



***DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE
PROPAGACIÓN IN VITRO PARA
Plukenetia volubilis L. “SACHA INCHI” A
PARTIR DE EXPLANTES NODALES***

ANA MARÍA HENAO RAMÍREZ



***DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN IN VITRO PARA
Plukenetia volubilis L. “SACHA INCHI” MEDIANTE EXPLANTES NODALES***

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGA

ANA MARÍA HENAO RAMÍREZ

ASESORA

LUCIA ATEHORTÚA GARCÉS

CO-ASESORA

ESTHER JULIA NARANJO

***UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
MEDELLÍN
2012***

Dedicatoria

A mi amado e inolvidable papá, gracias por guiarme y protegerme, estés donde estés.

Tu presencia cada día crece más en mi alma.

A ti, insuperable, preciosa, bella y amorosa mamá, por darme tu cariño, paciencia, apoyo, consejos y, por sobretodo, valor para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por ser siempre un apoyo incondicional y sincero, gracias a los cuales logre alcanzar la meta propuesta. A mis asesores la Dra. Lucía Atehortúa y Esther Julia Naranjo, por su tenacidad, experiencia, perseverancia y optimismo hacia mi trabajo.

A la empresa Colombiana de Biocombustibles S.A. y especialmente a Carlos Andrés Palacio Lopera, Director Departamento Técnico y Paula Andrea Díaz, Directora del Departamento de Investigación por su apoyo con el suministro del material vegetal y al CODI de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Antioquia por su apoyo.

Agradezco los consejos, cariño, afecto y la ayuda del equipo del Laboratorio de Cultivo. Además, a los compañeros de Biología que de alguna u otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo y finalmente, a todos las personas que durante este tiempo han hecho parte de mi vida y han contribuido a mi crecimiento personal y profesional.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABLAS	12
1 INTRODUCCIÓN	14
2 JUSTIFICACIÓN	17
3 MARCO TEORICO	19
3.1 Descripción botánica.....	19
3.2 Distribución geográfica.....	20
3.3 Usos, propiedades y aplicaciones	21
3.4 Propagación vegetativa de plantas	24
3.4.1 El cultivo de tejidos en la propagación de plantas.....	25
3.4.2 Organogénesis	26
3.4.3 Factores que afectan la regeneración.....	27
3.4.4 Etapas de la micropropagación	28
3.4.5 Ventajas de la propagación in vitro	30
4 OBJETIVOS.....	31
4.1 Objetivo general	31
4.2 Objetivos específicos	31
5 MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1 Localización del proyecto	32
5.2 Material vegetal.....	32
5.3 Desinfección de semillas colectadas en campo.....	34
5.4 Germinación in vitro de semillas	35
5.5 Crecimiento y desarrollo in vitro de las plántulas	35

5.6	Evaluación del efecto de diferentes factores sobre la inducción de organogénesis de yemas axilares en segmentos nodales	37
5.6.1	Evaluación de diferentes de medios de cultivos reportados en la literatura	37
5.6.2	Evaluación de diferentes concentraciones y tipos de citoquininas .	38
5.6.3	Evaluación de diferentes concentraciones de los nutrientes Ca y Mg en medio basal de Murashige y Skoog	39
5.6.4	Evaluación de diferentes medios de cultivo suplementados con agua de coco y otros compuestos.	41
5.6.5	Evaluación de diferentes medios de cultivo suplementados con reguladores de crecimiento (2-ip y KIN) y agua de coco.....	42
5.7	Análisis estadístico	43
6	RESULTADOS.....	44
6.1	Efecto de diferentes tratamientos de desinfección sobre el porcentaje de semillas establecidas.....	44
6.2	Efecto del medio de cultivo, presencia de testa y temperatura sobre la germinación de semillas (%)	44
6.3	Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento y desarrollo <i>in vitro</i> de plántulas.....	47
6.4	Efecto de diferentes factores sobre la inducción de morfogénesis en yemas axilares de segmentos nodales.....	47
6.4.1	Efecto de diferentes medios de cultivos reportados en la literatura sobre la diferenciación de yemas axilares (%) en segmentos nodales	48
6.4.2	Efecto de diferentes concentraciones de citoquininas sobre la formación de tejido calloso (cm ²) y la diferenciación de yemas axilares (%)	50
6.4.3	Efecto de diferentes modificaciones en la concentración de los nutrientes Ca y Mg en medio basal de Murashige y Skoog sobre la diferenciación de yemas (%) y sobrevivencia de explantes (%).....	53

6.4.4	Efecto de diferentes medios de cultivo suplementados con agua de coco y otros compuestos sobre la diferenciación de yemas axilares (%) en segmentos nodales	54
6.4.5	Efecto de diferentes medios de cultivo suplementados con reguladores de crecimiento (2-ip y KIN) y agua de coco sobre formación de hojas en segmentos nodales	56
7	DISCUSIÓN	59
8	CONCLUSIONES.....	69
9	BIBLIOGRAFÍA.....	70
10	ANEXOS	78
10.1	Análisis estadísticos.....	78
10.1.1	Anexo 1.....	78
10.1.2	Anexo 2.....	78
10.1.3	Anexo 3.....	79
10.1.4	Anexo 4.....	80
10.1.5	Anexo 5.....	81
10.1.6	Anexo 6.....	82
10.1.7	Anexo 7.....	82
10.1.8	Anexo 8.....	83
10.1.9	Anexo 9.....	84

RESUMEN

Plukenetia volubilis conocida como “Sacha Inchi”, es una planta Amazónica que constituye una fuente rica de ácidos grasos poliinsaturados tipo omega 3, omega 6, omega 9 y aminoácidos, compuestos óptimos para complementar la dieta humana. Los ácidos grasos de la semilla de *P. volubilis*, reúnen varias propiedades químicas que le confieren posibilidades de uso muy diversas, que van desde su importancia como fuente energética para la alimentación humana, hasta su utilización en campos como la industria oleoquímica, cosmética y los biocombustibles. Lo que permite sugerir a *P. volubilis* como una especie oleaginosa promisorio para el desarrollo agroindustrial de nuestro país.

El objetivo del presente trabajo fue establecer un protocolo de micropropagación para *P. volubilis*. La propagación se realizó mediante la diferenciación de yemas axilares de segmentos nodales obtenidos de semillas germinadas *in vitro*. Las semillas colectadas en campo fueron desinfectadas y cultivadas *in vitro* para su germinación, la cual se vio favorecida por condiciones como alta concentraciones de sales (MS completo), ausencia de testa y temperatura alta (28°C). Las plántulas obtenidas crecieron y se desarrollaron exitosamente en medio MS. Para inducir la morfogénesis de las yemas axilares se evaluaron factores como: diferentes concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento; modificaciones en las concentraciones de los macronutrientes (calcio y magnesio) y aditivos como el agua de coco acompañado de reguladores de crecimiento. Los mejores resultados fueron obtenidos en los medios de cultivo suplementados con altas concentraciones de calcio (453ppm) y los reguladores de crecimiento KIN (0,4ppm) y 2-ip (0,5ppm) acompañados con agua del

coco (10%). Esta investigación constituye el primer reporte en el establecimiento de un protocolo efectivo para la propagación *in vitro* de *P. volubilis*.

Palabras clave: *Plukenetia volubilis*, ácidos grasos poliinsaturados, yemas axilares, morfogénesis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fructificaciones de “Sacha inchi” *Plukenetia volubilis*. Fruto maduro con coloración café e inmaduro color verde..... 20
- Figura 2.** Fructificaciones de “Sacha inchi” *Plukenetia volubilis*. (a) Fruto inmaduro. (b) Fruto maduro. (c) Loculos. (d) Semillas. 33
- Figura 3.** (a) Semillas sin testa. (b) Aparición de la radícula. (c-d) Plántulas con 15 días y dos meses de cultivo..... 36
- Figura 4.** Efecto del (a) medio de cultivo, (b) presencia de testa y (c) temperatura sobre la germinación de semillas ($p < 0,05$) mediante la comparación de rangos múltiples de Fisher LSD..... 45
- Figura 5.** Análisis de interacciones. (a) Entre medio de cultivo*presencia de testa y (b) Presencia de testa*temperatura sobre la germinación de semillas. 46
- Figura 6.** Efecto del medio de cultivo sobre el número de hojas formadas por plántula después de 2 meses de cultivo ($p < 0,05$) mediante la comparación de rangos múltiples de Fisher LSD..... 47
- Figura 7.** Diferentes repuestas de los explantes en los medios de cultivos evaluados. (a) Formación de tejidos con forma irregular en medio suplementado con 1.0 ppm BAP y 1.0 ppm Kin. (b-c) Callo de aspecto nodular y forma irregular de los tejidos jóvenes en medio con 0.11 ppm TDZ. (d) Diferenciación de yemas axilares y producción de callo en la base del explante en medio con 3.0 ppm BAP. (e) Malformaciones en el borde de las hojas jóvenes en medio 1.0 ppm BAP. (f) sobrevivencia de los explantes después de 30 días de cultivo en medio con 1, 27 ppm BAP + 0.27 ppm Kin + 0,51 ppm 2-iP. 49
- Figura 8.** Efecto de diferentes concentraciones y diferentes tipos de citoquininas sobre la formación de tejido calloso (cm^2) en segmentos nodales..... 51

- Figura 9.** Efecto de diferentes concentraciones y diferentes tipos de citoquininas sobre la diferenciación de yemas axilares (%) en segmentos nodales..... 51
- Figura 10.** (a) Formación de callo en los explantes sembrado en el medio MS suplementado con BAP. (b) Yema axilar diferenciada en medio MS suplementado con Kin. (c) Yemas axilares diferenciadas en el medio MS suplementado con 2-iP. (d) Clorosis y dehiscencia de las hojas jóvenes en explantes después de 20 días de cultivo..... 52
- Figura 11.** (a-b) Diferenciación de yemas en medio MS modificado en la concentración de calcio (c) sobrevivencia de explantes en medio MS modificado con alta concentración de Mg. 54
- Figura 12.** Inducción del desarrollo axilar en segmentos nodales (a-b) Segmento nodal después de 15 días de cultivo en medio MS modificado y suplementado con 10% agua de coco + 0,5ppm 2-ip (M5). (c) En medio MS modificado y suplementado 10% agua de coco + 100ppm Adenina (M2). (d) En medio MS modificado y suplementado con 10% de agua de coco 50ppm Biotina (M3). 56
- Figura 13.** Inducción del desarrollo axilar en segmentos nodales (a-d) Segmento nodal después de 15 días de cultivo en medio MS modificado y suplementado con 10%coco + 0,5ppm 2-ip (M5). (e-h) En medio MS modificado y suplementado con 10%coco + 0,4 ppm KIN (M6). 58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización del aceite de las semillas de Sacha Inchi	22
Tabla 2. Composición de aminoácidos	24
Tabla 3. Matriz de tratamientos evaluados para la desinfección de semillas de <i>P. volubilis</i> provenientes de cultivos comerciales.	34
Tabla 4. Matriz de tratamientos evaluados para germinación de semillas de <i>P. volubilis</i>	35
Tabla 5. Matriz de los diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento evaluados, reportados en la literatura	38
Tabla 6. Matriz de medios de cultivos suplementados con Kin, BAP, 2-ip evaluados a 6 diferentes concentraciones para la inducción del desarrollo axilar	39
Tabla 7. Análisis de suelo de una parcelación comercial de Sacha inchi en Santafé de Antioquia, vereda Ahuyamal.	40
Tabla 8. Comparación de las concentraciones de macro y micronutrientes presente en una muestra de suelo y en medio basal MS.	40
Tabla 9. Comparación de las concentraciones de los nutrientes Ca y Mg entre el medio basal MS, y los diferentes medios de cultivo reportados en la literatura científica.	41
Tabla 10. Matriz de medios de cultivos suplementados con agua de coco al 10% y adenina/biotina evaluados para la inducción del desarrollo axilar.	42
Tabla 11. Matriz de medios de cultivos suplementados con los reguladores de crecimiento KIN y 2-ip y agua de coco al 10%	42
Tabla 12. Efecto de diferentes tratamientos de desinfección sobre el porcentaje de semillas establecidas de <i>P. volubilis</i> L. colectadas en campo.	44

Tabla 13. Efecto de diferentes medios de cultivos reportados en la literatura sobre la diferenciación de yemas axilares (%) en segmentos nodales.....	48
Tabla 14. Efecto de diferentes concentraciones y diferentes tipos de citoquininas sobre la formación de tejido calloso y diferenciaciones de yemas axilares en segmentos nodales	52
Tabla 15. Efecto de diferentes modificaciones en la concentración de nutrientes Ca, Mg sobre el la diferenciación de yemas axilares (%) y la sobrevivencia de explantes (%).....	53
Tabla 17. Efecto de diferentes medios de cultivo suplementados con agua de coco sobre la diferenciación de yemas axilares (%).	55
Tabla 18. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el número de hojas formadas por explante	57

1 INTRODUCCIÓN

Los aceites vegetales constituyen una alternativa para atender a las demandas energéticas, alimentarias y agroindustriales de países tropicales en desarrollo y países desarrollados (FAO, 2012). Según informes de la FAO, en los últimos decenios, 20 de cada 100 kilocalorías consumidas por las poblaciones de estos países, provienen de cultivos oleaginosos (FAO, 2012). Estos cultivos están entre los más dinámicos pero hasta el momento solo se han usado pocas especies como la palma, soja, girasol, algodón y colza (MADR, 2003). El manejo de los aceites vegetales en la nutrición humana ha adquirido especial relevancia, y los alimentos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados tipo omega son un tema actual de investigación

La semilla de “Sacha Inchi” *Plukenetia volubilis* constituye una fuente importante de ácidos grasos poliinsaturados, como los ácidos α -linolénico (ω -3) y linoléico (ω -6) (Follegatti-Romero, *et al.*, 2009), y de aminoácidos esenciales (Sathe, *et al.* 2002), que son óptimos para complementar la dieta. Sin embargo, el conocimiento sobre *P. volubilis*, una especie propia de nuestra biodiversidad (selva amazónica) (Comunicación personal Álvaro Cogollo) es limitado y por lo tanto son reducidas las posibilidades de explotación comercial.

Es importante resaltar la importancia de los cultivos de oleaginosas no convencionales como fuente energética para la alimentación. Los alimentos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados tipo omega, pueden desempeñar un papel importante en la prevención y el tratamiento de enfermedades coronarias, hipertensión, diabetes tipo II, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, enfermedades

renales, enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, otras enfermedades inflamatorias, autoinmunes y cáncer (Hull, 2011; Adkins & Kelley, 2010; Sethoma, *et al.*, 2010; Simopoulos, 2002; Gebauer, *et al.*, 2006; Lorgeril & Salen, 2004). Todos estos beneficios, se deben a que estos ácidos grasos son precursores de importantes moléculas, como prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos, moléculas esenciales como reguladores de funciones celulares (Hull, 2011; Adkins & Kelley, 2010; Sethoma, *et al.*, 2010; Rodríguez, *et al.* 2003).

Además, estos aceites vegetales insaturados son el componente básico empleado para muchas formulaciones cosméticas por sus innumerables propiedades hidratantes y antioxidantes (Follegatti-Romero, *et al.*, 2009). Por otro lado, el análisis de calidad de los aceites para fines agroindustriales, concluye que los altos índices de yodo en correspondencia con el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, le confieren al aceite de *P. volubilis* propiedades secantes, condición de gran utilidad en la industria oleoquímica para la fabricación de barnices y revestimientos (Pascual, 2000).

Debido a las cualidades de los aceites de *P. volubilis*, el fruto se ha ido consolidando en un mercado promisorio para la comercialización de productos elaborados, a partir de éstos aceites (Follegatti-Romero, *et al.*, 2009; Pascual, 2000). Sin embargo, la producción de materias primas es insuficiente, lo cual a la hora de exportar y de competir en los mercados, resulta un obstáculo (Correa & Bernal, 1992; Dewick, 2001). Una de las principales limitaciones es la falta de continuidad en el abastecimiento de la semilla de *P. volubilis*, y antes esta situación la reproducción *in vitro* es una de las mejores alternativas para empezar a desarrollar el potencial agroindustrial de la especie. Además, hasta la fecha no han sido reportados trabajos de propagación *in vitro* para *P. volubilis* pero dentro de la familia Euphorbiaceae se

han desarrollado con éxito varios protocolos para la propagación de especies de importancia agronómica y ornamental como: *Euphorbia esula* L. (Xu, *et al.*, 2008), *Euphorbia pulcherrima* Willd (Jasrai, *et al.*, 2003), *Givotia rottleriformis* Griff. (Samuel, *et al.*, 2009), *Manihot esculenta* (Konan, *et al.*, 1997), *Jatropha curcas* (Singh, *et al.*, 2010), *Phyllanthus niruri* L (Jiménez, *et al.*, 2007), entre otros, que fueron el punto de partida para este proyecto.

2 JUSTIFICACIÓN

Los ácidos grasos de la semilla de *P. volubilis*, reúne varias propiedades químicas que le confieren posibilidades de uso muy diversas, que van desde su importancia como fuente energética para la alimentación humana, hasta su utilización en campos como la industria oleoquímica, cosmética y los biocombustibles. Lo permite sugerir que *P. volubilis* se proyecta como una especie oleaginosa promisoría para el desarrollo agroindustrial de nuestro país.

