

**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS  
Escuela de Ingeniería Agronómica**

**DETERMINACIÓN DE UN MÉTODO DE DESINFECCIÓN Y UN  
MEDIO DE CULTIVO PARA LA MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE  
CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh).  
CUTUGLAGUA, PICHINCHA.**

**TESIS DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO  
DE INGENIERA AGRÓNOMA**

**ANA MARLENE NOROÑA GONZÁLEZ**

**QUITO-ECUADOR**

**2010**

## 7. RESUMEN

Los frutales amazónicos, se caracterizan por ser poco conocidos, con producción y comercio muy reducidos. Sin embargo, son considerados promisorios gracias a que la mayoría poseen características agronómicas adecuadas para su cultivo sostenible en regiones con suelos de baja fertilidad que deben ser manejados mediante el establecimiento de arreglos agroforestales y prácticas ecológicas que contribuyan a la conservación de la biodiversidad. En la actualidad, hay innumerables productos naturales que se ofrecen en el mercado nacional e internacional debido a sus características de sabor, aromas agradables y valor nutricional, pero pocos tienen propiedades sorprendentes, como es el caso del camu-camu *Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh; una Myrtaceae silvestre originaria de la Amazonía; cuya importancia radica en su alto contenido de vitamina C que puede llegar hasta 2.8 g por 100 g de pulpa. La demanda de pulpa está alrededor de las 20 000 t/año y sigue creciendo y Perú el país que mayor oferta posee llega apenas a 200 t/año. Uno de los principales problemas radica en su alogamia facultativa; pues sus flores perfectas tienen como característica emitir primero el estilo y después de un lapso de horas los estambres, que provoca poblaciones de individuos diferentes entre sí, por eso el uso de herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* de cultivos vegetales nos permite obtener varios miles de plántulas de similar tamaño y edad, de alta calidad y elevado valor genético. Por ello en la presente investigación se planteó los siguientes objetivos: Identificar el método de desinfección que permita obtener el mayor porcentaje de sobrevivencia, Determinar el medio de cultivo, para obtener el mayor índice de multiplicación y Realizar un análisis financiero de la tecnología utilizada en la investigación.

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIAP, localizado en la provincia de Pichincha, cantón Mejía, parroquia Cutuglagua, a una altitud de 3050 m, latitud de 00° 22' 00" S y longitud de 79° 32' O y unas condiciones del cuarto de crecimiento de: temperatura promedio  $26 \pm 2^\circ$  C, humedad relativa 40 – 60 %, fotoperiodo 16 horas luz, intensidad luminosa 2000 – 3000 lux

El experimento se dividió en dos etapas: Etapa I (Desinfección de explantes) los factores en estudio fueron tres concentraciones de hipoclorito de sodio (1%, 2% y 5%) y tres tiempos de exposición (5, 10 y 15 minutos). La Etapa II (Multiplicación *in vitro*) el factor en estudio fue medios de cultivo.

En la Etapa I se realizó un análisis a través de gráficos comparativos y cuadros de resumen utilizando análisis de frecuencias, rangos y cálculo de porcentajes. La unidad experimental estuvo constituida por 5 tubos de ensayo de 18 x 150 mm, con 5 ml de medio de cultivo. Las variables evaluadas fueron: presencia de hongos y bacterias, sobrevivencia y brotación de explantes.

Para el análisis de la Etapa II se utilizó un Diseño Completamente al Azar con 10 observaciones, la unidad experimental estuvo constituida por 4 tubos de ensayo de 18 x 150 mm, con 5 ml de medio de cultivo y un explante por tubo de ensayo; previo al análisis correspondiente, debido a que los datos recolectados de las variables, longitud de brote y número de nudos por explante no presentaron una distribución normal, fue necesaria una transformación estadística mediante la  $\sqrt{x+1}$ . Esto debido a que la medición de la longitud de brote se hizo a través del vidrio del tubo de ensayo por lo que se perdió exactitud en los datos. Además, la temperatura, luz, humedad relativa y aireación diferente que se produjo en el cuarto de crecimiento y que son bastante difíciles de controlar en este tipo de experimentos, se debe tomar en cuenta la heterogeneidad de los explantes en cuanto a tipo de corte, tiempo de exposición al aire antes de la siembra. Las variables evaluadas fueron: longitud de brote, número de nudos por explante, presencia de hongos y bacterias, sobrevivencia y brotación de explantes evaluados de la misma manera que en la etapa I; además se calculó el índice de multiplicación.

