápicas (IPIFA) de Lima, atendidos entre 1988 y 1991. Se les administraron plantas depurativas, curativas, sintomáticas y preventivas. Se halló que el 59.7% de las consultas con tratamiento curativo sin depuración tuvo una buena evolución, y que aumentó a 67.3%, cuando se agregó el tratamiento depurativo. Encontrando además que el aceite esencial de *Minthostachys setosa* tiene efectos inhibitorios sobre las bacterias enteropatógenas y estafilococicas.

La "muña" también, disminuye la aparición de problemas visuales (cataratas, miopía) y contribuye a mantener agudeza en la visión; en recientes investigaciones efectuadas por laboratorios de Austria y Suiza se ha descubierto que su composición química favorece la curación de innumerable afecciones a los ojos, tales como la degeneración macular (Inkanatural, 2011).

- **Aspectos nutricionales**

Alarcón (2009), menciona su aprovechamiento como complemento alimenticio por su alto contenido de calcio y fósforo que favorece el crecimiento y mantenimiento de los huesos y dientes.

**Tabla N° 01: Composición y análisis químico de la “muña” seca
(contenido en 100 g de la parte comestible)**

Componentes Mayores	g.
Agua	16.00
Proteínas	3.20
Grasas	2.80
Carbohidratos	66.30
Fibra	9.40
Cenizas	11.70
Minerales	mg.
Calcio	2.237.00
Fósforo	269.00
Hierro	22.40
Vitaminas	mg.
Retinol	306
Tiamina	0.35
Rivoflavina	1.81
Niacina	6.85

FUENTE: Collazos (1996).

El alto contenido alimenticio ha equilibrado durante milenios la dieta peruana por ser un excelente aromatizador, es imprescindible en la cocina andina, en la sopa de sierra, en el chupe de tubérculos andinos (papas, ollucos y ocas) y su consumo favorece una mejor digestión de los alimentos, evitando la formación de gases.

Ulloa (2006), menciona que en Bolivia es utilizada para condimentar la sopa de pescado (trucha o algunas especies de *Orestias*) del Lago Titicaca.

- **Conservación de la papa**

En la sierra peruana los campesinos utilizan la , como repelente por su fuerte efecto contra plagas durante el almacenamiento de los tubérculos, logrando mantenerlos por mayor tiempo. Gûiza y Rincón (2007) mencionan que el uso más conocido tiene que ver con la preservación de la papa, por ello se ha señalado que los campesinos de la sierra peruana la han utilizado desde hace muchos años con este fin. En Colombia es utilizada en forma similar por los campesinos del altiplano.

Las investigaciones de Guerra *et al.*, (2006) demostraron que *Minthostachys spp* retraen la oviposición de la pollilla de la papa, reduciendo el número de huevos puestos en un 80%; también redujeron el porcentaje de daño en tubérculos en comparación con el control (5% vs 12%), no encontrando diferencias significativas entre las especies *Minthostachys glabrescens* y *Minthostachys spicata*.

- **Otros usos**

Rivarola (2008), menciona que uno de sus usos menos conocidos, es la fabricación de la pólvora llamada "Q'oa muña"; elaborada a partir de sus tallos leñosos cargados con su resina (carbón de los tallos) se usa para la fabricación artesanal de pólvora para los juegos artificiales: carbón de "muña", azufre y alcohol de 40°. Esta pólvora del ande es utilizada en algunas comunidades de Ayacucho en los fuegos artificiales durante las fiestas patronales.

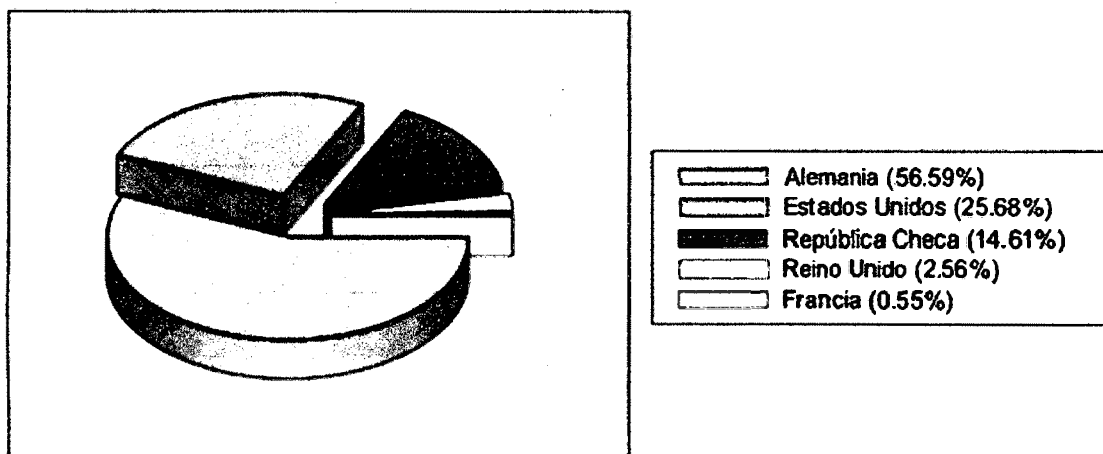
2.2.6. Valor comercial

El aspecto más importante de la "muña" radica en su calidad de planta medicinal, que provisto de principios activos con actividad farmacológica, que es aprovechada desde el punto de vista terapéutico.

El aceite esencial contiene sustancias que sirven como mecanismo de defensa contra el ataque de microorganismos, insectos y herbívoros. Algunos como terpenoides, proporcionan a la planta sus olores, otros (quinonas y taninos) son responsables del pigmento de la planta (Murphy, 1999). Existe una variabilidad grande en la composición exacta del aceite entre especies y entre plantas individuales de la misma especie, pero los aceites ricos en pulegona y mentona son frecuentes (Schmidt-Lebuhn, 2009).

Así mismo, de acuerdo a Inkanatural (2011), la composición media del aceite esencial de *Minthostachys mollis* es: Pulegona en un 46.70%; Mentona, en un 15.89%; Isomentona, en un 13.34%; Linalol, 2.94%; Cariofileno, 2.03%; Carvacrol acetato, 1.85%; Espatulenol, 1.65%; Limoneno, 1.43%; Isopulegon, 1.18%; y componentes menores, que representan un 12.99%.

Entre las especies aromáticas nativas no cultivadas de la región, la es la más requerida. Habiendo una amplia variedad de especies vegetales de exportación; la Comisión de Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo (PROMPERÚ), muestra la ubicación 8 para la "muña" en la Lista de priorización del Programa Nacional de Promoción del Biocomercio (Alarcón, 2009).

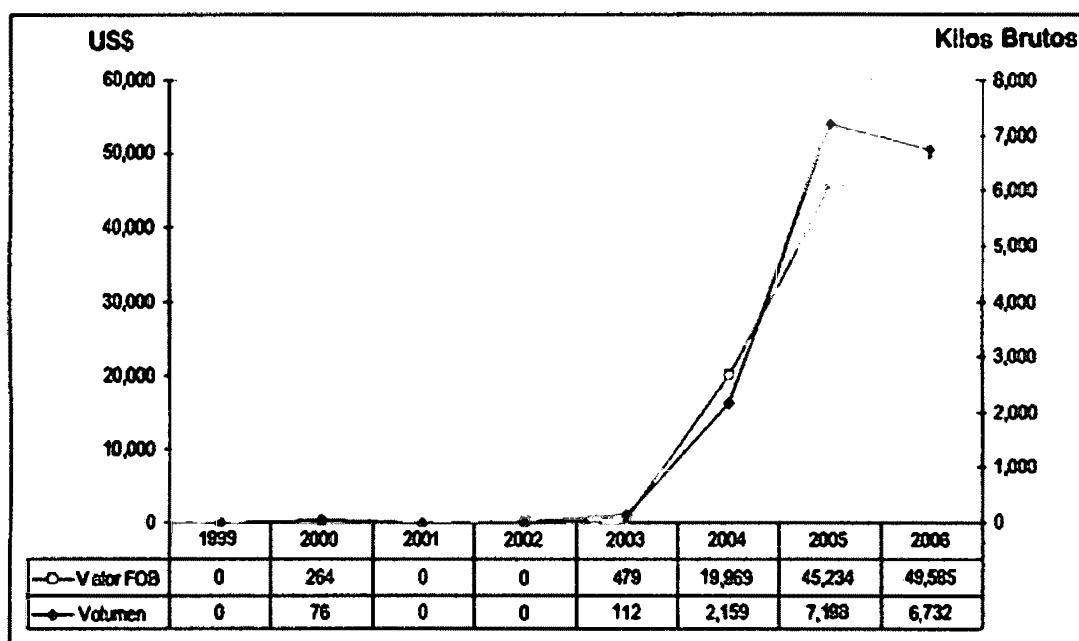


FUENTE: BIOCOMERCIO (2009)

Figura N° 01: Exportaciones del Producto según sus principales mercados en el 2010.

En el ámbito internacional existe un mercado para la "muña", la figura mostrada sólo considera las presentaciones que hayan registrado exportaciones. Encontramos un importante valor de exportación hacia Alemania (56.59%), seguida de un mercado norteamericano de 25.68% en las presentaciones: molida y hoja seca. Al ser un producto oriundo del Perú, poseemos ventajas comparativas, además hay pocos países donde se produce esta planta. Es así que, tomando en cuenta el éxito de las anteriores exportaciones realizadas se procedería a exportar este producto para hacerlo más conocido y demandado en el extranjero.

En la actualidad, las exportaciones de la "muña" se han incrementado debido a diversos factores, tales como mayor acceso a información por parte de los consumidores quienes han tomado conciencia que existen productos naturales que colaboran con la salud, por consiguiente demandan mayor cantidad de los mismos (Alarcón, 2009).



FUENTE: BIOCOMERCIO (2009)

Figura N° 02: Evolución de las exportaciones de las exportaciones de y sus derivados. 1999 - 2006.

Estos cambios recientes en el mercado representan una oportunidad para nuestro país, pero se debe avanzar en la investigación que aporte a la sostenibilidad que permitan ingresar a los exigentes mercados de Europa y Estados Unidos, donde las exigencias en hierbas medicinales está muy reglamentado (FIA, 2008).

Considerando que el Perú está entre los 12 países con mayor diversidad biológica, tanto por el número de especies, recursos genéticos y por la variedad de ecosistemas. Sin embargo, su participación en el mercado mundial de productos naturales es de sólo 0.02% (Palacios, 2005).

2.3. Micropropagación

Castillo (2004), define que la micropropagación es un sistema de multiplicación en un medio artificial y aséptico a partir de pequeños fragmentos (explantes) provenientes de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme con plantas genéticamente idénticas denominadas clones.

A su escala mayor, como ocurre en la industria de la micropropagación, el cultivo de tejidos vegetales se ha convertido en un proceso de manufactura que puede producir material vegetal libre o saneado de patógenos, de alta calidad, que puede atravesar fronteras internacionales (Morgan, 2009).

En algunas especies, esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación; al respecto, Hartmann y Kester (1995) mencionan que las ventajas más importantes son:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempo económicamente costeados.
- Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga.
- Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduanera.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos.

Según Castillo (2004), dentro del proceso de micropropagación diferenciamos varias fases, cuya secuencia abarca el ciclo completo del cultivo de plantas *in vitro*; puede ser aplicada a diferentes especies vegetales, en cada caso se podrán incluir simplificaciones o cambios de acuerdo a las características de las plantas. Estas etapas son:

FASE 0: Preparación de la planta madre

Corresponde a la pre-adaptación del material parental a condiciones que favorezcan la multiplicación vegetativa *in vitro*, para obtener explantes con un nivel nutricional.

FASE 1: Desinfección del material vegetal

Es la eliminación de los contaminantes externos de los fragmentos de la planta, a partir de los cuales se obtendrán los explantes.

FASE 2: Introducción del material *in vitro*

Es el establecimiento de los explantes en un medio de cultivo estéril para su posterior crecimiento, Pierik (1990) señala que el cultivo de segmentos nodales, consiste en el aislamiento de una yema, junto con una porción de tallo, para obtener un brote a partir de una yema. Este es el método más natural de propagación *in vitro*, ya que también puede aplicarse *in vivo*. Cada una de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas idénticas a las del ápice del tallo, pueden ser aisladas sobre un medio nutritivo, para lograr su desarrollo *in vitro*.

FASE 3: Propagación

Durante esta fase los explantes que sobrevivieron la fase 1 y 2 originan brotes que se desarrollan luego del contacto con el medio de cultivo adecuado.

FASE 4: Enraizamiento

Se logra mediante la elección de un medio adecuado, algunas veces modificado o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea.

FASE 5: Aclimatación de los explantes enraizados

Las plántulas son establecidas fuera de las condiciones *in vitro*, siendo muy sensibles a los cambios ambientales, el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación.

2.3.1. Medio de cultivo *in vitro*

Desde 1940 se ha desarrollado una gran cantidad de trabajos sobre los requerimientos nutricionales en medios estrictamente definidos. Actualmente, se ha desarrollado una gran cantidad de medios de cultivo diferentes que cumplen con los requerimientos nutricionales necesarios para sostener el crecimiento de vegetales (García Godos, 2007).

En cultivo *in vitro*, los macro y micro-nutrientes son proveídos por los medios de cultivo preparados con sales, las cuales en solución acuosa se disocian en catión y anión. Un medio de cultivo básico está compuesto por macro y micro-nutrientes, vitaminas, fuentes de carbono y un agente gelificante, si el medio es semi-sólido (Soltero *et al.*, 2004).

En términos generales, la mayor parte de tales tejidos se pueden cultivar exitosamente en un medio que contenga cualquiera de varias mezclas de sales

minerales diseñadas para mantener el crecimiento de tejidos y órganos. A menudo se utiliza la sacarosa como una fuente de energía (CIAT, 1991).

El primer medio de cultivo exitoso fue el formulado por Murashige y Skoog en 1962, del cual se han derivado el resto, al hacer las modificaciones de acuerdo a los requerimientos de los genotipos estudiados (Soltero *et al.*, 2004).

Hurtado y Merino (1987), indican que la fórmula de Murashige y Skoog contiene grandes cantidades de micronutrientes; también contiene una alta concentración de nitrógeno en forma de NH_4NO_3 y KNO_3 (ver Anexo N° 01).

- **Nutrientes**

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta *in vitro*, aparte del agua, son los minerales.

De acuerdo a Soltero *et al.*, (2004), entre los elementos más importantes tenemos el nitrógeno, muy importante para el desarrollo y morfogénesis en cultivo *in vitro*; el fósforo porque interviene en los procesos de transferencia de energía y producción de ácidos nucleicos y proteínas, el potasio como catión principal de tal manera que balancea las cargas, similar al osmótico de las células.