Actualmente la propagación de esta planta se hace solo por semilla, lo que implica alta variabilidad en el material vegetal y por lo tanto pueden perderse las características deseadas por los cultivadores. En este sentido, esta investigación se propone el desarrollo de un protocolo eficiente de propagación *in vitro* de *P. volubilis*, que permita contar con un material vegetal homogéneo de alta calidad, con calidad fitosanitaria y altos coeficientes de multiplicación durante todo el año independientemente de las condiciones ambientales, y por lo tanto facilitar el establecimiento comercial de este tipo de cultivos productivos. El desarrollo de este protocolo abre las puertas a la generación de un nuevo horizonte de investigación científica-tecnológica para el futuro mejoramiento de *P. volubilis*, el desarrollo de nuevas investigaciones tales como estudios fisiológicos, fenológicos, de productividad, de rendimientos y de su posible mejoramiento genético.

Por último, a la fecha, las investigaciones adelantadas sobre *P. volubilis* son escasas y trabajos sobre la propagación *in vitro* de esta especie no han sido reportados, lo que

convierte a esta investigación como el primer avance en la micropropagación de esta especie.

3 MARCO TEORICO

3.1 Descripción botánica

El género *Plukenetia* pertenece a la familia Euphorbiaceae. Se han identificado aproximadamente 37 especies de *Plukenetia*, de las cuales 12 se encuentran en el trópico americano y las demás en África y Madagascar. Las especies de este género son plantas trepadoras, generalmente con hojas aserradas, glándulas basilaminares, flores unisexuales, sin corola, con 16 a 18 estambres y frutos tetralobulados (Jiménez, *et al.*, 2000).

P. volubilis es una planta monoica, semileñosa y perenne. Sus hojas son simples alternas, acorazonadas, de 10 a 12cm de largo y 8 a 10cm de ancho. Poseen dos glándulas elípticas en la base de la hoja por el haz; bordes dentados, peciolo de 2 a 6cm de largo (Gómez, 2005). Las inflorescencias se presentan en forma de racimos de tamaños que pueden variar entre 5 y 15cm de longitud. La flor femenina nace en la parte axilar de la inflorescencia y tienen un estilo de longitud media de 3.1cm y un estigma ramificado de 4 a 5 lóbulos. Las flores masculinas son pequeñas de 0.5cm de diámetro, redondeadas, blanquecinas y conforman la mayor parte del racimo floral. Cada flor masculina tiene entre 4 y 6 pétalos y estambres de color amarillo en cantidades que oscilan entre 15 y 22, aunque pueden ser más. Los frutos tienen forma de estrella, con número variable de lóbulos que pueden ir desde cuatro hasta ocho. Predominan los frutos con cuatro y cinco lóbulos. Los frutos se dividen cuando el fruto madura y se seca (Figura 1). Dentro de los lóbulos, en el fruto maduro, se encuentran las semillas que son de color marrón oscuro, corrugadas y venadas, de forma lenticular y con 1.5 a 2cm de diámetro (Gómez, 2005).



Figura 1. Fructificaciones de “Sacha inchi” *Plukenetia volubilis*. Fruto maduro con coloración café e inmaduro color verde.

3.2 Distribución geográfica y ecología

Esta es una planta trepadora de rápido crecimiento, que habita en bosques secundarios, bordes de bosques, rastrojos, cercos vivos y alambrados (Gómez, 2005). Es una especie neotropical cuya presencia ha sido registrada en territorio amazónico, en los países como Brasil, Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú, Surinam, Venezuela y además en Costa Rica, Guyana Francesa, México, Nicaragua y Panamá (Missouri Botanical Garden, 2009). Se encuentra en zonas cuya temperatura media anual es entre 25°C y 30°C y la precipitación pluvial fluctúa entre 1000 y 5000mm (Correa & Bernal, 1990). Crece en altitudes desde 80 hasta 1500msnm en una amplia gama de suelos. Se comporta bien en suelos ácidos y con concentraciones elevadas de

aluminio y en suelos franco-arenosos como los suelos aluviales. En Colombia esta especie crece en condiciones naturales en el departamento del Chocó y también se ha registrado en los departamentos de Caquetá, Putumayo y el Amazonas (Gómez, 2005).

3.3 Usos, propiedades y aplicaciones

Las semillas de *P. volubilis* son valoradas por sus contenidos de aceites y proteínas; y han sido tradicionalmente consumidos por diferentes grupos aborígenes del Perú. Los nativos del Amazonas obtienen harina y aceite de las semillas que son usadas en la preparación de diferentes comidas y bebidas; las semillas son asadas y las hojas tiernas son cocinadas para ser consumidas (Guillén, 2003). Sin embargo, esta planta ha sido poco estudiada, y su importancia desde un punto de vista nutricional y funcional es todavía tema de investigación.

Hamaker, *et al.* (1992) y Follegatti-Romero, *et al.* (2009) realizaron una caracterización de los aceites de la semilla, y encontraron que estas contienen una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, aproximadamente un 93% de la semilla que corresponde a la presencia del ácido α -linolénico (Omega-3), ácido linoleico (Omega-6), ácido oleico (Omega-9), ácido palmítico, ácido esteárico y ácido galonéico (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización del aceite de las semillas de Sacha Inchi

Semillas	
Mezcla (%)	4.38
Aceite total (%)	54.3
Aceite crudo (Extracción con Soxhlet)	
Valor de yodo (g ^l /100g de óleo)	198
Ácidos grasos libres (%)	3.0
Valor de saponificación (mg KOH/g de óleo)	193
Composición de ácidos grasos (%)	
Acido palmítico	4.24
Acido esteárico	2.50
Acido oleico	8.41
Acido linoléico	34.08
Acido linolénico	50.41
Acido galonéico	0.16
Tocoferoles (total) (g/kg)	2.39

Fuente: Follegatti-Romero, *et al.* 2009

De acuerdo a esta composición, el aceite de *P. volubilis* es una de las fuentes vegetales más ricas de ácidos grasos poliinsaturados, donde el ácido graso predominante es el ácido α -linolénico (Omega-3) y seguidamente, el ácido linoléico (Omega-6) (Huaman, *et al.*, 2009). Los ácidos grasos α -linolénico (Omega-3) y linoléico (Omega-6) son conocidos como ácidos grasos esenciales, porque los seres humanos no pueden producirlos por ellos mismos y por lo tanto deben suministrarse en la dieta, ya que cumplen una importante función metabólica. (Hamaker, *et al.* 1992; Follegatti-Romero, *et al.*, 2009).

Los ácidos esenciales α -linolénico (Omega-3) y linoleico (Omega-6) una vez en el cuerpo, se pueden convertir en otros ácidos grasos derivados poliinsaturados, con cadenas más largas como el ácidos araquidónico, ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6) que normalmente están presentes en los lípidos de los peces (Follegatti-Romero, *et al.*, 2009). Varios estudios han sugerido que estos ácidos grasos son importantes en la prevención de enfermedades coronarias, la hipertensión durante el embarazo y la lactancia materna, la artritis

reumatoide, el cáncer y, posiblemente, la severidad de las infecciones virales. Además de mostrar un efecto hipocolesterolémico cuando se usan como complementos dietarios (Lorgeril, *et al.*, 2004; Simopoulos, 2002; Gebauer, *et al.*, 2006, Guillén, *et al.*, 2003).

Comúnmente el alto contenido de ácidos grasos insaturados hace que el aceite vegetal sea muy susceptible a la peroxidación bajo condiciones ambientales (20°C-30°C). Los estudios preliminares realizados por Hamaker (1992) mostraron que el aceite de *P. volubilis* sin refinar parece ser bastante estable, debido a la presencia de α -tocoferol y carotenos. Además, de acuerdo a lo reportado por Follegatti-Romero hay altas cantidades de γ -tocoferol en el aceite lo que podría aumentar la resistencia contra la oxidación. Los antioxidantes más activos en los lípidos son el γ -tocoferol y el δ -tocoferol, dicha acción decrece en el orden: $\gamma > \delta > \beta > \alpha$ -tocoferol, y los tocoferoles predominantes en el *P. volubilis* fueron los γ - y δ -tocoferol, lo que sugiere estabilidad a la oxidación.

Por otro lado, en los últimos años se ha investigado el contenido de proteínas en las semillas de *P. volubilis* y se ha encontrado que la albumina es el componente principal con un 30% del total de las proteínas presentes en la semilla y sobre esta fracción se caracterizaron los aminoácidos como se resume en la Tabla 2 (Sathe, *et al.*, 2002).

Tabla 2. Composición de aminoácidos

Aminoácido	g/100g de proteína ^a		Aminoácido	g/100 de proteína	
	Albumina	FAO/WHO ^b		Albumina	FAO/WHO
Asx	12.7		Met	1.4	
Glx	14.6		Cys	4.3	
Ser	6.0		Met + Cys	5.7	2.5
Gly	4.8		Ile	5.0	2.5
His	1.0	1.9	Leu	7.9	6.6
Arg	8.5		Phe	0.9	
Thr	5.7	3.4	Tyr	5.8	
Ala	3.7		Phe + Tyr	6.7	6.3
Pro	4.5		Lys	7.2	5.8
Tyr	5.8		Trp	4.4	1.1
Val	6.2	3.5	E/T ^c	47.61	

^a Datos expresados como gramo de aminoácidos por 100gramos de proteína. ^b recomendado para niños (2-5 años), aunque recientemente recomendado por la evaluación de calidad de la proteína dietaría para todos los grupos de edades realizado por la consulta conjunta de expertos FAO/WHO. ^c proporción de aminoácidos esenciales totales.

Fuente: Sathe, *et al.* 2002

De acuerdo con esta tabla, a excepción de la histidina, las semillas de *P. volubilis* tienen todos los aminoácidos esenciales y las cantidades adecuadas de aminoácidos de acuerdo a los parámetros recomendados por el Informe del Comité Mixto de Expertos FAO/OMS/UNU sobre los requerimientos energéticos humanos (FAO/WHO/UNU, 2001; Sathe *et al.*, 2002).

3.4 Propagación vegetativa de plantas

Las plantas se pueden multiplicar de varias maneras; en forma vegetativa (a través de estacas, yemas, acodos), de forma sexual (por semillas) y mediante sistemas de micropropagación *in vitro*. Todos estos sistemas de propagación tienen ventajas y desventajas que los hacen complementarios o excluyentes de acuerdo a la especie en particular. En algunas especies, la multiplicación sexual no es eficiente (no se forman semillas, o se forman muy pocas, las semillas pierden rápidamente su capacidad germinativa), quedando la opción de utilizar la multiplicación vegetativa.

La propagación vegetativa *in vivo* (por esqueje, división, acodo, acodo alto y distintos tipos de injerto), ha jugado durante muchos años un importante papel en la agricultura (George *et al*, 2008). Sin embargo, los métodos clásicos de reproducción *in vivo* o bien son insuficientes para las necesidades reales (demasiado lentos, difíciles o caros, generan variabilidad indeseada) o a veces son completamente inviables (Pierik, 1990).

3.4.1 *El cultivo de tejidos en la propagación de plantas*

La micropropagación consiste en la multiplicación de un genotipo a gran escala a través del empleo de técnicas de cultivo de tejidos. El cultivo de tejidos vegetales es así una herramienta muy útil, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada (Olmos, 2004). La micropropagación a través de técnicas de cultivo de tejidos se basa específicamente en la potencialidad de una célula vegetal para regenerar una planta entera (totipotencia) (Roca & Mroginski., 1991).

Las células aisladas desde tejidos diferenciados son generalmente quiescentes y no se dividen; para expresar la totipotencia las células primero deben pasar por la dediferenciación y la rediferenciación. El fenómeno de una célula madura que se revierte a estado meristemático y que forma un callo indiferenciado es llamado dediferenciación, mientras que la capacidad de una célula dediferenciada para formar una planta entera u órganos vegetales es llamada rediferenciación (Veeresham, 2004).

3.4.2 Organogénesis

La organogénesis se refiere al proceso por el cual explantes, tejidos o células pueden ser inducidos para formar órganos específicos, tales como raíces, tallos o plantas completas (Torres, 1989).

La regeneración es definida como la tendencia mostrada por un organismo desarrollado para restaurar cualquiera de sus partes que haya sido removida o fisiológicamente aislada o que produce un individuo completo. La regeneración a través de métodos biotecnológicos usando organogénesis o embriogénesis tiene distintas ventajas comparada con el método de propagación convencional (Torres, 1989). Esas son:

1. Fidelidad genética del proceso, ya que permite obtener individuos o clones similares o casi idénticos a los parentales.
2. Existe la posibilidad de producir plántulas libres de virus o cualquier otro patógenos de la especie.
3. El potencial para la producción de un alto número de plántulas y la uniformidad morfológica y citológica de las plántulas, especialmente de especies difíciles de propagar o regenerar por otros métodos
4. Se puede mantener una producción continua de material independiente de factores ambientales.
5. El material vegetativo puede ser almacenado por largos periodos de tiempo.

3.4.3 Factores que afectan la regeneración

La regeneración vía organogénesis *de novo* es un complejo fenómeno con múltiples etapas. Los factores que afectan el proceso de organogénesis son:

- **La fuente de explantes.** Los factores que influyen la respuesta del explante en el cultivo son: el estado fisiológico (fenología) y la época del año en el que se colecta el material vegetal; la calidad fitosanitaria de la planta de la cual se toman los explantes; la fuente y tamaño del explante.
- **Nutrientes y constituyentes del medio.** Los siguientes constituyentes pueden influir en la organogénesis (Glovac *et al*, 1982; Lindsey & Jones, 1992; Roca & Mroginski, 1991; Pierik, 1990; Henao & Marina, 1991; Ponce, 1998)
 - a) **Nutrientes minerales:** Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta, sin agua y sin nutrientes una planta no puede vivir *in vitro* o *in vivo*. Después de los azúcares, los minerales constituyen el grupo más importante de sustancias nutritivas en el cultivo *in vitro*. Existe una gran cantidad de posibilidades para las mezclas de macro y micronutrientes
 - b) **Fuente de carbono:** Se deben añadir también azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas no son completamente autotróficas cuando se desarrollan bajo estas condiciones
 - c) **Reguladores de crecimiento:** Sustancias que se requieren en mínimas concentraciones responsables de la división celular, el crecimiento de las células, etc. En la mayoría de los casos se hace necesario agregar reguladores generalmente del tipo auxinas o citoquininas
 - d) **Sustancias orgánicas:** Existe una larga lista de componentes que se han adicionado a los medios de cultivo, como fuentes de nitrógeno reducido,

factores de crecimiento, carbohidratos, y otros. Entre ellos están el agua de coco, el jugo de frutos de tomate, el extracto de levadura, y el extracto de tubérculos de papa.

- e) **Ambiente de cultivo:** Hay muchos aspectos que pueden influenciar el crecimiento y desarrollo organizado. Esos incluyen: el pH del medio, la calidad y cantidad de la luz, la temperatura, la humedad y la agente gelificante.

3.4.4 Etapas de la micropropagación

Etapa 0 Selección del stock de plantas y preparación.

Se debe tener una cuidadosa atención para seleccionar las plantas de una variedad o cultivar, buscando alta fidelidad fenotípica y genética de la especie o cultivo. El stock de plantas debe estar libre de enfermedades, preferiblemente mantenido en una cámara de crecimiento o invernadero (George, 2008).

Etapa I Establecimiento de un cultivo aséptico.

El primer paso en un programa de cultivo es obtener un gran porcentaje de explantes libres de patógenos superficiales y con una buena tasa de crecimiento. Además de la selección de una fuente de explante adecuado (Glovac *et al*, 1982).

Etapa II Multiplicación del tejido.

El mayor éxito en esta etapa es la rápida multiplicación de propágulos. A continuación se describen tres procedimientos para la multiplicación “clonal” de plantas:

- ***Embriogénesis somática.*** Es el proceso mediante el cual una sola célula o un conjunto de células, son desdiferenciadas para inducir la producción de un embrión o embriones, los cuales producen plantas completas (Lindsey & Jones, 1992).

- **Organogénesis**

- **Incremento del desarrollo axilar.** Un explante que contiene un solo brote puede, dependiendo de la especie y el medio de cultivo, desarrollarse en una sola yema o producir múltiples yemas. Aunque este es el método más lento de micropropagación, es el más ampliamente aplicable en términos de número de géneros que pueden ser propagados de esta manera (Torres, 1989).
- **Desarrollo de yemas adventicias.** Las yemas adventicias y órganos relacionados son estructuras que se originan de tejidos localizados en áreas diferentes a la yema axilar de la hoja o el ápice. Las yemas adventicias, raíces, bulbos y otras estructuras especializadas pueden originarse desde tallos, hojas, tubérculos, bulbos o rizomas (Roca & Mroginski, 1991).

Etapas III Enraizamiento.

Es una etapa donde se puede comenzar con la elongación de los brotes producidos en la etapa de inducción y la estimulación de los tejidos meristemático y parenquimáticos para la formación de raíces (Pierik, 1990).

Etapas IV Aclimatación.

Esta involucra el paso de condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro*. Durante este proceso se logra el endurecimiento de las plántulas que generalmente son poco vigorosas y consistentes. La aclimatación de plántulas generalmente se hace bajo condiciones de invernadero, con control de luz, humedad y temperatura; y por lo tanto constituye uno de los pasos más críticos en el proceso de micropropagación (Ponce, 1998).

3.4.5 *Ventajas de la propagación in vitro*

Las ventajas de la propagación *in vitro* son indicadas a continuación (Veeresham, 2004; Ponce, 1998; Roca & Mroginski, 1991; Pierik, 1990)

- La obtención de una progenie genéticamente estable
- La posibilidad de obtención de líneas libres de virus, resistentes a enfermedades, a herbicidas y tolerantes a ambientes salinos
- La obtención de caracteres fenotípicos especiales, genotipos distintos (tetraploides, haploides, híbridos)
- La multiplicación *in vitro* es más eficiente que la multiplicación *in vivo*.
- La propagación de materiales que no pueden ser multiplicadas *in vivo*.
- Se necesita una cantidad relativamente pequeña de material para iniciar un cultivo *in vitro*
- Permiten una gran precisión en el calendario de producción de plántulas, pues se puede eliminar el efecto estacional y conseguir una producción homogénea a lo largo del año.