El material utilizado fue obtenido de plantas en producción de la Estación Experimental Central de la Amazonía Granja San Carlos, localizada en la provincia de Francisco de Orellana, cantón Joya de los Sachas, parroquia San Carlos, a una altitud de 250 msnm, latitud de 00° 21' 11" S y longitud de 76° 39'; los brotes fueron adaptados al invernadero y de ellos se extrajo los explantes para la introducción *in vitro* a los que se les aplicó los diferentes tratamientos de desinfección.

Los principales resultados obtenidos fueron:

Etapa I, contaminación por hongos y bacterias que corresponde al 3.11%, con contaminaciones aisladas en los tratamientos t1 (1% de hipoclorito de sodio, 5 minutos), t6 (2% de hipoclorito de sodio, 15 minutos) y t7 (5% de hipoclorito de sodio, 5 minutos). En las variables sobrevivencia y brotación de explantes se obtuvo los mejores porcentajes de sobrevivencia en los tratamientos t1 (1 % de hipoclorito de sodio, 5 minutos) y t3 (1 % de hipoclorito de sodio, 15 minutos) con 100% y para brotación la mejor respuesta se obtuvo en el tratamiento t1 con 100% en la evaluación a los 15 días y una sobrevivencia y brotación general de 70.22% y 56.44% respectivamente en la evaluación a los 15 días.

Etapa II, el mejor resultado para la variable longitud de brote en la evaluación a los 15 y 30 días fue en el medio de cultivo m2 (M&S, Carbón activado 3.0 g/litro, Ácido

ascórbico 50 mg/litro, BAP 0.5 mg/litro, ANA 5 mg/litro, AG<sub>3</sub> 1.5 mg/litro, Sucrosa 20 g/litro y Agar 7 g/litro) con 9.98 mm y 12.16 mm respectivamente; en la evaluación a los 45 días la mejor respuesta se la obtuvo en el medio de cultivo m3 (M&S, Carbón activado 3.0 g/litro, Ácido ascórbico 50 mg/litro, AIA 5 mg/litro, AG<sub>3</sub> 1.5 mg/litro, Sucrosa 20 g/litro y Agar 7 g/litro.) con 14.38 mm. En la variable número de nudos/explante en las evaluaciones a los 15 y 30 días sobresale el medio de cultivo m2 con 2.35 y 2.65 nudos/explante respectivamente, para la evaluación a los 45 días el mejor resultado se observó en el medio de cultivo m3 con 3.09 nudos/explante.

En la variable presencia de hongos en las tres evaluaciones se presenta el 0% de contaminación en los cuatro medios de cultivo; en la variable presencia de bacterias se observó una contaminación del 12% en el medio m4 (WPM, Carbón activado 1.5 g/litro, Sucrosa 20 g/litro y Agar 7 g/litro), dando una contaminación general de 3.12%. Para las variables sobrevivencia y brotación de explantes en las evaluaciones a los 15 y 30 días la mejor respuesta se obtuvo en el medio de cultivo m1 (M&S, Carbón activado 1.5 g/litro, BAP 1.0 mg/litro, Sucrosa 30 g/litro y Agar 7 g/litro) con 100% de sobrevivencia y brotación. En la evaluación a los 45 días, sobresale el medio de cultivo m4 con 97.5 % de sobrevivencia y brotación. El mejor índice de multiplicación se observó en el medio de cultivo m3 (2.54 brotes/explante) a los 30 días. Al realizar un análisis económico de la tecnología del cultivo *in vitro* la producción de una planta hasta la fase de multiplicación cuesta 0.40 US\$ frente a la producción convencional donde producir una planta a partir de semillas botánica cuesta 0.26 US\$, sin embargo sobresalen las ventajas de uniformidad genética del material vegetal ya que se parte de plantas élites, disponibilidad de plantas en cualquier época del año, producción a gran escala en un tiempo relativamente corto y el beneficio que el agricultor obtendrá al utilizar plantas de calidad genética y sanitaria estará garantizado en la producción.

