

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS
BIOQUIMÍCAS Y BIOTECNOLÓGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA
BIOTECNOLÓGICA



“Establecimiento in vitro de Yemas y Efecto de Reguladores de Crecimiento ANA y BAP en la Micropropagación de *Polylepis rugulosa* (Queñua) de Zonas Altoandinas de Arequipa”

Presentado por la bachiller:
Katherine Lizbeth Zegarra Amézquita
Para optar el título profesional de:
Ingeniero Biotecnólogo

AREQUIPA

2014

DEDICATORIA

A mis padres por ser mi ejemplo, por
guiarme y haberme dado todo su amor.

A mí todo.



AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la sabiduría y fuerza para culminar esta etapa académica.

A mi papá por guiarme desde el cielo y por haberme dejado las enseñanzas para ser una persona de bien.

A mi mamá por ser un ejemplo de lucha, una guía en todo momento, por su dedicación y entrega.

A mi asesora Roxana Bardales por brindarme los conocimientos necesarios para culminar con el trabajo de investigación.

A Daniela por su apoyo constante e incondicional, por darme las fuerzas para seguir y por ser mi compañera en todo momento.

A José Alonso por la ayuda y consejos en todo momento.

A mi tío Oswaldo por todo su apoyo.

A mis familiares por su cariño y apoyo.

A todas aquellas personas que con paciencia y cariño me empujaron siempre a seguir adelante.

INDICE

Dedicatoria	I
Agradecimientos	II
Índice	III
Índice de tablas	VI
Índice de figuras	VIII
Resumen	XI
Abstract	XIII
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema	2
1.3 Objetivos	4
1.4 Hipótesis	5
Capítulo 2. Marco teórico	6
2.1 Características de la especie	6
2.1.1 Descripción Botánica	6
2.1.2 Distribución geográfica	6
2.1.3 Estado actual de la especie y factores antropogénicos	7
2.1.4 Importancia de la especie	7
2.1.5 Propagación de la especie <i>Polylepis</i>	8
2.2 Cultivo in vitro	9

2.2.1 Tipos de cultivo in vitro	9
2.2.2 Medios de cultivo y composición	10
2.2.3 Preparación del medio de cultivo	14
2.2.4 Factores que influyen en el cultivo in vitro de las especies vegetales	15
2.2.5 Etapas del cultivo in vitro en especies leñosas	18
Capítulo 3. Materiales y métodos	21
3.1 Fase de colecta	22
3.1.1 Localización geográfica	22
3.1.2 Plantas donadoras de explantes	22
3.1.3 Identificación de la especie	24
3.2 Fase de Laboratorio	24
3.2.1 Localización del ensayo	24
3.2.2 Período de Investigación	24
3.2.3 Materiales	24
3.2.4 Fase de establecimiento in vitro de <i>Polylepis rugulosa</i>	27
3.2.5 Fase de micropropagación in vitro de <i>Polylepis rugulosa</i>	32
Capítulo 4. Resultados y discusión	35
4.1 Fase de establecimiento in vitro de <i>Polylepis rugulosa</i>	35
4.1.1 Tratamiento con hipoclorito de sodio	36
4.1.2 Tratamiento con ácido ascórbico	41
4.1.3 Tratamiento con ácido giberélico	44

4.2 Fase de multiplicación in vitro de <i>Polylepis rugulosa</i>	48
4.2.1 Ensayo con reguladores de crecimiento ANA y BAP en medio <i>Murashige y Skoog</i>	48
4.2.2 Ensayo en medio <i>Woody plant</i>	60
4.2.3 Ensayo comparativo entre los medios <i>Murashige y Skoog</i> y el medio <i>Woody plant</i>	64
4.3 Discusión	69
4.3.1 Fase de establecimiento in vitro de <i>Polylepis rugulosa</i>	69
4.3.2 Fase de multiplicación in vitro de <i>Polylepis rugulosa</i>	70
Capítulo 5. Conclusiones	73
Capítulo 6. Recomendaciones	75
Capítulo 7. Referencias Bibliográficas	77
Anexos	83

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamiento de desinfestación de los explantes a tres concentraciones de hipoclorito de sodio y tres tiempos diferentes.	29
Tabla 2. Tratamientos para la etapa de multiplicación con tres concentraciones de ANA y cuatro concentraciones de BAP.	33
Tabla 3. Tratamientos en presencia y ausencia de reguladores de crecimiento.	34
Tabla 4. Porcentaje de explantes de Queñua sobrevivientes, contaminados y no contaminados en el tratamiento de desinfestación bajo tres concentraciones a tres tiempos diferentes de exposición de hipoclorito de sodio a los 8 días después del cultivo en el medio <i>Murashige y Skoog</i>	37
Tabla 5. Promedio de explantes no contaminados, contaminados, sobrevivientes y mortandad en tres concentraciones de hipoclorito de sodio.	39
Tabla 6. Promedio de explantes no contaminados, contaminados, sobrevivientes y mortandad en tres tiempo de exposición.	39
Tabla 7. Prueba de Tukey para el tratamiento con hipoclorito de sodio en tres concentraciones distintas en tres tiempos diferentes, generando 9 tratamientos para evitar la contaminación.	40
Tabla 8. Porcentaje de explantes de Queñua fenolizados y no fenolizados bajo tres concentraciones de ácido ascórbico a los 15 días del cultivo en el medio MS.	42
Tabla 9. Prueba de Tukey para el Tratamiento con ácido ascórbico en tres concentraciones distintas para evitar la fenolización.	44
Tabla 10. Tamaño y color de explantes de Queñua bajo 5 concentraciones de ácido giberélico a los 30 días después del cultivo en el medio MS.	45
Tabla 11. Prueba de Tukey para el Tratamiento con ácidogiberélico.	47

Tabla 12. Promedio del número de brotes y tolerancia de los 12 tratamientos con reguladores de crecimiento en el medio MS a los 7, 15, 21 y 28 días en 3 repeticiones por semana.	49
Tabla 13. Promedio de la longitud (mm.) de brotes y tolerancia de los 12 tratamientos con reguladores de crecimiento en el medio MS a los 7, 15, 21 y 28 días en 3 repeticiones por semana.	51
Tabla 14. Promedio del número de nudos y tolerancia de los 12 tratamientos con reguladores de crecimiento en el medio MS a los 7, 15, 21 y 28 días en 3 repeticiones por semana.	53
Tabla 15. Promedio del número de hojas y tolerancia de los 12 tratamientos con reguladores de crecimiento en el medio MS a los 7, 15, 21 y 28 días en 3 repeticiones por semana.	56
Tabla 16. Promedio de longitud de hojas (mm.) y tolerancia de los 12 tratamientos con reguladores de crecimiento en el medio MS a los 7, 15 y 21 días en 3 repeticiones por semana.	58
Tabla 17. Evaluación del número de brotes, número de nudos y número de hojas durante cuatro semanas en medio WP.	61
Tabla 18. Evaluación de la longitud de brotes (mm.) y longitud de hojas (mm.) durante cuatro semanas en medio WP.	61
Tabla 19. Longitud (mm.) de los explantes con y sin reguladores de crecimiento en el medio MS durante 4 semanas en el cultivo in vitro.	64
Tabla 20. Longitud (mm.) de los explantes con y sin reguladores de crecimiento en el medio WP durante 4 semanas en el cultivo in vitro.	66
Tabla 21. Prueba de Tukey para el Tratamiento con Medios MS y WP para la comparación en el crecimiento de los explantes.	68

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta donadora de explantes del bosque de <i>Polylepis rugulosa</i> proveniente de la zona del Colca.	22
Figura 2. Rama de un arbusto de <i>Polylepis rugulosa</i> , de las cuales obtendremos los explantes para la introducción in vitro.	23
Figura 3. Segmentos de ramas de 10-15 cm. llevadas al laboratorio para la obtención de yemas para la introducción en los medios de cultivo.	23
Figura 4. Lavado de los explantes con detergente.	28
Figura 5. Segmentos de brotes de <i>Polylepis rugulosa</i> después del tratamiento con detergente y fungicida.	28
Figura 6. Desinfestación del material vegetal con etanol al 70%.	29
Figura 7. Diagrama de flujo de la desinfestación del material vegetal con etanol e hipoclorito de sodio después del tratamiento con detergente y fungicida.	30
Figura 8. Aislamiento e inoculación de los explantes de <i>Polylepis rugulosa</i>	31
Figura 9. Explantes contaminados con hongos a los 8 días de iniciado el cultivo in vitro.....	36
Figura 10. Explantes sobrevivientes a la izquierda fenolizado y a la derecha sin fenolizar.	38
Figura 11. Porcentaje de explantes no contaminados después del tratamiento con hipoclorito de sodio.	40
Figura 12. Fenolización de explantes antes de la adición del ácido ascórbico...	42
Figura 13. Desarrollo de los explantes en el tratamiento 3.	43
Figura 14. Porcentaje de explantes no fenolizados producto de la adición de ácido ascórbico.	44
Figura 15. Explantes que presentaron color marrón oscuro.	45

Figura 16. Respuesta de los explantes en tratamiento 4.	46
Figura 17. Longitud de los explantes (mm.) en cinco concentraciones diferentes de AG3.	47
Figura 18. Desarrollo de brotes a las 4 semanas.	50
Figura 19. Promedio del número de brotes en 12 tratamientos con reguladores de crecimiento en el medio MS.	50
Figura 20. Longitud (mm.) de los brotes en el tratamiento 8 a las 4 semanas. ...	52
Figura 21. Promedio de longitud de brotes (mm.) en 12 tratamientos con reguladores de crecimiento en el medio MS.	53
Figura 22. Número de nudos producto en el tratamiento 8 a las 4 semanas. ...	54
Figura 23. Promedio del número de nudos en 12 tratamientos con reguladores de crecimiento en el medio MS.	55
Figura 24. Promedio de número de hojas en el tratamiento 12 a las 4 semanas. ...	57
Figura 25. Promedio del número de hojas en 12 tratamientos con reguladores de crecimiento en el medio MS.	58
Figura 26. Longitud (mm.) de las hojas en el tratamiento 8 a las 4 semanas. ...	59
Figura 27. Promedio del tamaño de hojas en 12 tratamientos con reguladores de crecimiento en el medio MS.	60
Figura 28. Longitud del explante a las 4 semanas de realizada la siembra en el medio WP.	62
Figura 29. Comparación del promedio del número de brotes, número de nudos y número de hojas en la cuarta semana en los medios WP y MS.	63
Figura 30. Comparación del promedio de la longitud de brotes (mm.), longitud de hojas (mm.) en la cuarta semana en los medios WP y MS.	63

Figura 31. Desarrollo de explantes con reguladores de crecimiento (ANA/BAP) y sin reguladores de crecimiento a las cuatro semanas del cultivo en el medio MS. ... 65

Figura 32. Longitud (mm.) de los explantes en el medio MS en presencia y ausencia de reguladores de crecimiento. 65

Figura 33. Desarrollo de explantes con reguladores de crecimiento (ANA/BAP) y sin reguladores de crecimiento a las cuatro semanas del cultivo en el medio WP... 67

Figura 34. Longitud (mm.) de los explantes en el medio WP en presencia y ausencia de reguladores de crecimiento. 67



RESUMEN

La especie *Polylepis* es una planta endémica del sur de los andes considerada en peligro de extinción, por lo cual es necesario desarrollar técnicas que promuevan su conservación. Se seleccionaron segmentos de ramas en buen estado retirando hojas y partes muertas se hizo un lavado con detergente y posteriormente con Benlate 2 g/L. durante 30 minutos, los brotes se lavaron con etanol al 70 % por 1 minuto para evaluar tres concentraciones de hipoclorito de sodio (0.65, 1.25 y 2.50 %) en tres tiempos de inmersión (2.30, 5.00 y 10.00min.) y se hicieron 3 enjuagues con agua destilada estéril durante 5 minutos cada uno. Los explantes fueron sembrados en tubos de ensayo conteniendo 8 ml. del medio de cultivo de *Murashige* y *Skoog*. Para evitar la fenolización de los explantes se utilizaron tres concentraciones de ácido ascórbico las cuales fueron 20 mM., 50 mM. y 100 mM. Para romper la dormancia se utilizó ácido giberélico en cinco tratamientos los cuales fueron; 0, 5, 10, 20 y 40 uM/L. de AG3. En la fase de micropropagación in vitro se trabajó con ANA (0; 0.5; y 1.0 uM.) y BAP (0; 1; 5 y 10 uM.). En la segunda etapa se utilizó el medio *Woody Plant* para observar si se daban diferencias significativas y hacer una comparación con el medio *Murashige* y *Skoog*. La tercera etapa consistió en la comparación entre los medios *Murashige* y *Skoog* y el medio *Woody Plant* en presencia y ausencia de ANA y BAP. Del ensayo con hipoclorito de sodio se observa que en una concentración de 2.5 % el promedio de explantes no contaminados es más alto, el porcentaje de sobrevivencia tuvo mejores

resultados en el mayor tiempo que fue de 10 minutos. El efecto del ácido ascórbico tuvo mejores resultados en la concentración de 100 mM/L., obteniéndose un 90 % de explantes no fenolizados. El mejor tratamiento para el ácido giberélico fue con 20 uM, ya que hubo mayor crecimiento de los explantes y se obtuvo el mayor número de explantes de color verde claro. En la etapa de micropropagación in vitro el mejor tratamiento fue el número 8 con 10 uM/L. de BAP y 0.5 uM/L. de ANA ya que se observó un mayor número de brotes. En la comparación que se hizo entre los medios MS y WP no se tuvo diferencias significativas demostrando que ambos medios nos dan buenos resultados. En la prueba en presencia y ausencia de reguladores de crecimiento se puede notar que su presencia es importante cuando se trata de la obtención de brotes, mientras que en su ausencia el tamaño (mm.) que se obtiene es mucho mayor.



ABSTRACT

The *Polylepis* specie is an endemic plant from the South of the Andes considered endangered specie, due to this, it's necessary to develop techniques which promote their conservation. Segments of branches in good conditions were chosen, removing the leaves and dead parts and washing them with detergent and later on with Benlate 2 g/L. for 30minutes, the sprouts were washed with ethanol at 70 % for 1 minute to evaluate three sodium hypochlorite concentrations (0.65, 1.25 and 2.50 %) in three immersion times (2.30, 5.00 and 10.00 min.) and 3 rinses were made with sterile distilled water for 5 minutes each. The explants were seeded in test tubes containing 8 ml. of *Murashige and Skoog* culture medium. To avoid the phenolisation of the explants three concentrations of ascorbic acid were used, concentrations which were 20 mM., 50 mM. and 100 mM. To break the dormancy, five gibberellic acid treatments at 0, 5, 10, 20 and 40 uM/L. of AG3 were used. During the in vitro micropropagation fase we worked with ANA (0; 0.5; and 1.0 uM.) & BAP (0; 1; 5 and 10 uM.). On the second stage we used the *Woody Plant* medium to see if significant differences were observed and make a comparisson with *Murashige and Skoog* medium. The third stage was comparing the *Murashige & Skoog* and the *Woody Plant* mediums in presence and absence of ANA and BAP. From the experiment with sodium hypochlorite we observe that in a 2.5 % concentration the average of explants not contaminated is higher, the percentage of survival had better results with the highest time, 10 minutes. The ascorbic acid effect had better results in a 100 mM/L. concentration, obtaining a 90 % of non-phenolized explants. The best treatment for the gibberellic acid was with 20 uM. since a bigger growth on the explants was observed and a greater number of light green colour explants were obtained. During the in vitro micropropagation stage the best treatment was number 8 with 10 uM/L. of BAP and 0.5 uM/L. of ANA since a greater number of sprouts were observed. On regards of the comparisson made between the MS and WP mediums, there were no significant differences showing that both mediums give us good results. On the experiment in presence and absence of growth regulators, the importance of the presence is well noticed when the target is obtaining sprouts, yet the absence of it improves their size (mm).

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

La especie *Polylepis* es una planta endémica del sur de los andes hasta parte de Bolivia y Chile que esta muy adaptado a condiciones extremas sobre los 3000 m.s.n.m. con precipitaciones escasas y heladas nocturnas, dándose también en la región de Arequipa, que se propaga por vía sexual que en su mayoría no llega a la producción de semillas debido a que en los últimos años ha sufrido una alarmante disminución poblacional debido a distintos factores antropogénicos como la tala del bosque, la extracción de leña, la introducción de otras especies y el incremento de las áreas de pastoreo ya que las plantas de Queñua son consumidas por el ganado y sembríos en la zona, lo cual está llevando a la especie a un proceso de extinción (Jameson S., Ramsay P., 2007; Kessler M., 2006; Renison D., Cingolani A., 2002).

Bajo condiciones naturales la recuperación de esta especie es complicada ya que las semillas presentan bajo poder germinativo según investigaciones realizadas por Prettell J., 1985 en Perú, *Polylepis incana* presentó valores de germinación 2-4 %. de acuerdo a experiencias realizadas en Argentina se reportó un 3.1 %. de plántulas germinadas para *Polylepis tomentella*, una dispersión pobre, lo que hace que la reproducción natural se efectúe a largo plazo (Quezada P., Rocabado K., 2005). El bajo poder germinativo podría estar relacionado a los fenómenos propios de la especie como la dicogamia y la dispersión anemófila (Cruz A., 1999).

A través del uso de técnicas de cultivo de tejidos vegetales, como la propagación *in vitro*, es posible desarrollar alternativas de conservación *ex situ*, especialmente en especies que presentan problemas reproductivos, como es el caso de la Queñua. Este tipo de técnicas tiene la ventaja de producir en forma masiva y en poco tiempo, gran cantidad de material vegetal, el cual puede ser utilizado para llevar a cabo programas de reforestación y restauración de poblaciones disminuidas o mantenimiento de poblaciones viables. (Vega K., et al., 2007).

1.2 Justificación del problema

Los bosques de *Polylepis* contienen una parte importante de la biodiversidad de Sudamérica (Yensen E., Tarifa T., 2001). De acuerdo con estudios ornitológicos en la región alto andina de Bolivia, más de 110 especies de aves utilizan los bosques de *Polylepis* y cerca de 40 especies dependen exclusivamente de estos bosques. Estos hábitats albergan especies endémicas y diferentes formas de vida vegetal, que incluyen plantas epífitas, lianas y numerosas especies herbáceas; además, incrementan la diversidad de mamíferos e insectos (Yensen E., Tarifa T., 2001).

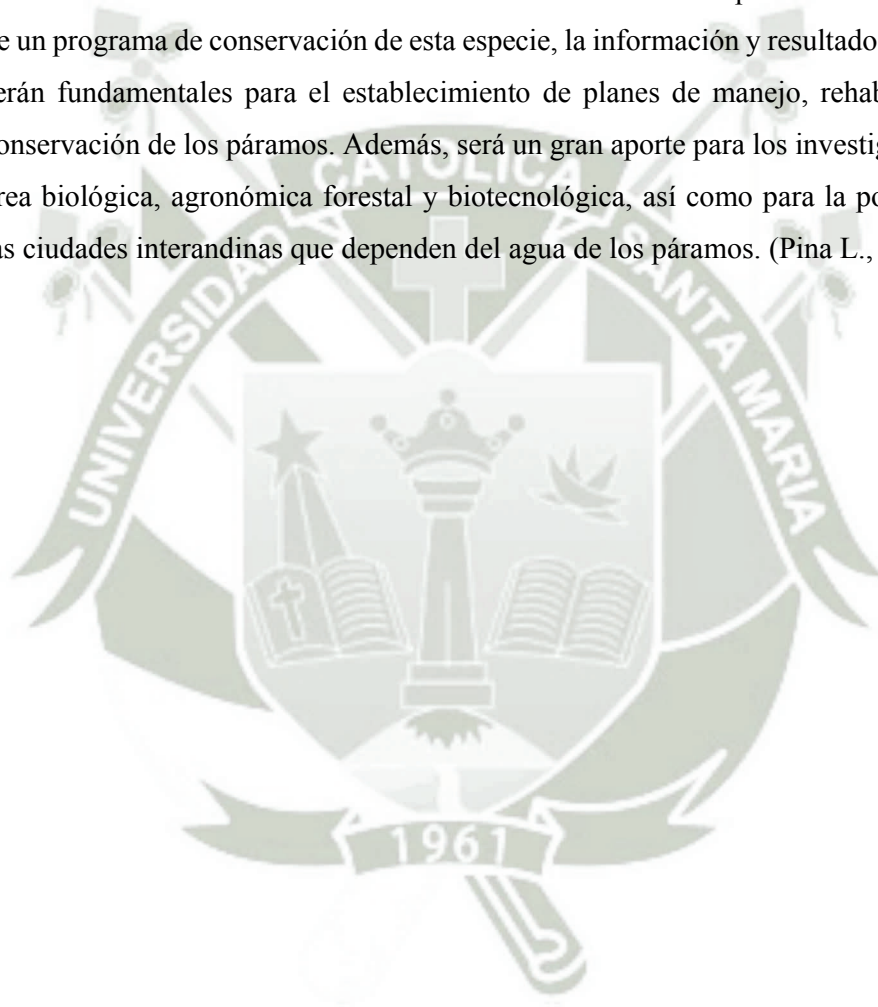
Estos bosques cumplen un rol central en la ecología alto andina, regulan la escorrentía, controlan los procesos erosivos, aumentan el aporte hídrico mediante la condensación de neblina en sus hojas, protege las cuencas, la calidad de los suelos y del agua y proveen de madera y combustible para los habitantes de la zona por lo que la pérdida de estos bosques generaría un gran impacto al ambiente y a la biodiversidad. (Renison D., Cingolani A., 2002). En la mayor parte de su distribución están en disminución debido al fuego, ganado y tala y su protección y regeneración es una prioridad. (Cabido M., Acosta A., 1985).

