



**INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE
INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS - INIAP**

ESTACIÓN EXPERIMENTAL: Santa Catalina

PROGRAMA/DEPARTAMENTO: Forestería/Biotecnología

PROYECTO: Programa Ecoregional de Investigación/Desarrollo de cadenas productivas y manejo sostenible de bosques en la amazonia ecuatoriana (21.00.047.001).

RESULTADO: **R3:** Generar y difundir tecnologías limpias para potenciar el aprovechamiento de las cadenas de valor de frutales amazónicos: guayaba, cocona, camu-camu, tampoi, asai, borojó, arazá y copoazú, en sistemas agroforestales en la provincias de Orellana y Sucumbíos

ACTIVIDAD: 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).

UBICACIÓN: Estación Experimental Santa Catalina

AUTOR: Noroña González Ana Marlene

CO-AUTORES: Dr. Jorge Grijalva Olmedo
Ing. Jacqueline Benítez

COLABORADORES: Estación Experimental Central de la Amazonia
Departamento de Biotecnología

FECHA DE INICIO: Enero 2009

FECHA DE TERMINACIÓN: Diciembre 2009

PRESUPUESTO: 7744.24 USD

FINANCIAMIENTO: INIAP (100 %)

1. ANTECEDENTES

Los frutales amazónicos, forman parte de la gran biodiversidad amazónica, se caracterizan por ser poco conocidos a escala nacional, con producción y comercio muy reducidos. Sin embargo, son considerados promisorios gracias a que la mayoría de especies poseen características agronómicas adecuadas para su cultivo sostenible; además de ser una fuente alternativa de producción para esta región, cuyos suelos en la mayoría de los casos de baja fertilidad; deben ser manejados mediante el establecimiento de arreglos agroforestales y prácticas ecológicas que contribuyan a la conservación de la biodiversidad. En la actualidad, han ganado gran interés en el mercado nacional e internacional debido a sus características de sabor, aromas agradables y valor nutricional (Fontagro, 2007).

La Región Amazónica constituye un espacio geográfico muy diverso y una de las zonas menos exploradas, con un alto desconocimiento del potencial productivo de especies vegetales que forman parte de sistemas integrados o agroforestales (INIAP, 2007). En la actualidad, hay innumerables productos naturales que se ofrecen en el mercado; sin embargo, son pocos los productos que tienen propiedades sorprendentes, como es el caso del camu-camu (Díaz, 2007).

El camu-camu *Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh pertenece a la familia de las Myrtaceae, es un frutal arbustivo silvestre, originario de la amazonía peruana que crece en las orillas anegables de los ríos; su conocimiento se detalla de hace 3 décadas, pero su cultivo fuera de su ambiente natural no estaba reportado, por ello en el Perú durante los últimos años, se ha realizado un gran esfuerzo de investigación de la especie, que ha permitido no sólo su domesticación, sino también la adaptación de su cultivo de las zonas inundables a las zonas no inundables, con excelentes resultados de producción equivalentes a 20 t/ha/año. Las mayores concentraciones de poblaciones naturales se encuentran en los ríos Amazonas, Ucayali, en el curso inferior del río Marañón y río Napo, cerca de la unión con el Amazonas. Esta especie está ampliamente distribuida en América del Sur, encontrándose en zonas de Brasil, Colombia, Venezuela y Ecuador (Taira, 2005, Díaz 2007).

Este frutal es sujeto cada vez de mayor atención por su alto contenido de vitamina C que llega a 2,700 mg por 100g de pulpa y equivale a casi 40 veces el de la pulpa de naranja. Además contiene tiamina, riboflavina, niacina y es rico en bioflavonoides (Gonzáles, 2002; Gutiérrez, 2003d; Verástegui, M., Estrada, R., Roca, W., 2003; Taira, 2005). Adicionalmente, posee pequeñas cantidades de calcio, hierro, tiamina y otros elementos fitoquímicos (Agro Acción Alemana, 2008). Actualmente y en función de los hábitos de consumo de países desarrollados como Estados Unidos, Japón y Alemania, es posible su introducción en estos mercados; la demanda internacional de pulpa congelada está por encima de las 20000 toneladas métricas anuales y sigue creciendo (Gutiérrez, 2003c). La oferta del Perú es de apenas 300 toneladas anuales (Verástegui, 2003).