Los resultados obtenidos sugieren las siguientes conclusiones:

- Se comprobó la eficiencia del agente desinfectante (Hipoclorito de sodio) al obtener una baja contaminación por hongos y bacterias, en la desinfección de explantes de “Camu camu”.
- El tratamiento t1 (1% de hipoclorito de sodio y 5 minutos de exposición), arrojó los mejores resultados de brotación y sobrevivencia de explantes y mínima contaminación por patógenos, en la desinfección de explantes de “Camu camu”.
- En la evaluación a los 30 días el medio de cultivo m2 (M&S, Carbón activado 3.0 g/litro, Ácido ascórbico 50 mg/litro, BAP 0.5 mg/litro, ANA 5 mg/litro, AG<sub>3</sub> 1.5 mg/litro, Sucrosa 20 g/litro y Agar 7 g/litro.) mostró excelentes resultados en las variables: longitud de brote, número de nudos/explante, sobrevivencia y brotación

de explantes e índice de multiplicación en la evaluación de medios de cultivo para multiplicación *in vitro* de “Camu camu”.

- En todas las evaluaciones el medio de cultivo m4 (WPM<sup>5</sup>, Carbón activado 1.5 g/litro, Sucrosa 20 g/litro y Agar 7 g/litro) sobresalió en las variables sobrevivencia y brotación de explantes en la evaluación de medios de cultivo para multiplicación *in vitro* de “Camu camu”.
- Los costos de producción de planta mediante cultivo *in vitro* son sensiblemente mayores y con beneficios muy marcados en el proceso de determinación de un método de desinfección y un medio de cultivo para la multiplicación *in vitro* de “Camu camu” *Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaughn.

Las recomendaciones de esta investigación:

- Utilizar en posteriores trabajos, para la desinfección de explantes de “Camu camu” el tratamiento t1 (1% de hipoclorito de sodio y 5 minutos de exposición), realizando previamente el proceso correspondiente a la doble desinfección.
- Realizar investigaciones posteriores en “Camu camu”, probando concentraciones de auxinas y citoquininas utilizando como medio basal Woody (Lloyd and McCown, 1980) que arrojó excelentes resultados en las variables sobrevivencia y brotación de explantes y lograr mejores resultados en longitud y número de nudos/explante.
- Probar medios de cultivo para el enraizamiento *in vitro* de explante brotados de “Camu camu” y su posterior adaptación en invernadero y traslado definitivo al campo.
- Realizar investigaciones similares en otros frutales amazónicos promisorios, para incorporarlos y de esta manera enriquecer la diversidad de la chacra con la aplicación de nuevas tecnologías. Descriptores: camu camu, *in vitro*, explante, multiplicación, desinfección, sobrevivencia, brotación.