La importancia ecológica de estos bosques de montaña radica en el aumento de la humedad del aire y de las precipitaciones, las cuales son retenidas y filtradas a través de la vegetación lo que permite obtener, en forma gradual, agua de mejor calidad y la prevención de la erosión (Chebez J., 1994). Sin embargo, la distribución actual de las poblaciones de *Polylepis* ha ido disminuyendo de manera alarmante por procesos antropogénicos e introducción de especies, las cuales presentan mayores ventajas

adaptativas al medio, provocando un impacto negativo en los ecosistemas naturales (Jameson S., Ramsay P., 2007).

Por lo mencionado, se deben desarrollar estrategias para la conservación y restauración de estos bosques, siendo el cultivo in vitro una de las alternativas para la propagación de esta especie ya que en condiciones naturales y bajo diversos factores antropogénicos la recuperación de estos bosques es muy complicada (Vega K., et al., 2007).

La estandarización de la técnica de cultivo in vitro contribuirá para el establecimiento de un programa de conservación de esta especie, la información y resultados obtenidos serán fundamentales para el establecimiento de planes de manejo, rehabilitación y conservación de los páramos. Además, será un gran aporte para los investigadores del área biológica, agronómica forestal y biotecnológica, así como para la población de las ciudades interandinas que dependen del agua de los páramos. (Pina L., 2008).



1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Determinar las condiciones adecuadas para el establecimiento in vitro y evaluar los efectos de los reguladores de crecimiento Ácido naftalenacético (ANA) y Bencilaminopurina (BAP) en la multiplicación in vitro de yemas de *Polylepis rugulosa*.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Analizar la respuesta del cultivo in vitro de yemas (porcentaje de sobrevivencia, porcentaje de contaminación y porcentaje de fenolización) de plantas de *Polylepis rugulosa* de zonas alto andinas de Arequipa con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio en el establecimiento y bajo concentraciones de ácido ascórbico y AG3 en el medio de cultivo.
2. Evaluar la proliferación y tamaño de brotes de explantes (yemas) en diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento Ácido naftalenacético (ANA) y Bencilaminopurina (BAP) en el medio de cultivo.
3. Comparar la influencia de los reguladores de crecimiento (auxinas, citoquininas) en los medios de cultivo *Murashige* y *Skoog* y *Woody Plant* en la micropropagación de *Polylepis rugulosa*.

1.4 Hipótesis

Dado que existe una gran diversidad de especies arbóreas nativas en la región Arequipa como la Queñua (*Polylepis*) que por sus usos y la tala indiscriminada es una especie en peligro de extinción impidiendo la producción de semillas adecuadas para su propagación.

Es probable que la conservación ex situ y la propagación vegetativa sea una alternativa favorable en la multiplicación in vitro de la Queñua mediante la proliferación de brotes en menor tiempo capaces de proporcionar material vegetal sano para su posterior multiplicación; ya que se conocen diversas técnicas de multiplicación rápida como el cultivo in vitro de yemas vegetativas con el control de la asepsia en las técnicas de cultivo in vitro y con la utilización de diferentes reguladores de crecimiento (auxinas, citoquininas) en diferentes medios de cultivo.



CAPITULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 Características de la especie

2.1.1 Descripción Botánica

La especie *Polylepis rugulosa* es un arbusto o árbol de 3-5 m. de alto, corteza de color marrón rojizo, desprendiéndose en grandes trozos. Hojas imparipinnadas, con 1-3 folíolos ovalados, obovados a circulares, de 18-35 mm. de ancho y 19-68 mm. de largo, brillantes en el haz, con pelos blanquecinos en el envés; raquis lanoso. Vainas estipulares protuberantes en el ápice. Inflorescencias colgantes, de 45-100 mm. de largo. Las flores y frutos secos no se ven fácilmente ya que se hallan entre el follaje. Fruto aquenio lanoso, con 2-5 proyecciones planas de forma irregular con varias puntas (Kessler M., 1995).

Las flores son polinizadas por el viento y poseen características típicas de esta forma de polinización; es decir, flores con pétalos reducidos, estambres sobresalientes y un estigma amplio. Los frutos son aquenios, dispersados por el viento. (Roca W., Mroginski L., 1993).

2.1.2 Distribución geográfica

El género *Polylepis* comprende un grupo de especies leñosas que crecen a mayor altura en Sudamérica, incluye 28 especies de árboles y arbustos que se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo de la Cordillera de Los Andes, desde el norte de

Venezuela en el estado de Lara hasta Tarapacá en Chile y Córdoba en Argentina (Kessler M., Shmidt-Lebuhn A., 2006).

Polylepis rugulosa es una especie endémica de los bosques andinos desde Arequipa en el suroeste de Perú y en el norte de Chile, donde crece a altitudes inferiores a *Polylepis tarapacana* la “queñua de altura”, entre los 3400-4100 m. (Brako L., Zarucchi L., 1993).

2.1.3 Estado actual de la especie y factores antropogénicos

La especie *Polylepis* representa uno de los ecosistemas más amenazados del mundo y en el Perú. Estos bosques se encuentran ubicados en la parte oriental de Arequipa y tiene una extensión de aproximadamente 2000 hectáreas de *Polylepis* que abarcan las localidades de Mosopuquio, Chiguata, Piaca y Totorani (9.930 habitantes), las cuales han sufrido un progresivo y acelerado deterioro, producto del sobrepastoreo, tala irracional para leña o carbón e incendios lo que ha ocasionado la rápida disminución de estos importantes Bosques de Queñua.

Las áreas deforestadas se siembran con especies no nativas que a menudo son más exitosas y presentan ventajas como: rápido crecimiento en un mayor rango de sitios, facilidad en su manejo (Richardson D., 1998). Sin embargo, estas especies introducidas a menudo no logran proporcionar al ecosistema las características provistas por las plantas endémicas y pueden afectar negativamente al ambiente y a la biodiversidad o pueden también invadir otras áreas que no han sido plantadas. (Renison D., et al., 2005). Los bosques de *Polylepis* comúnmente son restringidos a laderas rocosas o quebradas, los estudios recientes son los que han demostrado que la distribución de este género es resultado de miles de años de actividades humanas en los Andes, como es la frecuente quema de pastizales y prácticas de cacería (Kessler M., 2006).

2.1.4 Importancia de la especie

Estos bosques de queñua son considerados como especies multifuncionales ya que juegan un rol muy importante en el ciclo hidrológico, hábitat, refugio de vertebrados e invertebrados y plantas asociadas al relicto, además de estabilizar los suelos, pueden

modificar las características extremas ambientales de las zonas alto andinas. Estos árboles tienen gran importancia económica para las comunidades indígenas que viven cerca de los mismos porque son fuente de madera para la cocción de alimentos, construcción de corrales y herramientas; como también es una planta medicinal utilizada para curar enfermedades respiratorias y renales y como tinte de tejidos; los bosques también son sustento para el pastoreo llamas, alpacas ovejas y vacas. (Boza H., et al., 2005).

Esta especie es utilizada como cercos vivos y como cobertura de protección al cultivo contra los vientos fríos y las heladas en zonas altoandinas en condiciones ambientales adversas, por otro lado su follaje que fácilmente se desprende del tallo es utilizado para abonar el suelo.

La madera de esta especie es dura e imputrescible y es utilizada en la construcción de techos como vigas, también la utilizan para la elaboración de artesanías y herramientas. Por el alto poder calorífico, la gran resistencia y dureza de la Queñua, se puede obtener importantes beneficios, además la corteza interna de esta especie es utilizada como medicina natural debido a sus propiedades: paliativo de las amigdalitis, inflamaciones en la garganta y resfríos.

2.1.5 Propagación de la especie *Polylepis rugulosa*

Propagación sexual

El tiempo entre el florecimiento y la madurez de los frutos es cerca de los dos meses y una vez que los frutos están maduros caen muy pronto. Entonces es necesario seguir de cerca el desarrollo para estar seguro de que la cosecha se ha hecho en el momento preciso. Cada inflorescencia contiene un limitado número de frutos y dada la baja capacidad de germinación considerables cantidades tienen que ser recogidas (Echenique V., et al., 2004).

Propagación asexual

La forma más común de propagación de la Queñua es por esta vía. Se practican 3 métodos: por esquejes o ramillas, por estacas convencionales o por acodos. Esta se la realiza en el vivero utilizando “esquejes preformados” que son ramas con “chichones”.

Este procedimiento se ha probado con éxito en *Polylepis racemosa*, existiendo un crecimiento y desarrollo de los plantones rápido. (Pretell J., 1985).

2.2 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de plantas o tejidos vegetales se define como el cultivo sobre un medio nutritivo en condiciones estériles de partes de una planta, semillas, embriones, explantes, tejidos, células y protoplastos. Se les proporciona artificialmente condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Roca W., Mroginski L., 1993).

Esta técnica se caracteriza porque ocurre a una micro escala sobre una superficie pequeña; se optimizan las condiciones ambientales refiriéndose a los factores físicos, nutricionales y hormonales; además se elimina por completo la presencia de microorganismos y organismos patógenos o plagas; generalmente no se reproduce el patrón normal de desarrollo de una planta, ya que de un tejido aislado puede originarse un callo u otro órgano o embriones somáticos (Pierik R., 1999).

La micropropagación es prácticamente una multiplicación masiva *in vitro* permitiendo reproducir cientos de clones de una misma especie o de plantas con genotipos selectos, además esta técnica permite obtener otras ventajas versus los métodos convencionales como son: reducir los tiempos de multiplicación; tener mayor control de sanidad, facilita el transporte de material *in vitro* de un país a otro y permite multiplicar grandes cantidades de plantas en espacios reducidos (Roca W., Mroginski L., 1993).

2.2.1 Tipos de cultivo *in vitro*

Existen varios tipos de cultivo *in vitro* y estrategias de propagación clonal debido a la diversidad de material vegetal que encontramos en la constitución de la planta. Dentro del cultivo de tejido desorganizado está el cultivo de callos y células en suspensión; y en el cultivo de estructuras organizadas está el cultivo de órganos y para propósitos de micropropagación los más importantes son: cultivo de meristemos, cultivo de ápices caulinares, cultivo de segmentos nodales y cultivo de embriones (Cardoza V., 2008).

2.2.2 Medios de cultivo y composición

Los medios de cultivo son combinaciones de minerales (macro y micro), agua, hidratos de carbono, vitaminas, reguladores de crecimiento y ocasionalmente otras sustancias varias. Pueden ser sólidos, semisólidos o líquidos según el protocolo del sistema de cultivo. Estos medios de cultivo proporcionan las sustancias esenciales para el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales (Richardson D., 1998).

Los requerimientos nutritivos para un crecimiento óptimo *in vitro* varían con la especie y pueden ser específicos de acuerdo a la parte de la planta o tipo de tejido que se cultiva y a la respuesta que se desea obtener. Esto se debe a que el crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por diversos factores como: la constitución genética de la planta, los nutrientes presentes en el medio de cultivo, los factores físicos (luz, temperatura, pH, etc.) y las sustancias orgánicas como reguladores, vitaminas, etc. (Pierik R., 1999).

Los principales componentes de los medios de cultivo son los siguientes:

2.2.2.1 Agua

Es el componente con mayor cantidad en el medio de cultivo, constituye el 95 % del medio, se recomienda usar agua destilada. La utilización de agua de grifo o agua corriente puede poner en peligro el desarrollo del cultivo, debido a que además de contener contaminantes orgánicos y microorganismos posee una alta concentración de iones de calcio y puede afectar precipitando ciertos componentes del medio de cultivo. (Suarez I., Salgado J., 2008).

2.2.2.2 Nutrientes minerales

Los nutrientes utilizados en los medios de cultivo son los mismos establecidos para la nutrición mineral de las plantas en el campo. Entre estos tenemos el nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio, magnesio, hierro, boro, molibdeno, cobre, zinc, manganeso y cobalto. (Pierik R., 1999).

2.2.2.3 Fuentes de carbono

Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, y por lo tanto es esencial agregar al medio una fuente de carbono para el crecimiento y desarrollo. Generalmente se usan concentraciones del 2 % al 5 % de sacarosa (un disacárido), ya que este se sintetiza y se transporta de forma natural por las plantas, se puede reemplazar por glucosa, fructuosa, maltosa y galactosa pero resultan ser menos efectivas. Las concentraciones de azúcar dependen mucho del tipo y edad del material vegetal, por ejemplo los embriones jóvenes y anteras requieren concentraciones altas del 6 % al 12 %, mientras que en protoplastos se usan concentraciones del 1.5 %. Generalmente el crecimiento y desarrollo aumenta con la concentración adecuada de azúcar, hasta que alcanza un punto óptimo, disminuyendo después por muy altas concentraciones (Pierik R., 1999; Roca W., Mroginski L., 1991).

2.2.2.4 Vitaminas

Las vitaminas favorecen el crecimiento de los tejidos en cultivos *in vitro* y la falta de alguna de ellas puede ser un factor limitante de los fenómenos de organogénesis.

La tiamina se puede usar en concentraciones de 0.1 a 5.0 uM/L., tiene un efecto claro en los medios de cultivo y es probable que en forma general sólo sea esencial incorporar tiamina al medio. También se ha visto efectos favorables al emplear, ácido nicotínico (0.1-5.0 uM/L.), piridoxina (0.1-1.0 uM/L.) y riboflavina (0.1-10.0 uM/L.) sobre el crecimiento de los cultivos.

El compuesto que más frecuentemente se añade a los medios de cultivo es el mioinositol que se emplea en concentraciones entre 50-500 uM/L. y su efecto se evidencia sobre la proliferación de tejidos y sobre la activación de la organogénesis. El ácido ascórbico (1-100 uM/L.) y el ácido cítrico (50-100 uM/L.) se utilizan en ocasiones no como vitaminas sino como antioxidantes para evitar el oscurecimiento de determinados tejidos. (Roca W., Mroginski L., 1991).

2.2.2.5 Agente gelificante

Los medios de cultivo pueden ser sólidos, semisólidos y líquidos según la concentración del agente gelificante, entre las sustancias más utilizadas se encuentra el agar, es un polisacárido obtenido de la purificación de las algas, este solidifica el medio y forma un complejo coloidal con débil poder de retención iónica. El agar presenta algunos inconvenientes; el principal consiste en ofrecer una aireación insuficiente que puede afectar el crecimiento de algunos tejidos (Pedroza A., et al., 2007).

La concentración óptima de agar es variable, las concentraciones más utilizadas varían entre 6-10 g/L. La pureza del agar también es otro factor muy importante, ya que es frecuente la presencia de impurezas de naturaleza variable, la marca comercial y las concentraciones de agar utilizado pueden alterar las respuestas *in vitro* de los cultivos (Quintero I., et al., 1993).

2.2.2.6 Reguladores de crecimiento

Las fitohormonas son compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen en el crecimiento y el desarrollo, se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades. Actualmente se agrupan en cinco categorías: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno.

Los reguladores como las citoquininas y las auxinas juegan un papel muy importante y generalmente el cultivo *in vitro* es imposible sin reguladores, aunque el añadir estos compuestos al medio de cultivo, depende del tipo explante y especie vegetal. (Pierik R., 1999).

2.2.2.6.1 Auxinas

La principal auxina es el ácido 3-indolacético (AIA), esta se la utiliza en concentraciones de 0.001-10 uM/L., con un punto óptimo alrededor de 0.1 a 1 uM/L. pero también se pueden emplear auxinas sintéticas y relativamente más activas como el ácido 3-indol butírico (AIB), el 2.4 D (ácido 2.4 diclorofenoxiacético), el ácido naftalenacético (ANA), el ácido 3 naftoxiacético (NOA), que son auxinas fuertes. (Roca W., Mroginski L., 1991).

Las propiedades de las distintas auxinas son diferentes, generalmente producen elongación celular, expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), y formación de raíces adventicias, inhibición de vástagos axilares y adventicios y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión. Con una baja concentración de auxinas predomina la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones de auxina no se producen raíces, y tiene lugar la formación de callos (Pierik R., 1999).

2.2.2.6.2 Citoquininas

Las citoquininas son derivados purínicos, en especial derivados de la adenina, se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y desarrollo, las más comunes son la Kinetina y el BAP. Generalmente estimulan la división celular, sobre todo si van en compañía de una auxina. En concentraciones elevadas (1-10 uM/L.) pueden inducir la formación de vástagos adventicios e inhibir la formación de raíces. Las citoquininas promueven la formación de vástagos axilares, porque disminuyen la dominancia apical, también retardan el envejecimiento (Pierik R., 1999).

Entre las citoquininas naturales tenemos la zeatina, la isopentenil-adenina (IPA), la dimetil amino-purina, etc. Son citoquininas sintéticas la kinetina (KIN: 6-furfunil aminopurina) el BAP o BA (N-6- bencilaminopurina o N6-benciladenina). (Guerra M., Nodari R., 2004).

2.2.2.6.3 Giberelinas

La giberelina más difundida es el AG3 o ácido giberélico, en la actualidad se conocen más de 90 giberelinas diferentes, aunque en una misma planta pueden encontrarse solo algunas de ellas.

Las giberelinas provocan el alargamiento celular, eliminan el enanismo de las plantas; estimulan la germinación de la semilla de cereales mediante la inducción de la producción de la α -amilasa, inducen la floración de plantas, eliminan la dormancia de las yemas, inducen la elongación de los entrenudos, el crecimiento de los meristemos o yemas *in vitro*. Generalmente se usa el AG3

en concentraciones que van de 0.01 a 1.00 mg/L., con un punto óptimo de alrededor de 0.10 mg/L. (Roca W., Mroginski L., 1991).

2.2.3 Preparación del medio de cultivo

Existen varias formulaciones de medios de cultivo, y para escoger el tipo de medio puede depender de la especie, tipo de explante u órgano empleado, la edad del órgano, la sensibilidad a concentraciones altas de sales, las necesidades de reguladores, etc. Una vez escogida la formulación adecuada del medio de cultivo, se procede a su preparación.

Para la preparación de medios de cultivo se debe usar reactivos analíticos, pesarlos utilizando espátulas limpias y emplear una balanza analítica suficientemente sensible. El agar y la sacarosa se deben pesar al momento de preparar el medio, los macro y micro elementos deben tomarse a partir de soluciones madres, al igual que las vitaminas y reguladores (Pierik R., 1999).

Todos los componentes deben quedar bien disueltos, se toma los volúmenes necesarios de cada solución se añade agua destilada hasta un volumen inferior al de litro, ya que primero se debe ajustar el pH alrededor de 5.7-5.8 usando HCl o NaOH (1.0 N. o 0,1 N.), una vez ajustado el pH se afora a un litro, se añade el agar, el cual mediante calentamiento y agitación debe disolverse totalmente, el medio deberá quedar como una solución translúcida para luego ser vertido en los recipientes (Echenique V., et al., 2004).

El pH es un factor muy importante al momento de la preparación de los medios de cultivo, el pH en el rango de 5-6 es apto para el crecimiento, pero un pH bajo (menor a 4.5) o muy alto (mayor que 7) puede frenar el crecimiento.

En el caso de tratarse de un medio líquido, no se coloca agar y se procede a dosificar directamente en los contenedores escogidos. Tanto si es un medio sólido como líquido se debe autoclavar los contenedores con el medio, generalmente a 121 °C durante 15-20 minutos.

2.2.4 Factores que influyen en el cultivo in vitro de las especies vegetales

2.2.4.1 Material vegetal

Se puede usar dos tipos de material vegetal, el que es cultivado bajo condiciones controladas en invernaderos o cámaras de ambiente controlado o plantas cultivadas en el campo, teniendo en cuenta que hay más probabilidades de contaminación del material de campo, con excepciones de algunos tejidos aislados del interior del vegetal.

Es recomendable usar plantas vigorosas para los experimentos, ya que las plantas débiles son susceptibles a virus o enfermedades. Es importante usar material vegetal sano libre de bacterias, hongos, ácaros, virus, etc.

El explante es una parte de un tejido o de un órgano que se aísla de la planta con fines de cultivo. Los explantes tomados de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo.

El tamaño del explante es un factor importante que influye en la desinfección y la regeneración de la planta, a medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración, mientras que con el aumento del tamaño del explante es mayor el peligro de contaminación y más rápido el crecimiento y la regeneración de planta. (Cabido M., Acosta A., 1985).

2.2.4.1.1 Esterilización del material vegetal

Existen diversas sustancias para realizar la esterilización química, como son: el etanol, el hipoclorito de sodio, el hipoclorito de calcio, el cloruro de mercurio, etc. El etanol, para material vegetal se usa al 70 %, ya que el de 96 % deshidrata demasiado los tejidos. Al esterilizar instrumentos, material o mesas se debe emplear el etanol al 90 % o 96 %, ya que el de 70 % deja una lámina de agua después de la evaporación.

El efecto desinfectante del cloro se debe a la liberación de cloro libre (Cl_2); a su vez, el Cl_2 reacciona con el agua para dar ácido hipocloroso, que a pH ácido o neutro es un oxidante fuerte. Las concentraciones y tiempos de inmersión varían según el tejido vegetal.

El proceso puede iniciarse con un lavado con agua, si es necesario eliminar capas externas de tejido, hacer lavados con detergente, finalmente se hacen tres lavados con agua estéril dentro de la cámara de flujo laminar. Todo el material con el que se trabaje dentro de la cámara debe ser estéril (Echenique V., et al., 2004).

2.2.4.1.2 Aislamiento e Inoculación

Se inicia la manipulación del explante empleando pinzas y bisturí, todas las partes afectadas por el hipoclorito deben ser retiradas, en caso de ser yemas se eliminan los primordios foliares y si es necesario se usan microscopios binoculares para el aislamiento de meristemas.

Cuando se inocular el explante en el tubo de ensayo o frascos de vidrio, estos deben mantenerse en posición horizontal para reducir el número de infecciones. Los meristemas o yemas se inoculan sobre el medio, con una pequeña porción de este introducido en el medio, hay que tener cuidado de no ingresarlos demasiado ya que se produciría una deficiencia de oxígeno. (Borges G., et al., 2009).