Los requerimientos nutritivos para un crecimiento *in vitro* óptimo varían con la especie, e incluso son específicos de acuerdo a la parte de la planta que se este cultivando y a la respuesta que se desea obtener (Morgan, 1994), debido a estas necesidades específicas se han desarrollado muchas formulaciones.

- **Sustancias complejas y suplementos orgánicos**

Según Mejía (1994), algunos tejidos se pueden cultivar exitosamente en un medio completamente definido, mientras muchos otros no presentan crecimiento en

soluciones salinas relativamente simples, a menos que se complementen con ciertos microelementos, vitaminas y otras sustancias promotoras del crecimiento de naturaleza completamente indefinida, tales como:

- Agua de coco (AC)
- Caseína hidrolizada (CH)
- Jugo de tomate.
- Endospermo de maíz.
- Extracto de levadura.
- Extracto de malta.

2.3.2. Reguladores de crecimiento

Se entiende por hormonas vegetales aquellas sustancias que son sintetizadas en un determinado lugar de la planta y se translocan a otro, donde actúan regulando el crecimiento, desarrollo o el metabolismo del vegetal a muy bajas concentraciones. El término "sustancias reguladoras del crecimiento" es general y abarca a las sustancias tanto de origen natural, como las sintetizadas (Hurtado y Merino, 1987).

Actualmente se reconoce cinco tipos de sistemas químicos de reguladores del crecimiento vegetal (Hurtado, 1994) dividido en tres grupos principales:

- Promotores del crecimiento: auxinas, citocininas y giberelinas.
- Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico.
- Etileno.

Las principales hormonas utilizadas para el crecimiento vegetal *In vitro* son las auxinas y las citoquininas.

- **Auxinas**

Las auxinas (del griego auxein = incrementar) fueron identificadas por primera vez en 1926, donde se describió la acción elongadora del AIA en coleóptidos de avena (Krikorian, 1991). Las Auxinas son sustancias naturales que se producen en las partes de las plantas en fase de crecimiento activo y regulan muchos aspectos del desarrollo vegetal. Afectan al crecimiento del tallo, las hojas, las raíces y al desarrollo de ramas laterales y frutos. La manera en que las auxinas hacen crecer a la planta es por medio del aumento del volumen celular provocado por la absorción de agua. (Lucas, 2002)

Arias (2002), indica que las auxinas están relacionadas con la elongación celular, dominancia apical, iniciación de raíces, etc. Algunas de las auxinas usadas frecuentemente en cultivos *in vitro* son: Ácido indol acético (AIA), Ácido naftalén acético (ANA), Ácido indol butírico (IBA) y Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

- **Citoquininas**

En 1954 se descubrió un compuesto muy activo en la promoción de la citocinesis, el que se formaba por la descomposición parcial de ADN, llamándolo cinetina (Kinetina, KIN) y propusieron el término cinina para denominar las sustancias naturales y sintéticas que presentaban el mismo tipo de actividad biológica (Krikorian, 1991). Son sustancias derivadas de la adenina que en términos generales estimulan la división celular o citocinesis, se han reportado en pequeñas cantidades en el agua de coco, jugo de tomate, extractos de flores, tubérculos y

nódulos radicales, en frutos y semillas inmaduras de maíz (zeatina) de plantas o microorganismos, etc (Hurtado, 1994). Las citocininas se usan en una concentración de 0.03 a 30,0 mg/l y las más utilizadas son: benzilaminopurina (BAP), furfurilaminopurina (KIN) e isopentiladenina (2-IP) (García, 1992).

2.3.3. Factores externos del cultivo

- **Temperatura**

La temperatura actúa estimulando, hasta un cierto límite, tanto la respiración como el crecimiento y luego actúa como inhibidor. El papel del regulador de la temperatura sobre el crecimiento se realiza a través de la regulación de reacciones enzimáticas que, directa o indirectamente intervienen en el proceso (Thomas, 1998). El óptimo de temperatura la mayoría de las veces está entre 28 y 32°C y por encima de los 35°C, empieza a causar daño, ya que las diferentes reacciones poseen coeficientes de temperatura ligeramente distintos, un cambio de temperatura puede fomentar una reacción y por el contrario perjudicará a la otra. (Dieter, 1980).

- **El fotoperíodo**

Algunos fenómenos propios del desarrollo de las plantas (germinación, floración, tuberización, etc.) pueden ser activados por el número de horas diarias de luz que recibe la planta. De forma análoga, el número de horas de luz que recibe el explante cultivado *in vitro* puede afectar a su desarrollo. En general, el mejor fotoperíodo *ex vitro* será también el mejor fotoperíodo *in vitro*. (Barcelo, 2001).

- **La intensidad de luz**

La luz artificial puede emplearse para prolongar el fotoperíodo natural, se ha visto que el efecto estimulador no depende de la intensidad de luz, si no de la luz como tal, es decir basta con la luz de una linterna para estimular a una planta a la

producción de flores. Para algunas especies la luz de la luna llena basta para generar estimulación a la producción de brotes (Erston, 1967).

- **pH del medio**

Pelacho *et al.*, (2002), menciona que conviene optimizar el pH del medio para cada caso en concreto, valores inferiores a 3 impiden la solidificación de los agentes gelificantes añadidos a los sólidos, inferior a 3.5 se puede producir licuación; afectar el pH del citoplasma y como consecuencia la actividad de muchas enzimas, no obstante en la mayoría de las situaciones se trabaja con pH entre 5.2 y 5.8.

El pH del medio se acidifica después de la esterilización en autoclave y durante el cultivo, su valor también se ve afectado por la absorción de NH_4 ó NO_3 en el medio.

- **Disponibilidad de agua**

La disponibilidad de agua en el medio puede ser controlada por la concentración de agar e influye en las posibilidades de vitrificación (Soltero *et al.*, 2004). La producción de yemas florales es buena en medios sólidos y pobre en medios líquidos, aunque mejora en medios líquidos si se disminuye la humedad del aire.

García Godos (2007), menciona que es importante considerar que la sacarosa aparte de ser fuente de carbono en la planta, pues también cumple el papel de regular el potencial osmótico en el medio de cultivo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención del material vegetal

Se recolectaron las plantas de *Minthostachys mollis* de campo procedentes del distrito de Quinua (3 396 m.s.n.m.), en el mes de octubre y se trasplantaron en un vivero casero sometiéndose a riego permanente para la adaptación y crecimiento. Los nuevos brotes de las plantas se usaron para la obtención de los explantes. A su vez, se recolectaron las semillas de plantas silvestres para lograr su germinación.

3.2. Desinfección e introducción del material vegetal

Desinfección de explantes:

Los explantes nodales fueron sometidos a un pre-tratamiento de hidratación que consistió en sumergirlos en agua por 30 minutos, luego fueron lavadas con agua potable y detergente, se enjuagaron repetidas veces y posteriormente se llevaron a un recipiente estéril en la cámara de flujo laminar donde se adicionó alcohol etílico al 70% por 15 a 30 segundos, se descartó el alcohol y fueron sometidos a tratamientos con hipoclorito de sodio en las concentraciones de 1, 1.5, 2, 2.5% por prueba, así mismo se establecieron tiempos de sumergimiento de 15, 30 y 45 minutos para cada caso. Pasado este tiempo se enjuagaron 3 veces sucesivas con agua

destilada estéril, se procedió a la disección del material vegetal. El tamaño de las secciones nodales fue de 3 a 5 mm.

Desinfección de semillas: Se seleccionaron las semillas eliminando las que presentaban signos de hongos o daños, así como las que eran muy pequeñas tratando de uniformizar el tamaño de las mismas. Se sumergió el material en un recipiente con solución de hipoclorito de sodio a 1.5% durante 10 minutos, luego de enjuagar las semillas se introdujeron en los tratamientos de germinación.

3.3. Medios de cultivo

Se preparó la formulación mineral en base a medio de Murashige y Skoog (1962). (Anexos N° 01 y 02). Los explantes fueron introducidos en el medio MS suplementados con diferentes antioxidantes.

Tabla N° 02: Composición de los tratamientos de antioxidantes en la etapa de establecimiento *in vitro*

Tratamiento de establecimiento	Medio Basal	Ácido ascórbico (mg/L)	Ácido cítrico (mg/L)	Carbón activado (%)
1	MS	-	100	-
2	MS	150	-	-
3	MS	-	-	3
Control	MS	-	-	-

Se evaluaron diferentes reguladores de crecimiento, utilizando citocinas: 6 bencil amino purina (BAP), kinetina; auxinas: ácido naftalen acético (ANA), ácido indol acético (AIA) y ácido indol butírico (AIB), separadamente; así mismo se evaluaron

aisladamente y en combinaciones, los suplementos naturales: agua de coco (AC) y jugo de tomate, para el proceso de multiplicación y enraizamiento.

Tabla N° 03: Tratamientos de medios para la etapa de propagación (MC)

Tratamiento	Medio Basal	BAP (mg/L)	KIN (mg/L)	Agua coco (%)	Jugo tomate (%)
MC1	MS	-	1.0	-	-
MC2	MS	1.0	-	-	-
MC3	MS	-	-	1.0	-
MC4	MS	-	-	-	1.0
MCS	MS	-	1.0	1.0	-
MC6	MS	-	1.0	-	1.0
MC7	MS	1.0	-	1.0	-
MC8	MS	1.0	-	-	1.0
MC9	MS	-	-	-	-

MC: medio de crecimiento.

Tabla N° 04: Tratamientos de medios para la etapa de enraizamiento (ME)

Tratamiento	Medio Basal	ANA (mg/l)	AIA (mg/l)	AIB (mg/l)	Agua coco (%)	Jugo tomate (%)
ME1	MS/2	1.0	-	-	-	-
ME2	MS/2	-	1.0	-	-	-
ME3	MS/2	-	-	1.0	-	-
ME4	MS/2	-	1.0	-	1.0	-
MES	MS/2	-	1.0	-	-	1.0
ME6	MS/2	-	-	1.0	1.0	-
ME7	MS/2	-	-	1.0	-	1.0
ME	MS/2	-	-	-	-	-

ME: medio de enraizamiento.

3.4. Adaptación *in vitro*

Semillas:

Las semillas se colocaron en frascos con medio de cultivo o en placas con algodón y papel filtro humedecido, manteniéndose 7 días en oscuridad, se utilizaron 20 semillas *in vitro* para cada caso.

Explantos:

Las yemas apicales y de nódulos, se colocaron individualmente sobre la superficie del medio MS con antioxidantes, previamente distribuido en los tubos de ensayo de 25 x 150 mm durante 14 días, bajo dos condiciones: a. Fotoperíodo y b. Oscuridad por 24 horas. Se establecieron 30 nódulos vegetativos para cada prueba y se evaluó la oxidación alta (totalidad del explante) y media (oxidación parcial con crecimiento del explante); después de dos semanas de la introducción del explante.

3.5. Condiciones de cultivo

Los frascos conteniendo los explantes, fueron mantenidos en la cámara de crecimiento bajo las siguientes condiciones: fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, a una temperatura de 22 a 26°C.

3.6. Propagación

Se realizó el primer subcultivo a las 2 semanas, tomando los segmentos del tallo conteniendo dos yemas, estos se transfirieron individualmente a los medios de cultivo con las diferentes concentraciones hormonales, de acuerdo a los tratamientos planteados para la propagación.

3.7. Enraizamiento

Para enraizar los explantes obtenidos durante la fase de propagación, se utilizaron explantes que tenían entre 1 a 1.5 centímetros de longitud, estos explantes se transfirieron al medio MS/2 conteniendo hormonas del tipo auxinas y en

combinaciones con suplementos orgánicos. Se colocaron de 4 a 6 brotes por frasco de medio de cultivo.

3.8. Aclimatación

Posterior al enraizamiento, se retiró el sellado de parafina de los frascos, reduciendo la humedad relativa. Pasados siete días, se retiró cuidadosamente el agar de las raíces de las plántulas, se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en almácigueras con la mezcla de sustratos conteniendo una mezcla de tierra negra, arena y musgo en proporción 2:2:1. Se aplicó riego para mantener un ambiente húmedo a nivel del sustrato y minimizar el estrés. Finalmente, se evaluó la sobrevivencia de las plántulas aclimatadas.

3.9. Análisis estadístico

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

En la 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 de los diferentes tratamientos de propagación y enraizamiento se sometieron a un análisis de varianza dentro y entre tratamientos, cuando se hallaron interacciones significativas entre los diferentes tratamientos, se realizó una separación de medias mediante la prueba de Duncan para hacer el análisis de medias entre y dentro de los tratamientos.