4 OBJETIVOS

4.1 *Objetivo general*

Establecer un protocolo eficiente que permita la propagación *in vitro* de *P. volubilis*

4.2 *Objetivos específicos*

- Establecer un protocolo de desinfección adecuado para las semillas de *P. volubilis* L., para garantizar un cultivo aséptico.
- Estudiar el efecto de diferentes medios de cultivo sobre el porcentaje de germinación de semillas, crecimiento y desarrollo *in vitro* de plántulas de *P. volubilis* L.
- Evaluar el efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la inducción del desarrollo de yemas axilares en *P. volubilis* L.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización del proyecto

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Biología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Antioquia

5.2 Material vegetal

El material vegetal para el desarrollo de esta investigación fue suministrado por la empresa Colombiana de Biocombustibles S.A. que posee de cultivos comerciales de *P. volubilis* en la Vereda Ahuyamal, Sopetrán – Antioquia. El material vegetal usado fueron frutos en un estado avanzado de madurez fisiológica (Figura 2. **Fructificaciones de “Sacha inchi” *Plukenetia volubilis*. (a) Fruto inmaduro. (b) Fruto maduro. (c) Loculos. (d) Semillas.**Figura 2a-b), llevados al laboratorio para ser procesados manualmente para retirar completamente el pericarpo y dejar las semillas individuales para su posterior desinfección (Figura 2c-d). Las semillas fueron almacenadas a 24°C por un máximo de 5 días para su introducción *in vitro*.

Para el desarrollo de esta investigación se decidió partir de material aséptico germinado *in vitro* porque el material elite que facilitarían los cultivadores una vez definido el protocolo de micropropagación sería en estados juveniles. Además, ha sido ampliamente reportado que los explantes obtenidos de tejidos jóvenes tiene una mejor respuesta morfogénica *in vitro* (Ponce, 1998; Henao & Marina, 1991; Roca & Mroginski., 1991; Pierik, 1990).

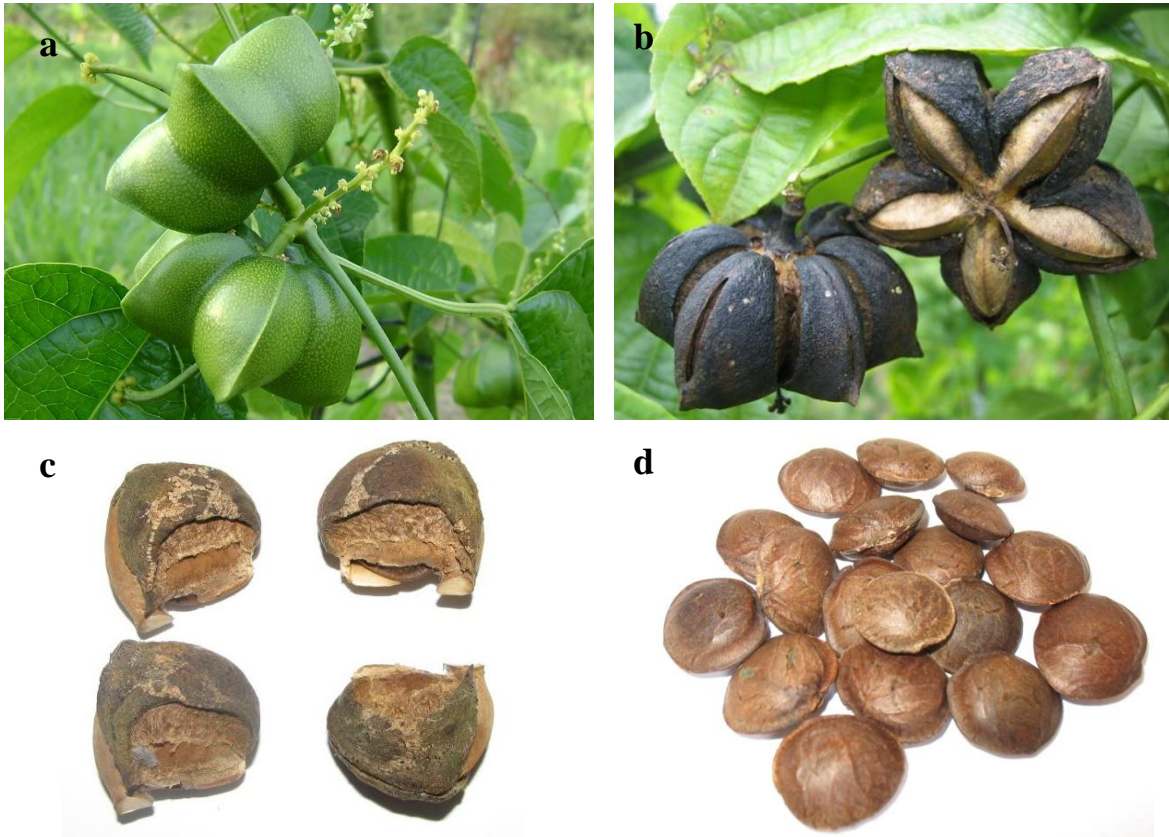


Figura 2. Fructificaciones de “Sacha inchi” *Plukenetia volubilis*. (a) Fruto inmaduro. (b) Fruto maduro. (c) Loculos. (d) Semillas.

5.3 Desinfección de semillas colectadas en campo

Para la desinfección de las semillas fueron evaluados diferentes tratamientos de desinfección (Tabla 3).

Tabla 3. Matriz de tratamientos evaluados para la desinfección de semillas de *P. volubilis* provenientes de cultivos comerciales.

	Tratamiento/Concentración	Tiempo
1	Solución de NaClO 3% + CH ₃ COOH 10%	10min
2	Solución yodada comercial	5min
	Solución de NaClO 3% + CH ₃ COOH 10%	20min
3	Alcohol 70%	15min
	Agua oxigenada Comercial	5min
	Solución yodada Comercial	5min
	Solución de NaClO 3% + CH ₃ COOH 10%	20min
4	Alcohol 70%	15min
	Solución yodada Comercial	5min
	Solución de NaClO 3% + CH ₃ COOH 10%	30min

En todos los tratamientos las semillas fueron inicialmente lavadas con agua corriente y jabón desinfectante y llevadas a fungicida comercial (Benlate) a una concentración de 2 g/L en agitación continua por 24 horas. A partir de este momento las semillas fueron procesadas en condiciones estériles en cámara de flujo laminar. Luego de la desinfección, las semillas fueron sembradas en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) (1962) a la mitad de su concentración (½MS) y después una semana de cultivo se registró el número final de semillas establecidas por tratamiento.

Para determinar el efecto de cada uno de los tratamientos de desinfección sobre el porcentaje de semillas establecidas, se seleccionaron como unidades experimentales grupos de 50 semillas y en cada grupo se contaron las semillas que no presentaron contaminación. Para cada tratamiento se hicieron 3 replicas para un N (tamaño de la muestra) total de 12.

5.4 Germinación in vitro de semillas

Para el proceso de germinación de las semillas de *P. volubilis* se evaluó el efecto de tres factores: medio de cultivo, presencia/ausencia de testa en la semilla y la temperatura (Tabla 4). Los dos medios de cultivo evaluados fueron el medio basal de Murashige y Skoog (MS) (1962) completo y este mismo a la mitad de su concentración (1/2MS). La presencia/ausencia se evaluó removiendo manualmente la testa de las semillas en condiciones de esterilidad (Figura 3a) y finalmente se evaluaron dos valores de temperatura, 18°C y 28°C.

Para determinar el efecto de cada tratamiento sobre el porcentaje de germinación de las semillas, se seleccionaron como unidades experimentales grupos de 20 semillas asépticas y en cada uno de ellos se contaron las semillas donde hubo extensión de la radícula. Cada tratamiento se evaluó por duplicado para un N total de 16. Los cultivos fueron mantenidos en total oscuridad hasta la aparición de la radícula (Figura 3b).

Tabla 4. Matriz de tratamientos evaluados para germinación de semillas de *P. volubilis*.

	Tratamientos		
1	MS	+ Testa	18°C
2	MS	+ Testa	28°C
3	MS	- Testa	18°C
4	MS	- Testa	28°C
5	1/2 MS	+ Testa	28°C
6	1/2 MS	+ Testa	18°C
7	1/2 MS	- Testa	18°C
8	1/2 MS	- Testa	28°C

5.5 Crecimiento y desarrollo in vitro de las plántulas

Se evaluó el efecto del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962) completo y a la mitad de su concentración (1/2MS), sobre el crecimiento y desarrollo de las plántulas, registrando el número de hojas en cada plántula cultivada a 23°C±2 bajo

condiciones de luz continua, los datos se registraron después de 2 meses de germinadas las semillas (Figura 3c-d). Para este experimento se seleccionaron como unidades experimentales cada una de las plántulas, y para cada tratamiento se realizaron 10 replicas para un N total de 20.



Figura 3. (a) Semillas sin testa. (b) Aparición de la radícula. (c-d) Plántulas con 15 días y dos meses de cultivo.

Todos los medios fueron suplementados con 20g/L de sacarosa y 2.7g/L de phytigel. Los valores de pH fueron ajustados a 5.75 con pH-metro (Metrohm) antes de ser autoclavados. La esterilización de los medios de cultivo se realizó en autoclave a 121°C y 15 psi durante 20 minutos. El manejo del material vegetal se llevó a cabo en cámara de flujo laminar horizontal.

5.6 Evaluación del efecto de diferentes factores sobre la inducción de organogénesis de yemas axilares en segmentos nodales de *P. volubilis*

Los explantes seleccionados para todos los ensayos fueron cortes de segmentos nodales (2,0 – 2,3cm de longitud) de vitroplantas obtenidas de semillas germinadas *in vitro* (2-3 meses de cultivo). Los explantes fueron sembrados en posición vertical con al menos un 30% de su superficie en contacto con el medio de cultivo. El medio de cultivo utilizado fue el medio basal de Murashige y Skoog (MS) (1962) suplementado con diferentes tipos/concentraciones de reguladores de crecimiento. Los cultivos fueron mantenidos a una temperatura entre 25°C y 28°C con un flujo de luz continuo suministrado por tubos de luz fluorescente. Los explantes fueron subcultivados cada tres semanas y los resultados fueron tomados a la cuarta semana de cultivo.

5.6.1 Evaluación de diferentes de medios de cultivos reportados en la literatura

Hasta el momento no han sido reportadas investigaciones sobre la propagación *in vitro* de *P. volubilis*. Por lo anterior, el punto de partida fue la revisión y evaluación de diferentes protocolos de micropropagación reportados para algunas especies relacionadas con *P. volubilis*, pertenecientes a la familia Euphorbiaceae: *Euphorbia esula* L. (Xu, *et al.*, 2008), *Euphorbia pulcherrima* Willd (Jasrai, *et al.*, 2003), *Givotia rottleriformis* Griff. (Samuel, *et al.*, 2009), *Manihot esculenta* (Konan, *et al.*, 1997), *Jatropha curcas* (Singh, *et al.*, 2010), *Phyllanthus niruri* L (Jiménez, *et al.*, 2007), *Phyllanthus caroliniensis* (Catapan, *et al.*, 2000). De los anteriores protocolos fueron seleccionados los tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento donde se obtuvieron los mejores resultados en la diferenciación de yemas axilares en las especies relacionadas (Tabla 5).

Para determinar el efecto de los diferentes medios de cultivos reportados en la literatura sobre el porcentaje de diferenciación de las yemas axilares, se seleccionaron como unidades experimentales grupos de 12 segmentos nodales y en cada grupo se contaron los explantes que diferenciaron sus yemas después de un mes de cultivo, para cada tratamiento se hicieron 3 replicas para un N total de 21.

Tabla 5. Matriz de los diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento evaluados, reportados en la literatura

Medio de cultivo	Reporte científico	Tipo y concentraciones de reguladores de crecimiento
M1	<i>Jatropha curcas</i> ^a	BAP (1.0 ppm) + Kin (1.0 ppm)
M2	<i>Givotia rottleriformis</i> ^b	TDZ (0.11 ppm)
M3	<i>Phyllanthus niuri</i> ^c	BAP (3.0 ppm)
M4	<i>Phyllanthus niuri</i> ^c	BAP (1.0 ppm)
M5	<i>Euphorbia ésula</i> ^d	BAP (0.25 ppm) + IBA (0.40 ppm)
M6	<i>Phyllanthus caroliniensis</i> ^e	BAP (1, 27 ppm) + KIN (0.27 ppm) + 0,51 ppm 2-ip
Control	-	0

^a Singh, *et al.*, 2010; ^b Samuel, *et al.*, 2009; ^c Jiménez, *et al.*, 2007; ^d Xu, *et al.*, 2008; ^e Catapan, *et al.*, 2000

5.6.2 Evaluación de diferentes concentraciones y tipos de citoquininas

Con base en los resultados obtenidos en el ensayo anterior, se determino evaluar el efecto de diferentes concentraciones de citoquininas sobre el porcentaje de diferenciación de las yemas axilares y la formación de tejido calloso (cm²). Los segmentos nodales fueron sembrados en diferentes medios suplementados con tres reguladores de crecimiento: kinetina (KIN), 2-ip y bencilaminopurina (BAP) (Tabla 6). Para ambos análisis se tomaron los datos después de un mes de cultivo.

Para determinar el efecto de las diferentes concentraciones de citoquininas sobre el porcentaje de diferenciación de las yemas axilares, se seleccionaron como unidades experimentales grupos de 12 segmentos nodales y en cada grupo se contaron los explantes que diferenciaron sus yemas, para cada tratamiento se hicieron 3 replicas

para un N total de 45. Para determinar el efecto de las diferentes concentraciones de citoquininas sobre el porcentaje en la formación de callo se seleccionaron como unidades experimentales los segmentos nodales, en cada uno de ellos se midió la formación de callo en cm². En cada tratamiento se hicieron 6 replicas para un N total de 120.

Tabla 6. Matriz de medios de cultivos suplementados con Kin, BAP, 2-ip evaluados a 6 diferentes concentraciones para la inducción del desarrollo axilar

Medios de cultivo/Concentraciones						
Regulador de crecimiento	M1	M2	M3	M4	M5	Control
KIN BAP 2-ip	0.8ppm	0.6ppm	0.4ppm	0.2ppm	0.1ppm	0ppm

5.6.3 Evaluación de diferentes concentraciones de los nutrientes Ca y Mg en medio basal de Murashige y Skoog

Teniendo en cuenta el análisis de suelo proporcionado por la empresa Colombiana de Biocombustibles S. A. (Tabla 7) se decido evaluar el efecto de la variación en la concentración de algunos nutrientes en medio basal. El suelo analizado corresponde a una parcelación ubicada en Santafé de Antioquia, vereda Ahuyamal ubicada en una zona a 500msnm y una temperatura promedio de 26°C.

Tabla 7. Análisis de suelo de una parcelación comercial de *P. volubilis* en Santafé de Antioquia, vereda Ahuyamal.

Bases		Cmolc/Kg	Fosforo y azufre disponible mg/Kg	
Ca		7,4	P	4
Mg		2,2	S	3
K		0,15	Micronutrientes	
CICE		9,8	Fe	34
pH del suelo		6,5	Mn	4
M.O.		% 1,7	Cu	2
			Zn	1
			B	0,8

Para relacionar y hacer una comparación entre las concentraciones de nutrientes del suelo respecto a las concentraciones de los nutrientes en el medio MS, se procedió a convertir las unidades a g/kg tanto para los componentes del suelo como para los componentes del medio MS (Tabla 8).

Tabla 8. Comparación de las concentraciones de macro y micronutrientes presente en una muestra de suelo y en medio basal MS.

Concentración en suelo (g/kg)		Concentración de medio MS (g/kg)
Ca	2,96	0,178 ↑
Mg	0,53	0,04 ↑
K	0,059	0,88
P	0,004	0,04
S	0,003	0,064
Fe	0,034	0,0064
Mn	0,004	0,0082
Cu	0,002	0,000007
Zn	0,001	0,002
B	0,0008	0,00122

El medio basal MS se modifico en las concentraciones de los elementos de Ca y Mg que fueron los macronutrientes que se encontraron en menor proporción en el medio MS en comparación con la concentración en el suelo (Tabla 8).

Para evaluar el efecto de los macronutrientes sobre la diferenciación de yemas se procedió a sembrar los segmentos nodales en 3 medios de cultivo, un control que consistió en la formulación original de MS completo sin modificaciones, uno modificado en la concentración de Ca y otro en la concentración de Mg de acuerdo a lo reportado en la literatura (Kao & Michayluk, 1975; White, 1963) (Tabla 9).

Tabla 9. Comparación de las concentraciones de los nutrientes Ca y Mg entre el medio basal MS, y los diferentes medios de cultivo reportados en la literatura científica.

Nutriente		Reporte científico	
Concentración MS (ppm)		Concentración (ppm)	
Ca	332,3	Kao & Michayluk	453
Mg	180,7	White	360

Para determinar el efecto de las modificaciones de la concentración de los nutrientes Ca y Mg en MS sobre el porcentaje de diferenciación de yemas axilares, se seleccionaron como unidades experimentales grupos de 25 segmentos nodales, y para cada tratamiento se hicieron 3 replicas para un N total de 9. Así mismo, para el porcentaje de explantes muertos se tomaron los mismos grupos de 25 explantes y para cada tratamiento se hicieron 3 replicas (N=9).