2.2.4.1.3 Repicado

El repicado o el cambio del explante a un medio nuevo, se realiza por diversas razones: El medio nutritivo está agotado, el tejido ha crecido y necesita más espacio o ser dividido, cuando hay exudados de color marrón o negro en el medio de cultivo (oxidación fenólica), cuando el medio nutritivo se ha secado se necesita cambiar la relación o concentración de reguladores de crecimiento, etc. (Batista J., 1999).

2.2.4.2 Factores Físicos

2.2.4.2.1 Temperatura

Determinar la temperatura óptima de crecimiento para cada cultivo in vitro puede ser un proceso muy laborioso, pero afortunadamente se pueden obtener resultados satisfactorios con temperaturas de incubación que oscilan entre los 20 y 28 °C. Generalmente en las cámaras de cultivo se mantiene temperaturas constantes de 24 a 26 °C, pero dependiendo de la especie experimental se puede elegir una temperatura más baja 18 °C o más alta 28-29 °C para especies tropicales (Afanador A., 2005).

2.2.4.2.2 Luz

Generalmente se eligen de 14 a 16 horas de luz, aunque otros cultivos usan luz continua y en casos muy especiales se realiza el cultivo en completa oscuridad. (Afanador A., 2005).

Se asume que las necesidades de luz de los cultivos in vitro son inferiores a las de la planta in vivo, dado que el medio de cultivo contiene cantidades importantes de sacarosa, los cultivos in vitro se comportan sólo parcialmente de forma autotrófica. Además de un aumento notable de la temperatura dentro del recipiente de cultivo. (Afanador A., 2005).

2.2.4.2.3 Humedad

La humedad dentro de los tubos de ensayo o recipientes es relativamente alta, y puede presentarse problemas si la cámara de crecimiento presenta humedades relativas menores al 50 %, debido a una pérdida de agua desde los tubos de ensayo, concentrando las sales del medio, lo cual es tóxico para los explantes. Sin embargo una elevada humedad en la cámara puede influir en una mayor cantidad de infecciones o contaminación. (Batista J., 1999).

2.2.4.2.4 Oxígeno

La formación de órganos, especialmente la formación de raíces adventicias; es facilitada por un mayor disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo. Se

ha comprobado que los esquejes de especies leñosas encuentran grandes dificultades en regenerar sus raíces cuando sus bases se encuentran en agar. La formación de raíces *in vivo* es mucho mejor en un medio líquido o en sustrato airado. (Batista J., 1999).

2.2.5 Etapas del cultivo *in vitro* en especies leñosas

En los últimos años ha nacido el interés por especies leñosas amenazadas o en vía de extinción, un claro ejemplo a nivel de Latinoamérica son las especies del género *Polylepis* como es el caso de *Polylepis tomentella* cuya propagación fue mediante técnicas de cultivo *in vitro*, los estudios de micropropagación en esta especie tuvieron como prioridad recuperar las poblaciones de *Polylepis tomentella* las cuales eran afectadas constantemente por diversos factores antropogénicos (Vega K., et al., 2007).

En la mayoría de especies vegetales leñosas al realizar la propagación vegetativa utilizamos la técnica del cultivo *in vitro* influyendo desde la obtención de la muestra, hasta el establecimiento y la obtención de nuevos explantes.

2.2.5.1 Etapas de la micropropagación

2.2.5.1.1 Etapa 0: Preparación y selección de plantas donadora

En esta etapa se selecciona el material vegetal que se utilizará como fuente de explantes y que debe provenir de plantas sanas y vigorosas, garantizando la propagación de un material con la mayor calidad desde el punto de vista genético y fitosanitario según los fines que se persigan.

2.2.5.1.2 Etapa 1: Establecimiento del cultivo *in vitro* aséptico

En esta fase los principales procesos a controlar son el aislamiento, inoculación y esterilización de los explantes (Echenique., 2004). En otros casos debe también controlarse la oxidación fenólica de los explantes ya que estos exudados pueden inhibir el desarrollo y el crecimiento, esto se puede contrarrestar con antioxidantes, o modificaciones en la composición del medio, etc. (Hartmann H., Kester D., 1997).

En esta etapa también pueden observarse infecciones por bacterias y hongos que sobreviven a los tratamientos de esterilización y patógenos endógenos latentes dentro del sistema vascular, resultado de una esterilización inefectiva de los explantes. Estos patógenos latentes podrían manejarse mediante el empleo de bacteriostáticos o antibióticos en el medio de cultivo (Echenique V., et al., 2004).

2.2.5.1.3 Etapa 2: Multiplicación

En esta etapa el objetivo es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (Echenique V., et al., 2004).

La proliferación de brotes axilares se logra con la adición de citoquininas al medio de cultivo para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas. El uso de citoquininas es generalizado en dependencia del balance endógeno de auxinas y citoquininas en los explantes.

Generalmente esta etapa es la más difícil de superar por la gran mortandad de los explantes (yemas), por contaminación microbiana, necrosis de explantes, fenolización, etc. influyendo en el éxito de la micropropagación o multiplicación. (Echenique V., et al., 2004).

2.2.5.1.4 Etapa 3: Enraizamiento y elongación

En esta fase los brotes obtenidos durante la etapa de multiplicación crecen hasta formar plantas completas y desarrollan un sistema radical que les permite ser trasplantadas a un sustrato, pero no siempre esta fase es llevada a cabo en condiciones *in vitro*, existiendo la posibilidad de hacerlo en recipientes con sustratos en condiciones de semilaboratorio, sumergiendo los brotes antes del trasplante en una solución enraizadora. En las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en las especies leñosas es complicado por su limitada capacidad rizogénica (Echenique V., et al., 2004).

2.2.5.1.5 Etapa 4: Aclimatación

Las plantas enraizadas se sacan a recipientes de cultivo, se lava por completo el agar que llevan adherido, debido a que es una fuente potencial de contaminación (Hartmann H., Kester D., 1997). Los sustratos empleados en esta etapa están compuestos por mezclas de arena, suelo, materia orgánica, vermiculita o zeolita, con una estructura física que permita un fácil crecimiento de la joven plántula. Las plantas permanecerán durante cierto tiempo hasta alcanzar un tamaño que le permita ser plantadas en el campo. (Hjarsen T., 1997).

2.2.5.2 Control de la Oxidación fenólica en especies leñosas

Algunas plantas en especial las leñosas producen exudados de color marrón o negro, la presencia de estos compuestos se encuentra asociada con tejidos vegetales sometidos a situaciones de estrés, tales como aquel provocado por el daño mecánico producido durante el aislamiento del explante de la planta madre, estos exudados son compuestos del tipo polifenol oxidados y taninos, que generalmente hacen imposible el crecimiento y desarrollo en el cultivo in vitro de tejidos vegetales. (Hjarsen T., 1997).

Existen algunas formas de controlar o prevenir la oxidación como adicionar carbón activado al medio; adicionar PVP (250-1000 mg/L.) el cual es un polímero que adsorbe las sustancias de tipo fenólicas, también se suele emplear soluciones antioxidantes de ácido cítrico, ácido ascórbico, tiourea o L-cisteína, estos compuestos pueden impedir la oxidación fenólica. (Hjarsen T., 1997).

CAPITULO 3

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo de investigación comprende dos etapas:

La primera etapa fue la fase de establecimiento a partir de yemas de plantas de Queñua desarrolladas en campo obtenidas de dos puntos el primero fue el Valle del Colca y el segundo la ciudad de Arequipa, esta fase se realizó en 3 ensayos o etapas los cuales fueron:

1. El tratamiento con hipoclorito de sodio en tres concentraciones distintas en tres tiempos diferentes, generando 9 tratamientos para evitar la contaminación.
2. En el segundo ensayo se evaluó el efecto del ácido ascórbico en tres concentraciones distintas para evitar la fenolización.
3. Finalmente se evaluó el efecto del ácido giberélico usando cinco concentraciones para romper la dormancia.

La segunda etapa fue la fase de multiplicación la cual se realizó en tres ensayos:

1. En el primer ensayo se trabajó con reguladores de crecimiento los cuales fueron ANA y BAP en doce tratamientos para evaluar su efecto y determinar el promedio de número de brotes, longitud de brotes, número de nudos, número de hojas y longitud de hojas.
2. En el segundo ensayo se utilizó el mejor tratamiento que obtuvimos en el primer ensayo, pero en esta etapa se utilizó el medio *Woody Plant* para observar si se daban diferencias significativas entre los medios.

3. El tercer ensayo consistió en la comparación entre los medios *Murashige* y *Skoog* y el medio *Woody Plant* en presencia y ausencia de ANA y BAP generando cuatro tratamientos.

3.1 Fase de colecta

3.1.1 Localización geográfica

En los primeros ensayos el material empleado fue recolectado de la zona del Colca-Arequipa, una vez conocida e identificada la planta se procedió a su localización en la ciudad de Arequipa para que sea más sencillo el trabajo de traslado y su manejo en el laboratorio.

Se ubicaron dos árboles de Queñua los cuales se encuentran en el distrito de Yanahuara y el otro en Cerro Juli en las instalaciones del INIA.

3.1.2 Plantas donadoras

Unos de los explantes más usados para la micropropagación son las yemas apicales o axilares las cuales poseen tejido meristemático, ya que mientras más joven y menos diferenciado sea el tejido mejor será la respuesta in vitro (Roca W, Mroginski L, 1991). (Figura 1.)



Figura 1. Planta donadora de explantes del bosque de *Polylepis rugulosa* proveniente de la zona del Colca.

Se recolectaron muestras de material vegetal que consistió en segmentos de ramas mediante una selección in situ de plantas proveedoras o donadoras de ramas (figura 2).



Figura 2. Rama de un arbusto de *Polylepis rugulosa*, de las cuales obtendremos los explantes para la introducción in vitro.

La toma de muestras se realizó mediante colecta manual, se realizó cortes de ramas de 10-15 cm. de longitud que presentaban yemas apicales y laterales (figura 3).

Una vez recolectadas las muestras, estas fueron colocadas en bolsas plásticas de polietileno, con 100 ml. de agua destilada y estéril a fin de evitar la pérdida de humedad y reducir el proceso de deterioro fisiológico del material vegetal; las bolsas se empacaron en un cooler para evitar daños mecánicos durante el transporte al laboratorio y conservar una temperatura baja para impedir la proliferación de microorganismos contaminantes (Vega K., et al., 2007). Este trabajo se realizó en la colecta que se hizo del Valle del Colca.



Figura 3. Segmentos de ramas de 10-15cm. llevadas al laboratorio para la obtención de yemas para la introducción en los medios de cultivo.

3.1.3 Identificación de la especie

Para verificar la identidad taxonómica del material vegetal colectado, se contó con la ayuda del herbario de la UNSA (Bióloga Fátima Cáceres), quien indicó que la planta correspondía a la especie *Polylepis rugulosa*.

3.2 Fase de Laboratorio

3.2.1 Localización del ensayo

El trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio H-302 de la Universidad Católica de Santa María, localizada en la Urb. San José s/n Umacollo Arequipa-Perú.

3.2.2 Período de Investigación

El tiempo que se empleó para el desarrollo de la investigación fue de 16 meses.

3.2.3 Materiales

Los materiales que se emplearon en la preparación de medios de cultivo fueron:

Materiales de vidrio

- Matraz, 250 ml.
- Beaker, 250 ml.
- Tubos de ensayo.
- Vaso de vidrio.
- Bagueta.
- Pipetas de 10, 5 y 1 ml.
- Probeta 1000 ml.
- Frascos de vidrio.

Equipos

- Autoclave. (H.W. Kessel S.A. modelo 290104. Italia).
- Microondas. (Samsung Ame-610W).
- pH metro. (Hanna instruments pH 213 microprocessor pH meter).
- Refrigerador. (Coldex).

Reactivos de los medios de cultivo.

- Macronutrientes:
 - Nitrato de amino
 - Nitrato de potasio
 - Cloruro de calcio
 - Sulfato de magnesio
 - Fosfatomonobásico de potasio
 - Sulfato de potasio
 - Nitrato de calcio
- Micronutrientes:
 - Sulfato de manganeso
 - Sulfato de zinc
 - Ácidobórico
 - Yoduro de potasio
 - Molibdato de sodio
 - Sulfato de cobre
 - Cloruro de cobalto
- Fuente de fierro:
 - Ácidoetilendiamino tetra acético
 - Sulfato ferroso
- Vitaminas:
 - Acido ascórbico
 - Glicina
 - Acido nicotínico
 - Piridoxina.HCl
 - Tiamina.HCl
 - Mio-inositol

- Fuente de carbohidratos:
Sacarosa
- Reguladores de crecimiento:
ANA
BAP
AG3
- Agente gelificante:
Phytigel

Los materiales que se emplearon en el cultivo in vitro fueron:

Material de vidrio

- Beaker 100 ml.
- Tubo de ensayo 10 ml. (17 mm. x 100 mm.)
- Matraz 100 ml.
- Frascos de vidrio.

Material biológico

- Yemas de *Polylepis rugulosa* (Queñua).

Equipos

- Cámara de flujo laminar horizontal. (H.W. Kessel S.A. Flow 180H).

Otros

- Pinzasratón.
- Bisturí numero 3.
- Hojas de bisturí numero 11.
- Algodón.
- Ligas.

- Film de polietileno.
- Papel craft y papel periódico estéril.
- Mechero.

Materiales químicos

- Etanol al 70 % y 96 %.
- Hipoclorito de sodio al 0.65 %, 1.25 %, 2.50 %.
- Agua destilada esterilizada.
- Fungicida (benlate).

3.2.4 Fase de establecimiento in vitro de *Polylepis rugulosa*

La fase de establecimiento se realizó en tres ensayos utilizando el medio *Murashige y Skoog*:

1. El tratamiento con hipoclorito de sodio en tres concentraciones distintas en tres tiempos diferentes, generando 9 tratamientos para evitar la contaminación.
2. En el segundo ensayo se evaluó el efecto del ácido ascórbico en tres concentraciones distintas para evitar la fenolización.
3. Finalmente se evaluó el efecto del ácido giberélico usando cinco concentraciones para romper la dormancia.

Previo a la fase de establecimiento se realizó la preparación del material vegetal.

3.2.4.1 Preparación del material vegetal

Los segmentos de ramas de 10 a 15 cm. que se llevaron al laboratorio para el establecimiento fueron cortadas en partes más pequeñas para hacerles un lavado con detergente (3 g. detergente/500 ml. de agua) por 5 minutos, después de esto se hicieron 3 lavados con agua destilada agitando fuertemente para retirar todo el detergente (Figura 4).



Figura 4. Lavado de los explantes con detergente.

Los segmentos de ramas en mejor estado fueron cortados con una longitud de 4-5 cm. (figura 5). obteniendo brotes, retirando hojas y partes muertas de los explantes se hizo un lavado con benlate 2 g/L. (fungicida) durante 30 minutos y después nuevamente 3 lavados con agua destilada estéril durante 5 minutos cada uno agitando fuertemente.



Figura 5. Segmentos de brotes de *Polylepis rugulosa* después del tratamiento con detergente y fungicida.

Los brotes fueron colocados en un vaso de precipitación con agua destilada para conservar el material en buen estado para ser llevados a la cámara de flujo laminar horizontal y poder iniciar con la fase de desinfestación.

3.2.4.2 Desinfestación del material vegetal

Como primera etapa de la fase de establecimiento se utilizó el medio nutritivo *Murashige* y *Skoog* para realizar el cultivo in vitro, la desinfestación del material vegetal se realizó con hipoclorito de sodio previo a la introducción in vitro. (Figura 6).

Después de eliminar el detergente y el fungicida, se procedió a la manipulación del material vegetal para obtener las yemas con las que se trabajará, todo esto se realizó en una cámara de flujo laminar con material totalmente estéril la cual se desinfectó con etanol al 96 %. Los explantes de 4 cm. se lavaron con etanol al 70 %. por 1 minuto, (figura 6) los explantes deben quedar completamente cubiertos, finalizado este tiempo se eliminó el etanol. Luego se evaluaron tres concentraciones de hipoclorito de sodio (0.65, 1.25 y 2.50 %) y tres tiempos de inmersión distintos (2.30, 5.00 y 10.00 min), generando 9 tratamientos (tabla 1). Para cada tratamiento de desinfestación se realizaron tres enjuagues consecutivos en agua destilada estéril, cada uno de cinco minutos, dentro de las cámaras de flujo laminar (Sánchez M., Salaverría J., 2004).

Tabla 1. Tratamiento de desinfestación de los explantes a tres concentraciones de hipoclorito de sodio y tres tiempos diferentes.

Tiempo	Hipoclorito de sodio %		
	0.65	1.25	2.50
2.30	0.65/2.30	1.25/2.30	2.50/2.30
5.00	0.65/5.00	1.25/5.00	2.50/5.00
10.00	0.65/10.00	1.25/10.00	2.50/10.00



Figura 6. Desinfestación del material vegetal con etanol al 70 %. durante 1 minuto.

DESINFESTACION DEL MATERIAL VEGETAL PARA FASE DE ESTABLECIMIENTO:

30 explantes por matraz, previamente lavados con detergente y benlate.

Hipoclorito de sodio %

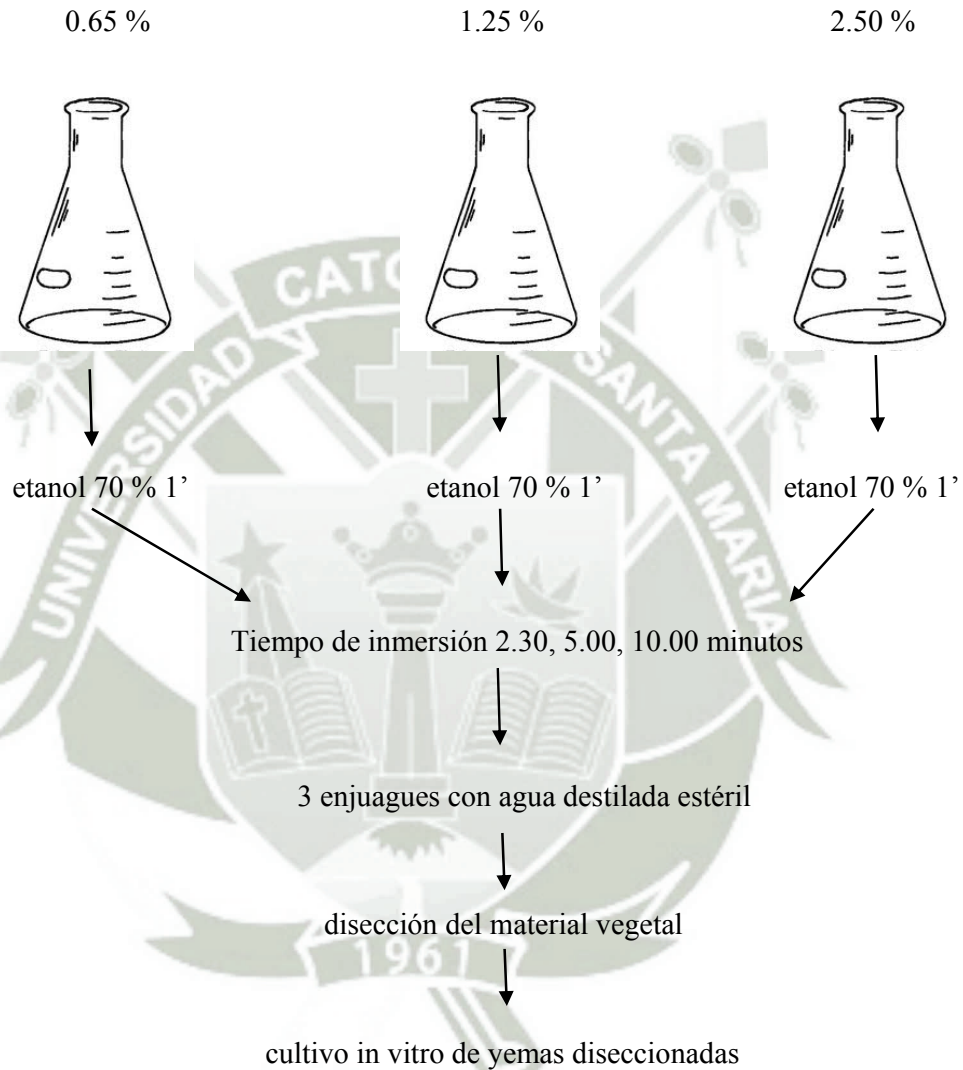


Figura 7. Diagrama de flujo de la desinfestación del material vegetal con etanol e hipoclorito de sodio después del tratamiento con detergente y fungicida.

3.2.4.3 Condiciones del cultivo

Dentro de la cámara de flujo laminar, en un papel adsorbente y con la ayuda de una pinzade punta diente ratón y bisturí numero 11, se seccionaron los explantes eliminando algunos foliolos. Los cuales fueron sembrados en tubos de ensayo de 17x100 mm. (Figura 8) que contenían 8 ml del medio de cultivo de *Murashige y Skoog*, más los reguladores de crecimiento 10 uM. de BAP, 20 uM. de GA3 y 0.5 uM. de ANA.

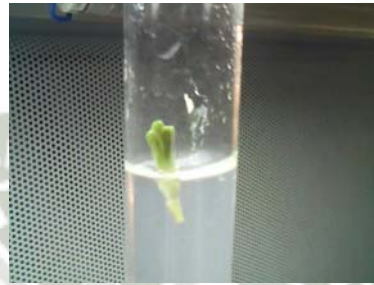


Figura 8. Aislamiento e inoculación de los explantes de *Polylepis rugulosa*.

Cada tratamiento de desinfección tuvo 10 repeticiones. Se evaluaron el porcentaje de explantes no contaminados, contaminados y sobrevivientes a los 7 días de iniciado el cultivo.