La amazonía peruana y especialmente la selva baja, presenta condiciones medioambientales favorables para el crecimiento y desarrollo de este frutal, que es una especie relativamente nueva como cultivo, por esta razón en Perú el

Instituto Nacional de Investigación Agraria – INIA a través de la Subdirección de Investigación de Recursos Genéticos y Biotecnología en la Estación Experimental Agraria San Roque – Iquitos, cuenta con una colección de germoplasma integrada por 43 accesiones con alto potencial de rendimiento y buenas características de fruto; como resultado de 10 años de investigación (Imán, 2007). Por su parte en la amazonía ecuatoriana, la Estación Experimental Napo Payamino nombra el camu-camu entre las 542 accesiones de frutales amazónicos, que se han identificado y caracterizado. Así, mediante la actividad de mantenimiento de las colecciones de frutales amazónicos se detecta una alta concentración de diversidad en frutales pero muy baja variabilidad dentro de cada especie (Tapia, 2004).

Estudios realizados por Peters y Vásquez (1986); citado por Villachica (1996), señalan que las flores individuales de camu-camu son hermafroditas; durante la antesis, el estilo sale primero y después pasa un lapso de varias horas antes de que salgan los estambres e indican que este mecanismo es muy efectivo en evitar la autogamia. Aparentemente, en el momento en que emergen los estambres para liberar polen, el estigma ya no está receptible a la polinización. La dicogamia que muestra esta planta; sin embargo, no descarta la posibilidad de autofecundación por geitonogamia debido a la falta de sincronía floral. Polen de otras flores sobre la misma planta pueden efectuar hasta el 91% de polinización en base a esos resultados concluyen que el camu-camu presenta alogamia facultativa pero no obligatoria y que no tiene mecanismos de incompatibilidad genética.

Tradicionalmente, el camu-camu se ha propagado por semillas que tienen una viabilidad mayor a 90%, cuando recién se separan del fruto, pero es preferible la propagación asexual de clones seleccionados para tener una población de camu-camu uniforme, con un alto rendimiento de frutos de calidad industrial uniforme y un comportamiento agronómico promedio similar. Esto se consigue generalmente mediante la clonación de individuos genéticamente iguales o la fijación de líneas heterocigotas por autogamia. La clonación puede realizarse mediante injertos, estacas, acodos o cultivo de tejidos (micropropagación y embriones somáticos), que permitan una mayor disponibilidad de material selecto (Agro Acción Alemana, 2008). Al respecto desde el año 2000, la Universidad Nacional Agraria La Molina de Perú ha realizado varias investigaciones biotecnológicas de introducción, propagación clonal *in vitro* y microinjertación de camu-camu. Logrando estandarizar una metodología para la introducción de semillas, el establecimiento de un medio de cultivo para la propagación de explantes apicales y nodales obteniendo mejor respuesta de los explantes nodales y un prendimiento del 25% en la microinjertación. Aún no se reporta la adaptación de plantas en invernadero o campo (Gutiérrez *et al.*, 2000a; Gutiérrez *et al.*, 2000b; Gonzáles, 2002; Gutiérrez, 2003d).

En muchas investigaciones la biotecnología es una alternativa muy importante para regenerar y multiplicar las especies forestales, que de otra manera sería un proceso lento y difícil (Universidad Católica de Occidente, 2006); es una herramienta que contribuye a la conservación de la biodiversidad genética y a la innovación de procesos tecnológicos (Daquinta *et al.*, 2000), caracterizándose por la elevada tasa de multiplicación, en un tiempo relativamente corto y bajo condiciones controladas de laboratorio (Abedini *et al.*, 2000).

El establecimiento de plantaciones de camu-camu utilizando la tecnología disponible y la posibilidad de su cultivo en zonas intervenidas de la amazonía, podrían contribuir a disminuir la presión sobre las poblaciones nativas de plantas cuando aumente la demanda de esta fruta y contribuir al desarrollo de esta especie (Villachica, 1996). Su introducción en los sistemas agroforestales de la amazonía, tomando en cuenta la fragilidad de los suelos de esta zona, significa conservar el estado productivo de los suelos agrícolas o recuperar suelos degradados, incrementar la biodiversidad, garantizar una producción sostenible y diversificada (Nieto, *et al.*, 2005; INIAP, 2007).

2. JUSTIFICACIÓN

Tomando en cuenta la importancia del cultivo de esta fruta, el Programa Nacional de Forestería a través del proyecto INIAP/SENACYT “*Programa Ecoregional de Investigación/Desarrollo de cadenas productivas y manejo sostenible de bosques en la amazonía ecuatoriana*” pretende generar nuevas tecnologías que nos permitan disponer de suficiente material de siembra, de buena calidad y con características genéticas conocidas de esta especie y promover su establecimiento en sistemas agroforestales.

Para lograr este propósito y hacer frente a la particular forma de polinización de esta planta, que dará como resultado una población de individuos diferentes entre sí a través de una multiplicación sexual, se hará uso de herramientas biotecnológicas que permiten superar estas dificultades. Esto significa que de un individuo con características deseadas, se podrá obtener varios miles de plántulas de similar tamaño y edad, de alta calidad y elevado valor genético, en comparación de los métodos convencionales de propagación.