5.6.4 Evaluación de diferentes medios de cultivo suplementados con agua de coco y otros compuestos.

En el presente ensayo se evaluó el efecto de medios de cultivo suplementados con agua de coco, el regulador de crecimiento 2-ip, adenina y biotina sobre el porcentaje en la diferenciación de yemas axilares (Tabla 10), el control consistió en medio basal MS. Para determinar este efecto se seleccionaron como unidades experimentales grupos de 20 segmentos nodales, y para cada tratamiento se hicieron 3 replicas para un N total de 18.

Tabla 10. Matriz de medios de cultivos suplementados con agua de coco al 10% y adenina/biotina evaluados para la inducción del desarrollo axilar

Medios de cultivo	Tipos y concentraciones de diferentes compuestos
M1	Control
M2	Agua de coco 10% + 100ppm Adenina
M3	Agua de coco 10% + 50ppm Biotina
M4	Agua de coco 10% + 0,5ppm 2-ip
M5	Agua de coco 10%

* Medio MS modificado en la concentración de calcio+ 1g/Lcarbón activado+ 50ppm cisteína+ 100ppm adenina+ 5ppmbiotina

5.6.5 Evaluación de diferentes medios de cultivo suplementados con reguladores de crecimiento (2-ip y KIN) y agua de coco

En el presente ensayo se procedió a evaluar el efecto del medio de cultivo suplementado con dos reguladores de crecimiento KIN (0,4ppm)/2-ip (0,5ppm) y agua de coco al 10%, sobre el número de hojas formadas por explante (Tabla 11). Para determinar este efecto se seleccionaron como unidades experimentales los segmentos nodales y en cada uno de los explantes se conto el número de hojas formadas. En cada tratamiento se realizaron 20 replicas para un N total de 60.

Tabla 11. Matriz de medios de cultivos suplementados con los reguladores de crecimiento KIN y 2-ip y agua de coco al 10%

Medios de cultivo	Tipos y concentraciones de diferentes compuestos
Control	10% agua de coco
M2	10% agua de coco+0,5ppm 2-ip
M3	10% agua de coco + 0,4ppm KIN

* Medio MS modificado en la concentración de calcio+ 1g/Lcarbón activado+ 50ppm cisteína+ 100ppm adenina+ 5ppmbiotina

5.7 *Análisis estadístico*

La significancia del efecto de los tratamientos fue determinado con análisis de varianza utilizando diseños completamente aleatorizados. Los resultados obtenidos en todos los experimentos fueron analizados mediante ANOVAS unifactoriales a excepción de los resultados del proceso de germinación que fueron analizados mediante una ANOVA multifactorial. Para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos se emplearon las pruebas de comparación múltiple de Fisher LSD. Las pruebas se consideraron significativas para un $p \leq 0.05$ y se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas (Gutiérrez, 2008; Kuehl, 2000). Lo datos fueron analizado con el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV.II 2010.

6 RESULTADOS

6.1 Efecto de diferentes tratamientos de desinfección sobre el porcentaje de semillas establecidas

De acuerdo al análisis de varianza ($p < 0,05$) podemos decir que existe un efecto del tratamiento de desinfección sobre el porcentaje de semillas establecidas (Anexo 1.). Además, el análisis de comparación de rangos múltiples de LSD indica que el tratamiento 4 resulto ser la más efectivo, pues se obtuvo el mayor porcentaje de semillas establecidas del 98% (Tabla 12). Por otro lado, es importante anotar que con los tratamientos 1 y 2 se obtuvo una alta contaminación tanto por bacterias como hongos (Datos no mostrados).

Tabla 12. Efecto de diferentes tratamientos de desinfección sobre el porcentaje de semillas establecidas de *P. volubilis* L. colectadas en campo.

Tratamiento desinfección		Semillas establecidas (%)
1	Sln (NaClO + CH ₃ COOH)	17,9 ab
2	Sln yodo + Sln (NaClO y CH ₃ COOH)	0,0 a
3	OH + H ₂ O ₂ + Sln yodo + Sln (NaClO y CH ₃ COOH)	88 b
4	OH + sln yodo + Sln (NaClO y CH ₃ COOH)	98 c

^a Los valores seguidos por la misma letra, en la misma columna, no son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) para la prueba de comparación de rangos múltiples de LSD

6.2 Efecto del medio de cultivo, presencia de testa y temperatura sobre la germinación de semillas (%)

Los factores medio de cultivo, presencia de testa y temperatura tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el porcentaje de semillas germinadas ($p < 0,05$)

(Anexo 2.). El porcentaje de germinación fue mayor en el medio MS (31,75%) respecto a 1/2MS (24,5%) (Figura 4 a); removiendo la testa de las semillas la germinación alcanzo un 56,25% mientras con la presencia de la testa la germinación fue nula (Figura 4 b), y se favoreció la germinación de las semillas mantenidas bajo 28°C (45%) respecto a las mantenidas bajo 18°C (11,25%) (Figura 4 c).

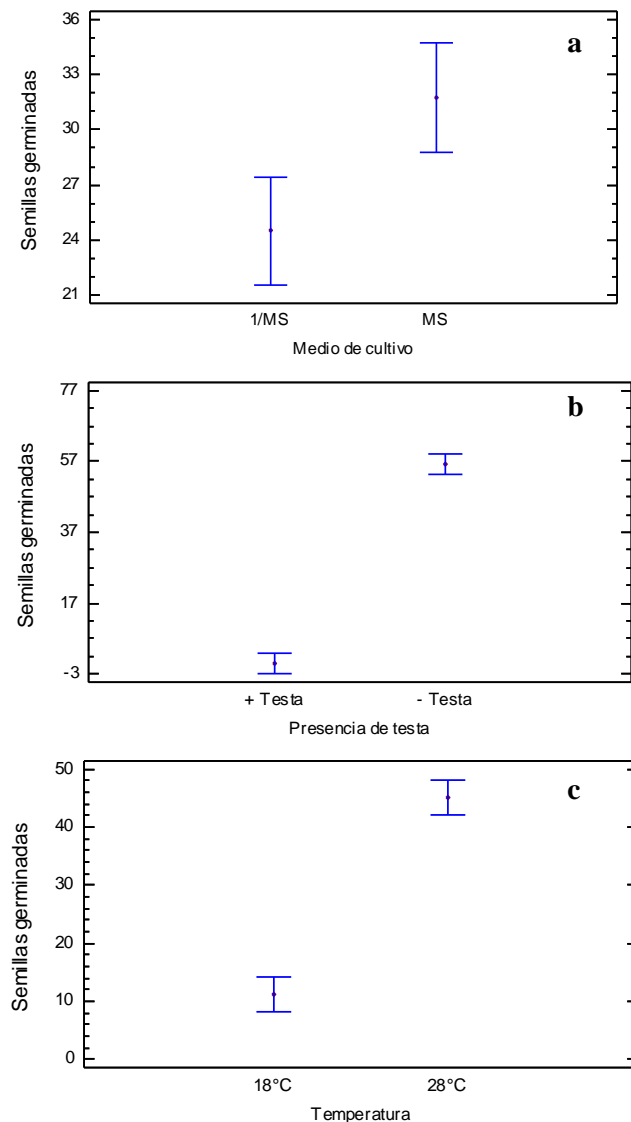


Figura 4. Efecto del (a) medio de cultivo (b) presencia de testa y (c) temperatura sobre la germinación de semillas de *P. volubilis* ($p < 0,05$) mediante la comparación de rangos múltiples de Fisher LSD.

Por ultimo, el análisis estadístico mostro que las interacciones entre medio de cultivo/presencia de testa y temperatura/presencia de testa fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) lo que indica que las mejores condiciones de cultivo para la germinación de semillas es cultivar en el medio de cultivo MS, sin presencia de testa y a una temperatura de 28°C (Figura 5 a-b).

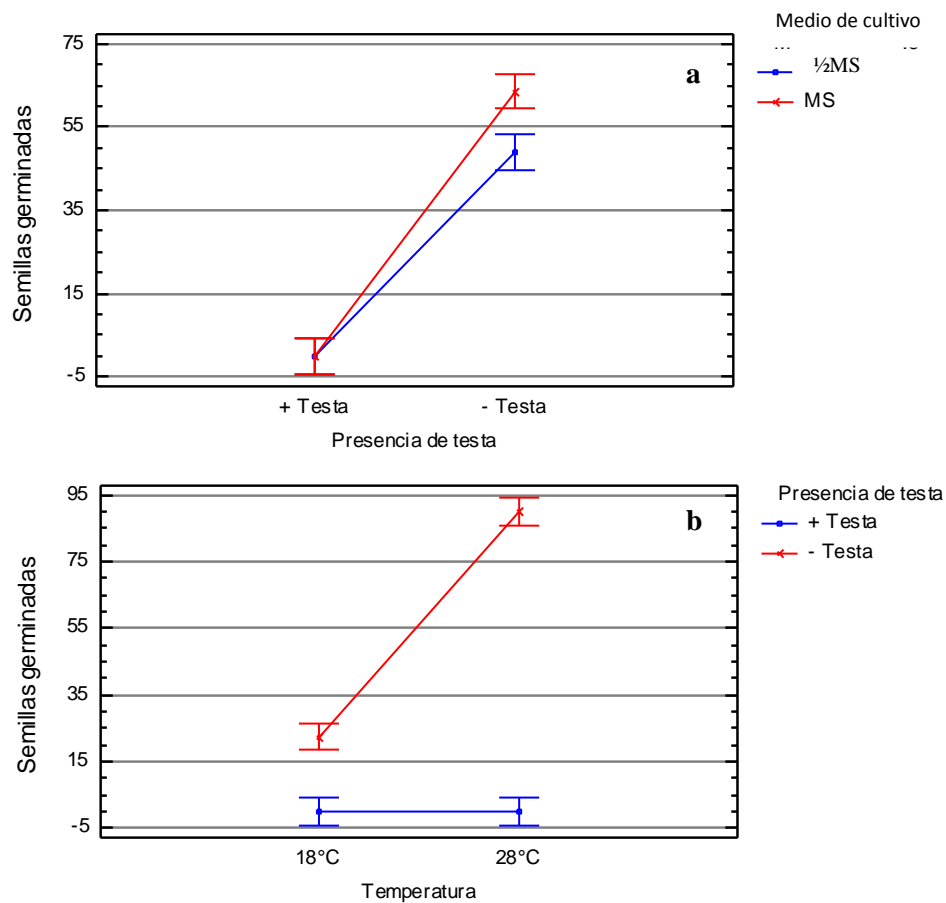


Figura 5. Análisis de interacciones. (a) Entre medio de cultivo*presencia de testa y (b) Presencia de testa*temperatura sobre la germinación de semillas de *P. volubilis*.

6.3 Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* de plántulas

De acuerdo al análisis estadístico existe un efecto del medio de cultivo sobre crecimiento y desarrollo de las plántulas en términos del número de hojas producidas después de 2 meses de cultivo ($p < 0,05$) (Anexo 3.). Las plántulas en el medio MS mostraron las mejores características en el crecimiento y desarrollo, lo que llevo se a seleccionar este medio de cultivo como el más adecuado para las vitroplantas, además de presentar diferencias estadísticamente significativas con el medio $\frac{1}{2}$ MS (Figura 6).

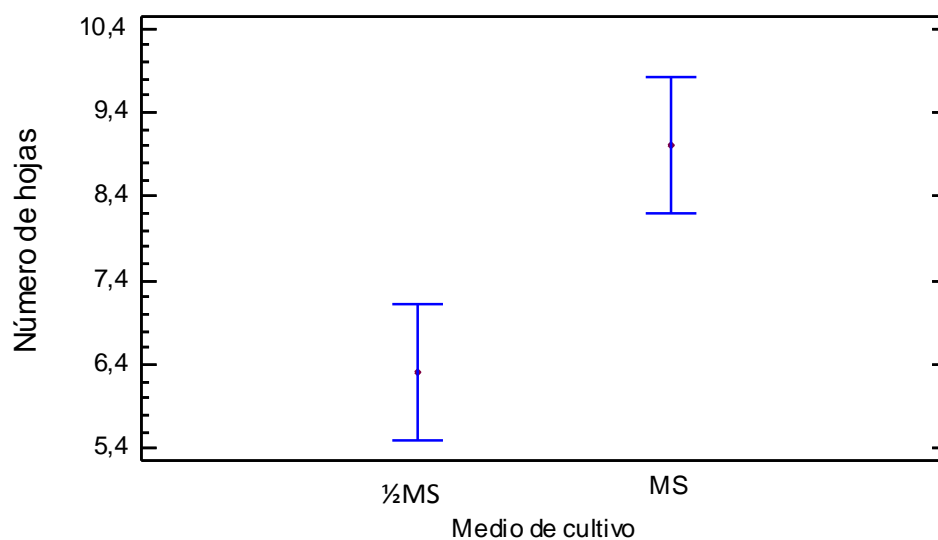


Figura 6. Efecto del medio de cultivo sobre el número de hojas formadas por plántula de *P. volubilis* después de 2 meses de cultivo ($p < 0,05$) mediante la comparación de rangos múltiples de Fisher LSD.

6.4 Efecto de diferentes factores sobre la inducción de morfogénesis en yemas axilares de segmentos nodales

6.4.1 Efecto de diferentes medios de cultivos reportados en la literatura sobre la diferenciación de yemas axilares (%) en segmentos nodales

El análisis de varianza mostro que existe un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$) del medio de cultivo sobre el porcentaje de yemas axilares diferenciadas (Anexo 4.). Además, de acuerdo al análisis de comparación de rangos múltiples de LSD la mejor respuesta se obtuvo con el BAP (1.0 ppm) y BAP (3.0 ppm), sin embargo, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Por otro lado, una diferenciación de tan solo del 25% de las yemas es un resultado que esta lejos de ser el deseado en esta investigación (Tabla 13).

En los medios M3 y M4, los explantes presentaron malformaciones y la presencia de abundante callo en la base de los explantes (Figura 7a). Los explantes en cada uno de los medios evaluados formaron callo de un aspecto nodular y se observo que la mayor formación de callo se dio en la porción del explante que está en contacto con el medio (Figura 7b-d). Por otro lado, los medios suplementados con 1.0 ppm BAP y 1.0 ppm Kin presentaron una morfología irregular en los tejidos jóvenes (Figura 7e) y después de 30 días de cultivo se observo una muerte progresiva de los explantes en todos los medios de cultivo (Figura 7f).

Tabla 13. Efecto de diferentes medios de cultivos reportados en la literatura sobre la diferenciación de yemas axilares (%) en segmentos nodales de *P. volubilis*.

Medios de cultivo		Diferenciación de yemas (%)
M1	BAP (1.0 ppm) + Kin (1.0 ppm)	10,33 a
M2	TDZ (0.11 ppm)	0 c
M3	BAP (3.0 ppm)	23 b
M4	BAP (1.0 ppm)	25 b
M5	BAP (0.25 ppm) + IBA (0.40 ppm)	0 c
M6	BAP (1, 27 ppm) + KIN (0.27 ppm) + 2-ip (0,51 ppm)	0 c
M7	Control	0 c

*Medio basal MS

^a Los valores seguidos por la misma letra, en la misma columna, no son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) para la prueba de comparación de rangos múltiples de LSD

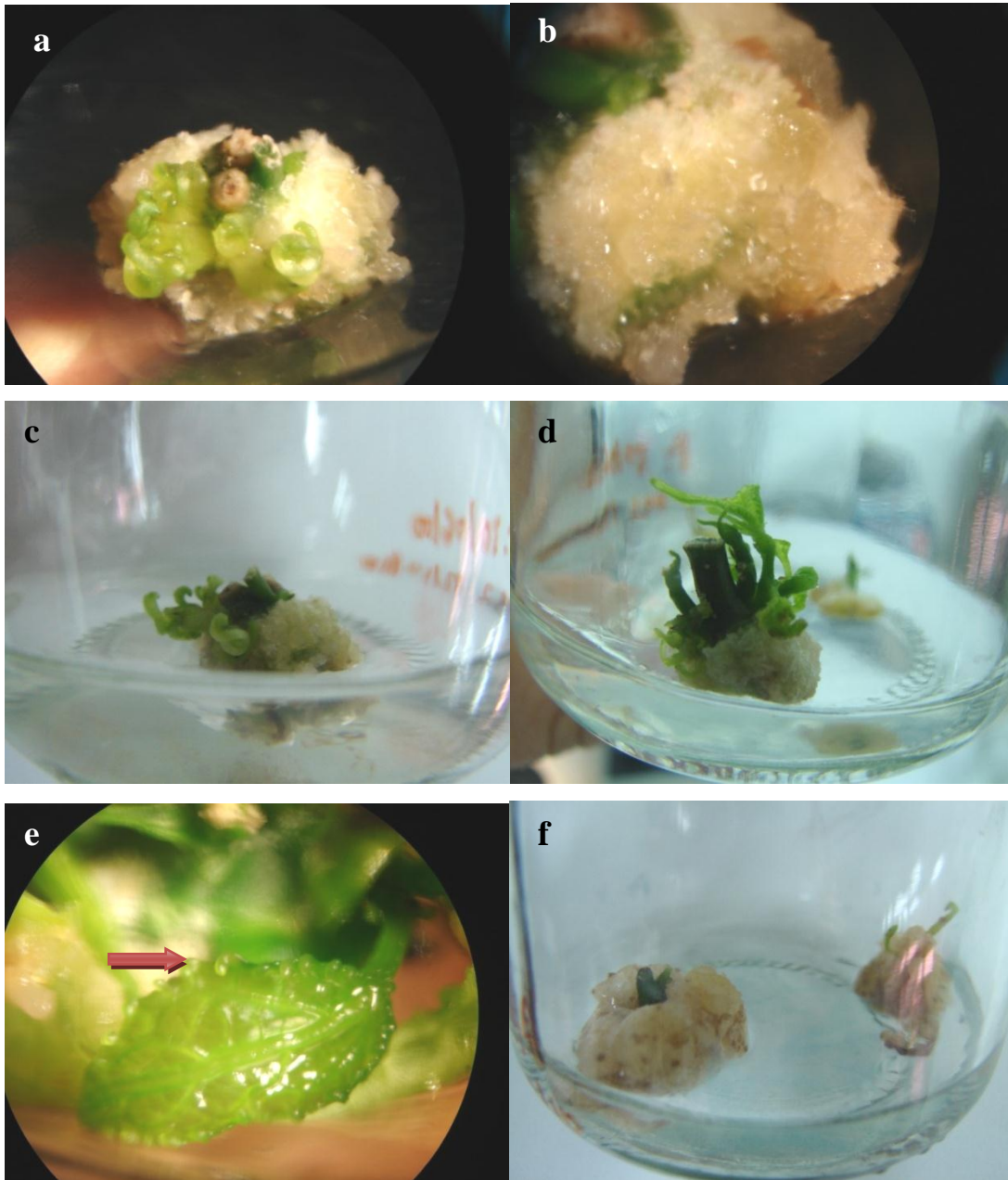


Figura 7. Diferentes repuestas de los explantes de *P. volubilis* en los medios de cultivos evaluados. (a) Formación de tejidos con forma irregular en medio suplementado con 1.0 ppm BAP y 1.0 ppm Kin. (b-c) Callo de aspecto nodular y forma irregular de los tejidos jóvenes en medio con 0.11 ppm TDZ. (d) Diferenciación de yemas axilares y producción de callo en la base del explante en medio con 3.0 ppm BAP. (e) Malformaciones en el borde de las hojas jóvenes en medio 1.0 ppm BAP. (f) Muerte de los explantes después de 30 días de cultivo en medio con 1, 27 ppm BAP + 0.27 ppm Kin + 0.51 ppm 2-iP.