3.2.4.4 Efecto del ácido ascórbico en tres concentraciones distintas para evitar la fenolización.

En el segundo ensayo en la fase de establecimiento se evaluó el efecto del ácido ascórbico el cual se utilizó como antioxidante para evitar la fenolización de los explantes se utilizaron tres concentraciones las cuales fueron 20 mM., 50 mM. y 100 mM. Se utilizaron 20 explantes por tratamiento y los resultados se observaron a los 15 días de realizado el cultivo. Se evaluó el porcentaje de explantes fenolizados y no fenolizados, para determinar la mejor concentración.

3.2.4.5 Efecto del ácido giberélico en cinco concentraciones distintas para romper la dormancia

El tercer y último ensayo en la fase de establecimiento fue el tratamiento que se hizo con ácido giberélico para romper la dormancia que se podía encontrar en los explantes, se realizaron cinco tratamientos los cuales fueron a; 0, 5, 10, 20 y 40 uM/L. de AG3 utilizando 15 explantes por tratamiento. Los resultados se evaluaron a los 30 días de iniciado el cultivo. Se evaluó la longitud (mm.) de los explantes y también el color que presentaron a los 30 días.

3.2.5 Fase de micropopagación *in vitro* de *Polylepis rugulosa*

En esta segunda fase se trabajaron tres ensayos los cuales consistieron:

1. En el primer ensayo se trabajó con reguladores de crecimiento los cuales fueron ANA y BAP en doce tratamientos para evaluar su efecto y determinar el promedio de número de brotes, longitud de brotes, número de nudos, número de hojas y longitud de hojas.
2. En el segundo ensayo se utilizó el mejor tratamiento que obtuvimos en el primer ensayo, pero en esta etapa se utilizó el medio *Woody Plant* para observar si se daban diferencias significativas entre los medios.
3. El tercer ensayo consistió en la comparación entre los medios *Murashige* y *Skoogy* el medio *Woody Plant* en presencia y ausencia de ANA y BAP generando cuatro tratamientos.

La introducción del material vegetal en los medios de cultivo se realizará dentro de una cámara de flujo laminar, la cual será previamente esterilizada con etanol 96 %. Tanto el material vegetal como el instrumental requeridos serán también esterilizados. Para la esterilización de los medios de cultivo y agua destilada se utilizó el autoclave y para la esterilización del material de disección como pinzas y bisturís se utilizó la estufa.

3.2.5.1 Efecto de reguladores de crecimiento los cuales fueron ANA y BAP en doce tratamientos

En esta fase se trabajó con doce tratamientos con ANA y BAP los cuales se observan en la tabla 2. el medio que se utilizó fue el medio MS para evaluar el desarrollo y crecimiento del material vegetal.

Se realizaron cuatro repeticiones, las cuales se hicieron en plazos de una semana. En este ensayo se evaluaron cinco aspectos: el número de brotes por explante, la longitud de los brotes, número de nudos, número de hojas y finalmente la longitud de las hojas.

Tabla 2. Tratamientos para la etapa de multiplicación con tres concentraciones de ANA y cuatro concentraciones de BAP.

ANAUm	BAPuM			
	0	1	5	10
0.0	0/0.0	1/0.0	5/0.0	10/0.0
0.5	0/0.5	1/0.5	5/0.5	10/0.5
1.0	0/1.0	1/1.0	5/1.0	10/1.0

3.2.5.2 En la segunda etapa de la fase de micropropagación *in vitro* se utilizó el mejor tratamiento que obtuvimos en el primer ensayo, pero en esta etapa se utilizó el medio *Woody Plant* para observar si se daban diferencias significativas y hacer una comparación con el medio *Murashige* y *Skoog*.

Uno de los medios nutritivos más usados en el cultivo *in vitro* es el de *Murashige* y *Skoog*, ya que resulta útil para un gran número de especies. A pesar de que este medio de cultivo es más utilizado para la mayoría de las plantas, no siempre es el más adecuado para ciertas especies, debido a su alto contenido de sales. Es por esto que se probó con el medio WP ya que resulta útil para especies leñosas. (Pina L., 2008).

Al igual que en el ensayo anterior se realizaron cuatro repeticiones en plazos de una semana y se evaluó el número de brotes por explante, la longitud de los brotes, número de nudos, número de hojas y finalmente la longitud de las hojas con una concentración de reguladores de 0.5 uM. ANA y 10 uM. BAP por litro de medio. (Guerra M., Nodari R., 2004).

3.2.5.3 La tercera etapa de la fase de micropropagación consistió en la comparación entre los medios *Murashige* y *Skoog* y el medio *Woody Plant* en presencia y ausencia de ANA y BAP generando cuatro tratamientos.

Como tercer ensayo se trabajo con medio MS y WP para comparar el desarrollo de los explantes, se utilizaron dos tratamientos en cada medio, se utilizó el mejor tratamiento producto de la prueba anterior y el segundo tratamiento fue un control sin reguladores, para poder observar el efecto de los mismos y compararlos en los diferentes medios de cultivo. Tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos en presencia y ausencia de reguladores de crecimiento.

	Con reguladores	Sin reguladores
Medio MS	0.5 uM.ANA/10 uM.BAP	0
Medio WP	0.5 uM. ANA/10 uM. BAP	0



CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Fase de establecimiento

La fase de establecimiento *in vitro* comprendió la escisión del material vegetal de yemas extraídas de segmentos de ramas jóvenes de plantas de Queñua de 10-15 cm. obtenidas de un jardín, las mismas que fueron lavadas con detergente y fungicida previo al ensayo de la desinfestación de los explantes. El lavado previo de los explantes con agua corriente y detergentes, ayuda a una mejor desinfestación. (Roca W., Mroginski L., 1991).

Los explantes obtenidos de las ramas fueron lavados con detergente comercial para eliminar impurezas propias de la especie, después se hicieron 3 lavados con agua para eliminarlo por completo. Después de este pre tratamiento se hizo un lavado con fungicida.

El fungicida utilizado fue benlate ya que es uno de los más comerciales y tiene la capacidad de eliminar contaminantes que se puedan encontrar tanto en la parte interior o exterior del material se utilizaron 2 g/L. de agua. Finalmente se enjuagaron los restos de benlate agitando fuertemente con agua estéril.

Una vez realizado el pre tratamiento con detergente y benlate las yemas se lavaron con alcohol al 70 %. por 1 min., dejando completamente cubiertos los explantes, finalizado este tiempo de inmersión se eliminó el alcohol para evaluar el efecto de hipoclorito de sodio. (Jaramillo P., 2008).

4.1.1 Tratamiento con hipoclorito de sodio en tres concentraciones distintas en tres tiempos de exposición, generando 9 tratamientos para evitar la contaminación.

Se utilizó el hipoclorito de sodio (NaOCl) como desinfectante ya que tiene la ventaja de enjuagarse mas fácilmente de las superficies después de la esterilización y así eliminarlos agentes contaminantes no deseados. La solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) a concentraciones entre 1%. a 3 %. son las más útiles ya que sirven para la esterilización superficial de todo tipo de material siempre y cuando no se produzcan lesiones debido a su acción blanqueadora. (Borges M., et al., 2009).

Debido a la presencia de microorganismos contaminantes en los medios de cultivo (Figura 9) se evaluó el efecto del hipoclorito de sodio de tres concentraciones en tres tiempos de exposición en la sobrevivencia y contaminación del tejido, cuyos resultados se observan en la tabla 4.



Figura 9. Explantes contaminados con hongos a los 8 días de iniciado el cultivo in vitro.

Tabla 4. Porcentaje de explantes de Queñua sobrevivientes, contaminados y no contaminados en el tratamiento de desinfección bajo tres concentraciones a tres tiempos de exposición en hipoclorito de sodio, a los 8 días después del cultivo en el medio *Murashige y Skoog*.

Tratamiento	hipoclorito de Na (%)	tiempo (min)	(%) no contaminados	contaminados (%)	sobrevivientes (%)	Mortandad (%)
0.65/2.30		2.30	30	70	60	40
1.25/2.30	0.65	5.00	40	60	50	50
2.50/2.30		10.00	30	70	70	30
0.65/5.00		2.30	50	50	60	40
1.25/5.00	1.25	5.00	60	40	60	40
2.50/5.00		10.00	60	40	50	50
0.65/10.00		2.30	70	30	70	30
1.25/10.00	2.50	5.00	80	20	80	20
2.50/10.00		10.00	90	10	90	10
promedio no contaminados (tiempo)		2.30	53.33			
		5.00	60.00			
		10.00	66.67			

(%) Porcentaje correspondiente a 10 explantes por tratamiento.

- Uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer los cultivos es el de la contaminación de los mismos con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias). El ambiente generado por explante en el medio de cultivo es altamente propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos que pueden provocar la destrucción de los cultivos, es por esto que es necesaria la esterilización externa de los explantes. (Roca W., Mroginski L., 1991).
- Los explantes fueron contaminados con el hongo *penicilium*. Los contaminantes más comunes durante el establecimiento *in vitro* de explantes procedentes de plantas adultas son los hongos y las bacterias que habitan de manera normal en el cultivo de las mismas en condiciones naturales. (Folgueras M., et al., 2001).
- Del efecto de las tres concentraciones de hipoclorito de sodio se observa que en una alta concentración (2.50 %) el promedio de explantes libres de

contaminación es más alto, mientras que en una baja concentración es más alta la contaminación, el porcentaje de sobrevivencia tuvo mejores resultados en el mayor tiempo que fue de 10.00 minutos en la concentración de 2.50 % de hipoclorito de sodio.

- En cuanto a la mortandad se observan que hay mayor sobrevivencia de explantes en la concentración de 2.50 %, pero es importante no pasar los 10.00 minutos, ya que después de este tiempo se puede presentar necrosis en los explantes provocando la muerte de los mismos.
- La muerte que se presentó en los explantes evaluados pudo deberse a la presencia de una necrosis continua de sus tejidos, la cual condujo de manera paulatina a la muerte de los mismos. Todo ello podría estar dado principalmente al efecto fitotóxico de las distintas concentraciones de hipoclorito de sodio. Es por esto que se determinó que el mejor tratamiento para la etapa de desinfestación fue el tratamiento 9 en el cual se utilizó hipoclorito de sodio al 2.50 % durante 10.00 minutos. (Figura 10).



Figura 10. Explantes sobrevivientes a la izquierda fenolizado y a la derecha sin fenolizar.

Tabla 5. Promedio de explantes no contaminados, contaminados, sobrevivientes y mortandad en tres concentraciones de hipoclorito de sodio.

Hipoclorito de sodio (%)	(%) no contaminados	contaminados (%)	sobrevivientes (%)	Mortandad (%)
0.65	33.33	66.67	60.00	40.00
1.25	56.67	60.00	60.00	40.00
2.50	80.00	53.33	63.33	36.67

Tabla 6. Promedio de explantes no contaminados, contaminados, sobrevivientes y mortandad en tres tiempo de exposición.

Tiempo (min)	(%) no contaminados	contaminados (%)	sobrevivientes (%)	Mortandad (%)
2.30	50.00	50.00	63.33	36.67
5.00	60.00	40.00	63.33	36.67
10.00	60.00	40.00	70.00	30.00

Con los datos obtenidos del porcentaje de explantes no contaminados, contaminados, sobrevivientes y mortandad de la primera etapa en la fase de establecimiento se realizó un análisis de varianza para el tratamiento con hipoclorito de sodio en tres concentraciones distintas en tres tiempos de inmersión, al encontrar diferencias significativas entre los tratamientos se realizó una prueba de Tukey para determinar cual fue el tratamiento con mejor efecto sobre las plantas, lo cual se puede observar en la tabla 7 donde se puede notar claramente que la significancia obtenida (0.00), es menor al nivel de significancia establecido para el experimento (0.05), lo cual da a conocer que existe suficiente evidencia para establecer que la concentración de cloro en un determinado tiempo de exposición, produce diferentes efectos sobre los explantes.

Tabla 7. Prueba de Tukey para el tratamiento con hipoclorito de sodio en tres concentraciones distintas en tres tiempos de exposición, generando 9 tratamientos para evitar la contaminación.

Tratamiento	Concentración de hipoclorito/tiempo	% No contaminados
T9	2.50/10.00	90 a
T8	1.25/10.00	80a
T7	0.65/10.00	70 b
T6	2.50/5.00	60 c
T5	1.25/5.00	60 d
T4	0.65/5.00	50 d
T2	1.25/2.30	40 e
T3	2.50/2.30	30 f
T1	0.65/2.30	30 g
Fc	1350.00	
cv	35.99 %	

Cabe resaltar que en la tabla anterior, para nueve tratamientos se forman 7 subconjuntos diferentes, esto quiere decir que existen algunos tratamientos que tienen efectos similares sobre los explantes, existiendo otros que tienen efectos totalmente diferentes. En tal sentido, el análisis estadístico da la potestad, de alguna manera, de elegir aquel tratamiento que genere la mayor cantidad de plantas no contaminadas; siendo en este caso el tratamiento 9 con 90 % de plantas no contaminadas. Esto es mejor observado en la figura 11.

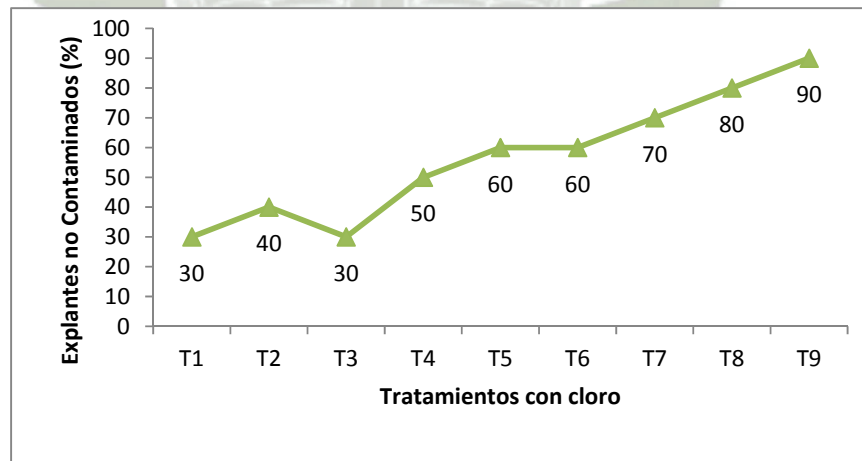


Figura 11. Porcentaje de explantes no contaminados después del tratamiento con hipoclorito de sodio.

4.1.2 Evaluación del efecto del ácido ascórbico en tres concentraciones distintas para evitar la fenolización.

Como segunda etapa en la fase de establecimiento se evaluó el efecto del ácido ascórbico en el cultivo *in vitro*, ya que en la prueba anterior hubo un gran porcentaje de explantes fenolizados (90 %). El carbón activado (0.1 a 5.0 %) suele ser incorporado al medio, dado que es probable que absorba metabolitos tóxicos para los cultivos. En algunos medios se incorporan ácidos orgánicos como el málico, el cítrico, el pirúvico y el succínico y es frecuente el empleo de L-glutamina y de caseína hidrolizada. También en ocasiones es necesaria la incorporación de agentes antioxidantes (L-cisteína, ácido ascórbico, polivinilpirrolidona) para prevenir el ennegrecimiento tisular causado por la oxidación de polifenoles presentes en los explantes. Este ennegrecimiento puede causar la muerte de los mismos. (Roca W., Mroginski L., 1993).

A través de otras investigaciones, se determinó que la adición de carbón activado al medio de cultivo mostró un efecto inhibitor del crecimiento, generando incluso la necrosis de los tejidos. (Pierik R., 1999).

En cuanto al efecto de la adición de ácido ascórbico se observa en trabajos anteriores que en el establecimiento *in vitro* de determinadas especies, especialmente leñosas, uno de los problemas que se enfrenta es la oxidación del medio de cultivo, debido a la liberación de compuestos fenólicos cuya acumulación puede resultar tóxica y, por tanto, afectar la viabilidad del material vegetal.

En este trabajo se utilizó el ácido ascórbico como antioxidante en tres concentraciones distintas y se evaluó el porcentaje de explantes fenolizados y no fenolizados; para esta etapa se tuvo que introducir nuevos explantes cuyos resultados se pueden observar en la tabla 8. cuyos resultados se corroboran con el trabajo (Vega K., et al., 2007).

Tabla 8. Porcentaje de explantes de Queñua fenolizados y no fenolizados bajo tres concentraciones de ácido ascórbico a los 15 días del cultivo en el medio MS.

concentración (mM)	fenolizados (%)	No fenolizados (%)
(T1) 20	75	25
(T2) 50	50	50
(T3) 100	10	90

(%) Porcentaje correspondiente a 20 explantes por tratamiento.



Figura 12. Fenolización de los explantes antes de la adición del ácido ascórbico.

- En el proceso de aislamiento, desinfección e inoculación en el medio de cultivo siempre se generan en mayor o menor medida situaciones de estrés, provocando la estimulación del metabolismo de los compuestos fenólicos y la exudación al medio de cultivo de estos productos (Pedroza A., et al., 2007).
- La eliminación de los primordios foliares permite minimizar la oxidación fenólica ya que al eliminar el tejido más expuesto a los agentes químicos, se está eliminando el tejido que mayor estrés fisiológico ha tenido en todo el proceso (Figura 12). Este tejido que posee compuestos oxidados puede potenciar otros procesos de oxidación, ya que tras su propia oxidación se convierten en potentes oxidantes. Estas sustancias se pueden ligar a proteínas de la membrana y enzimas generando toxicidad y la muerte celular (Batista J., 1999).

- El efecto del ácido ascórbico se evaluó a los 15 días de realizado el cultivo y se puede observar que el mejor resultado se obtuvo en la concentración más alta de ácido ascórbico la cual fue de 100 mM/L., obteniéndose un 90 % de explantes no fenolizados. (Figura 13).
- El mejor tratamiento fue el número 3 el cual tuvo una concentración de ácido ascórbico 100 mM. ya que la liberación de compuestos fenólicos que se observó en el 100 % de los explantes alteró la composición química del medio de cultivo y deterioro progresivamente el material vegetal hasta causar su muerte ya que la acumulación de sustancias fenólicas liberadas por el tejido vegetal en el medio de cultivo, son con frecuencia inhibidores del crecimiento y constituyen uno de los problemas más frecuentes asociados con la propagación clonal rápida, los cuales imponen serios problemas en el establecimiento de cultivos primarios.



Figura 13. Desarrollo de los explantes en el tratamiento 3.

Se analizaron diferentes concentraciones de ácido ascórbico y el efecto sobre la oxidación fenólica, mediante un análisis de varianza lo cual se puede observar en la tabla 9. Se encontró diferencias significativas en el porcentaje de oxidación entre las 3 concentraciones de ácido ascórbico. Al realizar la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) se determinaron tres grupos de significancia siendo la concentración de 100 mM. la que presento mayor porcentaje de explantes libres de oxidación (Figura 14) debido a que a mayor concentración de ácido ascórbico, será menos la liberación de compuestos fenólicos cuya acumulación resulta tóxica causando la oxidación (Echenique V., et al., 2004).

Tabla 9. Prueba de Tukey para el tratamiento con ácido ascórbico en tres concentraciones distintas para evitar la fenolización.

Tratamiento	Ac. Ascórbico	% no fenolizados
T3	100 mM.	90 a
T2	50 mM.	50 b
T1	20 mM.	25 c
Fc.		3225.00
cv.		63.13 %

Observando la tabla 9 podemos decir que ninguno de los tratamientos tiene efectos similares a otro. En tal sentido, se elige aquel tratamiento que genere la menor cantidad de plantas fenolizadas; siendo en este caso el tratamiento 3 con 90 % de plantas no fenolizadas. Esto también puede ser observado en la figura 14.

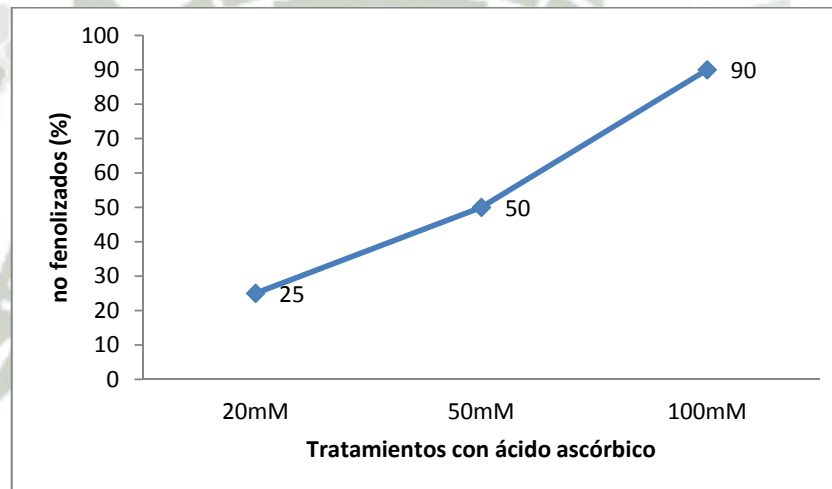


Figura 14. Porcentaje de explantes no fenolizados producto de la adición de ácido ascórbico.

4.1.3 Efecto del ácido giberélico usando cinco concentraciones para romper la dormancia.

La última etapa en la fase de establecimiento fue el tratamiento que se hizo con ácido giberélico para romper la dormancia que es común se presente en este tipo de explantes ya que no pertenecen a la zona. La época del año es un factor que suele tener mucha importancia en la micropropagación y que generalmente está asociado al grado de dormición que presentan ciertos explantes yemas, por ejemplo y también con la

posibilidad de mayor o menor proliferación de microorganismos. (Mroginski L., et al., 2005).

Se empleó ácido giberélico ya que permite incrementar tanto la división como la elongación celular, debido a que tras la aplicación de giberelinas se incrementa el número de células y la longitud de las mismas. (Mroginski L., et al., 2005).

Se trabajó con cinco tratamientos de ácido giberélico y se evaluó la longitud (mm.) y color de los explantes a los 30 días del cultivo, los resultados podemos observarlos en la tabla 10 evaluándose la longitud que alcanzaron los explantes a los 30 días y también el color que presentaron.