3. OBJETIVOS

General

Determinar un método de desinfección y un medio de cultivo para la multiplicación *in vitro* de camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh).

Específicos

Evaluar un método de desinfección, que permita obtener el mayor porcentaje de viabilidad de explantes para la introducción *in vitro* del camu-camu.

Evaluar un medio de cultivo, que permita obtener la mayor tasa de multiplicación *in vitro* de camu-camu.

Realizar un análisis económico de Presupuesto Parcial de la tecnología utilizada para la investigación.

4. HIPÓTESIS

H₀: El porcentaje de viabilidad de los explantes para la introducción *in vitro* de camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh) no es dependiente de los métodos de desinfección utilizados.

H₀: La tasa de multiplicación *in vitro* de camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh) no es dependiente del medio de cultivo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Características del lugar

5.1.1 Ubicación geográfica

La presente investigación se llevará a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo 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' W.

5.1.2 Características del laboratorio (cuarto de crecimiento)

Temperatura promedio	26 ± 2° C
Humedad relativa	60 – 70 %
Fotoperiodo	16 horas luz
Intensidad luminosa	2000 – 3000 lux

5.1.3 Ubicación geográfica de la zona de recolección del material vegetal

El material de trabajo será recolectado en 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 m, latitud de 00° 21' 11" S y longitud de 76° 39' W.

5.2 Materiales

5.2.1 Materiales de laboratorio

- | | |
|--------------------------|----------------------------|
| • Tubos de ensayo | • Agua destilada y estéril |
| • Cajas petri | • Recipientes de vidrio |
| • Probetas | • Sablón |
| • Vasos de precipitación | • Papel aluminio |
| • Erlenmeyer | • Papel toalla |

- Agitador
- Algodón
- Pinzas
- Alcohol
- Bisturí
- Mangos de bisturí
- Mechero

5.2.2 Equipo de laboratorio

- Cámara de flujo laminar
- Dispensador de medios
- Agitador magnético
- Destilador de agua
- Autoclave
- Estufa
- Humidificador
- Balanza de precisión
- Potenciometro

5.2.3 Reactivos

- Agar
- Medio Murashige y Skoog (MS)
- Ácido naftalenacético (ANA)
- Ácido indol acético (AIA)
- Carbón activado
- Ácido 2-4 diclorofenoxiacético (2-4D)
- Ácido giberélico (GA₃)
- Ácido indol butírico (AIB)
- Bencilaminopurina (BAP)

5.2.4 Material vegetal

- Yemas laterales obtenidas de segmentos de ramas jóvenes, recolectadas de plantas en producción.

5.2.5 Materiales y equipos de oficina

- Suministros de oficina

5.3 Etapas del experimento

5.3.1 Etapa 1: Desinfección de explantes

5.3.1.1 Factores en estudio

Métodos de desinfección (d):

d₁ = Doble desinfección (Modificado de Navarro, 2005). Ver anexo 1

d₂ = Desinfección con Hipoclorito de sodio (Mejía, 1994). Ver anexo 1

d₃ = Desinfección con Hipoclorito de calcio (Mejía, 1994). Ver anexo 1

Inhibidores de fenoles (i):

i_0 = Sin inhibidor de fenoles

i_1 = Ácido ascórbico 2mg/l/2horas (Mejía, 1994).

i_2 = Refrigeración a 4°C por 12 horas (comunicación personal, Ing. Benítez)

5.3.1.2 Tratamientos

Los tratamientos se generan a partir de la combinación de los factores en estudio y se detallan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Tratamientos para la determinación de un método de desinfección, que permita obtener el mayor porcentaje de vialidad de explantes para la introducción *in vitro* de camu-camu *Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh.

Tratamiento	Codificación	Descripción
T1	D1i0	Doble desinfección, Sin inhibidor de fenoles
T2	D1i1	Doble desinfección, ácido ascórbico (2mg/l/2horas)
T3	D1i2	Doble desinfección, Refrigeración a 4°C por 12 horas
T4	D2i0	Desinfección con Hipoclorito de sodio, Sin inhibidor de fenoles
T5	D2i1	Desinfección con Hipoclorito de sodio, ácido ascórbico (2mg/l/2horas)
T6	D2i2	Desinfección con Hipoclorito de sodio, Refrigeración a 4°C por 12 horas
T7	D3i0	Desinfección con Hipoclorito de calcio, Sin inhibidor de fenoles
T8	D3i1	Desinfección con Hipoclorito de calcio, ácido ascórbico (2mg/l/2horas)
T9	D3i2	Desinfección con Hipoclorito de calcio, Refrigeración a 4°C por 12 horas

5.3.1.3 Unidad experimental

La unidad experimental estará constituida por 1 tubo de ensayo de 18 x 150 mm, con 5 ml de medio de cultivo usado para introducción (Cuadro 3). Se sembrará un explante de 1 - 1.5 cm, con un nudo, de cada uno de los tratamientos en estudio.