6.4.2 Efecto de diferentes concentraciones de citoquininas sobre la formación de tejido calloso (cm^2) y la diferenciación de yemas axilares (%)

De acuerdo con los resultados anteriores donde se observó una importante formación de callo y poca diferenciación de las yemas, se procedió a evaluar las citoquininas BAP, Kin y 2-ip a bajas concentraciones (entre 0,1ppm y 0,8ppm). El ANOVA mostro que existe un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$) de las diferentes citoquininas y concentraciones evaluadas sobre la formación de callo y el porcentaje de yemas axilares diferenciadas (Anexo 5.).

La menor formación de callo se presentó con los medios suplementados con el 2-ip (0,4ppm, 0,1ppm y 0,2ppm) y con Kin (0,4ppm), sin presentarse diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Figura 9). En los medios suplementados con BAP se observó un incremento progresivo en el tamaño del callo a medida que aumentaba la concentración, sin la diferenciación de ninguna yema (Figura 10a).

Los mejores resultados obtenidos para la diferenciación de las yemas axilares fueron del 43% para el medio suplementado con 2-ip (0,6ppm) y de 42% para Kin (0,5ppm), sin embargo, estas concentraciones no presentan diferencias significativas entre sí (Tabla 14). Estos resultados sugieren que la Kin y el 2-iP a una concentración de 0,4ppm no favorecen la producción de callo y estimulan la diferenciación de yemas apicales y axilares (Tabla 14). No obstante, en los explantes que diferenciaron sus yemas después de 20 días de cultivo (Figura 10c), las hojas jóvenes presentaron clorosis y necrosis con la posterior caída de estas (Figura 10d).

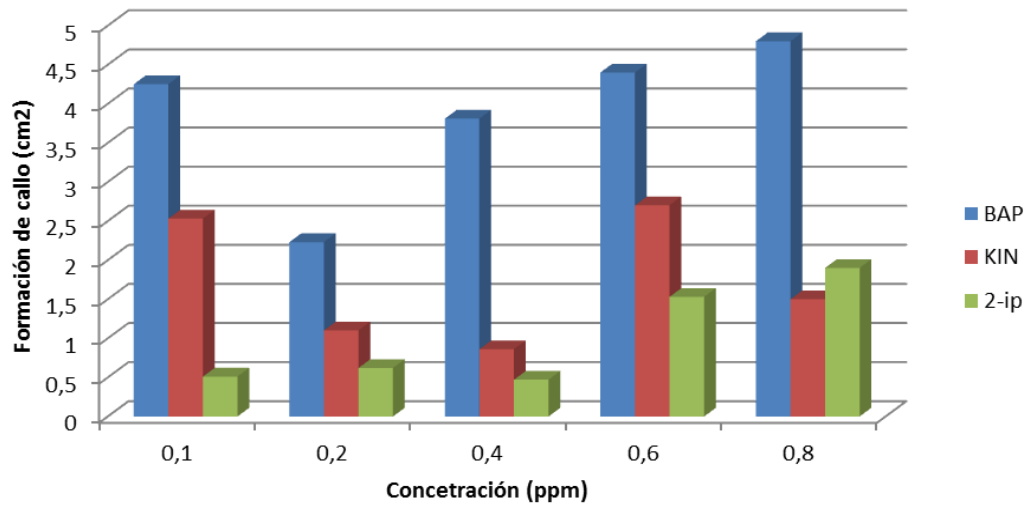


Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones y diferentes tipos de citoquininas sobre la formación de tejido calloso (cm²) en segmentos nodales de *P. volubilis*

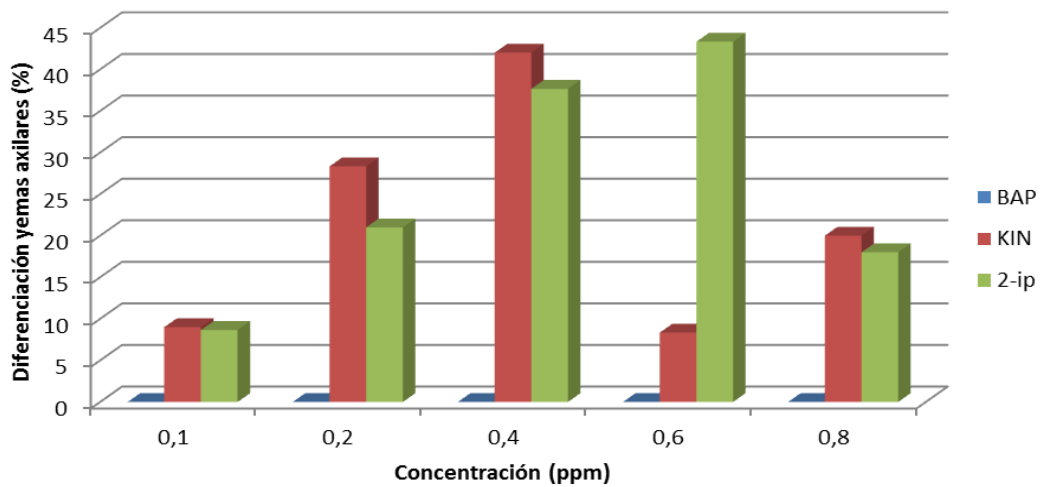


Figura 9. Efecto de diferentes concentraciones y diferentes tipos de citoquininas sobre la diferenciación de yemas axilares (%) en segmentos nodales de *P. volubilis*

Tabla 14. Efecto de diferentes concentraciones y diferentes tipos de citoquininas sobre la formación de tejido calloso y diferenciaciones de yemas axilares en segmentos nodales de *P. volubilis*

Concentración (ppm)	BAP		KIN		2-iP	
	Callo (cm ²)	Inducción yemas (%)	Callo (cm ²)	Inducción yemas (%)	Callo (cm ²)	Inducción yemas (%)
0,1	4,25 g	0 a	2,53 f	9 b	0,51 ab	8,66 b
0,2	2,23 ef	0 a	1,1 bc	28,33 d	0,62 ab	21 c
0,4	3,81 g	0 a	0,86 ab	42 f	0,47 a	37,66 e
0,6	4,4 g	0 a	2,7 f	8,33 b	1,53 cd	43,33 f
0,8	4,8 h	0 a	1,5 cd	20 c	1,9 de	18 c

*Medio basal MS

^a Los valores seguidos por la misma letra, en la misma columna, no son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) para la prueba de rangos múltiples de LSD

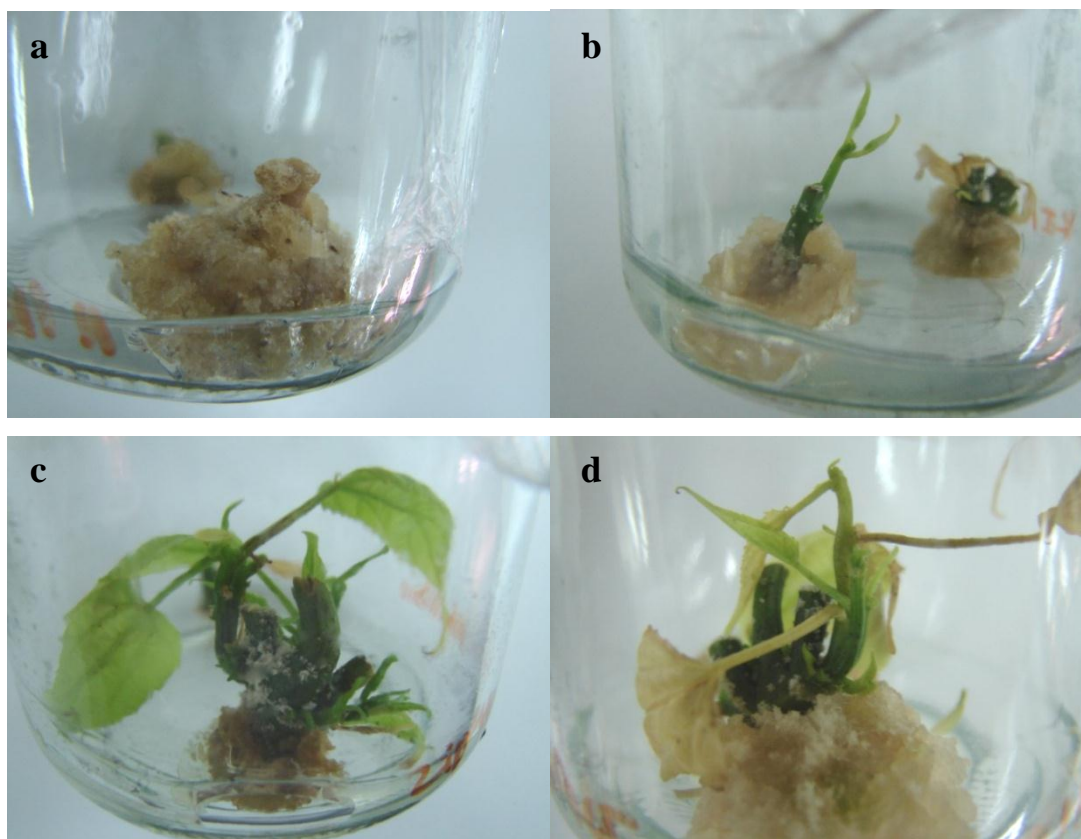


Figura 10. (a) Formación de callo en los explantes sembrado en el medio MS suplementado con BAP. (b) Yema axilar diferenciada en medio MS suplementado con Kin. (c) Yemas axilares diferenciadas en el medio MS suplementado con 2-iP. (d) Clorosis y dehiscencia de las hojas jóvenes en explantes después de 20 días de cultivo

6.4.3 Efecto de diferentes modificaciones en la concentración de los nutrientes Ca y Mg en medio basal de Murashige y Skoog sobre la diferenciación de yemas (%) y la sobrevivencia de los explantes (%).

El análisis estadístico mostro que existe un efecto de las diferentes modificaciones de macronutrientes en el medio basal MS sobre la diferenciación de yemas y sobrevivencia de los explantes ($p \leq 0,05$) (Anexo 7.). Se encontró que un aumento en la concentración de calcio estimulo la inducción del desarrollo axilar en un 76% con la mayor sobrevivencia de los explantes del 82% (Tabla 15). Por el contrario, con el Mg se obtuvo una sobrevivencia del 39% con tan solo una diferenciación de las yemas del 21% (Figura 11). Para la diferenciación de yemas los resultados muestran diferencias significativas entre todos los tratamientos de acuerdo al análisis de comparación de rangos múltiples de LSD y para la sobrevivencia de explantes los resultados para el Mg y el control no presentan diferencias significativas entre si (Tabla 15). De acuerdo a estos resultados para los siguientes ensayos se selecciono la concentración de calcio como la más adecuada para favorecer el desarrollo axilar y sobrevivencia de los explantes.

Tabla 15. Efecto de diferentes modificaciones en la concentración de nutrientes Ca, Mg sobre el la diferenciación de yemas axilares (%) y sobrevivencia de explantes (%) de *P. volubilis*

	Concentración (ppm)	Diferenciación yemas (%)	Sobrevivencia de explantes (%)
Ca	453	76 a	82 a
Mg	360	21 b	39 b
Control	-	0 c	50 b

*Medio basal MS

^a Los valores seguidos por la misma letra, en la misma columna, no son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) para la prueba de rangos múltiples de LSD

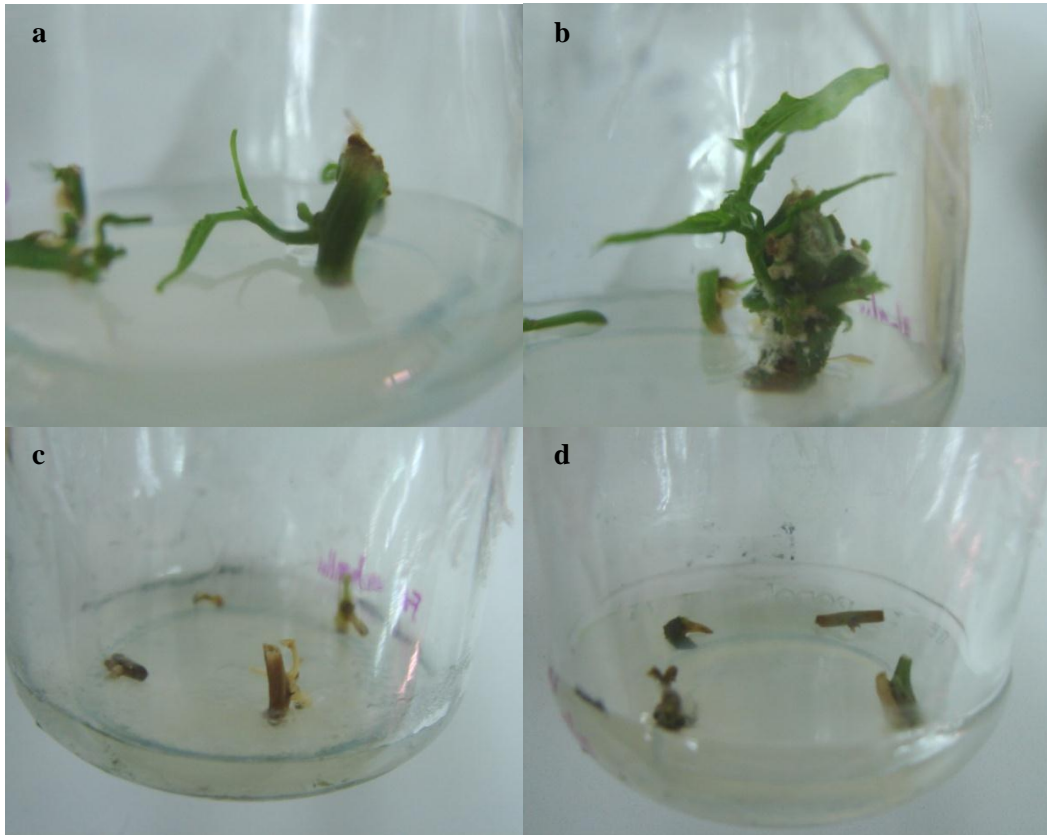


Figura 11. (a-b) Diferenciación de yemas en medio MS modificado en la concentración de calcio (c) sobrevivencia de explantes en medio MS modificado en la concentración de Mg.

6.4.4 Efecto de diferentes medios de cultivo suplementados con agua de coco y otros compuestos sobre la diferenciación de yemas axilares (%) en segmentos nodales

En la Tabla 16 se muestra el efecto de diferentes medios de cultivo suplementados con agua de coco, adenida y biotina sobre el porcentaje de diferenciación de las yemas axilares ($p \leq 0,05$) (Anexo 8.). En el medio suplementado con agua de coco al 10% + 0,5ppm 2-ip (Medio 5) se obtuvo el mayor porcentaje de inducción en la diferenciación de yemas correspondiente a un 93% (Tabla 16), siendo el mejor

resultado obtenido durante el desarrollo de esta investigación (Figura 12a-b). Seguidamente en los medios suplementado con agua de coco y biotina (M3) y el suplementado con agua de coco y adenina (M2), se obtuvieron un 42 y 31% de yemas diferenciadas respectivamente (Figura 12c-d), siendo estos resultados significativamente diferentes entre sí de acuerdo a la comparación de rangos múltiples de LSD y respecto al control donde se presento la menor diferenciación de yemas (16%) (Tabla 16).

Tabla 16. Efecto de diferentes medios de cultivo suplementados con agua de coco sobre la diferenciación de yemas axilares (%).