Tabla 10. Longitud (mm.) y color de explantes de Queñua bajo 5 concentraciones de ácido giberélico a los 30 días después del cultivo en el medio MS.

Concentración AG3 (uM.)	Tamaño (mm.)	color	
		marrón oscuro	verde claro
(T1) 0	5.47	11	4
(T2) 5	9.00	6	9
(T3) 10	15.87	4	11
(T4) 20	24.20	1	14
(T5) 40	19.40	2	13

Porcentaje correspondiente a 15 explantes por tratamiento.



Figura 15. Explantes que presentaron color marrón oscuro.

- El mejor tratamiento para el ácido giberélico fue el tratamiento numero 4 ya que hubo mayor crecimiento de los explantes y se obtuvo el mayor número de explantes de color verde claro, el cual se presentó en cuatro de los cinco

tratamientos, ya que el tratamiento que no tenía AG3 presentó un color marrón oscuro el cual nos indica la presencia de necrosis en los explantes.

- El tratamiento 5 cuya concentración de ácido giberélico fue la mayor con 40 uM. por litro de medio produjo efectos adversos a los deseados ya que debido a tan alta concentración el desarrollo de los explantes no fue mejor a la del tratamiento 4, ya que el tamaño de los explantes fue menor al mismo y el color no fue el que se esperaba, es por esto que se eligió al tratamiento 4 como el óptimo. (Figura 15).
- La relación que se mantiene entre los reguladores de crecimiento es importante para los procesos morfogénicos, de esta forma se pretende determinar si existe alguna influencia sobre las combinaciones de citoquininas, giberelinas y auxinas, en la inducción de brotes de las yemas establecidas. (Jaramillo P., et al., 2008).
- Al analizar el efecto del ácido giberélico, se encontró diferencias significativas en las concentraciones utilizadas, ya que el tratamiento 4 fue el que dio mejores resultados en una concentración de 20 uM/L. (Figura 16).



Figura 16. Respuesta de los explantes en el tratamiento 4.

Al realizar el análisis de varianza entre los diferentes tratamientos con ácido giberélico, se encontró diferencias significativas lo cual se puede observar en la tabla 11, al encontrarse diferencias significativas entre los 5 tratamientos se realizó una prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) determinándose 5 grupos de significancia que posiblemente indica que el desarrollo de los explantes está directamente relacionado a la concentración de AG3.

Tabla 11. Prueba de Tukey para el Tratamiento con ácido giberélico.

Tratamiento	AG3 (uM.)	Longitud (mm.)
T4	20	24,20 a
T5	40	19,40 b
T3	10	15,86 c
T2	5	9,00 d
T1	0	5,46 e
Fc.		73.94
cv.		51.51 %.

Observando la tabla 11, observamos que para 5 tratamientos se forman 5 subconjuntos diferentes, esto quiere decir que ninguno de los tratamientos tiene efectos similares a otro. En tal sentido, se elige aquel tratamiento que genere plantas con mayor longitud; siendo en este caso el tratamiento 4 con plantas de 24.20 mm.

Esto también puede ser observado en la figura 17, en donde notamos la diferencia de longitudes (mm.) en los 5 tratamientos utilizados, el gráfico se hizo en base a los datos obtenidos a la cuarta semana de iniciado el cultivo in vitro.



Figura 17. Longitud de los explantes (mm.) en cinco concentraciones diferentes de AG3.

4.2 Fase de multiplicación in vitro de *Polylepis rugulosa*

Luego de la fase de establecimiento in vitro se seleccionaron y a la vez se aumentaron explantes con el fin de obtener el número suficiente de explantes para la fase de multiplicación in vitro y evaluar el efecto de reguladores de crecimiento utilizando tres concentraciones de ANA y cuatro concentraciones de BAP obteniendo así doce tratamientos.

La relación que se mantiene entre los reguladores de crecimiento es importante para los procesos morfogénicos, de esta forma se pretende determinar si existe alguna influencia sobre las combinaciones de citoquininas, giberelinas y auxinas, en la inducción de brotes de las yemas establecidas.

Para determinar el efecto de las concentraciones de BAP en combinación con ANA, los tejidos desarrollados en los tratamientos que indujeron los mayores niveles de formación de brotes viables fueron seleccionados y transferidos a medio fresco con la misma formulación y concentración de reguladores de crecimiento obtenidos del mejor tratamiento. (Suárez I., Salgado J., 2008).

4.2.1 Ensayo con reguladores de crecimiento ANA y BAP en doce tratamientos para evaluar su efecto y determinar el promedio de número de brotes, longitud de brotes, número de nudos, número de hojas y longitud de hojas.

Como primera parte se evaluó el número de brotes obtenidos cuyos resultados podemos observar en la tabla 12. El resultado de la longitud de los brotes obtenidos se observan en la tabla 13.

Los resultados del número de nudos, número de hojas y longitud de hojas obtenidos se puede

Tabla 12. Promedio del número de brotes y tolerancia de los 12 tratamientos con reguladores de crecimiento en el medio MS a los 7, 15, 21 y 28 días en 3 repeticiones por semana.

BAP/ANA	semanas			
	1	2	3	4
	promedio	promedio	promedio	promedio
(T1) 0/0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
(T2) 1/0.0	0.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
(T3) 5/0.0	0.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
(T4) 10/0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.5±0.7	1.5±0.7
(T5) 0/0.5	0.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
(T6) 1/0.5	0.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.5±0.7
(T7) 5/0.5	0.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.3±0.5
(T8) 10/0.5	1.0±0.0	1.0±0.0	1.5±0.5	2.0±0.0
(T9) 0/1.0	0.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.3±0.0
(T10) 1/1.0	0.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
(T11) 5/1.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.5±0.7	1.5±0.7
(T12) 10/1.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.3±0.5	1.6±0.5

Promedio correspondiente a tres explantes por repetición en cada tratamiento.

- En la tabla 12 observamos que no se encontró diferencias significativas en el número de brotes entre los doce tratamientos evaluados. Estadísticamente los tratamientos son iguales, aunque los datos del promedio de número de brotes nos da a conocer que el mejor tratamiento fue el número 8 con las concentraciones de 10 uM/L. de BAP y 0.5 uM/L. de ANA ya que se observó un mayor número de brotes, con un promedio de 2 brotes por explante a 4 semanas de iniciada la fase de multiplicación.
- Del efecto de los reguladores de crecimiento vistos en los 12 tratamientos se obtuvo que a las más altas concentraciones de BAP se observan los mejores resultados, ya que el tratamiento número 12 en una concentración de 10 uM/L. de BAP y 1.0 uM/L. de ANA nos dió un resultado de 1.6 brotes. (Figura 18).

- Los tratamientos que tenían bajas concentraciones de reguladores de crecimiento no nos dieron los resultados esperados, ya que la ausencia de ANA y BAP no favorece a la proliferación de brotes.



Figura 18. Desarrollo de brotes a las 4 semanas.

De acuerdo a la prueba de Tukey que se realizó, se puede decir que los tratamientos para multiplicación no son diferentes significativamente al analizar el número de brotes de la planta, es decir, que con cualquiera de los tratamientos se van a obtener número de brotes similares después de 4 semanas de tratamiento. A pesar de ello se decide escoger un tratamiento, dicha elección está en función a que el tratamiento debe generar mayor número de brotes siendo en este caso el tratamiento 8 con un promedio de número de brotes de 2, tal como se muestra en la figura 19.

El valor de F. calculada que se obtuvo fue de 1.31.

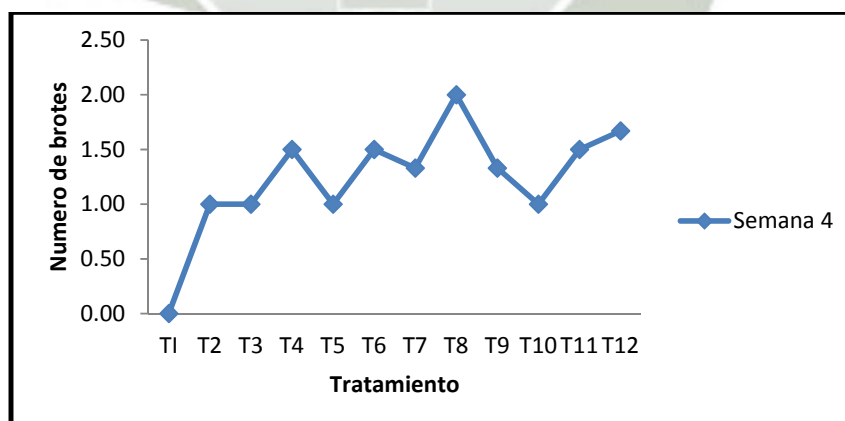


Figura 19. Promedio del número de brotes en 12 tratamientos con reguladores de crecimiento en el medio MS.

Como segunda parte se evaluó el tamaño de brotes obtenidos cuyos resultados podemos observar en la tabla 13.

Tabla 13. Promedio de la longitud (mm.) de brotes y tolerancia de los 12 tratamientos con reguladores de crecimiento en el medio MS a los 7, 15, 21 y 28 días en 3 repeticiones por semana.

BAP/ANA	semanas			
	1	2	3	4
	promedio	promedio	promedio	promedio
(T1) 0/0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
(T2) 1/0.0	0.0±0.0	20.0±0.0	30.0±0.0	30.0±0.0
(T3) 5/0.0	0.0±0.0	20.0±0.0	25.0±0.7	30.0±0.0
(T4) 10/0.0	20.0±0.0	25.0±0.7	30.0±0.0	30.0±0.0
(T5) 0/0.5	0.0±0.0	30.0±0.0	30.0±0.0	30.0±0.0
(T6) 1/0.5	0.0±0.0	20.0±0.0	25.0±0.7	25.0±0.7
(T7) 5/0.5	0.0±0.0	20.0±0.0	26.7±0.5	30.0±0.0
(T8) 10/0.5	20.0±0.0	30.0±0.0	30.0±0.0	36.0±0.5
(T9) 0/1.0	0.0±0.0	20.0±0.0	20.0±0.0	30.0±0.0
(T10) 1/1.0	0.0±0.0	25.0±0.7	30.0±0.0	30.0±0.0
(T11) 5/1.0	20.0±0.0	20.0±0.0	30.0±0.0	30.0±0.0
(T12) 10/1.0	20.0±0.0	25.0±0.7	30.0±0.0	33.3±0.5

Promedio correspondiente a tres explantes por repetición en cada tratamiento.

- En la tabla 13 podemos observar que no se encontró diferencias significativas en el tamaño de brotes entre los doce tratamientos evaluados. Estadísticamente los tratamientos son iguales, aunque los datos del promedio de tamaño de brotes nos da a conocer que el mejor tratamiento fue el número 8 con las concentraciones de 10 uM/L. de BAP y 0.5 uM/L. de ANA ya que se observó una mayor longitud de brotes (mm.), con un promedio de 36.0 mm. de tamaño de brotes a las 4 semanas de iniciada la fase de multiplicación.
- Del efecto de los reguladores de crecimiento vistos en los 12 tratamientos se obtuvo que a las más altas concentraciones de BAP se observan los mejores resultados, ya que el tratamiento número 12 en una concentración de 10 uM/L.

de BAP y 1.0 uM/L de ANA nos dio un resultado de 33 mm de tamaño de brotes.

- Los tratamientos que tenían bajas concentraciones de reguladores de crecimiento no nos dieron los resultados esperados, ya que la ausencia de ANA y BAP no favorece a la proliferación de brotes. Siendo el tratamiento número 1 el único que no nos dio respuesta alguna. (Figura 20).



Figura 20. Longitud (mm.) de los brotes en el tratamiento 8 a las 4 semanas.

En el cuadro anterior se puede observar que la significancia encontrada (0.35) es mayor a la significancia establecida para el experimento (0.05), de lo cual se puede concluir que los tratamientos para multiplicación no son diferentes estadísticamente al analizar la longitud de los brotes de la planta, es decir, que con cualquiera de los tratamientos se van a obtener longitudes de los brotes similares después de 4 semanas de tratamiento. A pesar de ello se decide escoger un tratamiento, dicha elección está en función a que el tratamiento debe generar brotes con mayor longitud, siendo en este caso el tratamiento 8 con un promedio de longitud de brotes de 36.0 mm., tal como se muestra en la figura 21.

El valor de F. calculada que se obtuvo fue de 1.12.

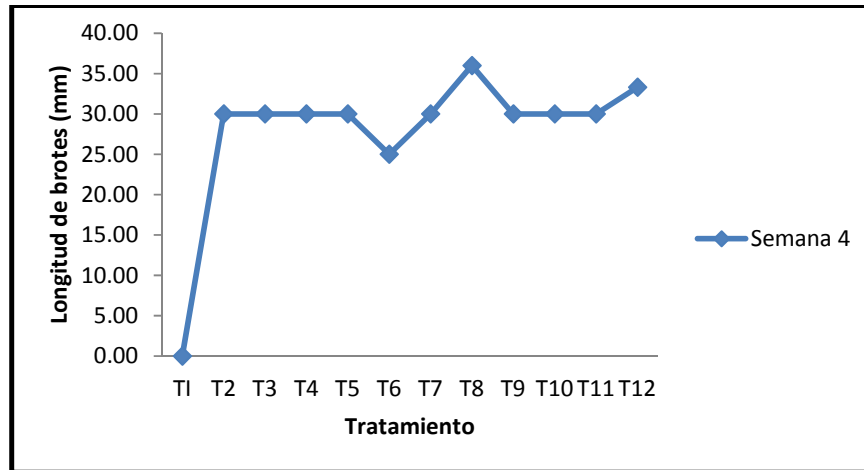


Figura 21. Promedio de longitud de brotes(mm.) de brotes en 12 tratamientos con reguladores de crecimiento en el medio MS.

Como tercera parte se evaluó el número de nudos obtenidos cuyos resultados podemos observar en la tabla 14.

Tabla 14. Promedio del número de nudos y tolerancia de los 12 tratamientos con reguladores de crecimiento en el medio MS a los 7, 15, 21 y 28 días en 3 repeticiones por semana.

BAP/ANA	semanas			
	1 promedio	2 promedio	3 promedio	4 promedio
(T1) 0/0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
(T2) 1/0.0	0.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
(T3) 5/0.0	0.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
(T4) 10/0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.5±0.7	1.5±0.7
(T5) 0/0.5	0.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
(T6) 1/0.5	0.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.5±0.7
(T7) 5/0.5	0.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.3±0.5
(T8) 10/0.5	1.0±0.0	1.0±0.0	1.7±0.5	2.0±0.0
(T9) 0/1.0	0.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.3±0.0
(T10) 1/1.0	0.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
(T11) 5/1.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.5±0.7	1.5±0.7
(T12) 10/1.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.3±0.5	1.6±0.5

Promedio correspondiente a tres explantes por repetición en cada tratamiento.

- En la tabla 14 podemos observar que no se encontró diferencias significativas en el número de nudos entre los doce tratamientos evaluados. Estadísticamente los tratamientos son iguales, aunque los datos del promedio de número de nudos nos da a conocer que el mejor tratamiento fue el número 8 con las concentraciones de 10 uM/L. de BAP y 0.5 uM/L. de ANA ya que se observó un mayor número de nudos, con un promedio de 2 nudos a las 4 semanas de iniciada la fase de multiplicación. (Figura 22).
- Del efecto de los reguladores de crecimiento vistos en los 12 tratamientos se obtuvo que a las más altas concentraciones de BAP se observan los mejores resultados, ya que el tratamiento número 12 en una concentración de 10 uM/L. de BAP y 1.0 uM/L. de ANA nos dio un resultado de 1.6 nudos.
- Los tratamientos que tenían bajas concentraciones de reguladores de crecimiento no nos dieron los resultados esperados, ya que la ausencia de ANA y BAP no favorece a la proliferación de brotes, por este motivo no tuvimos presencia de nudos. Siendo el tratamiento número 1 el único que no nos dio respuesta alguna.



Figura 22. Número de nudos producto en el tratamiento 8 a las 4 semanas.

La significancia encontrada (0.97) es mayor a la significancia establecida para el experimento (0.05), de lo cual se puede concluir que los tratamientos para multiplicación no son diferentes estadísticamente al analizar el número de nudos de la

planta, es decir, que con cualquiera de los tratamientos se van a obtener número de nudos similares después de 4 semanas de tratamiento. A pesar de ello se decide escoger un tratamiento, dicha elección está en función a que el tratamiento debe generar mayor número de nudos en la planta, siendo en este caso el tratamiento 8 con un promedio de número de nudos de 2; tal como se muestra en la figura 23.

El valor de F. calculada obtenido fue de 0.33.

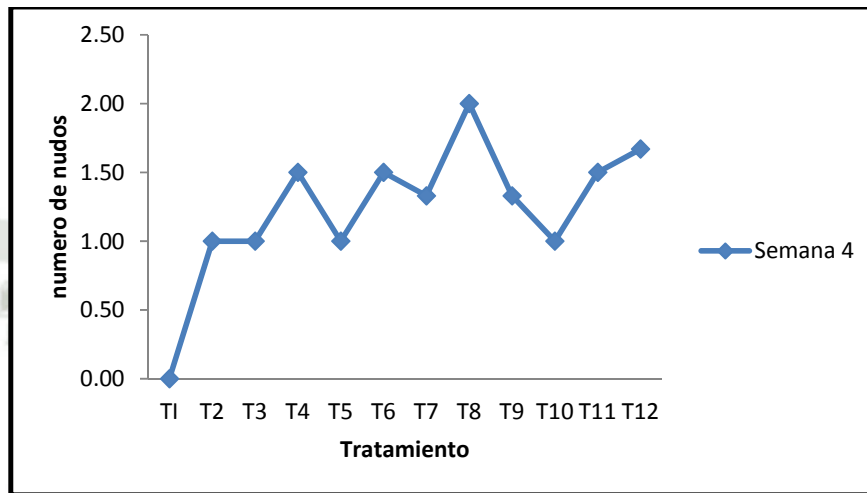


Figura 23. Promedio del número de nudos en 12 tratamientos con reguladores de crecimiento en el medio MS.

Como cuarta parte se evaluó el número de hojas obtenidas cuyos resultados podemos observar en la tabla 15.

Tabla 15. Promedio del número de hojas y tolerancia de los 12 tratamientos con reguladores de crecimiento en el medio MS a los 7, 15, 21 y 28 días en 3 repeticiones por semana.

BAP/ANA	semanas			
	1	2	3	4
	promedio	promedio	promedio	promedio
(T1) 0/0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
(T2) 1/0.0	0.0±0.0	1.5±0.7	2.0±0.0	2.5±0.7
(T3) 5/0.0	0.0±0.0	1.5±0.7	2.5±0.7	2.5±0.7
(T4) 10/0.0	1.5±0.7	2.0±0.0	2.5±0.7	4.5±0.7
(T5) 0/0.5	0.0±0.0	2.0±0.0	2.5±0.7	2.5±0.7
(T6) 1/0.5	0.0±0.0	1.5±0.7	2.0±0.0	3.5±0.7
(T7) 5/0.5	0.0±0.0	1.5±0.7	3.0±1.4	5.0±1.4
(T8) 10/0.5	2.0±0.0	2.0±0.0	3.5±0.5	5.2±2.1
(T9) 0/1.0	0.0±0.0	1.5±0.7	1.6±0.5	2.5±0.7
(T10) 1/1.0	0.0±0.0	1.5±0.7	1.5±0.7	2.5±0.5
(T11) 5/1.0	1.5±0.7	1.5±0.7	3.0±1.4	5.0±1.4
(T12) 10/1.0	1.0±0.0	2.0±0.0	3.3±0.5	5.6±2.0

Promedio correspondiente a tres explantes por repetición en cada tratamiento.

- En la tabla 15 podemos observar que no se encontró diferencias significativas en el número de hojas entre los doce tratamientos evaluados. Estadísticamente los tratamientos son iguales, aunque los datos del promedio de número de hojas nos da a conocer que el mejor tratamiento fue el número 12 con las concentraciones de 10 uM/L. de BAP y 1.0 uM/L. de ANA ya que se observó un mayor número de hojas, con un promedio de 5.6 hojas a las 4 semanas de iniciada la fase de multiplicación. Tal como se observa en la figura 24.
- Del efecto de los reguladores de crecimiento vistos en los 12 tratamientos se obtuvo que a las más altas concentraciones de BAP se observan los mejores resultados, ya que el tratamiento número 8 en una concentración de 10 uM/L. de BAP y 0.5 uM/L. de ANA nos dio un resultado de 5.20 número de hojas.

- Los tratamientos que tenían bajas concentraciones de reguladores de crecimiento no nos dieron los resultados esperados, ya que la ausencia de ANA y BAP no favorece a la proliferación de brotes, al no haber presencia de nudos no obtuvimos número de hojas. Siendo el tratamiento número 1 el único que no nos dio respuesta alguna.



Figura 24. Promedio del número de hojas en el tratamiento 12 a las 4 semanas.

La significancia encontrada (0.97) es mayor a la significancia establecida para el experimento (0.05), de lo cual se puede concluir que los tratamientos para multiplicación no son diferentes estadísticamente al analizar el número de hojas de la planta, es decir, que con cualquiera de los tratamientos se van a obtener número de hojas similares después de 4 semanas de tratamiento. A pesar de ello se decide escoger un tratamiento, dicha elección está en función a que el tratamiento debe generar mayor número de hojas en la planta, siendo en este caso el tratamiento 12 con un promedio de número de hojas de 5.67; ya que en la axila de cada hoja se desarrolla 1 yema que con el tiempo nos daría un nuevo brote, tal como se muestra en la figura 25.

El valor de F. calculada obtenido fue de 0.35.