## SUMMARY

The Amazon fruits are characterized by little-known, with very low production and trade. However, they are considered promising because they have most agronomic traits suitable for sustainable farming in regions with poor soils should be managed through the establishment of agroforestry arrangements and ecological practices that contribute to the conservation of biodiversity. Currently, there are many natural products that are offered domestically and internationally due to its characteristic flavor, pleasant aroma and nutritional value, but few have amazing properties, such as camu camu, *Myrciaria dubia* HBK Mc Vaugh, a wild Myrtaceae native of the Amazon, whose importance lies in its high content of vitamin C that can reach up to 2.8 g/100 g of pulp. The demand for pulp is around 20000 t/year and growing country and Peru increased supply has reached just 200 t/year. One of the main problems is its optional out crossing, because its flowers are characterized deliver perfect style first and then within hours of the stamens, causing populations of individuals different from each other, so the use of biotechnology tools such as *in vitro* cultivation of crops allows us to obtain several thousands of seedlings of similar size and age, high-quality, high genetic value. Therefore in this research were the following objectives: Identify the disinfection method to obtain the highest survival rate, determine the culture medium to obtain the highest rate of multiplication and performing a financial analysis of the technology used in research.

The experimental work was conducted in the Tissue Culture Laboratory, Department of Biotechnology, Santa Catalina Experimental Station of National Livestock Research Institute, INIAP, located in the province of Pichincha, canton Mejia, parish Cutuglagua, at an altitude of 3050 m , latitude 00 ° 22 '00 "S and longitude 79 ° 32' W and conditions of the room for growth: average temperature is  $26 \pm 2$  ° C, relative humidity 40 - 60%, photoperiod 16 hours light, light intensity from 2000 to 3000 lux .

The experiment was divided into two stages: Phase I (Disinfection of explants) factors were studied in three concentrations of sodium hypochlorite (1%, 2% and 5%) and three exposure times (5, 10 and 15 minutes). Stage II (Multiplication *in vitro*) the factor under study was culture media.

In Phase I was analyzed by comparative charts, summary tables using frequency analysis, ranges, and calculating percentages. The experimental unit consisted of 5 test tubes 18 x 150 mm, with 5 ml of culture medium. The variables evaluated were the presence of fungi and bacteria, survival and sprouting of explants.

For the analysis of Phase II used a completely randomized design with 10 observations, the experimental unit consisted of 4 test tubes 18 x 150 mm, with 5 ml of culture medium and one explant for test tube, prior for analysis because the data collected from the variables, length of shoot and number of nodes per explant did not

show a normal distribution, statistical transformation was required by  $\sqrt{x+1}$ . This is because the measurement of the length of outbreak was made through the glass test tube so that accurate data lost. In addition, temperature, light, humidity and different aeration occurred in the growing room and are difficult to control in these experiments, one must take into account the heterogeneity of the explants in type cutting time of exposure to air before planting. The variables were: length of shoot, number of nodes/explant, the presence of fungi and bacteria, survival and sprouting of explants evaluated in the same way as in stage I, also calculated the rate of multiplication.

The material used was obtained from plants in the production of the Central Experiment Station of the Amazon Granja San Carlos, located in the province of Orellana, Canton Joya de los Sachas, parish San Carlos, at an altitude of 250 m, latitude 00 ° 21 '11 "S and longitude 76 ° 39', the outbreaks were adapted to the greenhouse and they extracted the explants for *in vitro* introduction to which was applied to the different disinfection treatments.

The main results were:

Stage I, contamination by fungi and bacteria which corresponds to 3.11% with isolated contamination in the treatments t1 (1% sodium hypochlorite, 5 minutes), t6 (2% sodium hypochlorite, 15 minutes) and t7 (5% Sodium hypochlorite, 5 minutes). Variables in the survival and sprouting explants had the best survival rates in t1 (1% sodium hypochlorite, 5 minutes) and t3 (1% sodium hypochlorite, 15 minutes) with 100% and for sprouting the best response was obtained in treatment 1 with 100% in the evaluation at 15 days and overall survival and sprouting of 70.22% and 56.44% respectively in the 15 days evaluation.