	Medios de cultivo	Yemas diferenciadas (%)
M1	Control	0 a
M2	Agua de coco 10% + 100ppm Adenina	31 c
M3	Agua de coco 10% + 50ppm Biotina	42 d
M5	Agua de coco 10% + 0,5ppm 2-ip	93 e
M6	Agua de coco 10%	16 b

*Medio basal MS modificado + 1g/L carbón activado

^a Los valores seguidos por la misma letra, en la misma columna, no son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) para la prueba de rangos múltiples de LSD

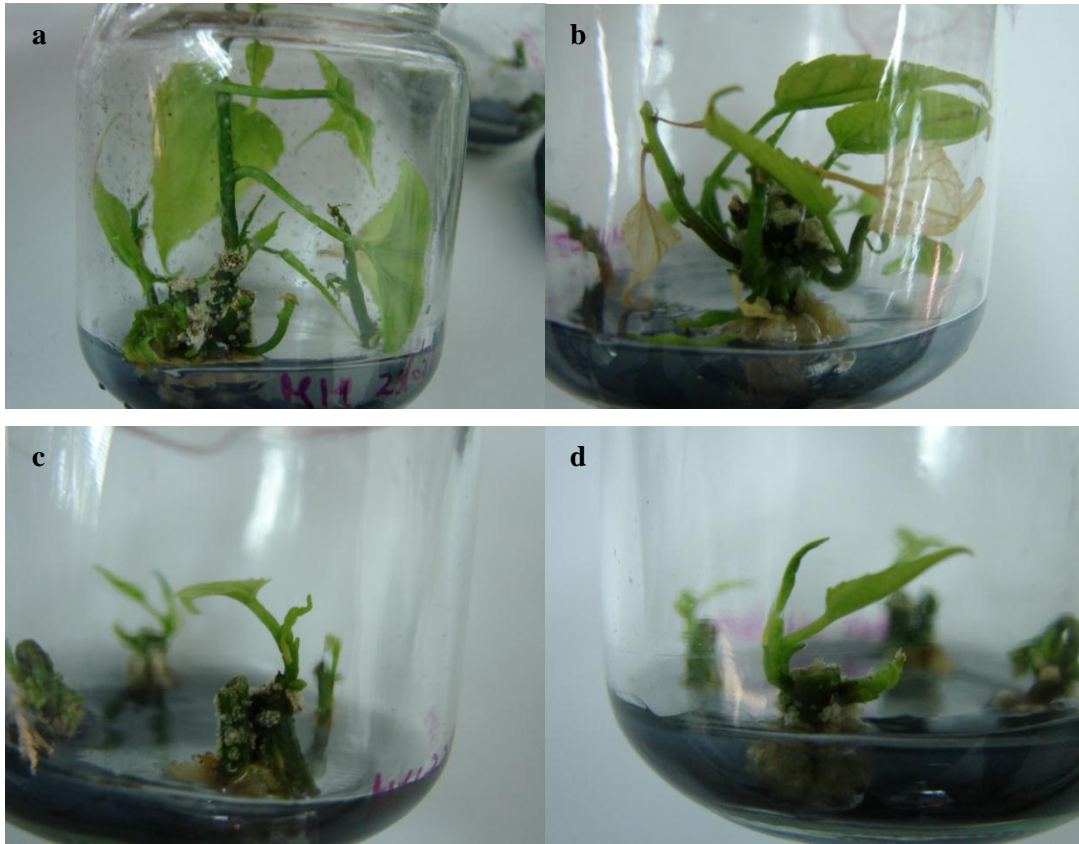


Figura 12. Inducción del desarrollo axilar en segmentos nodales de *P. volubilis* (a-b) Segmento nodal después de 15 días de cultivo en medio MS modificado y suplementado con 10% agua de coco + 0,5ppm 2-ip (M5). (c) En medio MS modificado y suplementado 10% agua de coco + 100ppm Adenina (M2). (d) En medio MS modificado y suplementado con 10% de agua de coco 50ppm Biotina (M3).

6.4.5 Efecto de diferentes medios de cultivo suplementados con reguladores de crecimiento (2-ip y KIN) y agua de coco sobre formación de hojas en segmentos nodales

Después de los resultados obtenidos en el ensayo anterior se decidió evaluar los reguladores de crecimiento KIN y 2-ip en las concentraciones delimitadas como las mejores obtenidas en el ensayo de las citoquininas. De acuerdo al análisis estadístico

se encontró que existe un efecto de los medios de cultivos suplementados agua de coco, Kin y 2-ip sobre la formación de hojas en los explantes de *P. volubilis* ($p \leq 0,05$) (Anexo 9.). Los mejores resultados se obtuvieron con ambos medios de cultivo suplementados con agua de coco + 0,5ppm 2-ip (Figura 13a-d) y 10%coco + 0,4 ppm KIN (Figura 13e-h) con 2,45 y 2,75 hojas formadas por explante respectivamente, sin embargo, no se presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Fisher LSD (Tabla 17).

Tabla 17. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el número de hojas formadas por explante

	Medios de cultivo	Numero de hojas por explante
M1	10% agua de coco	1,5 a
M2	10%coco + 0,5ppm 2-ip	2,45 b
M3	10%coco + 0,4 ppm KIN	2,75 b

*Medio basal MS modificado + 1g/L carbón activado + cisteína + adenina + biotina

^a Los valores seguidos por la misma letra, en la misma columna, no son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) para la prueba de rangos múltiples de LSD



Figura 13. Inducción del desarrollo axilar en segmentos nodales de *P. volubilis* (a-d) Segmento nodal después de 15 días de cultivo en medio MS modificado y suplementado con 10% coco + 0,5ppm 2-ip. (e-h) En medio MS modificado y suplementado con 10% coco + 0,4 ppm KIN.

7 DISCUSIÓN

Uno de los factores claves para el éxito de los sistemas de propagación de plantas por métodos biotecnológicos depende en gran medida del control y prevención de la contaminación microbiana y fúngica (Roca & Mroginski, 1991; Ponce, 1998; Pierik, 1990). Uno de los métodos utilizados para iniciar cultivos *in vitro* ha sido la utilización de explantes asépticos obtenidos de la germinación de semillas *in vitro*, con esta metodología se evitan los problemas de contaminación asociados a los tejidos obtenidos de plantas en campo (Glovac *et al*, 1982; Henao & Marina, 1991; Lindsey & Jones, 1992). Además, Doreen *et al.* (1994) proponen que los brotes obtenidos de ápices de plantas germinadas *in vitro* son más vigorosas y poseen un mayor potencial de multiplicación que los extraídos de plantas adultas.

Durante la evaluación de los protocolos de desinfección se observó una alta incidencia de contaminación debida a la presencia de hongos en las semillas. El alto porcentaje de contaminación por hongos y bacterias se puede atribuir a la asociación de microorganismos a las semillas de especies tropicales, que de manera natural ayudan a los procesos de germinación, pero que presentan un factor limitante para los trabajos *in vitro* (Castro, 2001). Una observación importante a considerar es la presencia de un hongo en el pericarpo de las infrutescencias maduras, que bajo condiciones de humedad se reproduce fácilmente e invade toda la infrutescencia (observaciones hechas en campo).

El tratamiento 4 (OH + sln yodo + Sln (NaClO y CH₃COOH) fue el más exitoso en el proceso de desinfección de las semillas debido probablemente a las sustancias bactericidas y antifúngicas utilizadas, junto con el tiempo de exposición a estas. En

general se observó una buena tolerancia de las semillas a los procesos de desinfección, debido probablemente a la impermeabilidad y grosor de la testa.

Varios autores han reportado al hipoclorito de sodio (NaClO) como una sustancia desinfectante efectiva, que exhibe actividad microbicida rápida (Roca, 1991; Ponce, 1998; Rutala & Weber, 1997; Estrela *et al.* 2002), sin embargo, es menos efectiva contra esporas bacterianas, hongos y protozoarios como se evidenció en esta investigación. Por lo anterior el hipoclorito se combinó con otros desinfectantes como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), alcohol (OH) y solución yodada (McDonnell *et al.* 1999; Rusell 2002; Kennedy *et al.* 2005; Vignoli 2008). El agua oxigenada ha sido reportada como bactericida, virucida, e incluso esporicida (McDonnell *et al.* 1999). Los compuestos yodados también han sido ampliamente reportados como una sustancia desinfectante (McDonnell *et al.* 1999; Rusell 2002; Kennedy *et al.* 2005), su mecanismo de acción bactericida se explica porque estos derivados del yodo penetran la membrana bacteriana y alteran la síntesis proteica (Rusell 2002; Kennedy *et al.* 2005). Por último, el alcohol al igual que los anteriores compuestos produce la precipitación y desnaturalización de proteínas y también lesiona la membrana citoplásmica (Vignoli 2008).

En la presente investigación, la germinación se vio favorecida por el medio basal MS completo; en concordancia con estos resultados, Rambabu *et al.* (2006) reportan que los embriones cigóticos de *Givotia* fueron 100% germinados en medio MS completo, mientras que aquellas semillas cultivadas en 1/2MS presentaron menor porcentaje de germinación. Aunque en varios estudios se ha planteado que el medio de cultivo con niveles bajos de sales es favorable para la germinación de embriones cigóticos maduros de diferentes especies (Hu y Zanettini 1995; Chang y Yang, 1996; Fregene *et al.* 1999). Los resultados obtenidos dependen de variados factores como el

genotipo, la edad del embrión, periodos de latencia y de los factores de crecimiento implicados en la germinación de los embriones cigóticos (Samuel, *et al.* 2009).

Hasta el momento, es poco lo que se sabe acerca de la fenología y específicamente lo relacionado con germinación y desarrollo de *P. volubilis*. De acuerdo a lo observado en los campos de cultivo, estas semillas son incapaces de germinar antes de su dispersión y entran en un periodo de dormición que suele eliminarse cuando las condiciones medioambientales del suelo son las adecuadas para germinar, como es el caso de la humedad y la temperatura (Comunicación personal con cultivador).

En las cubiertas seminales duras como en el caso de *P. volubilis* estas pueden comprimir el embrión y dificultar la germinación. De acuerdo con Azcon-Bieto (2008) el tipo de cubierta seminal puede ser responsable del control de la impermeabilidad y movimiento del agua de imbibición. Además, la temperatura y posiblemente el potencial hídrico del suelo, junto con las condiciones lumínicas son los factores mas importantes que determinan el fin de la dormición de las semillas (Salisbury, 1994; Azcon-Bieto, 2008)

La ausencia de testa en las semillas, favoreció enormemente la germinación y una vez retirada la testa, la actividad metabólica se reactiva inmediatamente y el crecimiento del embrión continua con la emergencia radicular, punto que marca el final de la germinación y el comienzo en el crecimiento de la plántula (George & Sherrington; 1984; Saldivar & Hugo, 2007; Salisbury; 1994; Azcon-Bieto, 2008). Por otro lado, el efecto de la temperatura como ya se había mencionado es otro factor importante en la germinación. En esta investigación, la temperatura de 28°C, fue la más apropiada para favorecer la germinación debido probablemente a la similitud de las condiciones de cultivo con su ambiente natural, pues al ser una planta de bosque seco tropical el

aumento de la temperatura puede inducir algunas de las respuestas bioquímicas necesarias para la germinación. Por otro lado, el crecimiento y desarrollo de las plántulas se vio favorecido por el medio de cultivo MS completo, lo que está en concordancia con numerosos autores que sostienen que la alta concentración de sales de esta formulación es ideal para la mayoría de las especies cultivadas *in vitro* (George & Sherrington; 1984; Hall, 2000; Pierik, 1990). Además, de acuerdo con el análisis de suelo se observó que la concentración de macro y micronutrientes era alta.

En la presente investigación donde se quiere una propagación fiel del material parental y de acuerdo con Ponce (1998) a medida que la regeneración de plantas sea de un tejido más diferenciado la variabilidad genética es menor, y específicamente en el caso de las plantas regeneradas de yemas axilares, éstas tienen mayor estabilidad genética, pues participan todas las capas del tejido meristemático. Al evaluar los protocolos reportados por la literatura los principales resultados obtenidos fueron la formación de callo con todos los reguladores de crecimiento utilizados y malformación de los tejidos con BAP y BAP+KIN, respuestas que no son las deseadas para este tipo de estudio. La presencia de callo en la base de los explantes a altas concentraciones de citoquininas y en combinación con la auxina, puede atribuirse según Puddephat (1997) a que dichas concentraciones superan un límite aceptable por el explante provocando éste desorden fisiológico; otra causa podría ser la alta intensidad metabólica de los explantes, que por ser tejidos jóvenes, tienen mayor potencial morfogénico y con ello mayor facilidad para emitir estructuras como brotes y raíces, o en su defecto callo (Bonga, 1982).

Los resultados positivos obtenidos con el 2-ip demuestran la necesidad de la adición de citoquininas al medio de cultivo para estimular la diferenciación de las yemas axilares, pues ha sido ampliamente reportado que la proliferación de brotes axilares

en el cultivo *in vitro* se logra con la adición de citoquininas en el medio de cultivo para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas (Roca, 1991; Ponce, 1998; Pierik, 1990; George & Sherrington, 1984).

Además, se observó en general que las bajas concentraciones de citoquininas promovieron la brotación y disminuyeron la formación de tejido calloso. Todos los resultados pueden ser atribuidos al contenido endógeno de los reguladores de crecimiento (Saxena, *et al.*, 1998; Khalafalla & Hattori, 1999; Faisal *et al.*, 2006). La competencia de las células para la brotación es controlada por numerosos factores internos (Ovecka *et al.*, 2000). Kim *et al.* (2000) sugiere que la habilidad para formar brotes en un explante está relacionado con el nivel *in vivo* de auxinas y citoquininas endógenas y que la respuesta diferencial a las diferentes citoquininas puede ser causada por las diferencias entre las estructuras químicas. De acuerdo a lo anterior y a los resultados obtenidos en los explantes de *P. volubilis* las concentraciones endógenas de las fitohormonas puede ser muy alta y por lo tanto presentarse un desbalance entre las concentraciones de los reguladores de crecimiento exógenos añadidos al medio, y por lo tanto se puede favorecer la formación de callo en los tejidos en contacto con el medio.

Con los reguladores de crecimiento KIN y el 2-ip se logró la diferenciación de las yemas axilares, sin embargo, los primordios foliares rápidamente presentaron clorosis y posteriormente necrosis con la muerte del explante. Una de las hipótesis planteadas en este punto de la investigación fue un posible efecto de una alteración nutricional. Según Azcon-Bieto (2008) las alteraciones nutricionales pueden no presentar síntomas visibles claros. Normalmente, los síntomas se hacen patentes cuando la deficiencia nutricional es alta y el ritmo de crecimiento disminuye significativamente. Los nutrientes Ca y Mg resultaron ser los nutrientes deficientes en el medio MS de

acuerdo con el análisis de suelo, pero solo el aumento en la concentración de Ca favoreció el desarrollo axilar y previno la clorosis en los primordios foliares. Numerosos autores reportan que altas concentraciones de calcio evitan la necrosis de puntos de brotación, sin afectar el crecimiento y la regeneración (Bairu *et al.*, 2009; Chang and Miller, 2005; Martin *et al.*, 2007). De acuerdo a Saldivar & Hugo (2007) los síntomas de deficiencia de este nutriente son siempre evidentes en el tejido joven y esto es congruente con los síntomas observados en las primeras hojas formadas como la clorosis y su posterior caída. Salisbury (1994) propone dos razones que explican este hecho: por un lado, la división celular se ve afectada por la deficiencia de calcio, y en los tejidos mencionados, el índice mitótico es alto. Por el otro, en la lámina media que se forma entre dos células hijas, uno de los principales compuestos es el pectato cálcico, el cual puede verse alterado. Además, el calcio es necesario para la integridad y funcionalidad de las membranas, y recientemente se ha visto que está implicado como segundo mensajero en el funcionamiento de algunas hormonas y en respuestas ambientales (Xu, *et al.*, 2009).

Aunque la modificación en la concentración de nutrientes tuvo un efecto significativo sobre la diferenciación de las yemas axilares y las bajas concentraciones de citoquininas fueron efectivas para evitar la formación de callo, en la mayoría de los tratamientos evaluados la formación de tejido calloso en la base de los explantes era una respuesta no deseada. La intensidad de la respuesta a la auxina depende de la concentración en cada órgano y de la relación que se establece entre las concentraciones endógenas y exógenas de las fitohormonas en el cultivo *in vitro* de tejidos. Para evitar la formación de callo en los explantes se evaluó el efecto de un compuesto antiauxínico (datos no mostrados), como el ácido triiodobenzoico (TIBA) que ha sido utilizado exitosamente para incrementar el número de brotes, inhibir la formación de callo y favorecer la longitud de los explantes en cultivos de *Rosa sp*

(Castilla, 2005). Las antiauxinas son inhibidores sintéticos análogos a las auxinas que interfieren en la respuesta de estas hormonas y que han sido utilizadas por algunos autores para inducir organogénesis (Oono *et al.*, 2003; Zhao & Hasenstein, 2010; Berleths *et al* 2000; Laskowski *et al.*, 2008; Castilla, 2005). El mecanismo de acción de estos compuestos antiauxinicos como el TIBA es que actúan como inhibidores del transporte polar de auxina, los cuales al ser diferentes estructuralmente a la auxina actúan de forma distinta y poseen sitios de unión específicos en determinados tejidos dianas (Mcrae *et al* 1953; Friml, 2003; Muday & DeLong, 2001). En el presente trabajo se esperaba obtener una disminución en la formación de callo en los tejidos de *P. volubilis* en los medios de cultivo suplementado con TIBA, sin embargo, los resultados obtenidos fueron la presencia de callo y muerte de los tejidos. Según Roca (1991) las respuestas *in vitro* a la adición de compuestos antiauxinicos suelen ser variables debido probablemente a los distintos niveles endógenos de fitohormonas en el momento del proceso morfogénico, como el estadio de desarrollo de la planta (Bohn-Courseau, 2010; Simon & Petrsek, 2011).