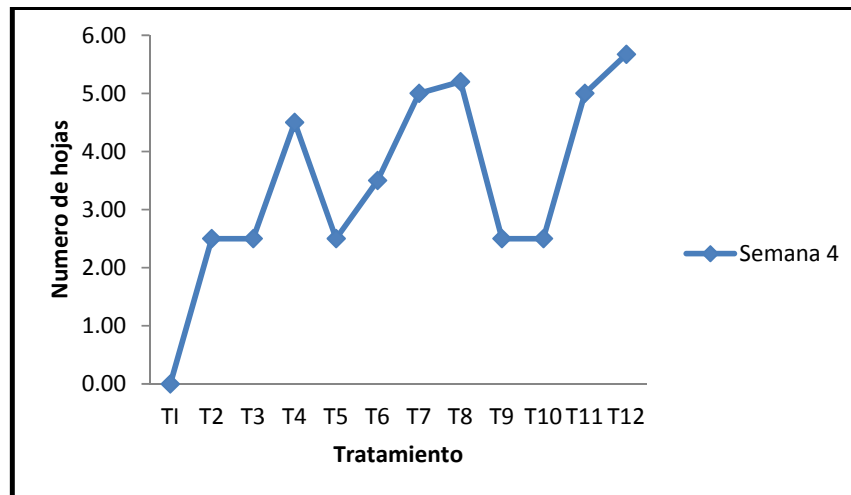


Figura 25. Promedio del número de hojas en 12 tratamientos con reguladores de crecimiento en el medio MS.

Como quinta parte se evaluó la longitud (mm.) de hojas obtenidas cuyos resultados podemos observar en la tabla 16.

Tabla 16. Promedio de longitud de hojas (mm.) y tolerancia de los 12 tratamientos con reguladores de crecimiento en el medio MS a los 7, 15 y 21 días en 3 repeticiones por semana.

BAP/ANA	semanas			
	1	2	3	4
	promedio	promedio	promedio	promedio
(T1) 0/0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
(T2) 1/0.0	0.0±0.0	25.0±0.7	25.0±0.7	25.0±0.7
(T3) 5/0.0	0.0±0.0	30.0±0.0	30.0±0.0	35.0±0.7
(T4) 10/0.0	25.0±0.7	25.0±0.7	25.0±0.7	35.0±0.7
(T5) 0/0.5	0.0±0.0	35.0±0.7	35.0±0.7	35.0±0.7
(T6) 1/0.5	0.0±0.0	25.0±0.7	25.0±0.7	30.0±0.0
(T7) 5/0.5	0.0±0.0	30.0±0.0	30.0±0.0	33.3±0.5
(T8) 10/0.5	30.0±0.0	32.5±0.5	35.0±0.5	40.0±0.7
(T9) 0/1.0	0.0±0.0	25.0±0.7	26.8±0.5	30.0±0.0
(T10) 1/1.0	0.0±0.0	25.0±0.7	30.0±0.0	35.0±0.7
(T11) 5/1.0	25.0±0.7	25.0±0.7	30.0±0.0	30.0±0.0
(T12) 10/1.0	25.0±0.7	30.0±0.0	33.3±0.5	33.3±0.5

Promedio correspondiente a tres explantes por repetición en cada tratamiento.

- En la tabla 16 podemos observar que no se encontró diferencias significativas en la longitud de hojas entre los doce tratamientos evaluados. Estadísticamente los tratamientos son iguales, aunque los datos del promedio de la longitud de hojas nos da a conocer que el mejor tratamiento fue el número 8 con las concentraciones de 10 uM/L. de BAP y 0.5 uM/L. de ANA ya que se observó una mayor longitud de hojas, con un promedio de 40.0 mm. a las 4 semanas de iniciada la fase de multiplicación. (Figura 26).
- Del efecto de los reguladores de crecimiento vistos en los 12 tratamientos se obtuvo que a las más altas concentraciones de BAP se observan los mejores resultados, ya que el tratamiento número 4 en una concentración de 10 uM/L. de BAP y 0.0 uM/L. de ANA nos dio un resultado de 35 mm. de longitud de hojas.
- Los tratamientos que tenían bajas concentraciones de reguladores de crecimiento no nos dieron los resultados esperados, ya que la ausencia de ANA y BAP no favorece a la proliferación de brotes. Siendo el tratamiento número 1 el que nos dio la menor respuesta con 10.0 mm. de tamaño de hojas.



Figura 26. Longitud (mm.) de las hojas en el tratamiento 8 a las 4 semanas.

La significancia encontrada (0.99) es mayor a la significancia establecida para el experimento (0.05), de lo cual se puede concluir que los tratamientos para multiplicación no son diferentes estadísticamente al analizar la longitud de hojas de la planta, es decir, que con cualquiera de los tratamientos se van a obtener longitudes de hojas similares después de 4 semanas de tratamiento. A pesar de ello se decide escoger

un tratamiento, dicha elección está en función a que el tratamiento debe generar mayor longitud de hojas en la planta, siendo en este caso el tratamiento 8 con un promedio de longitud de hojas de 40.0 mm.; tal como se muestra en la figura 27.

El valor de F. calculada obtenido fue de 0.22.

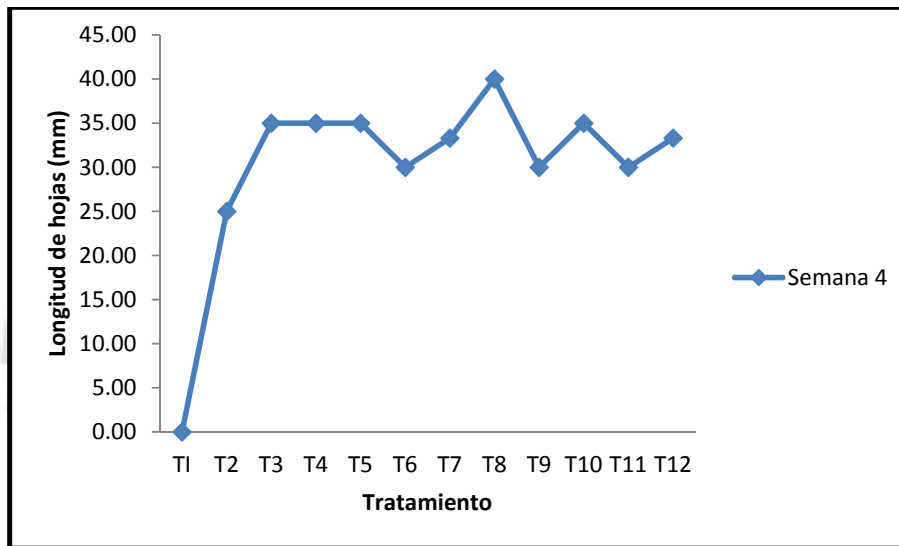


Figura 27. Promedio de longitud de hojas en 12 tratamientos con reguladores de crecimiento en el medio MS.

4.2.2 Ensayo utilizando el mejor tratamiento que obtuvimos en el primer ensayo, pero en esta etapa se utilizó el medio *Woody plant* para observar si se daban diferencias significativas entre los medios.

Algunas especies responden mejor al medio realizado por Lloyd y McCown (1981). Este medio de cultivo denominado *Woody Plant Medium* (WPM) es usado ampliamente para el cultivo de tejidos de plantas leñosas o sensibles a la salinidad (Cardoza V., 2008).

Es por esto que en la segunda etapa de la fase de multiplicación se trabajó con el medio *Woody Plant* (WP), solo se trabajó con una concentración la cual fue de 0.5 uM. ANA y 10 uM. BAP por litro, se decidió trabajar con esta concentración ya que fue la que mejores resultados tuvo cuando se trabajó con el medio MS.

Los resultados que se obtuvieron se muestran en la tabla número 17, en cual también se evaluó en número de brotes, longitud de brotes, número de nudos, número de hojas y longitud de hojas durante cuatro semanas.

Tabla 17. Evaluación del número de brotes, número de nudos y número de hojas durante cuatro semanas en medio WP.

evaluación	semanas			
	1	2	3	4
Nº brotes	1.00±0.00	1.00±0.00	1.50±0.58	1.66±0.58
Nº nudos	1.00±0.00	1.33±0.58	1.67±0.58	1.67±0.58
Nº hojas	1.50±0.71	2.00±1.00	3.00±1.00	3.00±1.15

Tabla 18. Evaluación de la longitud de brotes (mm.) y longitud de hojas (mm.) durante cuatro semanas en medio WP.

evaluación	semanas			
	1	2	3	4
Tamaño brotes	20.00±0.00	22.50±0.50	25.00±0.58	28.00±0.45
Tamaño hojas	20.00±0.00	30.00±0.00	35.00±0.58	36.00±0.55

- Los resultados obtenidos no tuvieron gran diferencia comparados con los que tuvimos en el medio MS demostrándonos que no había diferencias significativas entre los dos medios de cultivo.
- La tolerancia no fue a mayor a 1 en ninguno de los casos, excepto en el número de hojas en la cuarta semana ya que la desviación fue 1.15.
- Comparando los resultados obtenidos en el medio WP con los obtenidos en el medio MS observamos que el medio MS nos dio mejores resultados, siendo el número de brotes 1.66 en comparación con 2 brotes en el medio MS.

- Los resultados de número de brotes, longitud de brotes, número de nudos, número de hojas y longitud de hojas obtenidos en el medio WP fueron de 1.66 brotes; 28 mm.; 1.37 nudos; 3 hojas y 36 mm. respectivamente, los cuales fueron menores a los obtenidos en el medio MS los cuales fueron; 2 brotes, 36 mm.; 2 nudos; 5.2 hojas y 40 mm. respectivamente. (Figura 28).
- A pesar de los resultados obtenidos no se encontraron diferencias significativas entre los dos medios, lo cual nos indica que con cualquiera de los dos medios podremos obtener resultados favorables.



Figura 28. Longitud del explante a las 4 semanas de realizada la siembra en el medio WP.

Los resultados obtenidos en esta fase en la etapa de micropropagación *in vitro* se pueden observar en la figura 29 y 30 donde podemos ver el promedio de número de brotes, longitud de brotes, número de nudos, número de hojas y longitud de hojas en la cuarta semana de realizada la siembra, comparado con los resultados obtenidos en el medio MS.

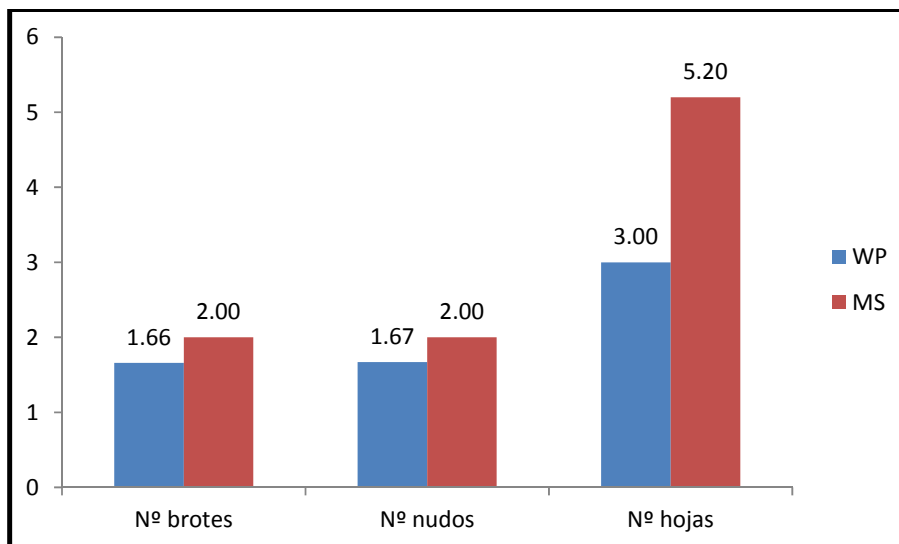


Figura 29. Comparación del promedio del número de brotes, número de nudos y número de hojas en la cuarta semana en los medios WP y MS.

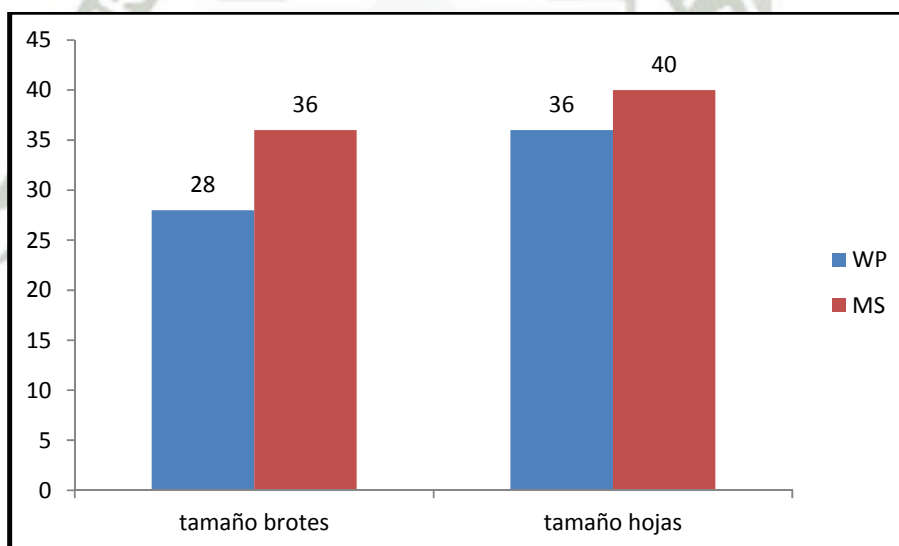


Figura 30. Comparación del promedio de la longitud de brotes (mm.), longitud de hojas (mm.) en la cuarta semana en los medios WP y MS.

4.2.3 Ensayo comparativo entre los medios *Murashige y Skoog* y el medio *Woody plant* en presencia y ausencia de ANA y BAP generando cuatro tratamientos.

Como tercera etapa en la fase de multiplicación se evaluó el crecimiento de los explantes con reguladores de crecimiento en una concentración de 0.5 uM. de ANA y 10 uM. de BAP por litro y se comparó el desarrollo de los explantes en ausencia de reguladores, se trabajó con el medio MS y WP para determinar si existía alguna diferencia significativa que nos demuestre sin un medio es mejor que el otro.

Los resultados se observan en las tablas número 19 y 20, se trabajó con tres explantes por frasco, teniendo un total de 11 frascos los cuales se evaluaron durante cuatro semanas.

Tabla 19. Longitud (mm.) de los explantes con y sin reguladores de crecimiento en el medio MS durante 4 semanas en el cultivo in vitro.

concentración semana	con reguladores (0.5 ANA/10 BAP)				sin reguladores			
	1	2	3	4	1	2	3	4
frasco 1	17.33	20.00	21.67	22.00	29.00	38.33	40.00	40.00
frasco 2	17.67	21.67	23.00	23.00	22.00	31.33	34.67	35.33
frasco 3	16.67	20.33	20.33	20.33	26.33	36.00	39.67	40.33
frasco 4	10.00	16.00	17.67	18.33	20.67	29.67	31.67	34.33
frasco 5	8.00	10.33	13.00	13.00	22.33	28.67	33.33	33.67
frasco 6	15.67	21.67	25.67	25.67	25.00	30.33	34.33	35.33
frasco 7	14.00	16.67	20.00	20.33	18.67	29.67	33.33	35.00
frasco 8	17.00	18.67	18.67	18.67	15.00	20.00	22.67	26.33
frasco 9	16.33	19.67	20.00	20.67	23.33	37.33	39.67	41.00
frasco 10	22.67	26.33	29.33	31.33	27.00	39.33	41.33	44.00
frasco 11	19.00	22.00	22.00	22.00	25.67	35.33	36.67	38.33
promedio	15.85	19.39	21.03	21.39	23.18	32.36	35.21	36.70

Promedio correspondiente a tres explantes por frasco.

- La prueba con reguladores de crecimiento nos muestra claramente que el tamaño que alcanzaron los explantes fue mucho menor al tamaño que se tuvo en la prueba sin reguladores, ya que el máximo tamaño alcanzado con reguladores fue de 31.33 mm . mientras que sin reguladores la elongación fue mucho mayor teniéndose una altura máxima de 44.00 mm.

- Las citoquininas son compuestos naturales o de síntesis que en presencia de adecuadas concentraciones de auxinas inducen la división celular en cultivos de tejidos vegetales. Es por esto que en presencia de reguladores de crecimiento tuvimos mayor tamaño de los explantes (mm.), ya que las auxinas son compuestos caracterizados por su capacidad de inducir elongación en células de vástagos y las citoquininas son un grupo de fitohormonas que regulan la división celular y la diferenciación en tejidos vegetales, participan en el control del desarrollo y la senescencia. Figura 31 y 32.



Figura 31. Desarrollo de los explantes con reguladores de crecimiento (ANA/BAP) y sin reguladores de crecimiento a las cuatro semanas del cultivo en el medio MS.

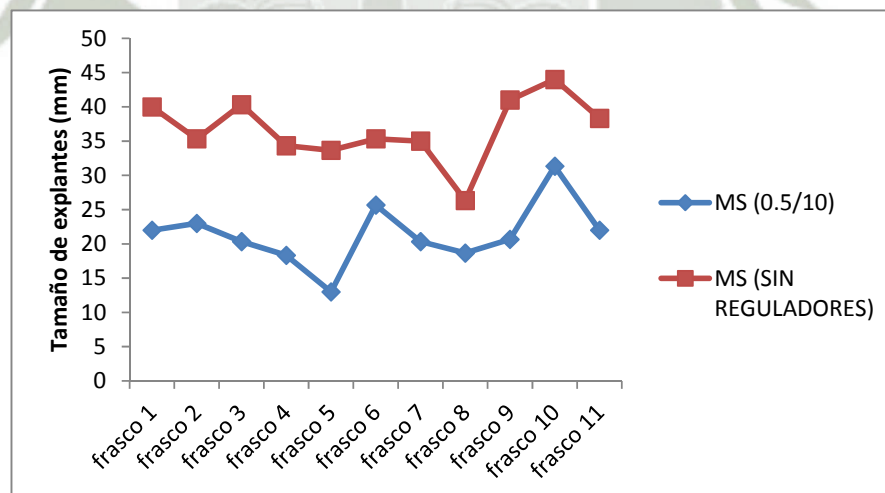


Figura 32. Longitud (mm.) de los explantes en el medio MS en presencia y ausencia de reguladores de crecimiento.

En la tabla 20 podemos observar los resultados obtenidos en el medio WP en presencia y ausencia de reguladores de crecimiento, los resultados se evaluaron durante 4 semanas de realizada la siembra.

Tabla 20. Longitud (mm.) de los explantes con y sin reguladores de crecimiento en el medio WP durante 4 semanas en el cultivo in vitro.

concentración semana	con reguladores (0.5 ANA/10 BAP)				sin reguladores			
	1	2	3	4	1	2	3	4
frasco 1	15.33	20.00	20.00	20.00	22.33	35.33	40.67	40.67
frasco 2	12.33	18.00	19.00	19.33	20.33	23.67	28.33	30.33
frasco 3	16.00	22.00	22.33	23.00	28.00	43.33	43.67	44.67
frasco 4	16.33	21.00	22.00	23.00	21.67	29.00	36.33	36.33
frasco 5	16.00	19.67	19.67	19.67	20.33	26.70	29.67	33.33
frasco 6	11.00	17.00	17.00	17.00	22.67	27.00	31.00	34.67
frasco 7	17.00	26.00	27.00	27.33	24.33	38.67	49.00	49.00
frasco 8	18.67	20.67	21.33	21.33	22.67	33.00	41.33	43.33
frasco 9	13.00	16.67	17.67	18.67	16.89	29.11	34.78	38.44
frasco 10	11.33	12.67	15.00	15.67	16.00	23.00	29.33	35.67
frasco 11	16.67	20.67	21.67	22.33	10.67	28.67	38.00	40.00
promedio	14.88	19.48	20.24	20.67	20.54	30.68	36.56	38.77

Promedio correspondiente a tres explantes por frasco.

- Al igual que con el medio MS se tuvo un mayor crecimiento en la prueba sin reguladores de crecimiento obteniendo como altura máxima 49.00 mm., mientras que con reguladores de crecimiento el mayor tamaño que se obtuvo fue de 26.00 mm.
- Utilizando el medio WP no se encontraron diferencias significativas en comparación con el medio MS, pero si se obtuvo resultados similares ya que en ausencia de reguladores de crecimiento obtuvimos mayor elongación, y en presencia de reguladores de crecimiento obtuvimos mayor número de brotes.
- Con los resultados obtenidos podemos decir que con cualquiera de los dos medios podemos obtener resultados favorables, ya que no existen diferencias

significativas; lo importante en el caso de las especies leñosas es realizar una buena desinfestación para evitar la contaminación. Figura 33.



Figura 33. Desarrollo de los explantes con reguladores de crecimiento (ANA/BAP) y sin reguladores de crecimiento a las cuatro semanas del cultivo en el medio WP.

Los resultados obtenidos del tercer ensayo se pueden observar en la figura 34 donde se notamos claramente la diferencia que se da en presencia y ausencia de reguladores de crecimiento.

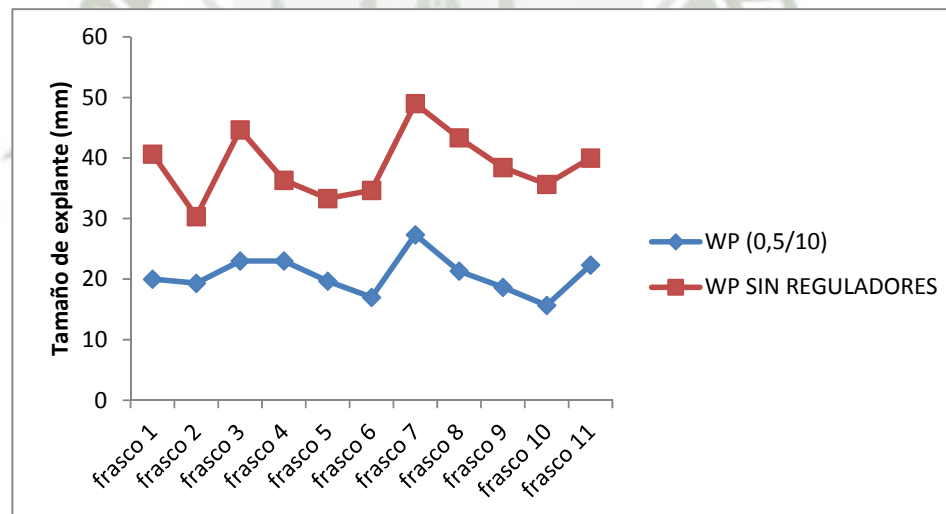


Figura 34. Longitud (mm.) de los explantes en el medio WP en presencia y ausencia de reguladores de crecimiento.