5.3.1.4 Análisis Estadístico

Se utilizará un Diseño Completamente al Azar (DCA) en arreglo factorial 3×3 (tres métodos de desinfección x tres inhibidores de fenoles) con 5 observaciones

Cuadro 2. ADEVA para la determinación de un método de desinfección, que permita obtener el mayor porcentaje de viabilidad de explantes para la introducción *in vitro* de camu-camu *Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh.

Fuente de Variación (F de V)	Grados de Libertad (G L)
Total	44
Tratamientos	8
Antioxidantes (A)	2
Métodos de desinfección (D)	2
A x D	4
Error Experimental	36

5.3.1.5 Análisis Funcional

Se calculará el coeficiente de variación (CV) y se expresará en porcentaje (%).

Se aplicará la prueba de Tukey al 5%, para todas las variables que presenten diferencias estadísticas significativas.

5.3.1.6 Variables y métodos de evaluación

Presencia de hongos.

Por observación visual, se registrará la presencia o ausencia de micelio a los 5, 10 y 15 días a partir de la siembra en los explantes y en el medio de cultivo. Se calificará con 1 la presencia y con 0 la ausencia.

Presencia de bacterias.

Por observación visual, se registrará la presencia o ausencia de exudados en el explante o en la base de éste, en contacto con el medio de cultivo a los 5, 10 y 15 días a partir de la siembra. Se calificará con 1 la presencia y con 0 la ausencia.

Presencia de explantes viables.

Por observación visual, se registrará la viabilidad de los explantes a los 5, 10 y 15 días a partir de la siembra de los mismos. Se considerará como explantes viables a aquellos que mantengan las características iniciales de introducción y no viables a aquellos que presenten color amarillento, pardo, tejido necrosado y además que no presenten signos de hongos, ni bacterias. Se calificará con 1 a los explantes viables y con 0 los explantes no viables.

Porcentaje de viabilidad.

Se contabilizará el número de explantes viables (vivos) del total de explantes introducidos y se realizará la relación porcentual a los 15 días de realizada la siembra.

5.3.1.7 Manejo específico del experimento

Preparación de medio de cultivo

Se preparará 1000 ml de medio de cultivo para la introducción de camu-camu.

Cuadro 3. Medio de cultivo para la introducción *in vitro* de camu-camu *Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh

Reactivo	Descripción	Cantidad (g/l)
Medio basal	Medio de Murashige - Skoog (1962)	4.3
Antioxidante	Carbón activado	1.5
Azúcares	Sucrosa	30.0
Gelificante	Agar	8.0

FUENTE: Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Biotecnología, EESC, INIAP, 2007

Una vez ajustado el pH a 5.6 se colocará 5 ml del medio en cada tubo de ensayo. Posteriormente para su esterilización se autoclavará a 15 psi (121 °C) por 15 minutos, luego de este tiempo se sacará y cuando adquieran temperatura ambiental serán guardados en refrigeración a 4°C para su conservación.

Recolección de explantes

A partir de plantas en producción, de la Granja San Carlos de la Estación Experimental Central de la Amazonia, se colectará segmentos de ramas jóvenes con nudos e inmediatamente se colocarán en agua esterilizada, para evitar la deshidratación hasta el traslado al sitio definitivo en el laboratorio.

Desinfección de explantes

Los explantes recolectados en el campo serán sometidos a los tratamientos descritos en el Cuadro 1, los cuales se detalla en el Anexo 1.

Siembra de los explantes

Una vez que los explantes hayan sido sometidos a los correspondientes tratamientos, en la cámara de flujo laminar con la ayuda de los instrumentos necesarios se realizará varios cortes hasta obtener un explante con una yema axilar o apical de 0,5 – 1,0 cm. Luego se los colocará en un tubo de ensayo con medio de cultivo descrito en el Cuadro 3.

Incubación

Los tubos sembrados se colocarán en el cuarto de crecimiento durante 60 días, bajo condiciones controladas de 26°C $\pm$ 2°C de temperatura, 70% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16 horas luz, excepto los 4 – 5 primeros días que la especie necesita de oscuridad (Mejía, 1994).

5.3.2 Etapa II: Multiplicación *in vitro*

5.3.2.1 Factores en estudio

A partir de información bibliográfica se obtuvo diferentes medios de cultivo que fueron probados en guayaba y en camu-camu respectivamente; de estos se modificó y se obtuvo un medio (m2) para evaluar en la presente investigación en conjunto, debido a que el material vegetal con que fueron evaluados provenía de semilla sexual.