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

IV. RESULTADOS

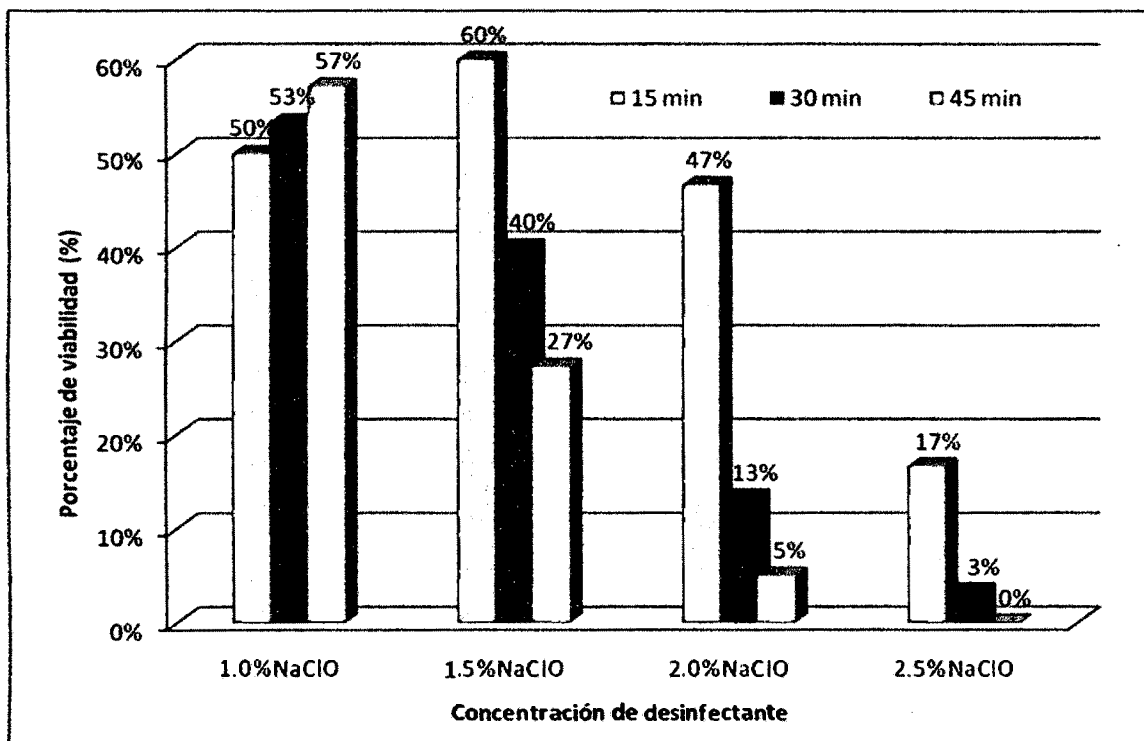


Figura N° 03: Evaluación del efecto de los tratamientos de desinfección en la viabilidad de los explantes de *Minthostachys mollis* "muña", después de una semana de la introducción

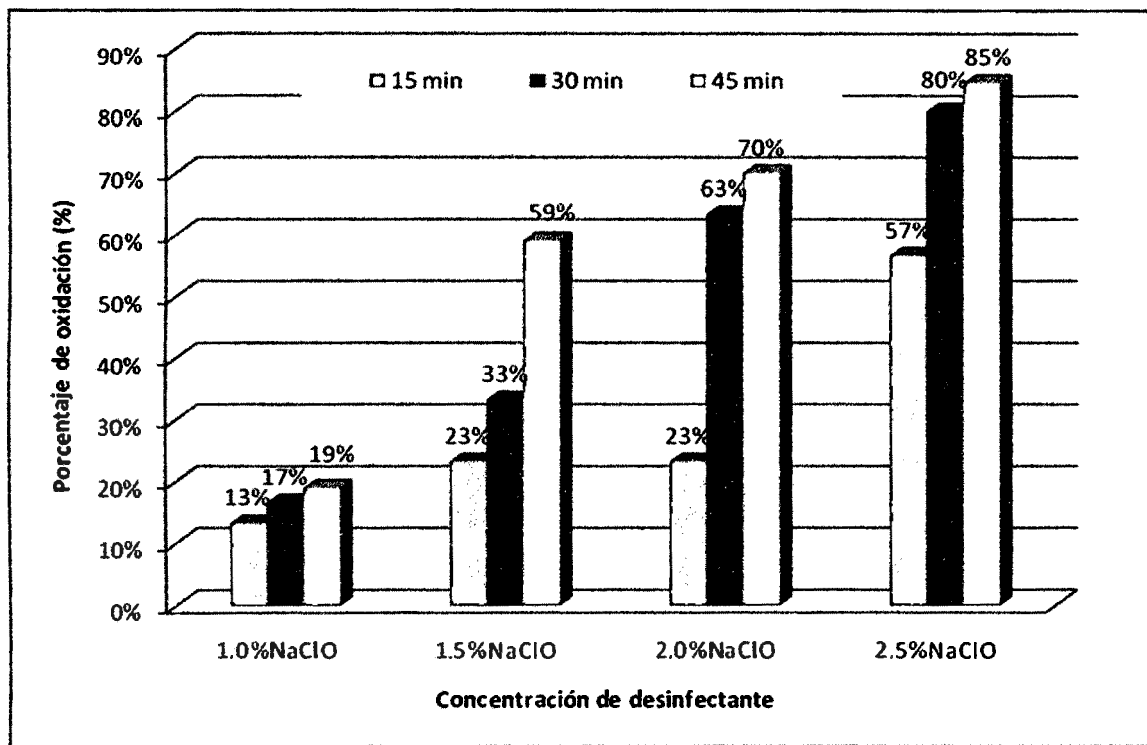


Figura N° 04: Evaluación de la oxidación de los explantes de *Minthostachys mollis* "muña" sometidos a los tratamientos de desinfección, después de una semana de la introducción

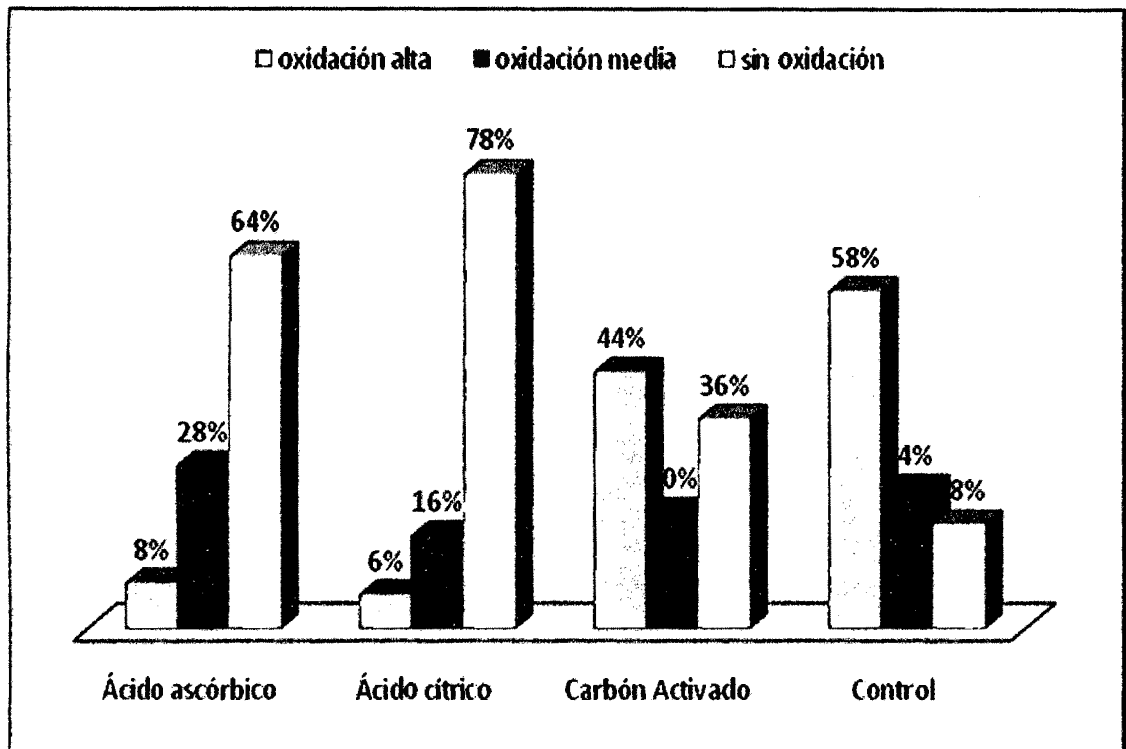


Figura N° 05: Comparación del efecto de los antioxidantes y el fotoperíodo en el establecimiento *in vitro* de los explantes de *Minthostachys mollis* "muña", a las dos semanas de la introducción

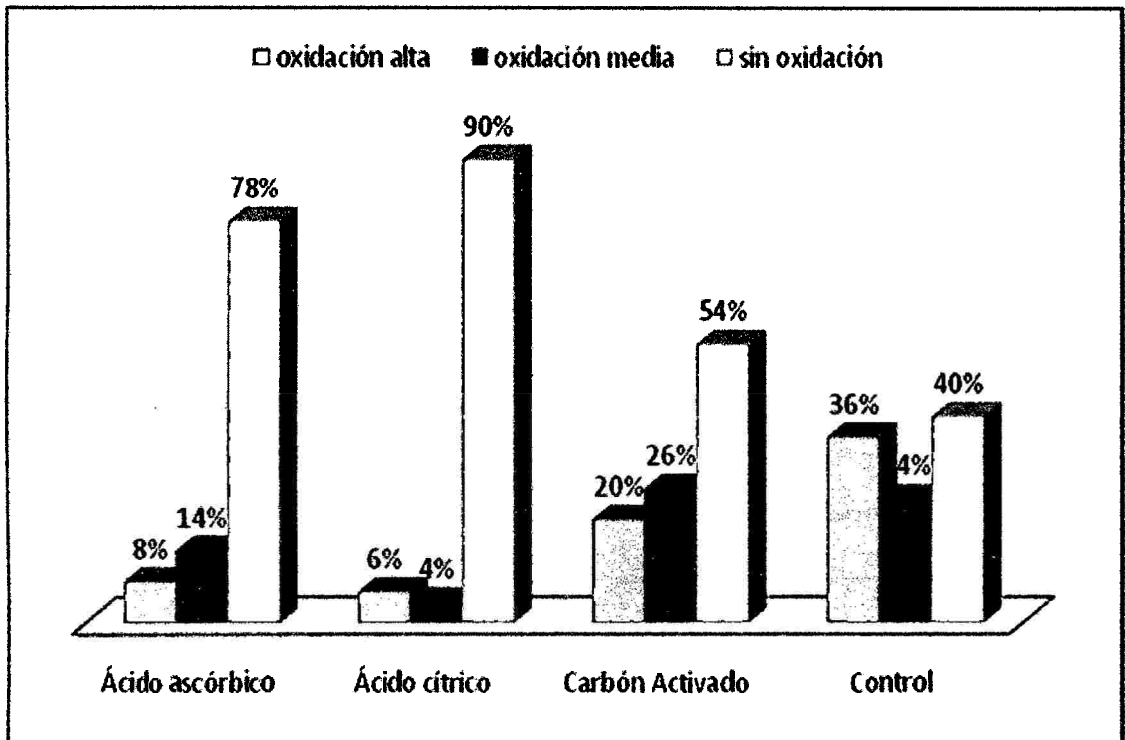


Figura N° 06: Comparación del efecto de los antioxidantes y de la ausencia de luz en el establecimiento *in vitro* de los explantes de *Minthostachys mollis* "muña", a las dos semanas de la introducción

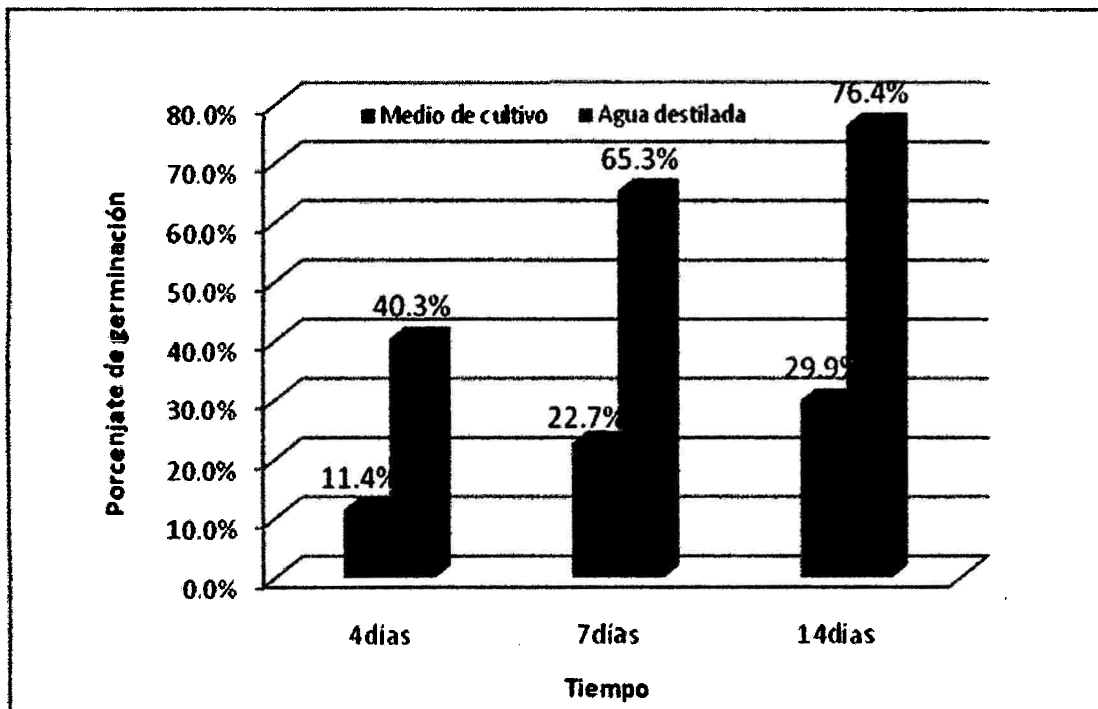


Figura N° 07: Evaluación de la germinación de las semillas de *Minthostachys mollis* "muña" en dos diferentes tratamientos, después de dos semanas de la introducción

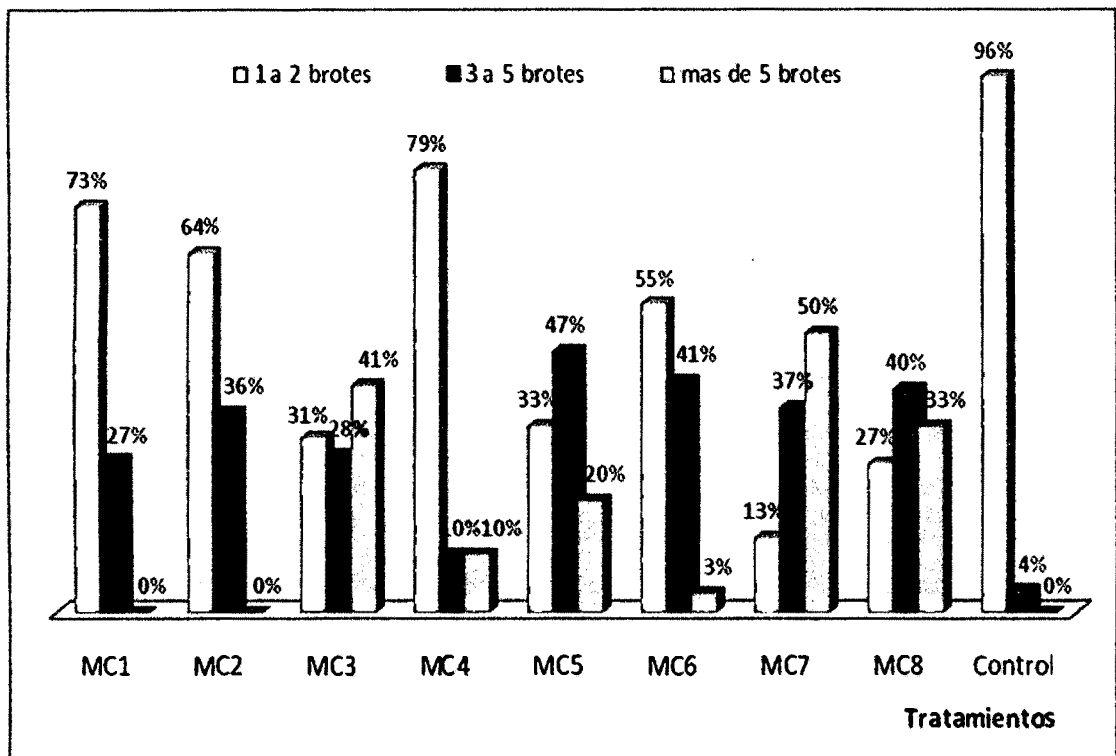


Figura N° 08: Evaluación de la brotación *in vitro* de los explantes de *Minthostachys mollis* "muña" en diferentes medios de propagación, después de 5 semanas de la introducción