Al observar los resultados anteriores se puede notar claramente que hay diferencia significativa, lo cual da a conocer que la presencia de reguladores de crecimiento es importante cuando se trata de la obtención de brotes, mientras que en ausencia de reguladores la longitud (mm.) que se obtiene es mucho mayor.

Obtenidos estos resultados se realizó una prueba de tukey para determinar el efecto sobre los explantes que se cultivaron en los medios MS y WP, la cual se puede observar en la tabla 21.

Tabla 21. Prueba de Tukey para el Tratamiento con Medios MS y WP para la comparación en el crecimiento de los explantes.

Medios	Tamaño (mm)
WP sin reguladores	38.90 a
MS sin reguladores	36.70 a
MS (0.5 ANA/10 BAP)	21.40 b
WP (0.5 ANA/10 BAP)	20.70 b
Fc.	59.94
cv.	37.59 %

De la tabla anterior se puede rescatar que se forman dos subconjuntos bien marcados, uno formado por los medios sin reguladores, los cuales tienen efectos similares sobre el crecimiento de las plantas; y otro formado por los medios MS y WP a una concentración de 0.5 uM. ANA/10 uM. BAP. Esto da a entender que los reguladores tienen poca influencia sobre la elongación de los explantes ya que con los mismos se obtienen longitudes promedio menores al ser comparados con las longitudes obtenidas con los medios sin reguladores.

En ambos medios (MS y WP), los tratamientos sin reguladores superan ampliamente a los tratamientos con reguladores de crecimiento en la elongación del tejido, pero no en la formación de brotes.

4.3 Discusión

4.3.1 Fase de establecimiento in vitro de *Polylepis rugulosa*

4.3.1.1 Tratamiento de desinfestación: La desinfestación de explantes aislados de plantas leñosas perennes ha sido siempre una de las limitantes más severas para el establecimiento in vitro de este tipo de especies reportándose contaminaciones mayores del 90 %. Indicando claramente que los enjuagues con etanol e hipoclorito de sodio no son suficientes para eliminar completamente los contaminantes presentes en la superficie de los explantes es por este que previo a la desinfestación se hicieron lavados con detergente y un fungicida.

Los tiempos muy prolongados de esterilización permiten disminuir en gran medida la contaminación por bacterias y hongos, este desinfectante es un gran agente oxidante, cuya actividad anti microbiana le permite matar microorganismo patógenos presentes en el tejido del material vegetal. El cloro actúa modificando grupos funcionales, inactivando proteínas enzimáticas, por lo que es un bactericida muy útil y muy potente (Alemán S., 2006). Pero puede causar efectos negativos sobre el explante y más aún si se trabaja con concentraciones altas de cloro, debido a que el líquido esterilizante puede penetrar por la heridas del explante y producir un efecto tóxico, inclusive puede causar la muerte del tejido vegetal (García F., 2007). Por esta razón para determinar el mejor método de desinfección se debe tomar no solo en cuenta el tratamiento que menos contaminación tiene, sino, el que permite mayor sobrevivencia con menor contaminación (Sánchez M., Salaverría J., 2004). Es por esto que nuestro tiempo de exposición al hipoclorito de sodio no excede los 10 minutos.

4.3.1.2 Tratamiento con ácido ascórbico: La oxidación fenólica provoca un fenómeno de ennegrecimiento que ocurre por acción de enzimas tipo polifenol oxidasas y tirosinasas que se liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren heridas.

La oxidación impide que las células del explante sintetizen algunas proteínas, que al no elaborarse, afectan la formación de estructuras y el crecimiento de las vitroplantas (Quintero I., et al., 2003). Por lo tanto la eliminación de los primordios foliares permite minimizar la oxidación fenólica ya que al eliminar el tejido más expuesto a los agentes químicos, se está eliminando el tejido que mayor estrés y daños fisiológicos ha tenido en todo el proceso (López C., 2002).

La adición de solución antioxidante en el procedimiento de desinfección permitió obtener una mayor sobrevivencia de explantes, así como una menor proporción de individuos necróticos. Si bien estos resultados tienden a establecer una ventaja efectiva en la aplicación de dicha solución, el comportamiento observado también pudo ser producto de la combinación de procesos y condiciones de cultivos óptimos (tiempo de desinfección, eliminación de compuestos inhibidores de crecimiento y aplicación de solución antioxidante) determinados durante la estandarización del procedimiento de desinfección. (Gray J., Trigiano N., 2000).

4.3.1.3 Tratamiento con AG3: Se empleó ácido giberélico ya que permite incrementar tanto la división como la elongación celular, debido a que tras la aplicación de giberelinas se incrementa el número de células y la longitud de las mismas además, de los efectos sinérgicos entre las giberelinas, con las auxinas y citoquininas in vitro (Alemán S., 2006).

4.3.2 Fase de micropropagación in vitro de *Polylepis rugulosa*

4.3.2.1 Efecto de reguladores de crecimiento ANA y BAP: La proliferación de brotes se logró con la adición de una mayor concentración de citoquinina (BAP) al medio de cultivo que permite romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas. Este balance hormonal, con mayor concentración de citoquininas y menor de auxinas es determinante en el coeficiente de multiplicación. (Gray J., Trigiano N., 2000).

Las auxinas como el AIA (auxina natural) se utilizan en concentraciones de 0.01 a 10 $\mu\text{M/L}$., y las auxinas sintéticas como AIB, ANA y 2,4-D, se usan

desde concentraciones menores que van desde 0.001-10 uM/L., por ser relativamente más activas.

Las citoquininas por su parte, se usaron para estimular el crecimiento y el desarrollo, siendo las más comunes, el 6-furfurilaminopurina ócinetina (KIN), 6-bencilaminopurina (BAP), 6-dimetilaminopurina (2iP), y 6-hidroxi metilbutirilaminopurina (zeatina). Estos reguladores, además de promover la división celular, inducen la formación de vástagos axilares por la disminución de la dominancia apical y retarda el envejecimiento y se usa generalmente altas concentraciones de 1-10 mg/L. (Cardoza V., 2008; Pina L., 2008; Pierik R., 1999).

Es por esto que se utilizó como reguladores de crecimiento ANA y BAP ya que son usados comúnmente en el cultivo in vitro dándonos buenos resultados.

4.3.2.2 Comparación con el medio *Woody plant*: La formación de brotes bien diferenciados y desarrollados con morfologías normales ocurrió en varios de los cultivos en presencia de diferentes tratamientos, observándose la mayor formación cuando los explantes fueron cultivados en presencia de 0.5 uM. de ANA y 10 uM. de BAP; es por esto que se comparo con el medio *Woody plant* el cual es específico para plantas leñosas, pero no se encontró diferencias significativas entre los medios de cultivo. (Guerra M., Nodari R., 2004).

El desarrollo de los explantes puede variar de un tejido a otro dentro de la misma planta, o entre plantas de la misma especie, lo cual supone que la respuesta de un determinado explante puede variar de la respuesta de otro explante bajo las mismas concentraciones de hormonas.

4.3.2.3 Efecto sin reguladores de crecimiento: Los datos registrados permitieron observar que la presencia de auxina en el medio de cultivo es necesaria y suficiente para inducir la formación de brotes en los explantes de Queñuay que este efecto podría verse potencializado por la adición conjunta de auxinas y citoquininas en el mismo medio de cultivo, la ausencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo evito la formación de brotes

pero si indujo a la elongación de los explantes. No se encontró diferencias significativas entre los dos medios de cultivo.

Los resultados del análisis de varianza no permitieron detectar diferencias estadísticamente significativas entre un medio y otro pero con respecto al incremento de masa fresca la combinación 0.5 ml. de ANA y 10 ml. de BAP obtuvo presencia de brotes mientras que en ausencia de reguladores no se obtuvo desarrollo de los mismos. (Suarez I., Salgado J., 2008).



CAPITULO 5

CONCLUSIONES

5.1 En la fase de establecimiento in vitro las condiciones adecuadas fueron de 2.5 % de hipoclorito de sodio en un tiempo de inmersión de 10 minutos, ya que el porcentaje de sobrevivencia fue de 90 % y la contaminación producida por los contaminantes microbianos fue de 10 %.

La concentración de ácido ascórbico que nos dio mejor resultado fue de 100 mM. evitando la fenolización en el 90 % de los explantes utilizados en el establecimiento.

El uso de ácido giberélico fue muy importante para romper la dormancia siendo el mejor tratamiento el de 20 uM., ya que se obtuvo una mayor longitud en los explantes (24.20 mm.) y presentó mayor número de brotes color verde claro.

5.2 En la etapa de multiplicación in vitro de *Polylepis rugulosa* se concluyó que el tratamiento óptimo para esta fase consistió en el uso del medio MS (*Murashige y skoog*) suplementado con 10 uM/L. de bencilaminopurina (BAP) y 0.5 uM/L. de ácido naftalenacético (ANA), que resultó ser el balance hormonal adecuado (citoquinina/auxina) para la multiplicación de explantes establecidos, ya que con esta concentración de reguladores de crecimiento obtuvimos el mayor número de brotes.

5.3 En la etapa de comparación entre medios *Murashige y Skoog* y *Woody Plant* no se obtuvo diferencias entre medios ya que los dos tuvieron respuestas favorables, es por esto que el uso de cualquiera de los dos nos puede dar los resultados esperados si trabajamos en condiciones óptimas.

Se observó claramente diferencias entre la presencia y ausencia de reguladores de crecimiento, ya que en ausencia de los mismos la elongación del tejido fue mucho mayor que en la concentración de 0.5 uM. de ANA y 10 uM. de BAP.



CAPITULO 6

RECOMENDACIONES

- Un factor a tomar en cuenta es la pubescencia del tejido, si el tejido es pubescente debe hacerse un prelavado con detergente para romper la tensión superficial y permitir que la superficie sea más accesible a la acción de los agentes desinfectantes. Los métodos de desinfección utilizados no siempre eliminan las poblaciones de bacterias y hongos, es por esto que se recomienda utilizar algún fungicida.
- Para controlar la oxidación se recomienda la modificación del medio disminuyendo las sales, ya que se disminuye el estrés fisiológico generado por el potencial osmótico y salino. Y de esta forma se previene la estimulación del metabolismo de los compuestos fenólicos y la exudación al medio de cultivo de estos productos.
- En futuras investigaciones se podría emplear el medio N6 modificado, debido a su efectividad para prevenir y minimizar la oxidación fenólica, además se podrían evaluar otros medios de cultivo como el TL Tremblay&Lalonde 1984.
- Se recomienda variar la concentración de sacarosa ya que podría contribuir a la disminución de la biosíntesis de polifenoles.
- En futuras investigaciones, es recomendable realizar la eliminación de primordios foliares de las yemas ya que es muy efectivo para prevenir la oxidación y

contaminación, además se podría realizar más pruebas con otros antioxidantes como el carbón activado.

- Es importante verificar el pH del medio el cual no debe exceder a 6, ya que cuando el pH es demasiado bajo el agar pierde su rigidez provocando que algunas sales de fosfato y hierro puedan precipitar.
- En futuras investigaciones se podrían realizar pruebas con diferentes tiempos de exposición a la luz, ya que podría ser un factor que altere o favorezca el desarrollo de los explantes cultivados.
- Se recomienda hacer pruebas con diferentes reguladores de crecimiento como el ácido indol acético (AIA), ya que esta auxina se suele formar brotes nuevos en la parte superior de la planta, y fluye hacia abajo para estimular el alargamiento de las hojas recién formadas.



CAPITULO 7

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Afanador A. Propagación *in vitro* de cinco variedades comerciales de *Dianthus caryophyllus* L. (clavel). Tesis previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas. Colombia 2005.
2. Batista J. Limitaciones en el proceso de cultivo *in vitro* de especies leñosas. Recursos Genéticos y Biotecnología. Brasil 1999.
3. Borges G. M., Estrada A. E., Pérez R. I., Meneses R. S. Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. Cuba 2009.
4. BOZA H., RIVERY R., PÉREZ A. Maderas que fueron usadas en la construcción de edificaciones coloniales del Centro Histórico de La Habana Vieja, Cuba 2005.
5. Brako L., Zarucchi L. Catalogue of the flowering plant and gymnosperms of Peru. Monographs in Systematic Botany Vol. 45. Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO. 1286 pp. 1993.
6. Cabido M., Acosta A. Estudio fitosociológico en bosques de *Polylepis australis*. (Tabaquillo) en las Sierras de Córdoba. Argentina 1985.

7. Cardoza V. Tissue culture: The manipulation of plant development. Plant biotechnology and genetic: principles, techniques, and applications. John Wiley and Sons, Inc. Knoxville, Tennessee. pp. 113-134.2008.
8. Chebez J. C. Especies argentinas en peligro. Editorial Albatros. Argentina 1994.
9. Cruz A.S. Efecto de sustratos orgánicos en la reproducción vegetativa de la queñua (*P. incana*, H.B.K.) Rosoideae. Tesis de ingeniería agronómica, Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. 112 p. Bolivia 1999.
10. Echenique V., Rubistein C., Mroginski L. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Argentina: INTA. Argentina2004.
11. Folgueras M., Herrera L., Carrazana D. La contaminación microbiana en la micropropagación *in vitro* de las raíces y tubérculos tropicales. Libro de reportes cortos. Ciego de Ávila: Taller internacional BioVeg 2001.
12. Fjeldsa J. The avifauna of the Polylepis woodlands of the Andean highlands: the efficiency of basing conservation priorities on patterns of endemism, Bird Conservation International. 1993.
13. Fjeldsa J., Kessler M. Conserving the Biological Diversity of *Polylepis* woodlands of the highland of Peru and Bolivia. A Contribution to Sustainable Natural Resource Management in the Andes. NORDECO, Copenhagen, Denmark, 250 pp. 1996
14. Hartmann H., Kester D. Propagación de plantas, principios y prácticas. Mexico1997.
15. Hjarsten T. The effects of plantations in the Andes. Tropical Forest Update. 1997.

16. Jameson S. J., Ramsay P. R. Changes in high-altitude *Polylepis* forest cover and quality in the Cordillera de Vilcanota, Peru 2007.
17. Jaramillo P. “Establecimiento del cultivo in vitro de *Polylepis microphylla* como futura estrategia de conservación de la especie en la provincia del Chimborazo”. Ecuador 2008.
18. Jaramillo P., Proaño K., Jadán M. Medios de inducción, control de oxidación y contaminación en el cultivo in vitro de *Polylepis microphylla*. Ecuador. 2008.
19. Kessler M. The genus *Polylepis* (Rosaceae) in Bolivia. 1995.
20. Kessler M. Bosques de *Polylepis*. Botánica económica de los andes centrales. 2006.
21. Kessler M., Schmidt-Lebuhn A. N. Taxonomical and distributional notes on *Polylepis* (Rosaceae). *Organisms, Diversity and Evolution*. 2006.
22. Mroginski L., Sansberro P., Flaschland E. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. 2005.
23. Pedroza A., Gonzalez S., Tellez D. Micropropagation of *Dodonea viscosa* (L) Jacq: and endangered plant. *Biotechnology*. 2007.
24. Pierik R. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. España 1999.
25. Pina L. Propagación de plantas. Universidad Politécnica de Valencia, España 2008.
26. Pretzell J. Apuntes sobre algunas especies forestales nativas de la sierra peruana. Proyecto FAO/Holanda/INFOR, Lima 1985.

27. Quezada P. J., Rocabado K. P. Inducción del enraizamiento in vitro de brotes caulinares de *Polylepis racemosa* a través del manejo de la concentración de ácido indol acético (AIA) y sacarosa. Biofarbo. 2005
28. Quintero I., Polo J., Jarma A., Espitia A. *In vitro* rooting of *Dioscoreas* sp. Revista Colombiana de Biotecnología. Colombia 1993.
29. Randall A K., Hake S. Shoot meristem formation in vegetative development. 1997.
30. Renison D., Cingolani A M., Suarez R., Menoyo E., Coutsiers C., Sobral A., Hensen I. The Restoration of Degraded Mountain Woodlands: Effects of Seed Provenance and Microsite Characteristics on *Polylepis australis* Seedling Survival and Growth in Central Argentina. Argentina 2005.
31. Renison D., Cingolani A. Evaluation of *Polylepis australis* (Rosaceae) seedling survival and growth to choose seeding plants. Agriscientia.2002.
32. Richardson D. M. Forestry trees as invasive aliens. Conservation Biology.1998.
33. Roca W., Mroginski L. Cultivo de tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Colombia 1991.
34. Roca W., Mroginski L. Principios básicos, metodologías y técnicas de cultivo de tejidos vegetales.Colombia1993.
35. Sánchez M., Salaverría J. Control of oxidation and contamination of strawberry cultivated in vitro. Revista UDO Agrícola. 2004.
36. Schmidt-Lebuhn A. N., Kumar M., Kessler M. An assessment of the genetic population structure of two species of *Polylepis* in the Chilean Andes.2006.

37. Suarez I., Salgado J. Propagación *in vitro* de *stevia rebaudiana* bert. (asteraceae-eupatorieae) a través de organogénesis. 2008.
38. Vega K. C., Bermejo F. J., Villegas A. G., Quezada P. J., Aguilar Ll. M., Conde V. E. Massive propagation of *Polylepis tomentella* Weddell ssp. through in vitro culture techniques. *Ecología en Bolivia*. 2007.
39. Yensen E., Tarifa T. Mamíferos de los bosques de *Polylepis* de Bolivia. *Revista Boliviana de Ecología y Conservación Ambiental* 9: 29-43. Fundación Simón y Patiño. Centro de Biodiversidad y Genética. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba. 2001.

PAGINAS WEB

1. Alemán S. Propagación vegetativa (cap. 4). Extraído el 10 de Septiembre, 2006, del sitio Web de la Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos, Cuba. 2000. Disponible:

<http://agroweb.umcc.cu/PaginasProfesores/Silvia%20PAG%20WEB%20BIOTECNOLOGÍA/silvia2/Páginas%20de%20la%20portada/Pagina%20tema%20IV.htm>.
2. Alemán S. Organización y técnicas de cultivo de células y tejidos (cap. 3). Extraído el 10 de Septiembre, 2006, del sitio Web de la Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos, Cuba 2000. Disponible:

<http://agroweb.umcc.cu/PaginasProfesores/Silvia%20PAG%20WEB%20BIOTECNOLOGÍA/silvia2/Páginas%20de%20la%20portada/Pagina%20tema%20III.htm>.
3. García F. J. Fitoreguladores (cap. 14). Extraído el 22 de Agosto, 2007, del sitio Web de la Universidad Politécnica de Valencia. 2004. Disponible:

http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema_14.htm

4. Gray J, Trigiano N. Plant tissue, culture concepts and Laboratory Exercises. United States of America. 2000. Disponible:

<http://pages.towson.edu/jsaunder/Saunders%20Publications/60.Use%20of%20protoplasts%20for%20plant%20improvement.pdf>

5. Guerra M. P, Nodari R. O. Biotecnología, Extraído el 10 de Marzo, 2007, del sitio Web de la Universidad de Federal de Santa Catarina, Centro de Ciencias Agrarias, Laboratorio de Fisiología do Desenvolvimento e Genética Vegetal, Brasil 2004. Disponible:

<http://www.cca.ufsc.br/lfdgv/style.css>

6. López C. Reacciones de hipersensibilidad en plantas cultivadas in vitro, Margara, J. 1988. Multiplicación Vegetativa in vitro: los meristemos y la organogénesis. España: Ediciones Mundi-Prensa. 2002. Disponible:

www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS26/26reacciones.htm

ANEXOS

Tabla 1. Macronutrientes y micronutrientes, soluciones Stock 100x del medio (MS)

Murashige y Skoog (1962).

Macros	Formula	Peso M.	mM.	Gr. 100ml.	mM.	Vol. ml.
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	80.04	1000	8	20.6	20.6
Nitrato de potasio	KNO ₃	101.11	1000	10.1	18.8	18.8
Cloruro de calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	147.02	1000	14.78	2.99	2.99
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	246.48	1000	24.6	1.5	1.5
Fosfato monobásico de potasio	KH ₂ PO ₄	136.1	100	1.36	1.25	12.5
Micros	Formula	Peso M.	uM.	Mg. 100ml.	uM.	Vol. ml.
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ .H ₂ O	169.00	10000	169	100	10
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.46	10000	287	29	2.9
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	61.83	10000	61.83	100	10
Yoduro de potasio	KI	166	1000	16.6	5	5
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241.95	1000	24.2	1	1
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	249.68	100	2.4	0.1	1
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	237.93	100	2.4	0.1	1
Fuente de hierro	Formula	Peso M.	uM.	Mg. 100ml.	uM.	Vol. ml.
Ac. Etilendiamino tetra acético	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	380	10000	380	100	10
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	278.02	10000	278	100	
Vitaminas	Formula	Peso M.	uM.	Mg. 100ml.	uM.	Vol. ml.
Ácido ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	198.1	10000	1.98g.	100000	2
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	75.1	10000	75.1	26.6	2.66
Ácido nicotínico	C ₆ H ₆ NO ₂	123.1	1000	12.3	4	4
Piridoxina. HCl		205.64	1000	20.5	2.4	2.4
Tiamina. HCl		337.3	1000	33.73	0.3	0.3
Mio-inositol		180.2	100000	1.8g.	550	5.5
Carbohidratos	Formula	Peso M.	uM.	Gr. 1L.	mM.	Vol. ml.
sacarosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342		30	87.6	
Reguladores de crecimiento	Formula	Peso M.	uM.	Mg. 100ml.	uM.	Vol. ml.
ANA		186.2	1000	18.6	0.5	0.5
BAP		225.3	1000	22.5	10	10
AG3		346.3	1000	34.6	8	8
AIA		175.2				
AIB		203.2				
Fitagel				3.5g/L		

Tabla 2. Macronutrientes y micronutrientes, soluciones Stock 100x del medio (WP)

Woody Plant.