Medios de cultivo (m):

m1 = Medio de cultivo para Guayaba (Mejía, 1994)

m2 = Medio para camu-camu (Modificado de Mejía, 1994, Gutiérrez, 2003d)

m3 = Medio para micropropagación de camu-camu (Gutiérrez, 2003)

m4 = Medio para establecimiento *in vitro* de camu-camu (Colque, 2000)

5.3.2.2 Tratamientos

Los tratamientos corresponden a los medios de cultivo en estudio y se describen en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Tratamientos para la determinación de un medio de cultivo, que permita obtener la mayor tasa de multiplicación *in vitro* de camu-camu *Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh.

Tratamiento	Codificación	Descripción
T ₁	m ₁	Medio de cultivo para Guayaba
T ₂	m ₂	Medio modificado para camu-camu
T ₃	m ₃	Medio para micropropagación de camu-camu
T ₄	m ₄	Medio para establecimiento <i>in vitro</i> de camu-camu

5.3.2.3 Unidad experimental

La unidad experimental estará constituida por 1 tubo de ensayo de 18 x 150 mm, con 5 ml de medio de cultivo de cada uno de los tratamientos mencionados, donde se sembrará un segmento de un solo nudo de camu-camu.

5.3.2.4 Análisis Estadístico

Se utilizará un Diseño Completamente al Azar (DCA) con 10 observaciones.

Cuadro 5. ADEVA para la determinación de un medio de cultivo, que permita obtener la mayor tasa de multiplicación *in vitro* de camu-camu *Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh.

Fuente de Variación (F de V)	Grados de Libertad (G L)
Total	39
Tratamientos	3
Error Experimental	36

5.3.2.5 Análisis Funcional

Se calculará el coeficiente de variación (CV) y se lo expresará en porcentaje (%).

Se aplicará la prueba de Tukey al 5%, para todas las variables que presenten diferencias estadísticas significativas.

5.3.2.6 Variables y métodos de evaluación

Altura de planta.

Se medirá la longitud de la planta, desde la base del tallo hasta el ápice de la planta con la ayuda de una regla milimetrada a los 15, 30 y 45 días a partir de la siembra. El valor será expresado en mm.

Número de nudos por planta.

Por ayuda visual, se contarán los nudos que cada planta presente a los 15, 30 y 45 días a partir de la siembra.

Tasa de multiplicación.

Se registrará el número de explantes que pueda producir una planta a los 60 días en los diferentes tratamientos y se proyectará a un año.

5.3.2.7 Análisis económico

Se realizará un análisis económico de costo – beneficio utilizando la metodología del presupuesto parcial, para comparar el costo de producción de una planta por el método convencional versus el costo de producción de una planta *in vitro*. Para ello se tomarán en cuenta las siguientes variables: cantidad y costo de insumos, cantidad y costo de mano de obra, número de plantas producidas en un tiempo determinado.

5.3.2.8 Manejo específico del experimento

Preparación de medio de cultivo

Se preparará 1000 ml de medio de cultivo para micropropagación *in vitro* de camu-camu, de acuerdo a los tratamientos en estudio y se detallan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Medios para la multiplicación de explantes *in vitro* de camu camu *Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh

Medios	Medio basal	g/l	Antioxidante	g/l	Sucrosa g/l	Hormonas mg/l				Agar g/l
						BAP	ANA	AG ₃	AIA	
Medio 1	M&S(1962)	4.4	Carbón activado	1.5	30.0	1.0	-	-	-	7
Medio 2	M&S(1962)	4.4	Carbón activado	3.0	20.0	0.5	5.0-	1.5	-	7
			Ácido ascórbico	0.05						
Medio 3	M&S(1962)	4.4	Carbón activado	3.0	20.0	-	10.0	1.5	-	7
			Ácido ascórbico	0.05						
Medio 4	WPM(1980)	2.3	Carbón activado	1.5	20.0	-	-	-	-	7

Una vez ajustado el pH a 5.6 de todos los medios, se colocará 5 ml de los medios de cultivo en estudio, en cada tubo de ensayo; posteriormente para su esterilización se los autoclavará a 15 psi (121 °C) por 15 minutos, luego de este tiempo se los sacará y cuando adquieran temperatura ambiental se guardará en refrigeración a 4°C para su conservación.

Micropropagación de plantas *in vitro*

Se utilizarán explantes viables establecidos *in vitro* de camu-camu, provenientes del mejor tratamiento de la etapa de introducción, que no tengan hongos, ni bacterias y de 60 días de edad.

Los tubos de ensayo que contienen los explantes serán llevados a una cámara de flujo laminar donde con la ayuda de pinzas y bisturís serán segmentadas y sembradas en cada uno de los tratamientos en estudio.

Incubación

Una vez sembradas los explante en número de uno por cada tubo de ensayo se los identificará y llevará al cuarto de crecimiento bajo condiciones de crecimiento controladas de 26°C $\pm$ 2°C de temperatura, 70% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16 horas luz. Por 60 días.