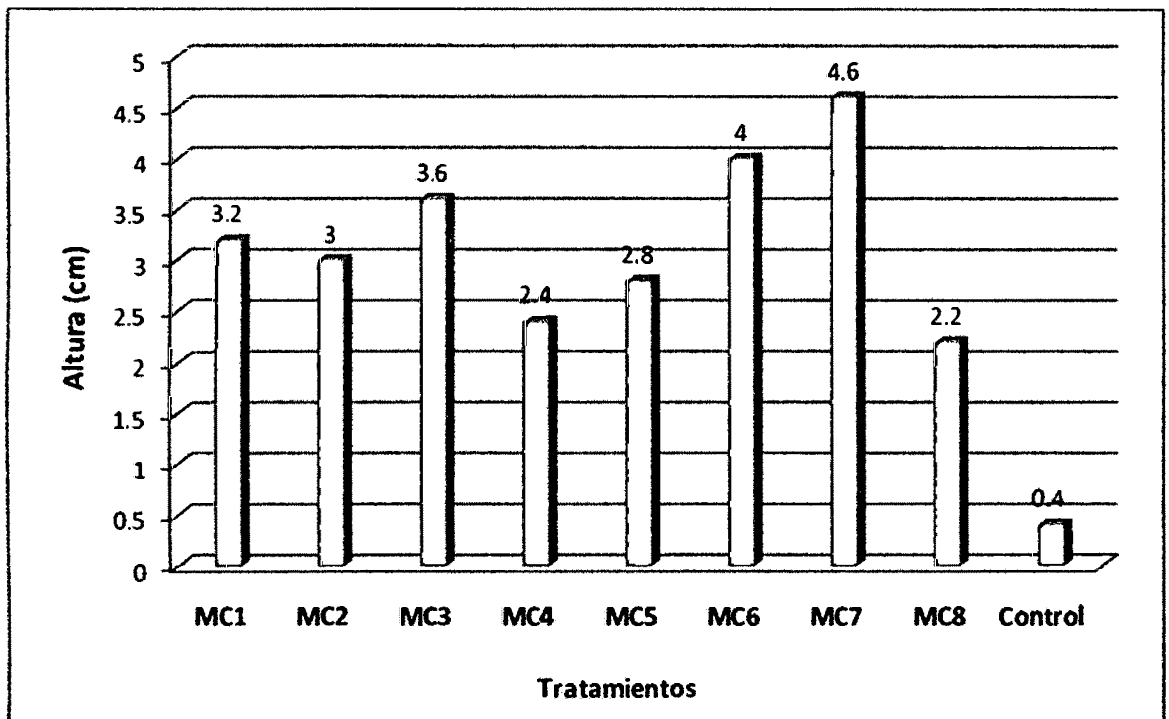


Figura N° 09: Evaluación del crecimiento *in vitro* de los explantes de *Minthostachys mollis* "muña" en diferentes medios de propagación, después de 5 semanas de la introducción

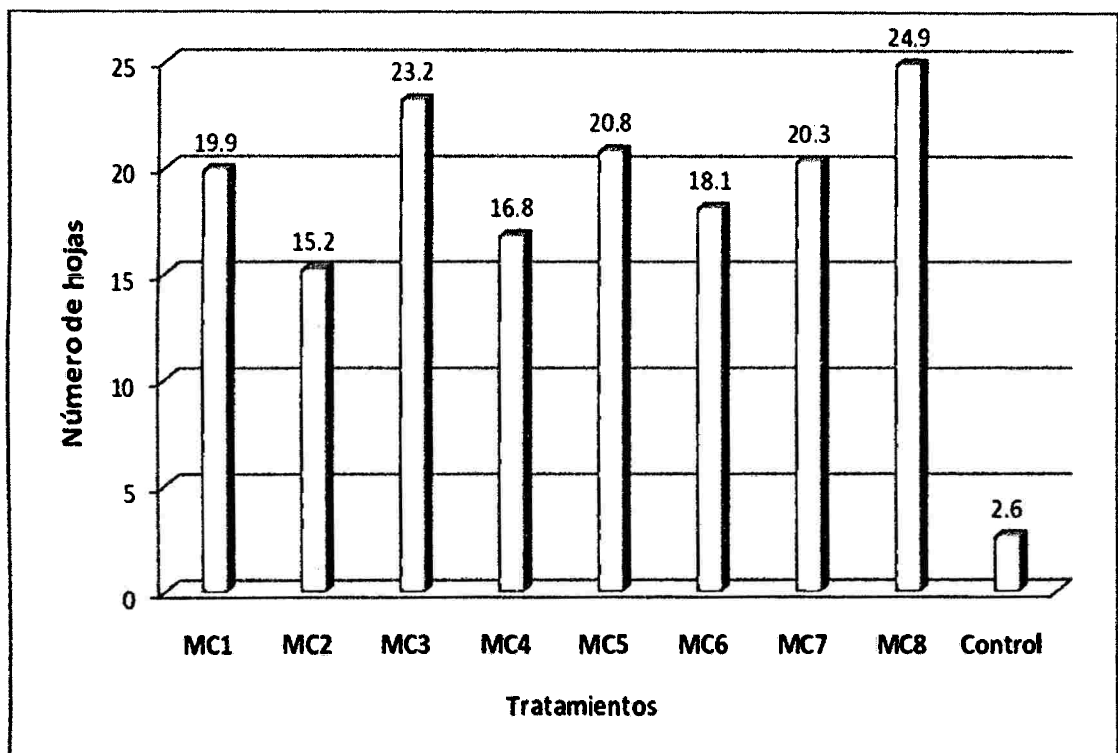


Figura N° 10: Evaluación del número de hojas en los explantes de *Minthostachys mollis* "muña" en los diferentes medios de propagación, después de 5 semanas de la introducción

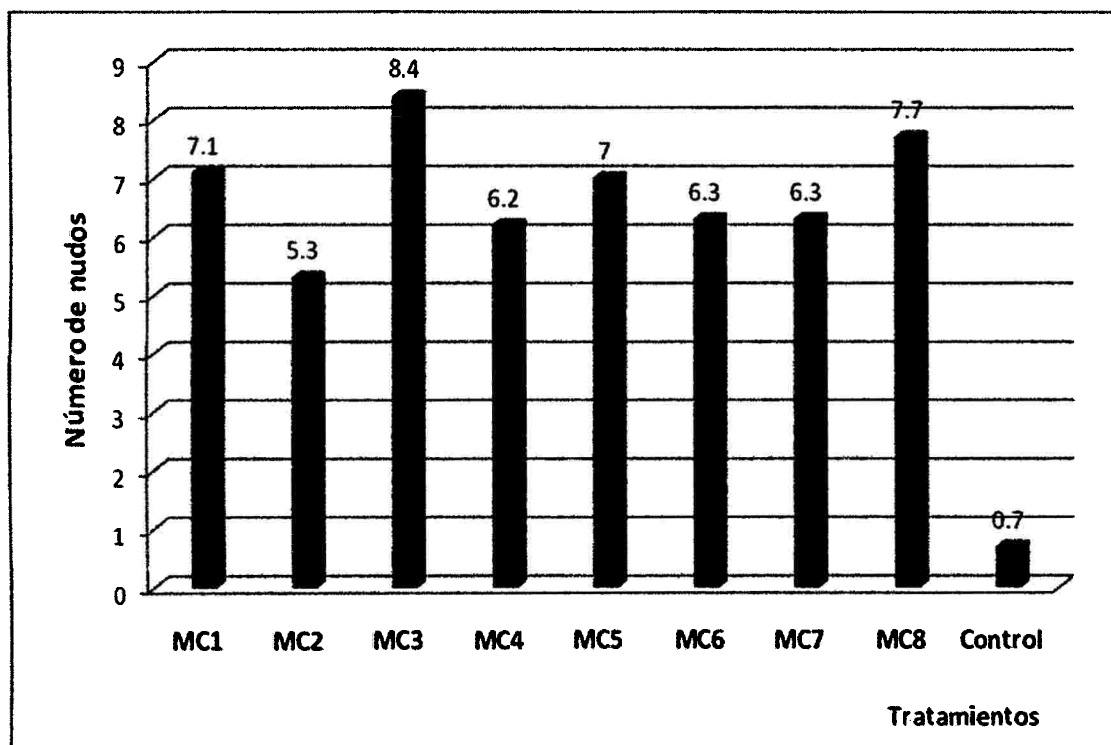


Figura N° 11: Número de nudos de los explantes de *Minthostachys mollis* “muña” por tratamiento en la etapa de propagación, después de la quinta semana de la introducción

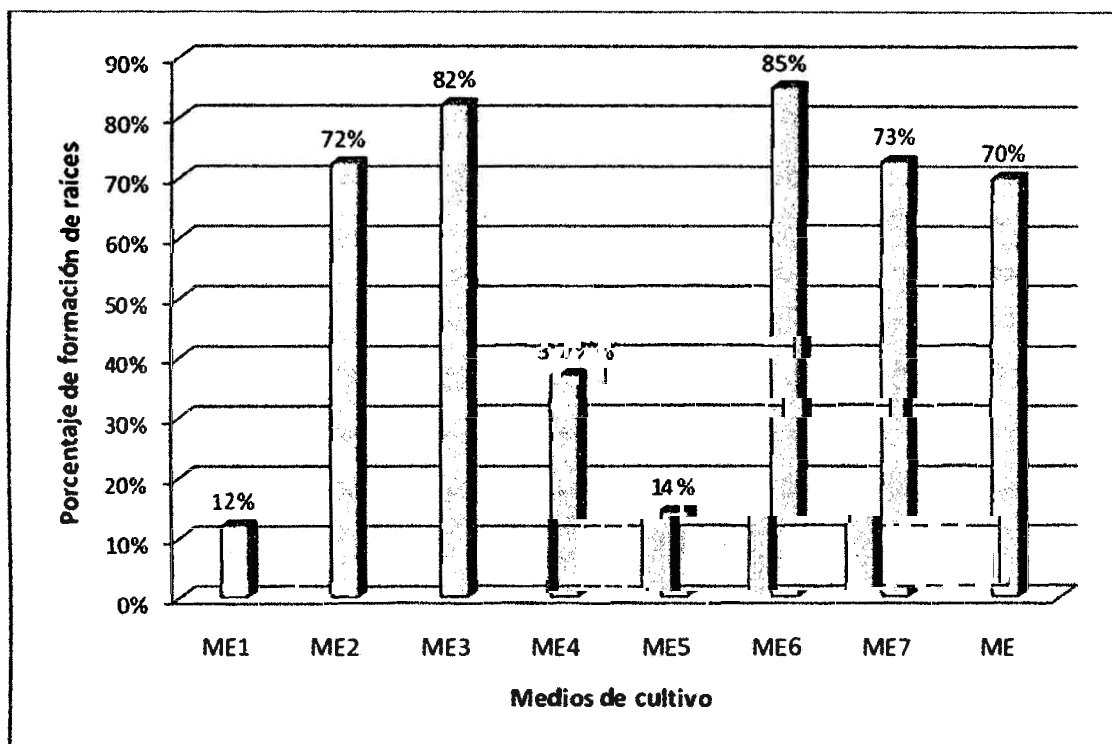


Figura N° 12: Evaluación de la formación de raíces en los explantes de *Minthostachys mollis* "muña" en los diferentes medios de enraizamiento, después de 4 semanas de la siembra

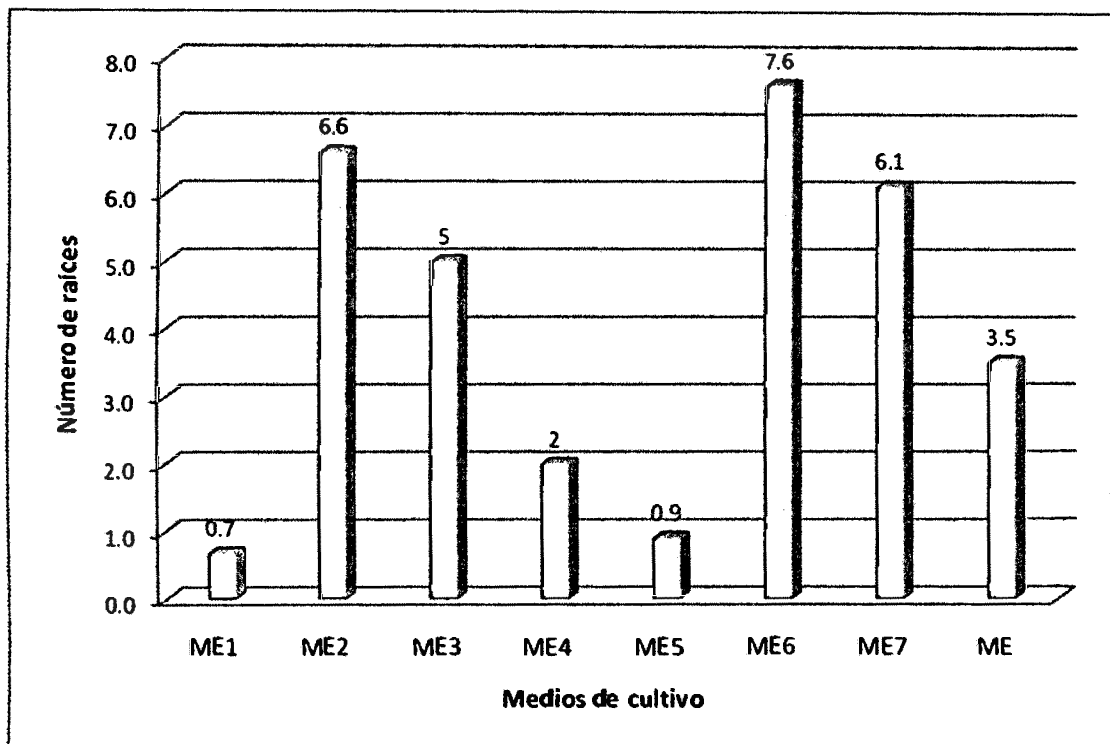


Figura N° 13: Evaluación del número de raíces de los explantes de *Minthostachys mollis* "muña" en los diferentes medios de enraizamiento, después de 4 semanas de la siembra