Finalmente, con el fin de obtener una diferenciación de yemas más eficiente en los segmentos nodales de *P. volubilis* se decidió suplementar el medio de cultivo con agua de coco. La adición de compuestos orgánicos al medio de cultivo es una variante del cultivo *in vitro* que ha sido utilizado en numerosos trabajos de micropropagación como en el caso de *Passiflora edulis* (Hall *et al*, 2000); *coffea arabica* (Ismail *et al*, 2003) y varias especies de orquídeas (Santos-Hernández *et al*, 2005). El efecto de esta sustancia en el cultivo de tejidos se debe principalmente a que el agua de coco es un medio muy complejo, con una amplia gama de componentes orgánicos e inorgánicos, entre los que vale la pena destacar algunos aminoácidos (glutamina, serina, asparagina, etc), vitaminas (ácido nicotínico, ácido pantoténico, biotina, etc), sustancias promotoras de crecimiento (auxina, giberelina,

zeatina, glucósido de zeatina, etc), compuestos nitrogenados (amonio, etalomamina, ácidos orgánicos como shikimico, quinino, pirrolidona-carboxilico, succínico, malico), azucares (sacarosa, glucosa y fructosa) y otros compuestos como ARN polimerasa, uracilo, adenina, leucoantocianinas, fosfatasa acida, diastasa, deshidrogenasa, peroxidasa, catalasa (Roca, 1991).

El agua de coco tuvo un efecto positivo sobre la frecuencia en la diferenciación de las yemas axilares de *P. volubilis*, lo que puede indicar que el tipo de explante utilizado requiere la adición de componentes complementarios como aminoácidos y vitaminas para inducir la formación de brotes (diferenciación de yemas). Estos resultados son consistentes con lo reportado por otros autores sobre el efecto del agua de coco en la formación de brotes en explantes juveniles y maduros de numerosas especies principalmente orquídeas (Peixe *et al.*, 2007; Tefera, 2004; Namdeo *et al.*, 2006; Loc *et al.*, 2005). Según Ge (2005), el efecto del agua de coco en los procesos de micropropagación como un promotor de crecimiento, se debe al efecto individual o sinérgico de sus componentes con los elementos del medio de cultivo como los reguladores de crecimiento (auxinas y citoquininas). Además, algunos autores han reportado que la adición de compuestos orgánicos al medio mejora la sobrevivencia *ex vitro*, una de las etapas más difíciles después del cultivo *in vitro* (Moreno & Manchaca, 2007).

Al suplementar el medio de cultivo con agua de coco se presento oxidación y ennegrecimiento de los tejidos en contacto con el medio. Los explantes de algunas especies frecuentemente tienden a ennegrecer pasados varios días después del aislamiento; cuando esto ocurre, el crecimiento generalmente se inhibe y el tejido muere (Ge, 2005). El ennegrecimiento del tejido es más severo en las especies que contienen altos niveles de taninos u otros hidroxifenoles (Tefera, 2004; Namdeo *et*

al., 2006). La oxidación del tejido puede ser prevenido por (1) la remoción de los compuestos fenólicos producidos; (2) la modificación del potencial redox; (3) la inactivación de las enzimas fenolasas; y (4) reducción de la actividad fenolasa y/o disponibilidad de sustrato (Torres, 1989). Veeresham, 2004., incluye en esta fase el establecimiento de un medio adecuado, en niveles y combinaciones de fitohormonas para promover el establecimiento y crecimiento de los explantes. Para evitar esta respuesta se añadió a los medio compuestos antioxidantes como el carbón cativado y la cisteína. El carbón activado se utiliza principalmente para controlar los problemas de oxidación asociados al cultivo de tejidos (liberación de compuestos fenólicos que provocan la oxidación y muerte del tejido), este absorbe las sustancias químicas en general, limitando así su intervención con el tejido cultivado. Con respecto a las auxinas y citoquininas, se cree que el carbón activado las retiene liberándolas progresivamente en el medio de cultivo favoreciendo procesos de organogénesis y embriogénesis (Abdelnour-Esquivel & Escalant, 1994).

La cisteína es normalmente utilizada como un antioxidante pero según George & Sherrington (1984) la cisteína no previene la oxidación, sino que actúa en la rápida remoción de cualquier quinona que se forma. Aunque las proteínas de las plantas contienen cantidades bajas de aminoácidos sulfúricos como la cisteína y la metionina (Durzan y Steward, 1983), estos son necesarios para un crecimiento y desarrollo normal. Por otra parte, el utilizar aminoácidos en la nutrición de los tejidos y células vegetales cultivadas se debe considerar que muchos tejidos responden diferencialmente a los suplementos de aminoácidos, y la cisteína puede ofrecer al explante nitrógeno orgánico para suplir sus algunos de sus requerimientos (Roca & Mroginski, 1991).

Finalmente para continuar favoreciendo la diferenciación de las yemas axilares además del agua de coco fueron añadidos al medio de cultivo otros compuestos como la adenina y la biotina. Se ha demostrado que la adenina y la adenosina tienen actividad citoquinina, y se adicionan al medio de cultivo con el fin de mejorar el crecimiento o reforzar la respuesta que normalmente se atribuyen a la acción de la citoquinina (García *et al.*, 2012). En este sentido, la adenina estimula la embriogénesis somática, la formación de callos e induce la proliferación de brotes (Van Staden *et al.*, 2008). En *Phaseolus vulgaris* (Gatica *et al.* 2010) el sulfato de adenina fue empleado exitosamente en la formación de brotes y por el contrario, Delgado-Sánchez *et al.* (2006) no encontraron diferencias al cuanto al número de yemas formadas en dos variedades mexicanas de frijol al suplementar con adenina.

La biotina ha sido utilizada para acelerar el crecimiento de raíces pues esta implicada en la nutrición y la asimilación (Roca & Mroginski, 1991). Borges *et al* (2007) utilizó diferentes formulaciones de vitaminas, entre ellas la biotina para inducir la multiplicación del ñame (*Dioscorea alata*), sin embargo, según Pierik (1990) la mayoría de las plantas son capaces de sintetizar las vitaminas *in vitro* y por lo tanto la mezcla de vitaminas no siempre es necesaria. En el presente trabajo no se observó ningún efecto de la biotina y este resultado está en concordancia con Badawy *et al* (2009) quienes evaluaron el uso de diferentes concentraciones de varias vitaminas para favorecer el etapa globular de los embriones somáticos de palmas (Arecaceae) y la adición de biotina fue la única que no mostró ser efectiva.

8 CONCLUSIONES

1. Para la desinfección eficiente de las semillas de provenientes de campo, es indispensable la combinación de varias sustancias desinfectantes como alcohol (70%), solución yodada (comercial) y solución de hipoclorito de sodio (3%) + ácido acético (10%).
2. la germinación de las semillas *in vitro* se ve favorecida por factores la eliminación de la testa de la semillas, temperaturas altas de incubación y alta concentración de sales en el medio (MS completo) y el medio MS completo es efectivo para el desarrollo y crecimiento de las plántulas *in vitro*
3. Altas concentración de la citoquinina BAP induce la formación de callo y no favorecen la diferenciación de las yemas axilares, además, de presentarse malformaciones en los tejidos a altas concentraciones.
4. Solo se favorece la morfogénesis en las yemas axilares utilizando la KIN y el 2-ip en concentraciones de 0,4ppm – 0,5ppm respectivamente.
5. Las modificaciones sobre la concentración de calcio en el medio basal de MS favorece la diferenciación de yemas y evita la perdida de los primordios foliares, contrariamente, la modificación en la concentración de Mg (360) afecta la sobrevivencia de los explantes.
6. Cuando el medio de cultivo es suplementado con agua de coco y 0,5ppm de 2-ip se logra la mayor diferenciación de yemas axilares.

9 BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Abdelnour-Esquivel, A., Escalant, J. V. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Catie. Costa Rica
- ✓ Atehortúa, L. 2007. Bioagricultura Urbana y Cambio Climático. Producción mas limpia, 2 (2): 72-89
- ✓ Azcon-Bieto, J., Talón, M. 2008. Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw Hill Interamericana. 2º Edición. España.
- ✓ Bairu, M.W., Jain, N., Stirk, W.A., Doležal, K., Van Staden, J. 2009. Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the médium. *South African Journal of Botany*, 75: 122–127
- ✓ Berleths, T., Mattsson, J., Hardtke, C. S. 2000. Vascular continuity and auxin signals. *Review: Trends in plant science*, 9 (5): 387-393, September. the Dept of Botany, University of Toronto
- ✓ Bhojwani, S., Razdan, N. 1996. Plant Tissue Culture: Theory and Practice. A revised edition. Amsterdam. Elviesier Science. 921 pp.
- ✓ Bohn-Courseau, I. 2010. Auxin: A major regulator of organogenesis. *Plant biology and patholog*, 333: 290–296
- ✓ Borges, M. Perez, Y., Zayas, D. 2007. Efecto de diferentes formulaciones de vitaminas en la multiplicación *in vitro* de ñame clon caraqueño. *Bioteecnología Vegetal*. 3 (7): 177-180
- ✓ Castilla, Y. 2005. Revisión bibliográfica cultivo de tejido de rosas (*Rosa sp*): un acercamiento a investigación recientes . *Cultivos tropicales*, 26 (26): 43-47
- ✓ Catapan, E., Fleith Otuki, M., Viana, A. M. 2000. *In vitro* culture of *Phyllanthus caroliniensis* (Euphorbiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 62: 195–202.
- ✓ Chang, Y.-C., Miller, W.B., 2005. The development of upper leaf necrosis in *Lilium* ‘Star Gazer’. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 130: 759–766.
- ✓ Choi, Y.E., Katsumi, M., Sano, H. 2001. Triiodobenzoic acid, an auxin polar transport inhibitor, suppresses somatic embryo formation and postembryonic shoot/root development in *Eleutherococcus senticosus*. *Plant Science*, 160: 1183–1190.
- ✓ Correa J., Bernal H. 1992. Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello. Colombia. 684pp.
- ✓ Curtis-Patiño J. 1986. Microtecnica Vegetal. Ciudad do México, Trillas.

- ✓ Delgado-Sánchez, P, Saucedo-Ruiz M, Guzmán-Maldonado SH, Villordo-Pineda E, González Chavira M, Fraire-Velázquez S, Acosta-Gallegos JA, Mora- Avilés A. 2006. An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Plant Science*, 170:822–827
- ✓ Dewick, P. M. 2001. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. Second Edition. Jhon Wiley & Song, LTD. England
- ✓ Dixon, R. 1991. Plant Cell Culture: A practical approach. England. IRL PRESS. 236 pp.
- ✓ Doreen, K. L., Goh, M., Bon, C., Monteuis, O. 1997. Prospects of Biotechnology for a rattan improvement programme. *Bois et forest des tropiques*, 254 (4): 51-67
- ✓ Durzan, D. J., Steward, F. C. 1983. Nitrogen metabolism. En: Steward, F. C. y Bidwell, R. G. S. (eds). Plant physiology: Atretise. Academia Press, Nueva Cork. 8: 55-265
- ✓ Estrela, C., Barbin, E. L., Spanó, J. C., Marchesan, M. A., Pécora, J. D. 2002. Mechanism of Action of Sodium Hypochlorite. *Braz Dent J*, 13(2): 113-117
- ✓ Faisal, M., Siddique, I., Anis, M., 2006. *In vitro* rapid regeneration of plantlets from nodal explants of *Mucuna pruriens*—a valuable medicinal plant. *Ann. Appl. Biol*, 148, 1–6.
- ✓ FAO, 2003. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. La biotecnología. La biotecnología agrícola. ¿Una respuesta a las necesidades de los pobres? Roma.
- ✓ Follegatti-Romero, L., Piantino, C., Grimaldi, R., Cabral, F. 2009. Supercritical CO₂ extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. *The Journal of Supercritical Fluids*, 49: 323–329.
- ✓ Friml, J. 2003. Auxin transport – shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 7-12.
- ✓ Gamborg, O. L, Miller, R. A., Ojima, K,. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*, 50: 151– 8.
- ✓ García L, Collado R, Bermúdez-Caraballosa I, Veitía N, Torres D, Romero C. 2009. Influencia del medio de cultivo en el crecimiento y desarrollo de brotes de *Phaseolus vulgaris* L. regenerados *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 9 (1):47-51
- ✓ García, L. R., Bermúdez-Caraballosa, I., Veitía, N., Collado, R., Torres, D., Romero, C. 2012. Efecto del sulfato de adenina en la regeneración y elongación de brotes de frijol común. *Biotecnología Vegetal*, 1 (12): 59 -62
- ✓ Ge, L., Hong Yong, J., Khang, N., Sai Chia, L., Ngin, S., Shi Ongb, E.2005. Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using a combined approach of liquid chromatography–tandem mass

- spectrometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 829: 26–34
- ✓ Gebauer, S., Psota, T., Harris, W., Kris-Etherton, P. 2006. N-3 Fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *The American Journal of Clinic Nutrition*, 83(suppl):1526S–35S.
 - ✓ George, E., Hallard, M. A., Jan de klerk, G. 2008. Plant propagation by tissue culture: micropropagation: Uses and Methods. 3° Ed. Dordrecht : Springer., 504p. ISBN 978-1-4020-5005-3
 - ✓ George, E. F., Sherrington, P. D. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture: Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics. Eversley, Basingstoke, England
 - ✓ Gitay, H., Suárez, A., Watson, R.T., Dokken, D.J. 2002. Cambio climático y biodiversidad. Documento técnico V del IPCC (Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático).
 - ✓ Gómez J. 2005. Monografía y cultivo de “Sacha inchi” (*Plukenetia volubilis* L.): Oleaginosa promisoría para la diversificación productiva en el trópico. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica. Produmedios. Bogotá.
 - ✓ Glovak, L., Greatbatch, W. 1982. Successful Tissue Culture of *Leucaena*. *Leucaena Reserch Report*, 3: 81-82
 - ✓ Gracia, N.M. 2007. La alimentación del futuro: nuevas tecnologías y su importancia en la nutrición de la población (Fundación Bengoa, Alimentación y nutrición). *Anales venezolanos de nutrición*, 2 (20): 108-114.
 - ✓ Guillén, M.D., Ruiz, A., Cabo, N., Chirinos, R., Pascual, G. 2003. Characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) Oil by FTIR Spectroscopy and ¹H NMR. Comparison with Linseed Oil. *Journal Am Oil Chem Soc*, 8 (80): 755-762.
 - ✓ Gutierrez, H. 2008. Análisis y diseño de experimentos. México. McGraw-Hill.
 - ✓ Hall R.D (2000). Plant cell culture initiation. *Molecular Biotechnology*, 16: 161-173.
 - ✓ Hall, R.M., Drew, R.A., Higgins, C.M., Dietzgen, R.G., 2000. Efficient organogenesis of an Australian passionfruit hybrid (*Passiflora edulis*, *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) suitable for gene delivery. *Aust. J. Bot*, 48 (5), 673–768.
 - ✓ Hamaker, B.R., Valles, C., Gilman, R., Hardmeier, R.M., Clark, D., Garcia, H.H., Gonzales, A.E., Kohlstad, I., Castro, M., Valdivia, R., Rodríguez, T., Lescano, M. Amino acid and fatty acid profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia volubilis*). *Cereal chemistry*, 69 (4): 461-463.