6. PRESUPUESTO DEL PROYECTO

Cuadro 7. Presupuesto para la 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.

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Coefficiente de ponderación	Cantidad	Total (USD)
Becaria	mes	325,00	1,00	12	3900,00
Subtotal					3900,00
Insumos					
Medio M&S	l	3,70	1,00	15	55,50
Medio WPM	l	3,60	1,00	5	18,00
Bencilamino purina (BAP)	mg	0,11	1,00	30	3,30
Agar	g	0,34	1,00	200	68,00
Acido giberélico (AG3)	mg	0,05	1,00	100	5,00
Acido naftalenacético (ANA)	mg	0,07	1,00	100	7,00
Acido indol acético (AIA)	mg	0,04	1,00	100	4,00
Carbón activado	mg	0,01	1,00	500	5,00
Hipoclorito de Calcio	l	2,50	1,00	1	2,50
Hipoclorito de Sodio	l	2,70	1,00	1	2,70
Sucrosa	g	0,02	1,00	2000	40,00
Sablón	l	5,00	1,00	2	10,00
Alcohol	l	1,40	1,00	12	16,80

Agua destilada	l	0,30	1,00	50	15,00
Desinfectante	l	1,00	1,00	4	4,00
Jabón líquido	l	2,50	1,00	4	10,00
Zapatos para laboratorio	par	35,00	1,00	1	35,00
Mascarilla	Unidad	0,20	1,00	15	3,00
Guantes	par	0,70	1,00	24	16,80
Hojas de bisturí	Unidad	0,20	1,00	200	40,00
Papel absorbente	paquete	2,00	1,00	5	10,00
Papel aluminio	paquete	4,00	1,00	5	20,00
Rolopac	paquete	2,20	1,00	3	6,60
Cinta autoclavable	rollo	10,00	1,00	1	10,00
Fundas	unidad	0,01	1,00	100	1,00
Tubos de ensayo	unidad	0,80	1,00	250	200,00
Subtotal					609,20
Materiales					
Cajas petri	unidad	1,50	0,10	5	0,75
Probeta 1000ml	unidad	53,00	0,10	5	26,50
Probeta 100ml	unidad	23,00	0,10	5	11,50
Pipeta 1ml	unidad	25,00	0,10	5	12,50
Pipeta 10ml	unidad	15,00	0,10	5	7,50

Vasos de precipitación 250ml	unidad	20,00	0,10	5	10,00
Mangos de bisturí	unidad	33,00	0,10	3	9,90
Espátulas	unidad	30,00	0,06	2	3,60
Pinzas	unidad	27,60	0,04	3	3,31
Mecheros de alcohol	unidad	5,00	0,25	2	2,50
Tijeras	unidad	10,00	0,10	2	2,00
Marcadores	unidad	4,00	0,25	6	6,00
Bandejas	unidad	3,00	0,10	10	3,00
Mandiles	unidad	20,00	0,33	1	6,60
Barras magnéticas	unidad	1,00	0,04	3	0,12
Subtotal					105,78
Equipo					
pHmetro	unidad	760,00	0,04	1	30,40
Dispensador de medio	unidad	100,00	0,04	1	4,00
Agitador magnético	unidad	432,00	0,04	1	17,28
Autoclave	unidad	900,00	0,04	1	36,00
Estufa	unidad	1500,00	0,04	1	60,00
Cámara de flujo laminar	unidad	12500,00	0,04	1	500,00
Balanza de precisión	unidad	2500,00	0,04	1	100,00
Microonda	unidad	170,00	0,04	1	6,80

Refrigeradora	unidad	600,00	0,33	1	198,00
Subtotal					952,48
Materiales de oficina					
Papel A4	resma	4,00	1,00	2	8,00
Tinta de impresión	tones	35,00	1,00	2	70,00
Material fotográfico	unidad	20,00	1,00	4	80,00
Empastado del texto	unidad	10,00	1,00	6	60,00
Copias	unidad	0,03	1,00	500	15,00
Subtotal					233,00
Movilización del proyecto					
Viáticos y subsistencias	unidad	135,00	1,00	7	945,00
Combustible	galones	1,50	1,00	100	150,00
Pasajes aéreos	Unidad	120,00	1,00	4	480,00
Subtotal					1575,00
Subtotal					7375,46
Imprevistos	0,05				368,77
TOTAL					7744,24

7. CRONOGRAMA

Actividades	Mes											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Elaboración del proyecto												
Obtención del material vegetal												
Preparación de medios para introducción												
Introducción de material vegetal												
Toma de datos												
Análisis de datos												
Preparación de medios para micropropagación												
Micropropagación del material vegetal												
Toma de datos												
Análisis de datos												
Escritura de tesis												