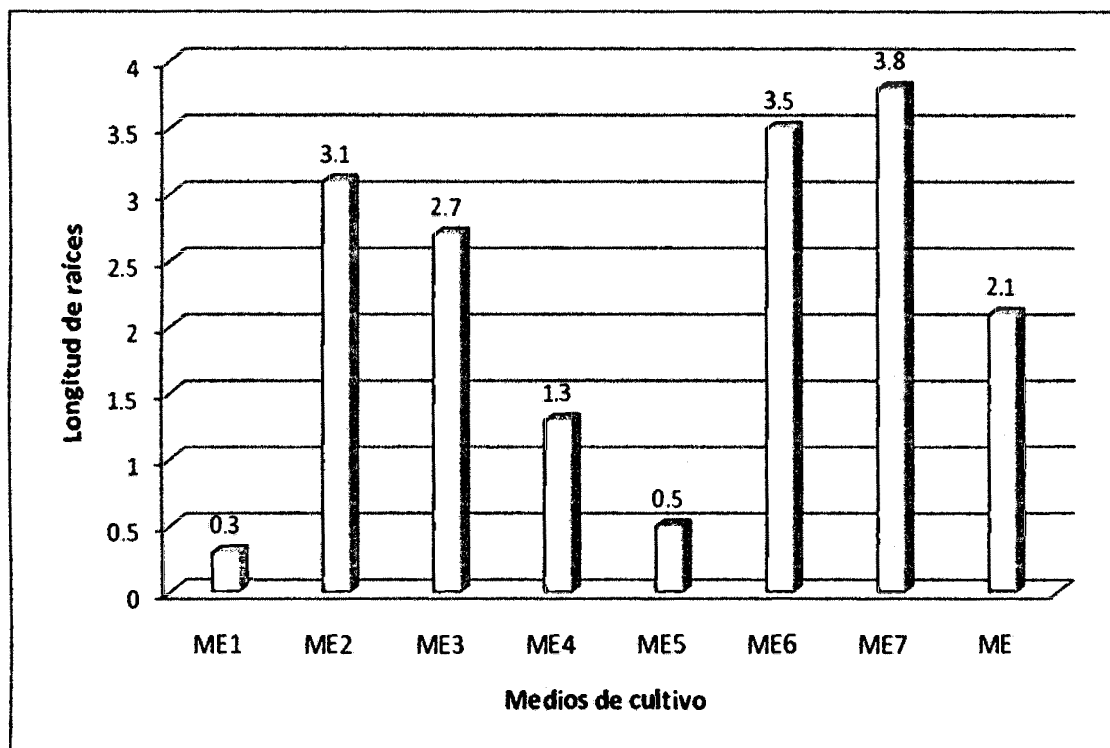


Figura N° 14: Efecto de los tratamientos de enraizamiento en la longitud de las raíces de las plántulas de *Minthostachys mollis* "muña", después de 4 semanas de la siembra

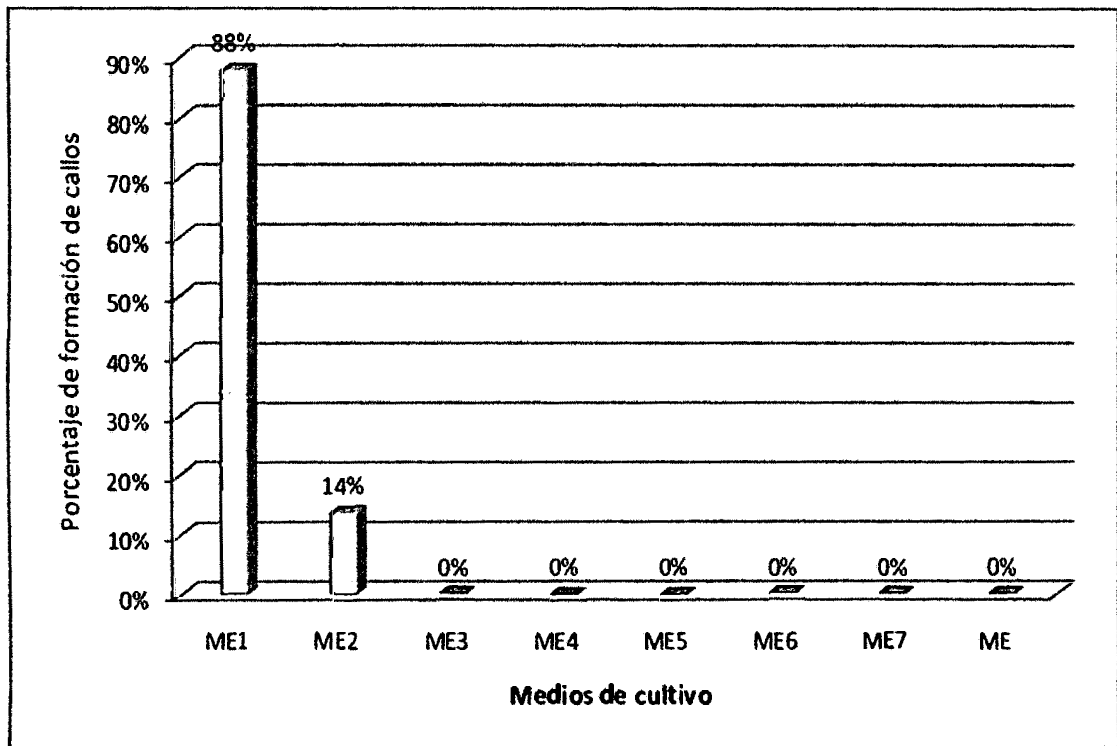


Figura N° 15: Efecto de los tratamientos de enraizamiento en la formación de callos en los explantes de *Minthostachys mollis* "muña", después de 4 semanas de la siembra

Tabla N° 05: Evaluación de la sobrevivencia de las plántulas de *Minthostachys mollis* a los 14 días después de la aclimatación.

Tratamientos	Sobreviven	No sobreviven	Total
ME2	37.50%	62.50%	100.00%
ME3	62.50%	37.50%	100.00%
ME6	75.00%	25.00%	100.00%
ME7	87.50%	12.50%	100.00%
ME	25.00%	75.00%	100.00%

V. DISCUSION

El tratamiento para la desinfección es susceptible de variación, tal es así que Hurtado y Merino (1987) recomiendan la determinación empírica del agente desinfectante así como su concentración y el tiempo de exposición adecuado.

La viabilidad de los explantes se obtiene de la respuesta al tratamiento de desinfección, de tal manera que en la investigación se observó que la viabilidad mayor fue de 60% en el tratamiento con 1.5% de NaClO a un período de tiempo de 15 minutos (Figura N° 03).

La efectividad del agente desinfectante depende en gran parte de las condiciones en las que se encuentra la planta donadora del explante y de las características de la especie (García, 1992); el material vegetal que se utilizó provenía de campo, por lo que fue necesario un estricto control durante el proceso de desinfección. Los valores mínimos se encontraron en los tratamientos a mayores concentraciones de NaClO a mayor tiempo.

La mayor fuente de contaminación en el cultivo de tejidos vegetales se produce por la presencia de microorganismos superficiales y sistémicos de la planta donadora (Castillo, 2004), en el caso de la "muña" su morfología epidérmica impide la

afiliación del desinfectante en algunas zonas, por lo que es necesario el uso de detergente para lograr una mejor penetración del desinfectante en el material (Soltero *et al.*, 2004); estos resultados fueron similares a los obtenidos por Bima *et al.*, (2006), que lograron un 90% de explantes sin contaminación con el uso de NaClO + Tween 20 durante 20 minutos.

Las concentraciones de NaClO estadísticamente influyeron directamente en la viabilidad de los explantes, por el contrario el tiempo no fue relevante en la respuesta del explante (Anexo N° 03); las mayores probabilidades de éxito en la viabilidad se encontraron mediante la utilización de 1% de NaClO.

La Figura N° 04 muestra la relación existente entre la oxidación y los tratamientos de desinfección, donde el porcentaje de oxidación más alto fue de 84.6% con 2.5% de NaClO a 45 minutos, el mayor tiempo de tratamiento disminuye drásticamente la sobrevivencia de los explantes; Bima *et al.*, (2006) no describieron pérdidas de explantes por oxidación y aunque estas variables no estuvieron sujetas al ANVA, fue importante medirlas porque afectaron los resultados.

Los daños mecánicos que se producen en los explantes de "muña" durante la desinfección y la preparación para el cultivo *in vitro*, en su mayoría son resultado de la producción de sustancias fenólicas, estos fenoles son compuestos lábiles que se oxidan muy fácilmente (Debergh y Read, 1991), la oxidación de estos exudados fenólicos produce sustancias que causan el oscurecimiento del medio y que son letales para los explantes, en los medios semisólidos los exudados son retenidos por el agar y se empiezan a concentrar en las proximidades del explante. El tratamiento con ácidos en el medio de cultivo permite la reducción de la presencia de sustancias fenólicas producidas inmediatamente después del corte de los

explantes (García, 1992) y los oxidados fenólicos pueden inducir, a su vez, una mayor producción de exudados (Castillo, 2004).

De acuerdo con Sanchez y Salaverría (2004), las enzimas involucradas en la biosíntesis y la oxidación de fenoles se incrementan con la luz, por lo que es conveniente mantener los explantes en la oscuridad unas horas antes de pasarlos a la cámara de crecimiento.

En el experimento con antioxidantes, los resultados indicaron que la oxidación fue reducida notablemente, obteniendo hasta un 78% de explantes sin oxidación con ácido cítrico (Figura N° 05), los valores se incrementaron en ausencia de luz por 24 horas, en todos los tratamientos con o sin adición de antioxidantes (Figura N° 06), se destaca el incremento de los valores de los tratamientos con el ácido cítrico en un 90% y con ácido ascórbico en un 78% de explantes sin oxidación. El ácido ascórbico es sólo efectivo durante un corto periodo de tiempo ya que el mismo se puede convertir rápidamente en un oxidante muy fuerte (Debergh y Read, 1991), en los resultados del control y del carbón activado en ausencia de luz se mostraron afectados incrementando los porcentajes de explantes sin oxidación. La distancia del corte con respecto a los nódulos, también contribuyen a reducir la distribución de los compuestos fenólicos en los explantes, pues en el área próxima a las yemas, las células son recientes y están en formación de tejidos (Scandaliaris *et al*, 2007).

La utilización de la fase previa para aumentar el éxito en el establecimiento de los explantes y reduciendo los niveles de oxidación, permitió además identificar contaminaciones en el estado inicial donde es más frecuente su aparición, reduciendo las posibilidades de contaminación en los siguientes pasos de la micropropagación.

Por otra parte se observa que el porcentaje de la germinación de las semillas de (Figura N° 07), donde los mejores resultados se obtuvieron en las placas con algodón humedecido (76.4%), frente al porcentaje de germinación en los medios de cultivo (29.9%). Dentro de los tratamientos no se llega a la germinación total, hay que considerar la posibilidad de que algunas semillas no se hayan fecundado. La baja germinación en el medio de cultivo se debe a la poca disponibilidad de agua, pues para que la semilla recupere su metabolismo es necesaria la rehidratación de sus tejidos, la absorción de agua en el interior de la semilla se debe a una diferencia de potencial hídrico entre la semilla y el medio externo. Por ello, en el tratamiento con algodón humedecido el agua llega eficazmente al embrión a través de las paredes celulares de la cubierta. INTA (2007), informó los valores germinativos de las semillas de "muña" en dos tratamientos (semillas limpias y semillas con restos de fruto), encontrando que el mayor valor fue de 32% de germinación en las semillas limpias, en nuestra investigación el porcentaje germinación fue mayor a pesar de que las semillas también provenían de plantas silvestres.

Los tratamientos de propagación manifestaron diferencias en la brotación de los explantes (Figura N° 08), la mayor cantidad de brotes se presentaron en los medios MC7 (suplementado con 1.0 mg/l de BAP + 1% de AC) y MC8 (con 1.0 mg/l de BAP + 1% de Jugo de tomate), la menor cantidad de brotes, se obtuvieron en el control (medio MS a concentración total). El AC y el jugo de tomate promueven la brotación en los tratamientos con BAP, de manera similar a lo reportado por Chebel *et al.*, (1998), en nuestra investigación no fue necesaria adicionar auxinas porque fueron reemplazadas con los suplementos orgánicos.

El crecimiento de los explantes se observan en la Figura N° 09, los mayores promedios para la altura de planta en centímetros, fue el ejercido por el medio MC8 (4.65) seguido del medio MC6 (4.05), ambos medios conteniendo jugo de tomate en adición de KIN y BAP respectivamente, mientras que en el medio MS (Control) el crecimiento fue mínimo. Los medios de cultivo con suplementos orgánicos beneficiaron el desarrollo foliar de los explantes de (Figura N° 10), el mayor promedio fue de 23.2 con AC, esto comprueba lo mencionado por Krikorian (1991).

Las condiciones *in vitro* estimulan el desarrollo de las yemas axilares permitiendo la formación de una planta por cada yema, la eficiencia de este sistema está en el número de nudos con yemas axilares, este sistema muestran individuos con una gran estabilidad genética, al respecto la Figura N° 11 corresponde al número de nudos promedio que alcanzó hasta 8.4 con AC, a diferencia de la respuesta de los explantes del medio MS sin reguladores. Se pudo observar que el requerimiento de las citoquininas no fue relevante, además Chebel *et al.*, (1998), encontraron hiperhidricidad y menor elongación a mayores concentraciones.

Se encontraron diferencias significativas en la altura y el número de hojas de los explantes entre los tratamientos de propagación (ANVA, Prueba de Duncan, $p > 0.05$), donde el control es altamente significativa respecto al resto de tratamientos.

Según, Serrano y Piñol (1991) en algunas especies los brotes pueden desarrollar raíces, si son subcultivados en un medio carente de citoquinina, con o sin hormona de enraizamiento porque todas las citoquininas inhiben el enraizamiento, por su parte Villalobos y Thorpe, (1991) indican que el proceso de enraizamiento requiere del transplante a un medio con menos concentración de sales, por ejemplo, el

medio MS reducido al 50% de la concentración, que ha dado resultados positivos en diferentes especies.