- ✓ Henao, M., Marina, L. 1991. Cultivo de tejidos vegetales. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Agronomía, Medellín.
- ✓ Hurtado, D., Merino, M. 1988. Cultivo de Tejidos Vegetales. México. 1ª Edición. Editorial Trillas. 232 pp.
- ✓ Proyecto Atlas de la Biodiversidad de Colombia - Programa de Inventarios de la Biodiversidad. 2008. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt Equipo Coordinador del Sistema de Información sobre Biodiversidad. Bogotá
- ✓ Ismail, S., Naqvi, B., Anwar, N., Zuberi, R., 2003. *In vitro* multiplication of *Coffea arabica*. *Pak. J. Bot*, 35 (5), 829–834.
- ✓ Jiménez, J., Martínez M, Cruz, D. R: 2000. El género *Plukenetia* (Euporbiaceae) en México. Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica. México.
- ✓ Jiménez, M., Alvarenga, S., Alan, E. 2007. Establecimiento del Protocolo de Micropropagación para la Planta Medicinal *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). *Tecnología en Marcha*, 2 (20): 32-40
- ✓ Johansen DA. 1940. Plant Microtechnique. New York: Mc Graw Hill.
- ✓ Kao K.N. and Michayluk M.R. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* (Berl.): 126, 105.
- ✓ Kennedy, J., Bek, J., Griffin, D. 2005. Selection and Use of Disinfectants. NebGuide University of Nebraska–Lincoln Extension, 1: 8-10
- ✓ Khalafalla, M.M., Hattori, K., 1999. A combination of thidiazuron and benzyladenine promotes multiple shoot production from cotyledonary node explants of fababean (*Vicia faba* L.). *Plant Growth Regul*, 27: 145–148.
- ✓ Klerk (eds) Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Volume I. The Background. pp. 213–216. Springer, Dordrecht
- ✓ Kim, K.H., Park, H.K., Park, M.S., Yeo, U.D., 2001. Effects of auxin and cytokinin on organogenesis of soybean *Glycine max* L. *J. Plant Biotechnol*, 3: 95–100.
- ✓ Konan, N. K., Schiipke, C., Cárcamo, R., Beachy, R. N., Fauquet, C. 1997. An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on nodal explants and axillary bud-derived meristems. *Plant Cell Reports*, 16:444-449
- ✓ Kuehl, R. 2000. Diseño de experimentos: principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. México. Editorial: Thomson.
- ✓ Laskowski, L. E., Monerri, C., García-Luis, A., Guardiola, J. L. 2008. Efecto de la aplicación de ácido indol-acético e inhibidores de auxina sobre el desarrollo inicial del fruto de *Citrus sinensis* (L.). *Bioagro*, 3 (20): 167-176

septiembre-diciembre. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado Venezuela

- ✓ Lindsey, K., Jones, M. G. 1992. Biotecnología vegetal agrícola. Acribia, España
- ✓ Llyod, G., McCown. B., 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain lurel, *Kalma latifolia*, by use of shoot tip cultura. *Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc*, 30: 327-421
- ✓ Loc BH, Duc DT, Kwon TH (2005) Micro propagation of Zedoary (*Curcuma zedoaria*, Roscoe)—valuable medicinal plant. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 81:119–122
- ✓ Lorigeril, M., Salen, P. 2004. Alpha-linolenic acid and coronary heart disease. *Nutrition Metabolic Cardiovascular Disease*, 14:162-169.
- ✓ Martin, K.P., Zhang, C.-L., Slater, A., Madassery, J., 2007. Control of shoot necrosis and plant death during micropropagation of banana and plantains (*Musa* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 88: 51–59.
- ✓ McDonnell G, Denver A. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (1): 147-179
- ✓ Mcrae, D. H., Honnek, J. 1953. Chemical Structure and Antiauxin Activity. *Physiologia Plantarum*, 1 (6): 485-510.
- ✓ Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural MADR. 2003. Observatorio de agrocadenas. Bogotá.
- ✓ Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426 – 428
- ✓ Moreno, D., Manchaca, R. 2007. Efecto de los compuestos organicos en la propagación *in vitro* de *Stanhopea Tigrina* Bateman (Orchidaceae). *Foresta Veracruzana*, 2 (9): 27-32
- ✓ Muday, G. K., DeLong, A. 2001. TRENDS in Plant Science. 11(6): 535-542. Dept Biology, Wake Forest University, Winston- Salem
- ✓ Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cell cultures. *Physiol Plant*, 15: 473–97.
- ✓ Namdeo AG, Mahadik RR, Kadam SS (2006) Cost effective method for callus initiation from *Catharanthus roseus* leaves. *Pharmacogn Mag*, 2(8):227–231
- ✓ Oono, Y., Ooura, C., Rahman, A., Aspuria, E. T., Hayashi, K., Tanaka, A., Uchimiya, H. 2003. *p-Chlorophenoxyisobutyric Acid Impairs Auxin* Response in *Arabidopsis* Root. *Plant Physiology*, (133): 1135–1147, November. American Society of Plant Biologists
- ✓ Ovecka, M., Nadubinska, M., Volkmann, D., Baluška, F., 2000. Actomyosin and exocytosis inhibitors alter root hair morphology in *Poa annua*. *Biology*, 55: 105–114.

- ✓ Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO. 2008. El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo. Los precios elevados de los alimentos y la seguridad alimentaria: amenazas y oportunidades. FAO. Italia.
- ✓ Pascual, G., Mejía. J. 2000. Extracción y caracterización de aceite de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*). Anales Científicos Universidad Agraria la Molina. (13). Perú.
- ✓ Pérez, J. N. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Cuba.
- ✓ Peixe, A., Raposo, A., Lourenc, R., Cardoso, H., Macedo, E. 2007. Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. *Scientia Horticulturae*, 113: 1–7.
- ✓ Ponce, J. N. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Ed. Santa Clara. Cuba
- ✓ Rodríguez S.B., Megías S. M., Molina S., Baena B.M. 2003. Alimentos funcionales y alimentación optima. ¿Cerca o lejos? *Revista española de salud publica*. 3 (7): 317-331.
- ✓ Samuel, K., Debashish, D., Madhumita, B., Padmaja, G., Ram Prasad , S., Bhaskara Ramana, V., Rao, P. S. 2009. *In vitro* germination and micropropagation of *Givotia rottleriformis* Griff. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 45:466–473
- ✓ Simopoulos, A. 2002. Omega-3 fatty acids in wild plants, nuts and seeds. *Asia Pacific Journal of Clinic Nutrition*, 11(S6): S163–S173.
- ✓ Simon, S., Petrasek, J. 2011. Review: Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science*, 180: 454–460.
- ✓ Singh, A., Parandhami Reddy, M., Chikara, J., Singh, S. 2010. A simple regeneration protocol from stem explants of *Jatropha curcas* A biodiesel plant. *Industrial Crops and Products*, 31: 209–213
- ✓ Roca, W., Mroginski, L.A. 1991. Cultivo de tejidos vegetales en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Cali.
- ✓ Rutala, W. A, Weber, D. J. 1997. Uses of Inorganic Hypochlorite (Bleach) in Health-Care Facilities. *Clinical Microbiology Reviews*, 1: 597–610
- ✓ Rusell, A. D. 2002. Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49: 597-599
- ✓ Santos-Hernandez, L., Martinez-Garcia, M., Campos, J.E., Aguirre-Leon, E., 2005. *In vitro* propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in Mexico. *HortScience*, 40 (2): 439–442.
- ✓ Saldivar, L; Hugo, R. 2007. Fisiología Vegetal. Editorial Trillas. 2 Edición. México

- ✓ Salisbury, F. B., Ross, C. W. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México
- ✓ Shuler, M., Kargi, F. 1992. Bioprocess Engineering: Basic concepts. U. S. A. Prentice Hall. 479 pp.
- ✓ Sathe, S., Hamaker, B., Sze-tao, K.W., Venkatachalam, M. 2002. Isolation, Purification, and Biochemical Characterization of a Novel Water Soluble Protein from Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17 (50): 4906-4908.
- ✓ Saxena, C., Rout, G.R., Das, P., 1998. Micropropagation of *Psoralea corylifolia*. *J. Med. Aromat. Plant Sci*, 20: 15–18.
- ✓ Szabados, L., Mroginski, L.A., Roca, W.M. 1991. Suspensiones celulares: descripciones, manipulación y aplicaciones. En: Roca, William M. Cultivo de tejidos vegetales en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Cali.
- ✓ Tefera W, Wannakraioj S (2004) Micropropagation of Karwan. *Sci Asia*, 30:9–15
- ✓ Torres, K. 1989. Tissue culture techniques for horticultural crops Ed. Chapman & Hall. New York.
- ✓ Van Staden J, Zazimalova E, George EF. 2008. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. En: George EF, Hall MA, Geert-Jan De
- ✓ Veeresham, C., 2004. Medicinal plant biotechnology. CBS publishers. New Delhi. India. ISBN: 81-239-1097-5
- ✓ Vignoli R, 2008. Esterilización, Desinfección, Antisepsia. In: (Org.). Temas de bacteriología y Virología Médica. Ed. 3º, Montevideo, Oficina del libro FEFMUR, 1: 705-726
- ✓ Viñas, M., Jiménez, V. Factors affecting *in vitro* somatic embryogenesis of palms (Arecaceae). 2011. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2 (13): 229-242.
- ✓ White P.R. 1963. The cultivation of Animal and Plant Cells, Ronald Press, New York.
- ✓ Xu, B., Dai, W., Chao, W.S. 2008. An efficient method for *in vitro* regeneration of leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 44:548–556
- ✓ XU, T., LI T, QIMing, F. 2009. Analysis of Calcium Content, Hormones, and Degrading Enzymes in Tomato Pedicel Explants During Calcium-Inhibited Abscission. *Agricultural Sciences in China*, 8(5): 556-563
- ✓ Zhao, Y., Hasenstein, K. H. 2010. Physiological interactions of antiauxins with auxin in roots. *Journal of Plant Physiology*, 167 : 879–884

Sitios Web:

- ✓ Human energy requirements: Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation (Rome). [on line]. 2001. [citado diciembre de 2009]. URL disponible en: <http://www.fao.org/docrep/007/Y5686E/y5686e00.htm>
- ✓ Missouri Botanical Garden Missouri Botanical Garden. [on line]. 2009. [citado diciembre de 2009]. URL disponible en: <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html>
- ✓ Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO. La agricultura y los cambios climáticos: la función de la FAO. [on line]. 2 de diciembre de 2007. [Citado junio de 2009]. URL disponible en: <http://www.fao.org/Noticias/1997/971201-s.htm>
- ✓ Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO. La agricultura: esencial para hacer frente al cambio climático. [on line]. 3 de junio de 2009. [Citado junio de 2009]. URL disponible en: <http://www.fao.org/news/story/es/item/20243/icode>
- ✓ Organisation for Economic Co-operation and Development OCDE and Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO. Agricultural prospects 2009-2016. ISBN 978-92-64-044777. [on line]. 2009. [citado junio de 2009]. URL disponible en: <http://www.agri-outlook.org/dataoecd/2/35/43039868.pdf>
- ✓ Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO. Oilseeds market summary FAO - Trade and Markets Division. [on line]. Mayo de 2012. [Citado julio de 2012]. URL disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Oilcrops/Documents/Food_outlook_oilseeds/Food_Outlook_May_12.pdf
- ✓

10 ANEXOS

10.1 Análisis estadísticos

10.1.1 Anexo 1.

ANOVA Simple - Semillas establecidas por Tratamiento

Variable dependiente: Semillas establecidas

Factor: Tratamientos

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 4

Tabla ANOVA para Semillas establecidas por Tratamientos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2,18258	3	0,727527	374,45	0,0000
Intra grupos	0,0155433	8	0,00194291		
Total (Corr.)	2,19812	11			

Pruebas de Múltiple Rangos para Semillas establecidas por Tratamientos

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
2	3	0,0	x
1	3	0,1789	x
3	3	0,88	x
4	3	0,98	x

Verificación de Varianza

	Prueba	Valor-P
de Bartlett	1,51041	0,363418

10.1.2 Anexo 2.

ANOVA Multifactorial - Germinación de semillas

Variable dependiente: Germinación de semillas (%)

Factores:

Medio de cultivo
 Presencia testa
 Temperatura

Número de casos completos: 16

Análisis de Varianza para Semillas germinadas - Suma de Cuadrados Tipo I

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Medio de cultivo	210,25	1	210,25	8,01	0,0221
B:Presencia de testa	12656,3	1	12656,3	482,14	0,0000
C:Temperatura	4556,25	1	4556,25	173,57	0,0000
INTERACCIONES					
AB	210,25	1	210,25	8,01	0,0221
AC	30,25	1	30,25	1,15	0,3144
BC	4556,25	1	4556,25	173,57	0,0000
ABC	30,25	1	30,25	1,15	0,3144
RESIDUOS	210,0	8	26,25		
TOTAL (CORREGIDO)	22459,8	15			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para Semillas germinadas por Medio de cultivo

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Medio de cultivo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1/MS	8	24,5	1,81142	×
MS	8	31,75	1,81142	×

Pruebas de Múltiple Rangos para Semillas germinadas por Presencia de testa

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Presencia de testa</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
+ Testa	8	0,0	1,81142	×
- Testa	8	56,25	1,81142	×

Pruebas de Múltiple Rangos para Semillas germinadas por Temperatura

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Temperatura</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
18°C	8	11,25	1,81142	×
28°C	8	45,0	1,81142	×

10.1.3 Anexo 3.

ANOVA Simple - Número de hojas por Medio de cultivo

Variable dependiente: Número de hojas

Factor: Medio de cultivo

Número de observaciones: 20

Número de niveles: 2

Tabla ANOVA para Número de hojas por Medio de cultivo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	36,45	1	36,45	12,13	0,0027
Intra grupos	54,1	18	3,00556		
Total (Corr.)	90,55	19			

Pruebas de Múltiple Rangos para Número de hojas por Medio de cultivo

Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1/2MS	10	6,3	X
MS	10	9,0	X

Verificación de Varianza

	Prueba	Valor-P
de Bartlett	1,09361	0,21672

10.1.4 Anexo 4.

ANOVA Simple - Diferenciación yemas axilares por Medio de cultivo (Reportes literatura)

Variable dependiente: Diferenciación yemas axilares (%)

Factor: Medio de cultivo

Número de observaciones: 21

Número de niveles: 7

Tabla ANOVA para Diferenciación yemas axilares por Medio de cultivo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2324,0	6	387,333	16,20	0,0000
Intra grupos	334,667	14	23,9048		
Total (Corr.)	2658,67	20			

Pruebas de Múltiple Rangos para Diferenciación yemas axilares por Medio de cultivo

Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
6	3	0,0	X
7	3	0,0	X
2	3	0,0	X
5	3	0,0	X
1	3	10,3333	X
3	3	23,0	X
4	3	25,0	X

Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
de Bartlett	1,12148	0,754717

10.1.5 Anexo 5.**ANOVA Simple - Diferenciación yemas axilares por Medio de cultivo (Citoquininas)**

Variable dependiente: Diferenciación yemas axilares

Factor: Medio de cultivo

Número de observaciones: 45

Número de niveles: 15

Tabla ANOVA para Diferenciación yemas axilares por Medio de cultivo

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	10591,0	14	756,498	170,21	0,0000
Intra grupos	133,333	30	4,44444		
Total (Corr.)	10724,3	44			

Pruebas de Múltiple Rangos para Diferenciación yemas axilares por Medio de cultivo

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0,8 BAP	3	0,0	X
0,2 BAP	3	0,0	X
0,4 BAP	3	0,0	X
0,1 BAP	3	0,0	X
0,6 BAP	3	0,0	X
0,6 KIN	3	8,33333	X
0,1 2-ip	3	8,66667	X
0,1 KIN	3	9,0	X
0,7 2-ip	3	18,0	X
0,8 KIN	3	20,0	X
0,2 2-ip	3	21,0	X
0,2 KIN	3	28,3333	X
0,4 2-ip	3	37,6667	X
0,4 KIN	3	42,0	X
0,6 2-ip	3	43,3333	X

Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
de Bartlett	1,46471	0,694111

10.1.6 Anexo 6.

ANOVA Simple - Formación de callo por Medio de cultivo (Citoquininas)

Variable dependiente: Formación de callo (cm²)

Factor: Medio de cultivo

Número de observaciones: 120

Número de niveles: 15

Tabla ANOVA para Formación de callo por Medio de cultivo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	239,335	14	17,0953	49,83	0,0000
Intra grupos	36,0261	105	0,343106		
Total (Corr.)	275,361	119			

Pruebas de Múltiple Rangos para Formación de callo por Medio de cultivo

Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0,4ppmIP	8	0,4725	X
0,1ppmIP	8	0,51625	XX
0,2ppmIP	8	0,61875	XX
0,4ppmKIN	8	0,86375	XX
0,2ppmKIN	8	1,075	XX
0,8ppmKIN	8	1,49375	XX
0,6ppmIP	8	1,52875	XX
0,8ppmIP	8	1,945	XX
0,2ppmBAP	8	2,23	XX
0,1ppmKIN	8	2,52875	X
0,6ppmKIN	8	2,725	X
0,4ppmBAP	8	3,80625	X
0,6ppmBAP	8	4,04	X
0,1ppmBAP	8	4,2475	X
0,8ppmBAP	8	4,84375	X

Verificación de Varianza

	Prueba	Valor-P
de Bartlett	1,2369	0,0955234

10.1.7 Anexo 7.

ANOVA Simple - Diferenciación yemas axilares por Medio de cultivo modificado en macronutrientes

Variable dependiente: Diferenciación yemas axilares

Factor: Medio de cultivo modificado

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para Diferenciación yemas axilares por Medio de cultivo modificado

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,926489	2	0,463244	242,40	0,0000
Intra grupos	0,0114667	6	0,00191111		
Total (Corr.)	0,937956	8			

Pruebas de Múltiple Rangos para Diferenciación yemas axilares por Medio de cultivo modificado

Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	3	0,0	X
Mg	3	0,206667	X
Ca	3	0,76	X

Verificación de Varianza

	Prueba	Valor-P
de Bartlett	1,11472	0,555509

10.1.8 Anexo 8.

ANOVA Simple - Diferenciación de yemas por Medio de cultivo

Variable dependiente: Diferenciación de yemas

Factor: Medio de cultivo

Número de observaciones: 15

Número de niveles: 5

Tabla ANOVA para Diferenciación de yemas por Medio de cultivo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,49253	4	0,373133	169,61	0,0000
Intra grupos	0,022	10	0,0022		
Total (Corr.)	1,51453	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para Diferenciación de yemas por Medio de cultivo

Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
M1	3	0,0	X
M5	3	0,16	X
M3	3	0,306667	X
M2	3	0,423333	X
M4	3	0,926667	X

Verificación de Varianza

	Prueba	Valor-P
de Bartlett	1,35607	0,568963

10.1.9 Anexo 9.

ANOVA Simple - Numero de hojas por Medio de cultivo

Variable dependiente: Numero de hojas
Factor: Medio de cultivo

Número de observaciones: 60
Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para Numero de hojas por Medio de cultivo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	389,7	2	194,85	73,12	0,0000
Intra grupos	151,9	57	2,66491		
Total (Corr.)	541,6	59			

Pruebas de Múltiple Rangos para Numero de hojas por Medio de cultivo

Método: 95,0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	20	2,2	x
M1	20	7,45	x
M2	20	7,75	x

Verificación de Varianza

	Prueba	Valor-P
Levene's	1,00057	0,374036