Macros	Formula	Peso M.	mM.	Gr. 100ml.	mM.	Vol. ml.
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	80.04	1000	8	4.99	4.99
Cloruro de calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	111.02	1000	11.10	0.86	0.86
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	120.48	1000	12.04	1.5	1.5
Fosfato monobásico de potasio	KH ₂ PO ₄	136.1	100	1.36	1.25	12.5
Sulfato de potasio	K ₂ SO ₄	174.25	1000	17.42	5.68	5.68
Nitrato de calcio	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236.15	1000	23.6	2.35	2.35
Micros	Formula	Peso M.	uM.	Mg. 100ml.	uM.	Vol. ml.
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ .H ₂ O	169.00	10000	169	100	10
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.46	10000	287	29	2.9
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	61.83	10000	61.83	100	10
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241.95	1000	24.2	1	1
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	249.68	100	2.4	0.1	1
Fuente de hierro	Formula	Peso M.	uM.	Mg. 100ml.	uM.	Vol. ml.
Ac. Etilendiamino tetra acético	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	380	10000	380	100	10
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	278.02	10000	278	100	
Vitaminas	Formula	Peso M.	uM.	Mg. 100ml.	uM.	Vol. ml.
Ácido ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	198.1	10000	1.98g.	100000	2
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	75.1	10000	75.1	26.6	2.66
Acido nicotínico	C ₆ H ₆ NO ₂	123.1	1000	12.3	4	4
Piridoxina. HCl		205.64	1000	20.5	2.4	2.4
Tiamina. HCl		337.3	1000	33.73	0.3	0.3
Mio-inositol		180.2	100000	1.8g.	550	5.5
Carbohidratos	Formula	Peso M.	uM.	Gr. 1L.	mM.	Vol. ml.
sacarosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342		30	87.6	
Reguladores de crecimiento	Formula	Peso M.	uM.	Mg. 100ml.	uM.	Vol. ml.
ANA		186.2	1000	18.6	0.5	0.5
BAP		225.3	1000	22.5	10	10
AG3		346.3	1000	34.6	8	8
AIA		175.2				
AIB		203.2				
Fitagel				3.5g/L		

Tabla 3. Tamaño y color de explantes de Queñua bajo el efecto de 0 uM. de ácido giberélico a los 30 días después del cultivo en el medio MS.

AG3 (uM.)	frasco	explante	Longitud (mm.)	color del explante	
				marrón	verde
0	1	1	5	x	
		2	5	x	
		3	4	x	
		promedio	4.67		
	2	4	5		x
		5	6		x
		6	5	x	
		promedio	5.33		
	3	7	5		x
		8	6	x	
		9	6	x	
		promedio	5.67		
	4	10	5	x	
		11	5	x	
		12	5	x	
promedio		5			
5	13	7	x		
	14	7		x	
	15	6	x		
	promedio	6.67			
promedio			5.47		

Tabla 4. Tamaño y color de explantes de Queñua bajo el efecto de 5 uM. de ácido giberélico a los 30 días después del cultivo en el medio MS.

AG3 (uM.)	frasco	explante	Longitud (mm.)	color del explante	
				marrón	verde
5	1	1	10		x
		2	9		x
		3	7	x	
		promedio	8.67		
	2	4	7	x	
		5	11		x
		6	11		x
		promedio	9.67		
	3	7	7	x	
		8	9		x
		9	6	x	
		promedio	7.33		
	4	10	6	x	
		11	7	x	
		12	11		x
promedio		8.00			
5	13	10		x	
	14	12		x	
	15	12		x	
	promedio	11.33			
promedio			9.00		

Tabla 5. Tamaño y color de explantes de Queñua bajo el efecto de 10 uM. de ácido giberélico a los 30 días después del cultivo en el medio MS.

AG3 (uM.)	frasco	explante	Longitud (mm.)	color del explante	
				marrón	verde
10	1	1	18		x
		2	18		x
		3	17		x
		promedio	17.67		
	2	4	20		x
		5	9	x	
		6	9	x	
		promedio	12.67		
	3	7	18		x
		8	19		x
		9	9	x	
		promedio	15.33		
	4	10	19		x
		11	8	x	
		12	19		x
promedio		15.33			
5	13	19		x	
	14	18		x	
	15	18		x	
	promedio	18.33			
	promedio		15.87		

Tabla 6. Tamaño y color de explantes de Queñua bajo el efecto de 20 uM. de ácido giberélico a los 30 días después del cultivo en el medio MS.

AG3 (uM.)	frasco	explante	Longitud (mm.)	color del explante	
				marrón	verde
20	1	1	28		x
		2	27		x
		3	25		x
		promedio	26.67		
	2	4	26		x
		5	26		x
		6	25		x
		promedio	25.67		
	3	7	24		x
		8	20		x
		9	9	x	
		promedio	17.67		
	4	10	24		x
		11	26		x
		12	27		x
promedio		25.67			
5	13	25		x	
	14	26		x	
	15	25		x	
	promedio	25.33			
	promedio		24.20		

Tabla 7. Tamaño y color de explantes de Queñua bajo el efecto de 40 uM. de ácido giberélico a los 30 días después del cultivo en el medio MS.

AG3 (uM.)	frasco	explante	Longitud (mm.)	color del explante	
				marrón	verde
40	1	1	8	x	
		2	19		x
		3	18		x
		promedio	15.00		
	2	4	20		x
		5	21	x	x
		6	21		x
		promedio	20.67		
	3	7	19		x
		8	23		x
		9	20		x
		promedio	20.67		
	4	10	20		x
		11	19		x
		12	23		x
promedio		20.67			
5	13	21		x	
	14	19		x	
	15	20		x	
	promedio	20.00			
	promedio		19.40		

Tabla 8. Número de brotes a las cuatro semanas de iniciada la siembra en el medio MS utilizando 3 explantes por tratamiento en tres repeticiones por semana.

	semana	1			2			3			4			
		repetición	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
T1	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
		2	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	n° de explantes	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
		2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	n° de explantes	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
		2	0	1	0	0	1	0	0	2	0	0	2	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
		3	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
T6	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
		2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7	n° de explantes	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	2	0	1
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
T8	n° de explantes	1	0	0	1	0	1	1	0	2	1	0	2	2
		2	0	1	0	0	1	0	0	2	0	0	2	0
		3	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	0	2
T9	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
		3	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
T10	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
		3	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
T11	n° de explantes	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
		2	0	1	0	0	1	0	0	2	0	0	2	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T12	n° de explantes	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
		2	0	1	0	0	1	0	0	2	0	0	2	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2

Tabla 9. Longitud (mm.) de brotes a las cuatro semanas de iniciada la siembra en el medio MS utilizando 3 explantes por tratamiento en tres repeticiones por semana.

	semana	1			2			3			4			
		repeticion	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
T1	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	2	0	0	3	0	0	3
		2	0	0	0	2	0	0	3	0	0	3	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	n° de explantes	1	0	0	0	2	0	0	3	0	0	3	0	0
		2	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	3	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	n° de explantes	1	0	0	2	0	0	3	0	0	3	0	0	3
		2	0	2	0	0	2	0	0	3	0	0	3	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3
		3	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	0
T6	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	2	0	0	3	0	0	3
		2	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7	n° de explantes	1	0	0	0	2	0	0	3	0	3	3	0	3
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	3	0
T8	n° de explantes	1	0	0	2	0	3	3	0	3	3	0	3	4
		2	0	2	0	0	3	0	0	3	0	0	4	0
		3	0	0	0	0	0	3	0	0	3	3	0	4
T9	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
		3	0	0	0	0	2	2	2	2	2	3	3	3
T10	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	2	0	0	3	0	0	3	0
		3	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	0	0
T11	n° de explantes	1	2	0	0	2	0	0	3	0	0	3	0	0
		2	0	2	0	0	2	0	0	3	0	0	3	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T12	n° de explantes	1	2	0	0	2	0	0	3	0	0	3	0	0
		2	0	2	0	0	3	0	0	3	0	0	4	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3

Tabla 10. Número de nudos a las cuatro semanas de iniciada la siembra en el medio MS utilizando 3 explantes por tratamiento en tres repeticiones por semana.

	semana	1			2			3			4			
		repeticion	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
T1	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
		2	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	n° de explantes	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
		2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	n° de explantes	1	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	0	2
		2	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
		3	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
T6	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2
		2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7	n° de explantes	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0
T8	n° de explantes	1	0	0	1	0	1	1	0	2	1	0	2	2
		2	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0
		3	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2	0	2
T9	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
		3	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
T10	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
		3	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
T11	n° de explantes	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
		2	0	1	0	0	1	0	0	2	0	0	2	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T12	n° de explantes	1	1	0	0	1	0	0	2	0	0	2	0	0
		2	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1

Tabla 11. Número de hojas a las cuatro semanas de iniciada la siembra en el medio MS utilizando 3 explantes por tratamiento en tres repeticiones por semana.

	semana	1			2			3			4			
		repeticion	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
T1	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	2
		2	0	0	0	2	0	0	2	0	0	3	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	n° de explantes	1	0	0	0	2	0	0	3	0	0	3	0	0
		2	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	2	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	n° de explantes	1	0	0	1	0	0	2	0	0	3	0	0	5
		2	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	4	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	2	0	0	3	0	0	3
		3	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0
T6	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	4
		2	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	3	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7	n° de explantes	1	0	0	0	1	0	0	2	0	2	3	0	2
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	5	0
T8	n° de explantes	1	0	0	2	0	2	2	0	4	3	0	8	5
		2	0	2	0	0	2	0	0	3	0	0	6	0
		3	0	0	0	0	0	2	0	0	4	2	0	5
T9	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
		3	0	0	0	0	1	2	1	2	2	2	3	3
T10	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	3	0
		3	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	0
T11	n° de explantes	1	1	0	0	1	0	0	2	0	0	4	0	0
		2	0	2	0	0	2	0	0	4	0	0	6	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T12	n° de explantes	1	1	0	0	2	0	0	3	0	0	5	0	0
		2	0	1	0	0	2	0	0	4	0	0	7	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3

Tabla 12. Longitud (mm.) de hojas a las cuatro semanas de iniciada la siembra en el medio MS utilizando 3 explantes por tratamiento en tres repeticiones por semana.

	semana	1			2			3			4			
		repeticion	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
T1	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3
		2	0	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	n° de explantes	1	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	0	0
		2	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	4	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	n° de explantes	1	0	0	2	0	0	2	0	0	3	0	0	4
		2	0	3	0	0	2	0	0	2	0	0	3	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	4	0	0	4	0	0	4
		3	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	0
T6	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	3
		2	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7	n° de explantes	1	0	0	0	3	0	0	3	0	3	3	0	4
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	0
T8	n° de explantes	1	0	0	3	0	4	3	0	4	3	0	5	3
		2	0	3	0	0	3	0	0	3	0	0	4	0
		3	0	0	0	0	0	3	0	0	4	4	0	4
T9	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
		3	0	0	0	0	3	2	3	3	2	3	3	3
T10	n° de explantes	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	2	0	0	3	0	0	4	0
		3	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	0	0
T11	n° de explantes	1	3	0	0	3	0	0	3	0	0	3	0	0
		2	0	2	0	0	2	0	0	3	0	0	3	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T12	n° de explantes	1	2	0	0	3	0	0	3	0	0	3	0	0
		2	0	3	0	0	3	0	0	4	0	0	4	0
		3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3

Tabla 13. Evaluación del número de brotes, longitud (mm.) de brotes, número de nudos, número de hojas y tamaño de hojas durante cuatro semanas en medio WP bajo una concentración de 0,5 ml. ANA y 10 ml. BAP por litro durante cuatro semana de realizada la siembra.

		semana	1			2			3			4		
		repetición	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
n° de brotes	n° de explantos	1	1	0	0	1	0	1	2	0	1	2	0	2
		2	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	2	0
		3	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1
longitud de brotes	n° de explantos	1	2	0	0	2	0	2	2	0	3	2	0	3
		2	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	3	0
		3	0	0	2	0	0	3	0	0	3	3	0	3
n° de nudos	n° de explantos	1	1	0	0	1	0	0	2	0	0	2	0	0
		2	0	1	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0
		3	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
n° de hojas	n° de explantos	1	1	0	0	2	0	0	4	0	0	4	0	0
		2	0	2	0	0	3	0	0	3	0	0	4	0
		3	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2	0	2
longitud de hojas	n° de explantos	1	2	0	0	3	0	0	4	4	0	4	4	0
		2	0	2	0	0	3	0	0	3	0	0	3	0
		3	0	0	0	0	0	3	0	0	3	3	0	4

Tabla 14. Longitud (mm.) de los explantes con reguladores de crecimiento en el medio MS a las cuatro semanas de realizada la siembra como prueba comparativa entre el medio MS y WP utilizando el mejor tratamiento (0.5 ANA/10 BAP) obtenido en la fase de multiplicación comparado con la ausencia de reguladores de crecimiento.

frasco	explante	longitud inicial	semana			
			1	2	3	4
1	1	5	23	25	25	25
	2	5	13	16	21	21
	3	5	16	19	19	20
2	1	4	21	22	24	24
	2	5	26	30	30	30
	3	5	6	13	15	15
3	1	5	17	21	21	21
	2	5	18	21	21	21
	3	5	15	19	19	19
4	1	4	7	19	19	20
	2	4	6	10	14	15
	3	5	17	19	20	20
5	1	4	8	10	14	14
	2	4	6	10	10	10
	3	5	10	11	15	15
6	1	4	9	15	21	21
	2	5	21	25	28	28
	3	5	17	25	28	28
7	1	5	19	22	22	22
	2	4	5	8	18	18
	3	5	18	20	20	21
8	1	5	18	18	18	18
	2	5	17	18	18	18
	3	5	16	20	20	20
9	1	4	17	20	20	20
	2	5	16	20	20	22
	3	5	16	19	20	20
10	1	5	28	34	34	40
	2	5	22	25	34	34
	3	5	18	20	20	20
11	1	5	18	20	20	20
	2	5	26	26	26	26
	3	4	13	20	20	20

Tabla 15. Longitud (mm.) de los explantes sin reguladores de crecimiento en el medio MS a las cuatro semanas de realizada la siembra como prueba comparativa entre el medio MS y WP utilizando el mejor tratamiento (0.5 ANA/10 BAP) obtenido en la fase de multiplicación comparado con la ausencia de reguladores de crecimiento.

frasco	explante	Longitud inicial	semana			
			1	2	3	4
1	1	4	23	28	28	28
	2	4	31	49	51	51
	3	4	33	38	41	41
2	1	4	20	30	34	36
	2	5	26	30	30	30
	3	5	20	34	40	40
3	1	5	24	39	45	46
	2	6	35	45	45	45
	3	5	20	24	29	30
4	1	4	20	25	27	30
	2	5	27	40	44	45
	3	4	15	24	24	28
5	1	5	23	33	44	45
	2	5	29	31	31	31
	3	4	15	22	25	25
6	1	5	18	19	20	23
	2	5	22	24	35	35
	3	5	35	48	48	48
7	1	5	26	33	35	35
	2	5	20	39	43	48
	3	4	10	17	22	22
8	1	5	20	29	29	29
	2	4	8	11	19	25
	3	5	17	20	20	25
9	1	6	31	38	41	43
	2	5	22	38	40	40
	3	5	17	36	38	40
10	1	6	31	40	41	44
	2	6	23	33	36	38
	3	5	27	45	47	50
11	1	5	26	40	41	44
	2	5	18	20	22	22
	3	5	33	46	47	49

Tabla 16. Longitud (mm.) de los explantes con reguladores de crecimiento en el medio WP a las cuatro semanas de realizada la siembra como prueba comparativa entre el medio MS y WP utilizando el mejor tratamiento (0.5 ANA/10 BAP) obtenido en la fase de multiplicación comparado con la ausencia de reguladores de crecimiento.

frasco	explante	longitud inicial	semana			
			1	2	3	4
1	1	4	12	18	18	18
	2	5	18	24	24	24
	3	5	16	18	18	18
2	1	4	10	15	15	15
	2	5	12	20	21	21
	3	5	15	19	21	22
3	1	5	20	23	23	24
	2	4	13	20	21	21
	3	5	15	23	23	24
4	1	5	15	22	23	23
	2	4	13	16	16	16
	3	5	21	25	27	30
5	1	5	16	20	20	20
	2	5	16	20	20	20
	3	4	16	19	19	19
6	1	4	10	11	11	11
	2	4	11	19	19	19
	3	5	12	21	21	21
7	1	5	20	28	30	30
	2	5	16	27	27	27
	3	4	15	23	24	25
8	1	5	14	15	15	15
	2	5	20	22	24	24
	3	5	22	25	25	25
9	1	5	13	15	16	16
	2	4	11	14	15	18
	3	5	15	21	22	22
10	1	5	11	11	12	12
	2	4	4	6	8	8
	3	5	19	21	25	27
11	1	5	16	20	23	25
	2	5	16	20	20	20
	3	5	18	22	22	22

Tabla 17. Longitud (mm.) de los explantes sin reguladores de crecimiento en el medio WP a las cuatro semanas de realizada la siembra como prueba comparativa entre el medio MS y WP utilizando el mejor tratamiento (0.5 ANA/10 BAP) obtenido en la fase de multiplicación comparado con la ausencia de reguladores de crecimiento.

frasco	explante	longitud inicial	semana			
			1	2	3	4
1	1	5	21	40	40	40
	2	6	31	40	47	47
	3	5	15	26	35	35
2	1	5	21	23	30	31
	2	5	18	25	25	27
	3	5	22	23	30	33
3	1	6	32	45	45	46
	2	5	25	44	45	47
	3	5	27	41	41	41
4	1	5	25	32	32	32
	2	5	22	28	45	45
	3	4	18	27	32	32
5	1	4	15	25	33	33
	2	5	21	25	26	36
	3	5	25	30	30	31
6	1	6	29	30	42	49
	2	5	18	21	21	25
	3	5	21	30	30	30
7	1	5	23	40	52	52
	2	6	27	44	55	55
	3	5	23	32	40	40
8	1	5	17	30	40	40
	2	5	22	30	30	36
	3	6	29	39	54	54
9	1	5	16	30	33	41
	2	6	31	44	44	44
	3	5	25	33	34	34
10	1	6	31	34	41	46
	2	4	6	15	22	28
	3	4	11	20	25	33
11	1	5	13	35	40	46
	2	4	6	28	34	34
	3	6	13	23	40	40

Tabla 18. Análisis de varianza para el tratamiento con hipoclorito de sodio en tres concentraciones distintas en tres tiempos diferentes, generando 9 tratamientos para evitar la contaminación.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	gl.	Media cuadrática	F _c	Significancia
Tratamiento con cloro	10800	8	1350	1350	0.000
Error	18	18	1		
Total	10818	26			

Tabla 19. Análisis de varianza para la evaluación del efecto del ácido ascórbico en tres concentraciones distintas para evitar la fenolización.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	gl.	Media cuadrática	F _c	Significancia
Tratamiento con ácido ascórbico	6450	2	3225	3225	0.000
Error	6	6	1		
Total	6456	8			

Tabla 20. Análisis de varianza para la aplicación de AG3 usando cinco concentraciones para romper la dormancia evaluando el tamaño de los explantes en la cuarta semana de iniciada la siembra.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	gl.	Media cuadrática	F _c	Significancia
Tratamiento con AG3	3471.12	4	867.78	73.947	0.000
Error	821.467	70	11.735		
Total	4292.587	74			

Tabla 21. Análisis de varianza sobre el número de brotes en 12 diferentes tratamientos con ANA y BAP usando el medio MS.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	gl.	Media cuadrática	F _c	Significancia
Tratamiento para n° de brotes	5.778	11	0.525	1.319	0.226
Error	38.222	96	0.398		
Total	44	107			

Tabla 22. Análisis de varianza sobre el tamaño de brotes en 12 diferentes tratamientos con ANA y BAP usando el medio MS.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	gl.	Media cuadrática	F _c	Significancia
Tratamiento para longitud de brotes	16.852	11	1.532	1.116	0.357
Error	131.778	96	1.373		
Total	148.63	107			

Tabla 23. Análisis de varianza sobre el número de nudos en 12 diferentes tratamientos con ANA y BAP usando el medio MS.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	gl.	Media cuadrática	F _c	Significancia
Tratamiento para n° de nudos	1.657	11	0.151	0.33	0.977
Error	43.778	96	0.456		
Total	45.435	107			

Tabla 24. Análisis de varianza sobre el número de hojas en 12 diferentes tratamientos con ANA y BAP usando el medio MS.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	gl.	Media cuadrática	F _c	Significancia
Tratamiento para n° de hojas	4.917	11	0.447	0.352	0.971
Error	122	96	1.271		
Total	126.917	107			

Tabla 25. Análisis de varianza sobre el tamaño de hojas en 12 diferentes tratamientos con ANA y BAP usando el medio MS.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	gl.	Media cuadrática	F _c	Significancia
Tratamiento para longitud de hojas	5.407	11	0.492	0.222	0.996
Error	212.222	96	2.211		
Total	217.63	107			

Tabla 26. Análisis de varianza para el uso de medios MS y WP y la comparación en el crecimiento de los explantes en presencia y ausencia de reguladores de crecimiento.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	gl.	Media cuadrática	F _c	Significancia
Comparación entre medios MS y WP	9354.212	3	3118.071	59.948	0.000
Error	6657.697	128	52.013		
Total	16011.909	131			