En cuanto a la etapa de enraizamiento, Hurtado (1994), mencionó que un exceso de auxinas puede suprimir la división y/o el crecimiento celular, no obstante los tratamientos dieron buenos resultados para obtener plántulas de "muña, con lo cual, queda reflejado en este experimento ya que no fue necesaria el uso de concentraciones mayores de hormonas. En cuanto a la formación de raíces, la Figura N° 12 muestra la formación de raíces en un 85% en el medio ME6 suplementado con 1.0 mg/l de AIB + AC seguido de un 82% en el medio ME3 con AIB, esto contrasta con los resultados de Bima *et al.*, (2006) que logró un 80% en tratamientos con AIB (1 a 1.5 mg/l). El menor porcentaje fue de 12% en el medio ME1 (1.0mg/l de ANA), esto no concuerda con los resultados de Chebel *et al.*, (1998) porque la concentración que reportaron fue mucho mayor (5.5mg/l de ANA), a su vez Castillo y Jordan (1997) utilizaron concentraciones de hasta 5.3 mg/l; al respecto Pierik (1990), indicó que con una baja concentración de auxinas predomina la formación de raíces adventicias, lo que es beneficioso, ya que la falta de pelos radiculares en las raíces desarrolladas *in vitro* puede estar relacionada con la baja tasa de supervivencia de las plántulas cultivadas *in vitro* (Alonso, 2002).

El mayor número de raíces se produjo en el medio ME6 con AIB + AC (Figura N° 13), mientras que en medio ME1 los resultados fueron desfavorables, se generaron raíces robustas y de hasta 3.8 cm. de longitud promedio en el medio con 1.0 de AIB + jugo de tomate (Figura N° 14); frente a los obtenidos en los medios ME4 y ME5 que no tuvieron respuestas efectivas, posiblemente debido a que la auxina AIA y los

suplementos orgánicos interactuaron promoviendo la división celular y favoreciendo la formación de yemas (Krikorian, 1991), lo que inhibió el enraizamiento.

El tratamiento ME1, medio con 1.0 mg/l de ANA, produjo un 88% de formación de callos en las zonas de corte los explantes (Figura N°15), el callo se produce en casi la totalidad de los explantes con ANA, Pierik (1990) define que el ANA es una auxina fuerte mientras que AIA se considera débil que tuvo un 14% de formación callos; distintamente no se formaron callos en los otros tratamientos. La adición de ANA terminó desequilibrando la proporción hormonal de los explantes que redujeron su tamaño debido a la formación de tejido calloso, este tipo de callo puede ser útil para la regeneración de plantas mediante un paso intermedio de cultivo en medio líquido (Soltero *et al.*, 2004), en la presente investigación se desarrolló un proceso de organogénesis directa.

La elección de las plantas que se aclimataron se basaron en las características que presentaron *in vitro*. Investigadores como Olivera *et al.*, (2000), mencionan que un desarrollo pobre del sistema radical hace que el crecimiento *in vivo* se haga muy difícil, es por esto que se aclimataron las plántulas obtenidas de 5 medios de cultivo con mejores resultados.

Existieron diferencias en la aclimatación de plantas, dependiendo del medio de cultivo en el que se realizara el enraizamiento, así la Tabla N° 05 muestra que el mayor porcentaje de aclimatación fue en las plántulas procedentes del medio ME7 con un 87.5% de sobrevivencia, este resultado se debió a la calidad de las raíces obtenidas con jugo de tomate y AIB, auxina con lo que Castillo y Jordan (1997), lograron una aclimatación satisfactoria.

Se observó una relación directa moderada entre la longitud, el número de las raíces con el porcentaje de plantas aclimatadas, sin embargo las plántulas aclimatadas procedentes del medio ME2 tuvieron regular respuesta (37.5%) pese a tener un buen número de raíces, esto puede deberse principalmente a lo mencionado por Thomas (1998) sobre la dificultad de la aclimatación de las plantas *in vitro* porque poseen tallos y hojas suculentas, debido a la alta humedad dentro del vaso de cultivo y el agua libre en el medio. Las plantas aclimatadas con menor porcentaje de sobrevivencia fueron las del medio ME (Tabla Nº 05), esta deficiencia en la aclimatación se puede atribuir a que las raíces que se formaron *in vitro* eran delgadas, frágiles y no estaban integradas al tejido vascular de la planta (Olivera *et al.*, 2000).

Para la evaluación de la epata de enraizamiento, el número de raíces obtenidas en los medios de cultivo fueron diferentes entre cada tratamiento, de manera similar en la longitud encontrando diferencias significativas y subconjuntos homogéneos en los tratamientos (ANVA, Prueba de Duncan, $p > 0.05$).

Por tanto, la micropropagación de *Minthostachys mollis* involucra una serie de condiciones y parámetros que se evaluaron a nivel del crecimiento de los explantes, por lo que los protocolos desarrollados en la investigación son válidos para la micropropagación en esta especie.

VI. CONCLUSIONES

1. Se estandarizó el proceso de desinfección, donde la inmersión en NaClO (1.5%) durante 20 minutos permitió obtener un 60% de viabilidad, los explantes fueron afectados en gran parte por la oxidación que alcanzó hasta un 84.6% a mayor tiempo y concentración de lejía.
2. El establecimiento adecuado del cultivo *in vitro* de *Minthostachys mollis*, se logró en el medio MS con antioxidantes, que alcanzó un 78% de explantes sin oxidación con ácido cítrico (100mg/l), ampliándose a 90%, en condiciones de oscuridad.
3. Se evaluó el crecimiento *in vitro* de *Minthostachys mollis*, donde la germinación de las semillas se realizó en placas con algodón humedecido, la propagación óptima se logró en medios con suplementos orgánicos, como el caso del tratamiento con 1.0 mg/l de BAP y agua de coco (AC) o jugo de tomate, que estimulan de manera positiva el crecimiento vegetativo.

4. El enraizamiento se logró en el tratamiento con 1.0 mg/l de AIB suplementado con AC (85% de formación radicular) y la longitud media de las raíces fue mayor con AIB + Jugo de tomate; las plántulas de *Minthostachys mollis* "muña" se aclimataron satisfactoriamente, logrando un 87.5% sobrevivencia de las plántulas enraizadas con AIB y jugo de tomate.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar un estudio comparativo del efecto de las concentraciones de las auxinas y de citocinas en el cultivo *in vitro* de *Minthostachys mollis* "muña" y evidenciar las diferencias referidas en esta investigación.
2. Realizar investigaciones en embriogénesis para conocer la factibilidad de cultivos en suspensión.
3. Optimizar en la micropropagación y las técnicas de mejoramiento en la especie *Minthostachys mollis* "muña", por su valor comercial e importancia económica, para establecer un sistema de eonegocio regional con enfoque en las especies medicinales endémicas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Alarcón, P.** 2009. El éxito de la muña. Características de la muña. (Artículo Web). Disponible en: <http://biocomercio-lamuna.blogspot.com> Accesado en noviembre 2010.
2. **Alonso, M.** 2002. Biotecnología aplicada a mejora de *Pelargonium*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/tesis/bio/ucm-t26001.pdf> marzo 2011.
3. **Arias, A.** 2002. Biotecnología y metabolitos secundarios en *Lepidium peruvianum* Chacón. "maca". Tesis de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
4. **Barcelo, C.** 2001. Fisiología Vegetal. Editorial Anaya S.A.C. Madrid – España.
5. **Bima, P.; Vargas, L. and Ojeda, M.** 2006. *In vitro* propagation of peperina *Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb. Molecular Medicinal Chemistry. Vol.11: 3-5. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
6. **Biocomercio.** 2009. Estadísticas. Exportaciones de la "muña" según tipo de presentación. Disponible en: <http://biocomercio-lamuna.blogspot.com/2009/05/estadisticas.html> Accesado en agosto 2009.
7. **Bravo, M.; Hernández, N.; Tereschuk, M.; Romero, C. y Abdala L.** 2003. *Minthostachys mollis* Griseb y *Lepechinia meyenii* (Walp.) Actividad antimicrobiana de sus extractos. Determinaciones preliminares de sus flavonoides mayoritarios. Revista del Centro de Investigaciones de Zonas Áridas y Semiáridas CIZAS. Vol. 5. Nov. 2004. Universidad Nacional de Catamarca. Argentina.
8. **Bustos, A y Bonino, S.** 2005. Cosecha silvestre de "peperina" *Minthostachys mollis*, en Córdoba, Argentina: implicancias socioeconómicas. Revista Iberoamericana de Economía Ecológica Vol. 2: 45-55.
9. **Cano, C.** 2007. Actividad antimicótica *in vitro* y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* "muña". Tesis de Maestría en Recursos Vegetales y Terapéuticos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

10. **Castillo, A.** 2004. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria - Las Brujas. Uruguay. Disponible en: http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf accesado en agosto 2010.
11. **Castillo, J. and Jordan, M.** 1997. *In vitro* regeneration of *Minthostachys andina* (brett) Epling - a Bolivian native species with aromatic and medicinal properties. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Edit. Springer Netherlands. Vol. 49, N°2. Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/mx671vx5x5777x3x/> Accesado en noviembre 2009.
12. **Chebel, A.; Koroch, R.; Juliani R. and Trippi, S.** 1998. Micropropagation of *Minthostachys mollis* (H.B.K.) Griseb. and essential oil composition of clonally propagated plants. *In vitro* cellular & Developmental Biology. Plant. Vol. 34, N°3, pp. 249-251 Edit. Cambridge University Press. Disponible en: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=2395355> Accesado en setiembre 2009.
13. **CIAT.**1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. (Roca, W. y Mroginski, L.; Eds.). Cali - Colombia.
14. **Collazos, C., et al.** 1996. Tablas Peruanas de Composición de Alimentos. 7ma Edición. Instituto Nacional de Salud. Perú.
15. **Debergh, P. and Read, P.** 1991. Micropropagation. En: Micropropagation: Technology and Application. Kluwer Academic Publishers Group, The Netherlands. pp.1-13. Canada.
16. **Díaz, K.** 2005. Determinación de la actividad antibacteriana "*in vitro*" de *Minthostachys mollis* Griseb (muña) frente a bacterias orales de importancia estomatológica. Tesis de odontología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
17. **Dieter, H.** 1980. Fisiología Vegetal. Fundamentos Moleculares y Bioquímicos-fisiológicos del Metabolismo y el Desarrollo. Ediciones Omega. Barcelona España.
18. **Encamación, K.** 2009. Determinación de propiedades físico-químicas del aceite esencial de poleo (*Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb) en diferentes estados

- fenológicos y de tres lugares de la provincia de Loja mediante GC-MS Y GC-FID. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador.
19. **Erston, V.** 1967. Fisiología Vegetal. Editorial Hispano Americano. México. Pág. 240.
 20. **Evans, D.; Sharp, W.; Amirato, P. y Yamada, Y.** 1983. Handbook of Plant Cell Culture. Techniques and applications. New York: Mac Millan Publishing.
 21. **FIA,** 2008. Resultados y lecciones en plantas medicinales y aromáticas. Serie Experiencias de innovación para el emprendimiento agrario. Fundación para la Innovación Agraria. Ministerio de Agricultura. Chile. Disponible en: [http://beta1.lindap.cl/Docs/Cedoc/Publicaciones%20Virtuales/Libros%20virtuales%20\(FIA,%20INIA,%20BPA,%20FUCOA,%20Otros\)/Plantas%20Medicinales%20y%20Arom%3%A1ticas.pdf](http://beta1.lindap.cl/Docs/Cedoc/Publicaciones%20Virtuales/Libros%20virtuales%20(FIA,%20INIA,%20BPA,%20FUCOA,%20Otros)/Plantas%20Medicinales%20y%20Arom%3%A1ticas.pdf) Accesado en marzo 2011.
 22. **García L.** 1992. Cultivo de Tejidos Vegetales "in vitro". Editorial Acribia. España.
 23. **García Godos, P.** 2007. Manual de Prácticas de Cultivo de Tejidos Vegetales. Área académica de Biotecnología. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho-Perú.
 24. **Guerra, P.; Molina, I.; Yábar, E. y Gianoli, E.** 2006. Oviposition deterrence of shoots and essential oils of *Minthostachys spp.* (Lamiaceae) against the potato tuber moth. (Artículo científico web). Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco y Universidad de Concepción. Disponible en: <http://www2.udec.cl/~egianoli/07guepjappent.pdf> accesado en abril 2011.
 25. **Gúiza, D. y Rincón, L.** 2007. Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* combinado con inactivación térmica, sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus coreus*. Tesis de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.
 26. **Hartmann, H. y Kester, E.** 1995. Propagación de Plantas. Principios y Prácticas. Compañía Editorial Continental S.A. Cuarta edición. México D. F.
 27. **Herbotecnia.** 2010. "Tecnología en producción de plantas medicinales, aromáticas y tintóreas". Cultivo de peperina (*Minthostachys mollis*) y usos. Argentina. Disponible en: <http://www.herbotecnia.com.ar/aut-peperina.html> Accesado en setiembre de 2010.
 28. **Hurtado, D.** 1994. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas S.A. México.

29. **Hurtado, D. y Merino, M.** 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas, S. A. Impreso en México.
30. **Inkanatural.** 2011. Aceite de muña. Artículos. (Página web). Perú. Disponible en: <http://www.inkanatural.com/es/arti.asp?ref=aceite-muna> Accesado en febrero 2011.
31. **INTA.** 2004. Avances en la domesticación de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb. Una especie aromática de la Argentina. Boletín N° 9. Ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Córdoba - Argentina. Disponible en: http://www.inta.gov.ar/manfredi/info/boletines/extension/frutales/lf_bole99.pdf Accesado en octubre 2010.
32. **INTA.** 2007. Introducción al cultivo de especies aromáticas y medicinales en el marco de un manejo sustentable. Boletín N° 16. Ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Córdoba - Argentina. Disponible en: <http://www.inta.gov.ar/manfredi/info/boletines/extension/frutales/boletin-2007-lanfranconi-16-a-esta.pdf>
33. **Kolmans, E. y Vásquez, D.** 1999. Manual de Agricultura Ecológica. Una Introducción a los Principios Básicos y su Aplicación. Grupo de Agricultura Orgánica. Asociación Cubana de Técnicos Agrícolas y Forestales. 2da Ed. Disponible en: <http://agriculturasostenible.info/images/Manual%20AE.pdf>
34. **Krikorian, A.** 1991. Medios de Cultivo: Generalidades, Composición y Preparación. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. (Roca, W. y Mroginski, L.; Eds.). Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Cali, Colombia.
35. **Lucas, C.** 2002. Principio de Propagación de Plantas. Hormonas vegetales. (Artículo web). Chosica - Perú. Disponible en: <http://www.cannabiscafe.net/foros/showthread.php?t=14307> Accesado en setiembre 2010.
36. **Maquera, D.; Romero, S.; Tello, M.; Cotacallapa, D. y Reynaga, M.** 2007. Explotación de la muña *Minthostachys mollis* como cultivo comercial con diferentes densidades de siembra para la obtención de aceites esenciales. Informe de investigación. Universidad Nacional Hermilio Valdizán. Huánuco-Perú.
37. **Mamatas, K.** 1983. Informe preliminar de fin de misión. Plantas medicinales e insumos vegetales para la industria química. Proyecto Fopex. Lima.