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abedini, W., P. Boeri, L. Marinucci, M. Ruscitti y L. Celso. 2000. *Biotécnicas aplicadas a especies forestales nativas*. La Plata – Argentina. Disponible en: <http://www.inia.es/gcontrec/pub/abedi1049191338225.pdf> (7 – 01 – 2009)
2. Agro Acción Alemana. 2008. *Cultivo e información general de camu-camu*. Disponible en: http://www.camucamuperu.com/camucamu_informacion.htm (18 - 09 - 2008)
3. Colque, S. 2000. *Establecimiento in vitro de Camu-camu (Myrciaria dubia H.B.K. Mc Vaugh) a partir de segmentos nodales juveniles*. Disponible en: <http://www.inia.gob.pe/boletin/boletin0012/#TECNOLOGIAS%20AGRARIAS%20DEL%20INIEA> BOLETÍN CAMU CAMU (18-09-2008)
4. Daquinta, M., L. Ramos, I. Capote, Y. Lezcano, R. Rodríguez, D. Trina y M. Escalona. 2000. *Micropropagación de Teca (Teutona grandis L.F.)*. Revista Forestal Centroamericana. Comunicación técnica. Disponible en: <http://web.catie.ac.cr/información/RFCA/rev35/pagina25-28.pdf> (7 – 01 – 2009)
5. Díaz, V. 2007. *Tipos de Cultivos - Frutas Amazónicas, Cultivo de Camu-Camu*. Tecnología agrícola. Universidad Particular San Martín de Porres. Disponible en: http://www.concope.gov.ec/Ecuaterritorial/paginas/ApoyoAgro/TecnologiaInnovacion/Agricola/CultivosTradicionales/Cultivos/Frutas/frutas_am/textos/camuc.htm (18 – 09 – 2008)
6. FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria). 2007. *Investigación e innovación, organizativa y empresarial con organizaciones de pequeños productores, en la evaluación la producción, cosecha, poscosecha y usos de frutales amazónicos pertenecientes a la familia de Myrtaceae, arazá (Eugenia stipitata), camu-camu (Myrciaria dubia) y guayaba (Psidium guajava L.) con potencial para el desarrollo y fortalecimiento de cadenas de valor que contribuyan a la generación de ingresos y al mejoramiento de la calidad de vida de los productores de la región amazónica de los países Colombia, Perú y Ecuador*. s.n.t. Perfil de proyecto convocatoria extraordinaria. p 1.
7. Gonzales, R. 2002. *Microinjertación de camu-camu Myrciaria dubia (H.B.K) Mc Vaugh en dos patrones y cuatro medios de cultivo*. Loreto – Perú. Disponible en: <http://www.siamazonia.org.pe/Archivos/Publicaciones/MicroInjCamu.pdf> (06-11-2008)
8. Gutiérrez, A., E. Inguil, P. Tord, F. Falconi y J. Barbarán. 2000a. *Aplicaciones biotecnológicas en camu-camu. Myrciaria dubia (H.B.K) Mc Vaugh*. Universidad Nacional Agraria La Molina. Disponible en: <http://www.lamolina.edu.pe/cirgebb/articulocamucamucongresogenetica.pdf> (20-10-2008)
9. Gutiérrez, A., E. Inguil, M. Micky y M. Rodríguez. 2000b. *Avances en la introducción de genotipos de camu-camu Myrciaria dubia (H.B.K) Mc Vaugh a condiciones in vitro*. Universidad Nacional Agraria La Molina. Centro de Investigaciones en Recursos Genéticos y Biotecnología Vegetal. Disponible en: <http://www.lamolina.edu.pe/cirgebv/AvancesBiotecnologiaCamucamu.pdf> (18-09-2008)
10. Gutiérrez, A., 2003c. *“Uso sostenible de especies vegetales amazónicas de importancia económica: Cartilla para la propagación de camu-camu Myrciaria dubia H.B.K. McVaugh mediante injerto”*. Asociación trópicos. Centro de investigación en recursos genéticos y biotecnología vegetal – cirgebv. Fundación para el desarrollo

agrario – FDA. Disponible en: [http://www. Cartilla%202/inia.org.pe/](http://www.Cartilla%202/inia.org.pe/) (20-10-2008)