Stage II, the best result for the variable length of an outbreak in the evaluation at 15 and 30 days was in the culture medium m2 (M&S, activated carbon 3.0 g/liter, ascorbic acid 50 mg/liter, BAP 0.5 mg/liter, ANA 5 mg/liter, GA<sub>3</sub> 1.5 mg/liter, sucrose 20 g/liter and Agar 7 g/liter) with 9.98 mm and 12.16 mm respectively in the evaluation at 45 days the best response was obtained, in the middle of culture m3 (M&S, activated carbon 3.0 g/liter, ascorbic acid 50 mg/liter, IAA 5 mg/liter, GA<sub>3</sub> 1.5 mg/liter, sucrose 20 g/liter and Agar 7 g/liter.) to 14.38 mm. In the variable number of nodes/explant evaluation s at 15 and 30 days stands the culture medium with 2.35 and 2.65 m2 nodes/explant respectively, for evaluation after 45 days, the best result was observed in the culture medium m3 with 3.9 nodes/explant.

In the variable presence of fungi in the three evaluations were presented 0% of pollution in the four culture media, in the variable presence of bacteria contamination was observed in the middle 12% m4 (WPM, activated carbon 1.5 g/liter , sucrose 20 g/liter and Agar 7 g/liter), giving an overall contamination of 3.12%. For variables

survival and sprouting of explants in the assessments at 15 and 30 days, the best response was obtained in the culture medium m1 (M & S, activated carbon 1.5 g/liter, BAP 1.0 mg/liter, sucrose 30 g/liter, Agar 7 g/liter) with 100% survival and sprouting. The evaluation after 45 days, excel m4 medium with 97.5% survival and sprouting. The best multiplication rate was observed in the culture medium m3 (2.54 shoots/explant) at 30 days. In conducting an economic analysis of the technology of *in vitro* production of a plant to the multiplication phase costs U.S. \$ 0.40 compared to conventional production where a plant produced from botanical seed cost is 0.26 U.S. \$, however outstanding advantages genetic uniformity of plant material because plants are part of elites, availability of plants at any time of year, large-scale production in a relatively short time and will benefit the farmer plants using genetic quality and health is guaranteed production.

The results suggest the following conclusions:

- We tested the effectiveness of disinfectant (sodium hypochlorite) to obtain a low contamination by fungi and bacteria, the disinfection of explants "Camu camu".
- The treatment 1 (1% sodium hypochlorite and 5 minutes of exposure) gave the best results of germination and survival of explants and minimal contamination by pathogens, disinfection of explants "Camu camu".
- In the evaluation at 30 days the culture medium m2 (M & S, activated carbon 3.0 g/liter, ascorbic acid 50 mg/liter, BAP 0.5 mg/liter, ANA 5 mg/liter, GA<sub>3</sub> 1.5 mg/liter, Sucrose 20 g/liter and Agar 7 g/liter.) showed excellent results in the variables: shoot length, number of nodes/explant survival and sprouting of explants and multiplication rate in the evaluation of culture media for *in vitro* multiplication " Camu camu".
- In all of the culture medium m4 (WPM5, activated carbon 1.5 g/liter, sucrose 20 g/liter and Agar 7 g/liter) excelled in the variables survival and sprouting of explants in the evaluation of culture media for multiplication *in vitro* "Camu camu".
- The costs of plant production by *in vitro* culture are significantly larger and very marked benefits in the process of determining a method of disinfection and a culture medium for *in vitro* multiplication of "Camu camu" *Myrciaria dubia* HBK Mc Vaughn.



The recommendations of this research were:

- Use in further research, for the disinfection of explants "Camu camu" treatment 1 (1% sodium hypochlorite and 5 minutes of exposure), making the process previously for dual disinfection.
- Conduct further research on "Camu camu", testing concentrations of auxins and cytokinins used as Woody basal medium (Lloyd and McCown, 1980) yielded excellent results in the survival and sprouting variables explants and achieve better results in length and number of nodes/outbreak.
- Test culture media for in vitro rooting of explants sprouted from "Camu camu" and its subsequent adaptation in the greenhouse and final transfer to the field.
- Conduct similar research in other Amazonian fruits promising for incorporation and thus enrich the diversity of the farm with the application of new technologies. Keywords: camu camu, *in vitro*, explants, multiplication, disinfection, survival, sprouting.