38. **Mejía, R.** 1994. Propagación Comercial de 312 Especies de Plantas por Cultivo "in vitro". Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima.
39. **Morgan, W.** 1994. Cultivo de Tejido Vegetal. (Artículo web). Disponible en <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/CultivoTejidos.pdf>. Accesado en marzo 2009.
40. **Muñoz, F.** 1990. Plantas Aromáticas, Medicinales y Condimentos. Su estudio, Cultivo y Procesado. Edit. Mundiprensa. Madrid.
41. **Murphy, J.** 1999. Preoperative considerations with herbal medicines. American Organization of Resgisteres Nuerses Journal. Vol.69. 173-183.
42. **Olivera, V.; Gutiérrez, M.; Gutiérrez, J. y Andrade, M.** 2000. Cultivo *in vitro* de *Gerbera (Gerbera jamesonii H. Bolus)* y su aclimatación en invernadero. Bioagro. Vol. 12 (3), 75-80. Venezuela.
43. **Ojeda, M.; Carreras, J.; Coirini, R.; Palacio, L. y Carrizo, L.** 2000. Aprovechamiento Sustentable de la "peperina". Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Ed. Triunfar. Córdoba - Argentina.
44. **Palacios, E.** 2005. Economía y plantas medicinales. Artículos de interés. (Página web). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/publicaciones/consejo/boletin52/pdf/a04.pdf> Accesado en agosto 2009.
45. **Pelacho, A.; Martín, L.; Cueva, R.; Sanfelire, J.; Badía, J. y Alins, G.** 2002. Cultivo *in vitro* (Página web). Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrícola de Lleida. Disponible en: http://www.etsea2.udl.es/in_vitro/luz Accesado en agosto 2010.
46. **Pierik, R.** 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. 3ra Ed. Edit. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
47. **Pillai, SK. y Hildebrandt, AC.** 1968. *In vitro* differentiation of geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) plants from apical meristems. Phytón. Vol. 25(2): 81-87. Buenos Aires.
48. **Rivarola, M.** 2008. Muña: la menta de los andes. Generación, Una revista para la generación del cambio. Año 6, nº70: 136-140. Lima, Perú. Disponible en: <http://www.generacion.com/secciones/biodiversidad/pdfs/Generacion-Edicion-70-biodiversidad-52.pdf> Accesado en mayo 2009.

49. **Sanchez, M. y Salaverría, J.** 2004. Control de la oxidación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). Revista UDO Agrícola 4 (1): 21-26. Universidad de Oriente. Núcleo de Monagas. Venezuela.
50. **Scandaliaris, M.; Fuentes, E. y Lovey, R.** 2007. Dos especies de lamiáceas comercializadas en Córdoba (Argentina) bajo el nombre de "peperina". Cátedra de Botánica Taxonómica. Herbario ACOR. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
51. **Schmidt-Lebuhn, A.** 2009. Aceites esenciales en *Minthostachys*. (Página web). Disponible en <http://www.minthostachys.com/index2.html>
52. **Serrano, M. y Piñol, T.** 1991. *Biología Vegetal*. Editorial Síntesis S. A. Madrid.
53. **Soltero, R.; Ramírez, C. y Portillo, L.** 2004. *Manual de Prácticas de Biología Vegetal*. Departamento de Botánica y Zoología. Universidad de Guadalajara. México.
54. **Thomas, P.** 1998. Humid incubation period and plantlet age influence acclimatization and establishment of micropropagated grapes. *Scientific article In vitro cell.* 34:52-56.
55. **Thomas, P. and Schiefelbein, J.** 2001. Combined *in vitro* and *in vivo* propagation for rapid multiplication of grapevine cv. Arka Neelamani. HortScience.
56. **Ulloa, C.** 2006. Aromas y sabores andinos. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. Universidad Mayor de San Andrés. Bolivia. Disponible en: <http://www.mobot.org/mobot/research/curators/pdf/Aromas.pdf> Accesado en junio 2010.
57. **Villalobos, M. y Thorpe, A.** 1991. *Micropropagación: Conceptos, Metodología y Resultados*. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. (Roca, W. y Mroginski, L.; Eds.). Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Cali, Colombia.
58. **Villar, M. y Villavicencio, O.** 1992. Uso de Plantas Medicinales en el tratamiento del asma bronquial. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*. Vol. 5 Nº 4. Lima. Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/spmi/v05n4/trabajos%20originales4.htm> Accesado en octubre 2010.

ANEXOS

Anexo N° 01
COMPOSICIÓN DE LOS STOCKS EN LA PREPARACIÓN DEL MEDIO DE
CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG (1962)

STOCK A (Sales)	
REACTIVO	g/1000 ml H₂O
KNO ₃	19.0000
NH ₄ NO ₃	16.5000
CaCl ₂ .2H ₂ O	4.4000
KH ₂ PO ₄	1.7000
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.1690
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0614
H ₃ BO ₃	0.0620
KI	0.0083
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.0025
CoSO ₄ .6H ₂ O*	0.0025
CuSO ₄ .5H ₂ O*	0.0025
STOCK B (Magnesio)	
REACTIVO	g/100 ml H₂O
MgSO ₄ .7H ₂ O	3.7
STOCK C (Fierro)	
REACTIVO	g/100 ml H₂O
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.746
Na ₂ EDTA	0.556
STOCK D (Vitaminas)	
REACTIVO	mg/50 ml H₂O
Tiamina HCl	0.1
Piridoxina	0.5
Ácido nicotínico	0.5
Glicina	2.0

FUENTE: Evans, D., Sharp, W., Amirato, P., Yamada, Y. (1983).

Anexo N° 02
CANTIDAD DE STOKS Y PREPARACIÓN DE 1 LITRO
DE MEDIO MURASHIGE Y SKOOG (1962)

Compuesto	Volumen
Stock A	100 ml
Stock B	10ml
Stock C	5ml
Stock D	1 ml
Pantotenato de calcio	2 ml
Sucrosa	20g
Myo-inositol	0.10g
Agar-agar	7.0g

Nota: Enrasar a 1 litro con H₂O destilada y llevar a pH 5.6.
Añadir al medio el gelificante y someter a calentamiento y agitación.

FUENTE: Evans, D., Sharp, W., Amirato, P., Yamada, Y. (1983).

Anexo Nº 03
ANALISIS ESTADÍSTICO DE LA DESINFECCIÓN

Dependent Variable: VIABILIDAD

Method: ML - Binary Logit

Date: 09/20/11 Time: 07:26

Sample: 1 316

Included observations: 316

Convergence achieved after 3 iterations

Covariance matrix computed using second derivatives

Variable	Coefficient	Std. Error	z-Statistic	Prob.
TIEMPO	0.003574	0.010489	0.340712	0.7333
NaClO	-1.435964	0.232141	-6.185736	0.0000
C	2.660839	0.529148	5.028537	0.0000
Mean dependent var	0.560127	S.D.dependentvar		0.497159
S.E. of regression	0.463418	Akaike info criterion		1.252308
Sum squared resid	67.21860	Schwarz criterion		1.287963
Log likelihood	-194.8646	Hannan-Quinn criter.		1.266552
Restr. log likelihood	-216.7442	Avg. log likelihood		-0.616660
LR statistic (2 df)	43.75911	McFadden R-squared		0.100946
Probability(LR stat)	3.15E-10			
Obs with Dep=0	139	Total obs		316
Obs with Dep=1	177			

Tabla Nº 06: Efecto de los tratamientos de desinfección en los explantes de “muña” después de la introducción *in vitro*

NaClO (%)	Tiempo								
	15 minutos			30 minutos			45 minutos		
	C	N	Total	C	N	Total	C	N	Total
1.0	33%	17%	30	27%	20%	30	19%	24%	21
1.5	23%	17%	30	17%	43%	30	5%	68%	22
2.0	20%	33%	30	17%	70%	30	5%	90%	20
2.5	17%	67%	30	7%	90%	30	0%	100%	13

Leyenda:

NaClO: Hipoclorito de sodio

C: contaminación

N: necrosis

Anexo N° 04
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO PARA LA ETAPA DE PROPAGACIÓN

**Tabla N° 07: Prueba de normalidad para la variable número de brotes de los
 explantes en los diferentes tratamientos**

Tratamiento		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Nro de	MC1	,345	33	,000	,812	33	,000
Brotes	MC2	,244	28	,000	,842	28	,001
	MC3	,169	32	,021	,864	32	,001
	MC4	,334	29	,000	,696	29	,000
	MC5	,205	30	,002	,863	30	,001
	MC6	,275	29	,000	,878	29	,003
	MC7	,164	30	,039	,943	30	,112
	MC8	,152	30	,074	,929	30	,045
	Control	,333	25	,000	,721	25	,000

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Tabla Nº 08: Análisis de Varianza para la variable altura de explantes en los diferentes tratamientos de propagación

Descriptivos

Altura

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
MC1	33	3,1636	1,41837	,24691	2,6607	3,6666	,20	5,70
MC2	28	3,0196	1,90877	,36072	2,2795	3,7598	,10	7,20
MC3	32	3,6531	2,17122	,38382	2,8703	4,4359	,50	7,70
MC4	29	2,3724	1,13952	,21160	1,9390	2,8059	,70	4,80
MC5	30	2,8067	1,10794	,20228	2,3930	3,2204	1,20	5,90
MC6	29	4,0586	1,32194	,24548	3,5558	4,5615	1,50	6,10
MC7	30	4,6500	1,33617	,24395	4,1511	5,1489	2,00	7,40
MC8	30	2,2467	,80590	,14714	1,9457	2,5476	,70	4,20
Control	25	,4240	,17861	,03572	,3503	,4977	,10	,80
Total	266	2,9852	1,76472	,10820	2,7721	3,1982	,10	7,70

ANVA

Altura

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	324,124	8	40,515	20,777	,000
Intra-grupos	501,150	257	1,950		
Total	825,274	265			

Tabla N° 09: Prueba de Duncan la variable altura de explantes

Duncan^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Control	25	,4240					
MC8	30		2,2467				
MC4	29		2,3724				
MC5	30		2,8067	2,8067			
MC2	28		3,0196	3,0196	3,0196		
MC1	33			3,1636	3,1636		
MC3	32				3,6531	3,6531	
MC6	29					4,0586	4,0586
MC7	30						4,6500
Sig.		1,000	,052	,360	,102	,267	,106

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 29,389.

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 N° 10: Análisis de Varianza para la variable número de hojas en los diferentes tratamientos de propagación

Descriptivos

Nro. hojas

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
MC1	33	18,79	10,954	1,907	14,90	22,67	0	46
MC2	28	15,18	7,124	1,346	12,42	17,94	2	32
MC3	32	23,25	11,265	1,991	19,19	27,31	6	46
MC4	29	16,76	6,556	1,217	14,27	19,25	6	28
MC5	30	20,80	7,766	1,418	17,90	23,70	10	40
MC6	29	18,07	8,237	1,530	14,94	21,20	2	34
MC7	30	20,27	7,750	1,415	17,37	23,16	6	44
MC8	30	24,87	9,153	1,671	21,45	28,28	8	48
Control	25	2,60	2,179	,436	1,70	3,50	0	8
Total	266	18,20	10,126	,621	16,98	19,43	0	48

ANVA

Nro. hojas

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	8892,110	8	1111,514	15,626	,000
Intra-grupos	18280,928	257	71,132		
Total	27173,038	265			

Tabla Nº 11: Prueba de Duncan para la variable número de hojas

Duncan^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
Control	25	2,60				
MC2	28		15,18			
MC4	29		16,76	16,76		
MC6	29		18,07	18,07		
MC1	33		18,79	18,79	18,79	
MC7	30			20,27	20,27	20,27
MC5	30			20,80	20,80	20,80
MC3	32				23,25	23,25
MC8	30					24,87
Sig.		1,000	,137	,104	,064	,056

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 29.389.

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.

Anexo N° 05
ANALISIS ESTADÍSTICO DE LA ETAPA DE ENRAIZAMIENTO

Tabla N° 12: Evaluación del crecimiento de los explantes de *Minthostachys mollis* "muña" en los diferentes medios de enraizamiento.

Tratamientos	Valores promedio				
	Nro de Brotes	Altura (cm)	Nro de hojas	Nro de raíces	Longitud raíz (cm)
ME1	1	0.6	3.1	0.7	0.3
ME2	2.3	6.2	19.4	6.6	3.1
ME3	1.8	5.1	29.8	5	2.7
ME4	3.7	3.2	23.5	2	1.3
ME5	4.2	3.6	41.3	0.9	0.5
ME6	3.1	5.2	31.5	7.6	3.5
ME7	3.4	3.7	26.9	6.1	3.8
ME	1.8	1.5	9.5	3.5	2.1

Tabla N° 13: Análisis de Varianza para la variable número de raíces en los diferentes tratamientos de enraizamiento

Descriptivos

Nro raíces

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
ME2	29	6,59	4,379	,813	4,92	8,25	0	15
ME3	28	5,00	2,893	,547	3,88	6,12	0	11
ME4	27	1,96	1,512	,291	1,36	2,55	0	6
ME5	21	,90	,659	,144	,60	1,20	0	2
ME6	20	7,60	4,198	,939	5,64	9,56	0	16
ME7	22	6,09	1,950	,416	5,23	6,96	3	10
ME	30	3,47	2,662	,486	2,47	4,46	0	9
Total	177	4,48	3,624	,272	3,94	5,02	0	16

ANVA

Nro raíces

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	860,012	6	143,335	16,790	,000
Intra-grupos	1451,266	170	8,537		
Total	2311,278	176			

Tabla N° 14: Prueba de Duncan para la variable número de raíces

Duncan^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa= 0,05				
		1	2	3	4	5
ME5	21	,90				
ME4	27	1,96	1,96			
ME	30		3,47	3,47		
ME3	28			5,00	5,00	
ME7	22				6,09	6,09
ME2	29				6,59	6,59
ME6	20					7,60
Sig.		,206	,071	,067	,073	,088

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 24,679.