11. Gutiérrez, A., E. Inguil. 2003d. Micropropagación clonal *in vitro* de plántulas de camu-camu. *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh. Universidad Nacional Agraria La Molina. Centro de Investigaciones en Recursos Genéticos y Biotecnología Vegetal. Disponible en: [http://www.lamolina.edu.pe/ cirgebb/AGRUM-In-vitro.pdf](http://www.lamolina.edu.pe/cirgebb/AGRUM-In-vitro.pdf) (20-10-2008)
12. Imán, S., 2007. *Tecnología para la producción de camu-camu Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh en la región Loreto. Instituto Nacional de Investigación Agraria – INIA. Programa de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología en la Estación Experimental Agraria San Roque – Iquitos. Lima- Perú 50 p.
13. INIAP, 2007. *Contribuciones del INIAP a la Región Amazonía Ecuatoriana*. Publicación miscelánea No 134. 49 p.
14. Mejía, R., 1994. *Propagación comercial de 312 especies de plantas por cultivo in vitro*. La Molina. 364p.
15. Navarro, M., 2005. *Determinación de una metodología de desinfección y un medio de cultivo para la introducción y micropropagación in vitro de 12 ecotipos de ají (Capsicum sp.) y cuatro de tomate de árbol (Solamun betaceum)*. Tesis Ing. Agr. Universidad Técnica del Cotopaxi. 131p.
16. Nieto C., R. Ramos y J. Galarza. 2005. *Sistemas agroforestales aplicables en la sierra ecuatoriana*. Resultado de una década de experiencia en el campo. INIAP- Estación Experimental Santa Catalina. 195p.
17. Taira, F. 2005. *Demanda de Camu-Camu*. Universidad Particular San Martín de Porres. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos/10/formulac/formulac.shtml#FUNC> (20 -10 -2008)
18. Tapia, C. 2004. *Toma de datos sobre características morfológicas relevantes y de importancia económica en otros frutales promisorios: Camu- Camu Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh. Informe Técnico Anual. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Quito (Ecuador). Estación Experimental Santa Catalina. Departamento Nacional de Recursos Filogenéticos y Biotecnología. s.p.
19. UNIVERSIDAD CATÓLICA DE OCCIDENTE. 2006. *Metodología de micropropagación de cedro (Cederla odorata L.) y caoba (Swientenie humilis), obtenidos a partir de semilla seleccionada, establecidos bajo condiciones de laboratorio*. Disponible en: [http://www.unico.edu. sv/lti/download/2007/cedro_caoba.pdf](http://www.unico.edu.sv/lti/download/2007/cedro_caoba.pdf) (7 – 01 – 2009)
20. Verástegui, M., R. Estrada y W. Roca. 2003. *Embriogénesis Somática. Propagación clonal del “Camu-Camu” Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh. Disponible en: <http://www.lamolina.edu.pe/cirgebb/Cartilla%202.pdf> (20-10-2008)
21. Villachica, H. 1996. *El cultivo del camu-camu Myrciaria Dubia* H.B.K. Mc Vaugh en la amazonia peruana. Disponible en: <http://www.siamazoinia.org.pe/Archivo/Publicaciones/amazonia/Libros/46/46000#13htm> (20 -10 -2008)

9. ANEXOS

Anexo 1. Métodos para desinfectar explantes de camu-camu (*Myrciaria Dubia* H.B.K. Mc Vaugh)

DOBLE DESINFECCIÓN (Adaptado de Navarro, 2005)

- Lavar los segmentos de las ramas con agua corriente.
- Colocar jabón líquido y cinco gotas de povidín durante 5 minutos.
- Enjuagar con agua corriente.
- Colocar benomil al 1% por 5 minutos.
- Enjuagar con agua corriente.
- Llevar a la cámara de flujo laminar.
- Colocar en alcohol al 70% durante 60 segundos.
- Enjuagar por 2 minutos dos veces.
- Colocar en una solución de cloro comercial al 10%, con dos gotas de tween 20 por 10 minutos
- Lavar con agua destilada estéril hasta eliminar completamente la solución anterior.

DESINFECCIÓN CON HIPOCLORITO DE SODIO (Mejía, 1994. Para cultivo de guayaba)

- Lavar los segmentos de las ramas con agua corriente.
- Colocar jabón líquido y cinco gotas de povidín durante 5 minutos.
- Enjuagar con agua corriente.
- Colocar benomil al 1% por 5 minutos.
- Enjuagar con agua corriente.
- Llevar a la cámara de flujo laminar.
- Colocar en una solución de Hipoclorito de sodio al 10% por 10 minutos.
- Lavar con agua destilada estéril hasta eliminar completamente la solución anterior.

DESINFECCIÓN CON HIPOCLORITO DE CALCIO (Mejía, 1994. Para cultivo de Eucalipto)

- Lavar los segmentos de las ramas con agua corriente.
- Colocar jabón líquido y cinco gotas de povidón durante 5 minutos.
- Enjuagar con agua corriente.
- Colocar benomil al 1% por 5 minutos.
- Enjuagar con agua corriente.
- Llevar a la cámara de flujo laminar
- Colocar en agitación en una solución de hipoclorito de Calcio al 5% por 20 minutos.
- Lavar con agua destilada estéril hasta eliminar completamente la solución anterior.