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 N° 15: Análisis de Varianza para la variable longitud de raíces en los diferentes tratamientos de enraizamiento

Descriptivos

Longitud

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
ME2	29	4,0310	4,11757	,76461	2,4648	5,5973	,90	23,00
ME3	27	4,0556	5,80407	1,11699	1,7595	6,3516	,20	31,00
ME4	22	1,3045	,79371	,16922	,9526	1,6565	,20	2,90
ME5	15	,4933	,29147	,07526	,3319	,6547	,10	1,10
ME6	19	3,7053	1,43002	,32807	3,0160	4,3945	1,80	7,30
ME7	22	3,7864	1,70749	,36404	3,0293	4,5434	1,20	7,60
ME	26	2,1500	,90565	,17761	1,7842	2,5158	,80	4,50
Total	160	2,9506	3,31131	,26178	2,4336	3,4676	,10	31,00

ANVA

Longitud

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	259,852	6	43,309	4,466	,000
Intra-grupos	1483,548	153	9,696		
Total	1743,400	159			

Tabla N° 16: Prueba de Duncan para la variable longitud de raíces

Duncan^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
ME5	15	,4933	
ME4	22	1,3045	
ME	26	2,1500	2,1500
ME6	19		3,7053
ME7	22		3,7864
ME2	29		4,0310
ME3	27		4,0556
Sig.		,098	,072

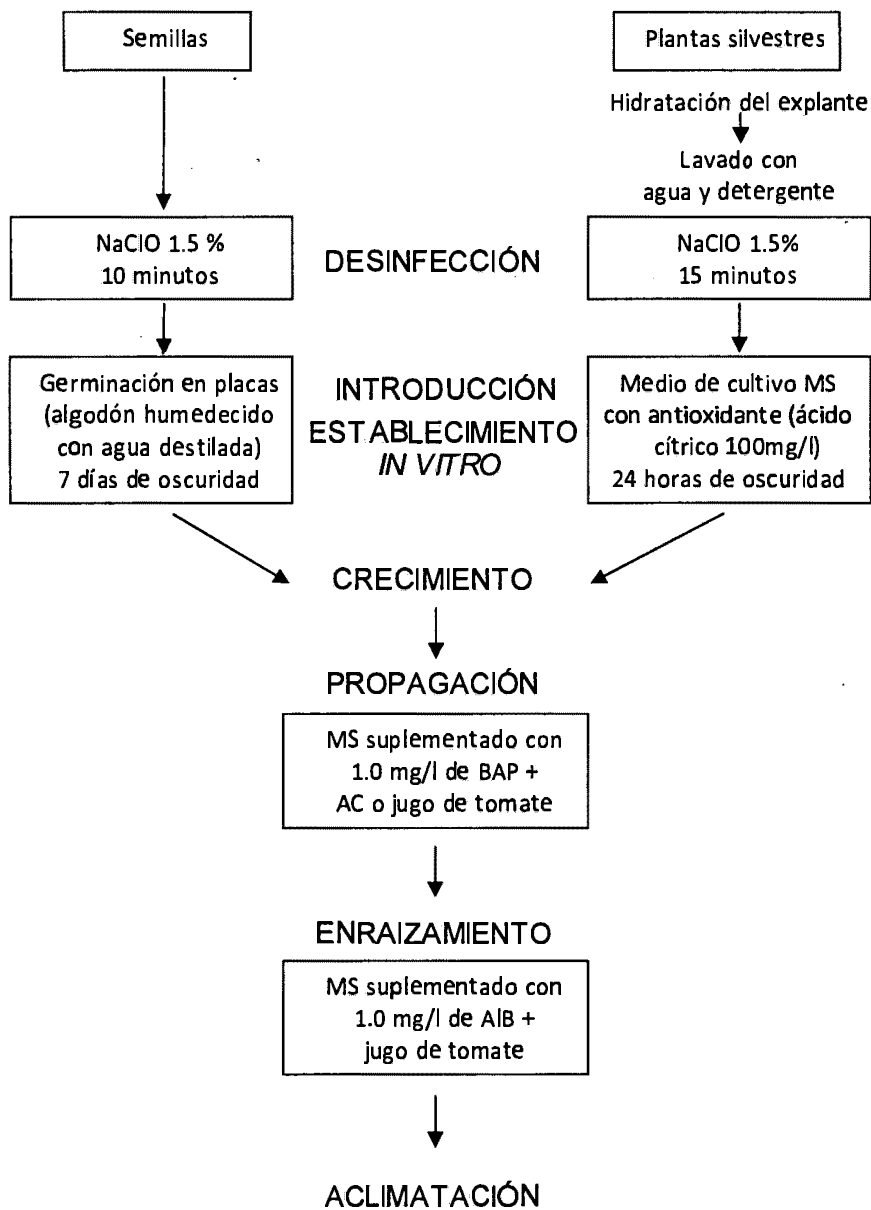
Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica= 21.862.

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.

Anexo Nº 06
METODOLOGÍA DE LA MICROPROPAGACIÓN
DE *Minthostachys mollis* "muña"

MATERIAL DE SIEMBRA



Anexo N° 07
FOTOGRAFÍAS



Foto N° 01: Plantas silvestres de *Minthostachys mollis* "muña"



Foto N° 02: Selección de semillas de "muña"

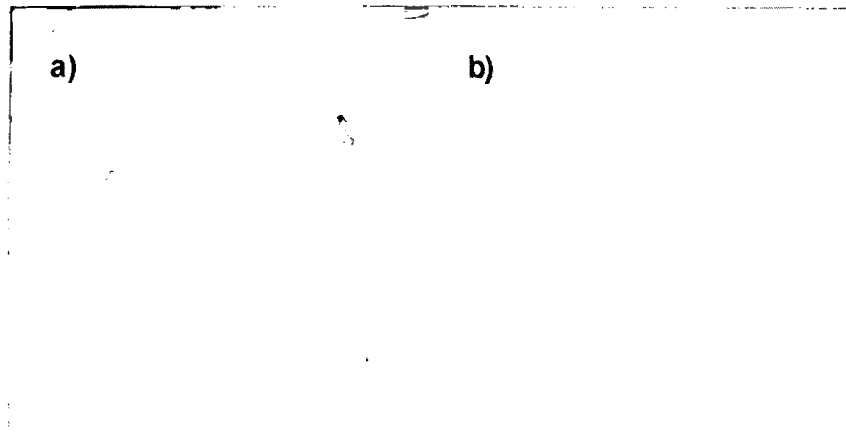


Foto N°03: Germinación de semillas. a) algodón humedecido con agua destilada, b) medio de cultivo



Foto N°04: Establecimiento de los explantes de "muña"



Foto N°05: Crecimiento *in vitro* de los explantes de "muña"

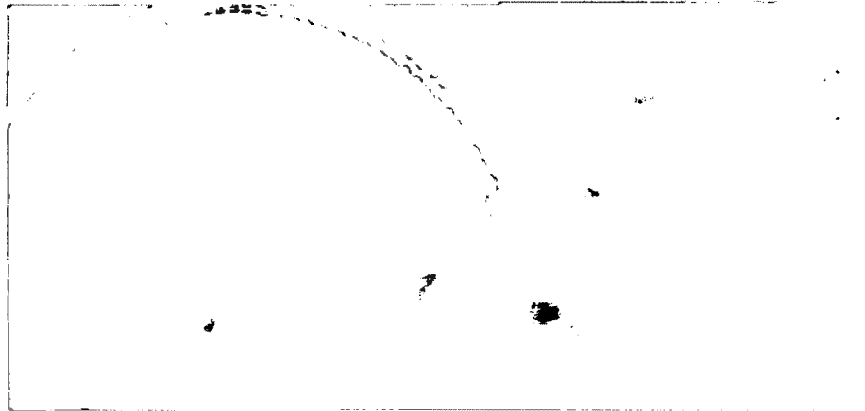


Foto N°06: Enraizamiento de *Minthostachys mollis* "muña"

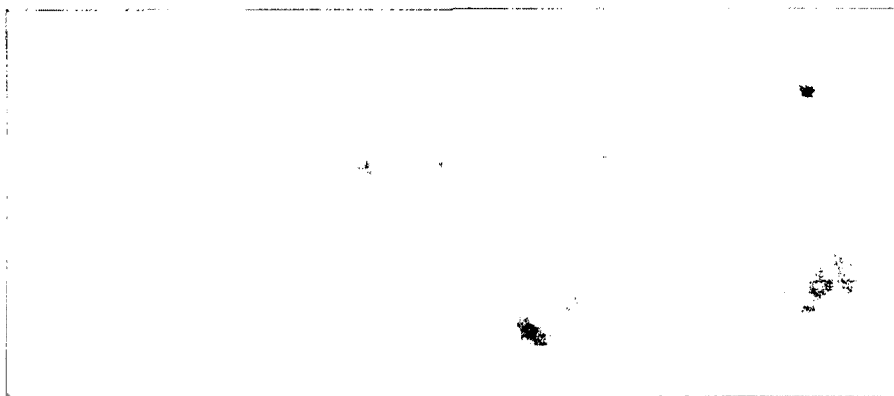


Foto N°07: Formación de callos en los explantes de "muña"



**Foto N°08: Banco de germoplasma, Especialidad de Biotecnología.
Laboratorios de la Facultad de Ciencias Biológicas**



Foto N°08: Aclimatación de las plántulas de "muña"

MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO: Micropropagación de <i>Minthostachys mollis</i> "muña". Ayacucho 2010.		AUTORA: Bach. Tanna Liz Alfaro Astorima		
PROBLEMA	OBJETIVO	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	
		VARIABLES	METODOLOGÍA	
<p>¿Se logrará micropropagar <i>Minthostachys mollis</i> "muña"?</p>	<p>Objetivo General: Realizar la micropropagación de <i>Minthostachys mollis</i>.</p> <p>Específicos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Estandarizar el proceso de desinfección para introducir <i>in vitro</i> los explantes de <i>Minthostachys mollis</i>. 2. Determinar el medio de cultivo adecuado para la introducción y la adaptación <i>in vitro</i> de <i>Minthostachys mollis</i>. 3. Evaluar el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Minthostachys mollis</i> "muña". 4. Lograr el enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Minthostachys mollis</i> "muña". 	<p>La "muña" es una planta silvestre, que crece en forma natural en lugares escarpados y en los bordes de los campos de cultivo de las zonas alto andinas del país. El aspecto más importante radica en su calidad de planta medicinal, provista de principios activos con una actividad farmacológica, aprovechada desde el punto de vista terapéutico. Los estudios realizados sobre la especie <i>Minthostachys mollis</i> "muña" son escasos o son de tipo descriptivo, en general relativos a la fitoquímica, actividad antimicrobiana o a su domesticación productiva (Ojeda <i>et al.</i>, 2000). Castillo (2004), la micropropagación es un sistema de multiplicación en un medio artificial y aséptico a partir de explantes de la planta madre, se obtiene descendencia genéticamente uniforme (clones). En algunas especies, esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación; Hartmann y Kester (1995) mencionan:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo. - Reducción del tiempo de multiplicación. - Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempo económicamente costeados. - Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga. - Facilidad para transportar el material <i>in vitro</i> de un país a otro, con menos restricciones aduanera. <p>Dentro del proceso de micropropagación diferenciamos varias fases, cuya secuencia abarca el ciclo completo del cultivo de plantas <i>in vitro</i> (Castillo, 2004).</p>	<p>Variable independiente: Parámetros y condiciones <i>in vitro</i>.</p> <p>Variable dependiente: Micropropagación de <i>Minthostachys mollis</i>.</p>	<p>Población: Plantas de muña de la región de Ayacucho, provincia de Huamanga, distrito de Quinua.</p> <p>Muestra: Esquejes de 10 plantas de muña, obtenidas en el mes de octubre del 2009.</p> <p>Diseño Metodológico: La investigación científica se plantea usando en el método experimental. El proceso comprende las siguientes etapas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Selección de la planta madre. • Ensayo de desinfección. • Introducción y adaptación <i>in vitro</i>. • Propagación. • Enraizamiento. • Aclimatación. <p>Diseño Estadístico: El diseño es factorial, el procesamiento de los datos obtenidos y el posterior análisis se efectuará mediante la aplicación estadística del análisis de varianza (ANVA) y la prueba de Duncan.</p>

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

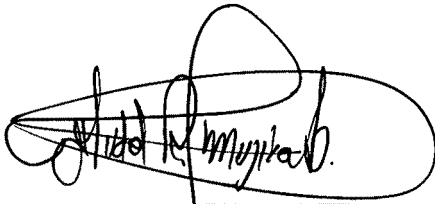
R.D. N° 186-2009-FCB-D

Bach. Tannia Liz Alfaro Astorima

En la ciudad de Ayacucho a los once días del mes de noviembre del año dos mil once, siendo las cuatro con quince de la tarde, reunidos en el Auditorium de la Facultad de Ciencias Biológicas con la finalidad de recepcionar la sustentación y defensa del trabajo de tesis titulado: Micropropagación de *Minthostachys mollis* "muña". Ayacucho 2009, presentada por la Bach. Tannia Liz Alfaro Astorima, acto académico que estuvo presidido por el Decano (e) Dr. Víctor Alegría Valeriano y con la participación de los miembros del jurado el Mg. Fidel Mujica Lengua, Mg. Marta Romero Viacava, Mg. Paula García Godos Alcázar y miembro-secretario el Mg. Gilmar Peña Rojas. El Decano (e) dió inicio al acto de sustentación previa verificación de los documentos pertinentes del acto académico de sustentación, luego del cual invitó a la sustentante a exponer su trabajo de investigación previo conocimiento de las normativas del acto de acuerdo al reglamento vigente de la UNSCH. La sustentante dió inicio a la sustentación de su trabajo de investigación haciendo uso de medio audiovisuales, haciendo uso del tiempo establecido, finalizada la exposición el Decano aperturó la segunda etapa, indicando a los miembros del jurado a fin de que puedan realizar las preguntas, correcciones y aclaraciones que consideren pertinentes. Culminada esta etapa el Decano (e) invitó a la 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.A PREGUNTAS	PROMEDIO
Mg. Fidel Mujica Lengua	17	17	17
Mg. Marta Romero Viacava	17	15	16
Mg. Paula García Godos Alcázar	19	18	19
Mg. Gilmar Peña Rojas	16	15	16
		PROMEDIO:	17

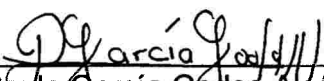
De la evaluación efectuada, la sustentante obtuvo la calificación promedio de DIECISIETE (17), de lo cual dan fe los miembros del Jurado Calificador estampando su firma al pie del presente, culminado el acto de sustentación de tesis siendo las seis con treinta minutos.



Mg. Fidel Mujica Lengua
Jurado



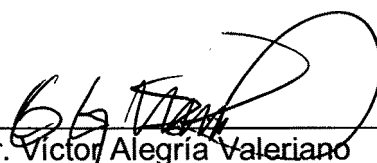
Mg. María Romero Viacava
Jurado



Mg. Paula García Godos Alcázar
Asesora



Mg. Gilmar Peña Rojas
Jurado-secretario (e)



Dr. Víctor Alegría Valeriano
Presidente