

**UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO
ÁREA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS PECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



TESIS DE GRADO

**EFFECTO DE LA BENCIL AMINOPURINA (BAP) Y EL ÁCIDO
INDOLBUTÍRICO (AIB) EN LOS ESTADIOS DE MULTIPLICACIÓN Y
ENRAIZAMIENTO DE TRES ESPECIES DE KEÑUA (*Polylepis
tomentella* Weddell ssp. *nana*, *Polylepis incana* Kunth, *Polylepis
besseri* Hieron) EN CONDICIONES *IN VITRO***

POR:

LUIS FERNANDO LIA CRUZ

EL ALTO – BOLIVIA

NOVIEMBRE, 2015

**UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO
ÁREA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS PECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**EFFECTO DE LA BENCIL AMINO PURINA (BAP) Y EL ÁCIDO INDOL
BUTÍRICO (AIB), EN LOS ESTADIOS DE MULTIPLICACIÓN Y
ENRAIZAMIENTO DE TRES ESPECIES DE KEÑUA (*Polylepis
tomentella* Weddell ssp. *nana*, *Polylepis incana* Kunth, *Polylepis
besseri* Hieron) EN CONDICIONES *IN VITRO***

*Tesis de Grado como requisito
parcial para optar el Título de
Ingeniero Agrónomo*

LUIS FERNANDO LIA CRUZ

Tutores:

Ing. Ph.D. Víctor Hugo Mendoza Condori

Ing. Laoreano Coronel Quispe

Tribunal Revisor:

Ing. M. Sc. Cristóbal Riquelme Molina

Ing. Lourdes Martínez Estévez

Ing. M. Sc. Rogelio Maydana Apaza

APROBADA

Director de Carrera:

Ing. Laoreano Coronel Quispe

V - IX - MM

DEDICATORIA:

Dedico la presente tesis de grado a Dios por ser la luz y guía de mi camino que me ha dado sabiduría salud e inteligencia para cumplir cada una de las metas que me he trazado; a mi padre y madre por el apoyo incondicional brindado durante mi formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

Mi profundo agradecimiento a Dios por la oportunidad de concederme la vida, por guiarme en su camino y por la conclusión de mi carrera profesional.

Mis más sinceros agradecimientos a las siguientes instituciones y personas:

A la Carrera de Ingeniería Agronómica de la Universidad Pública de El Alto, al plantel docente y administrativo, por haberme impartido valiosos conocimientos que contribuyeron en mi formación profesional.

Al Ingeniero Jorge Quezada Portugal especialista y con amplia experiencia en cultivos *in vitro* en especies forestales, que me brindo su ayuda en los momentos que llegue a necesitar en las diferentes etapas de mi trabajo de tesis en laboratorio.

A mis Asesores: Dr. Víctor Hugo Mendoza Condori y el Ing. Laoreano Coronel Quispe brindándome su tiempo y apoyo en la planificación, corrección y orientación profesional.

A mis Tribunales Revisores: Ing. M.Sc. Cristóbal Riquelme Molina, Ing. Lourdes Martínez Estévez, Ing. M.Sc Rogelio Maydana Apaza, por sus sugerencias y correcciones en la revisión del presente trabajo de tesis.

Y un agradecimiento inmenso a la Dirección de Investigación Ciencia y Tecnología (DICyT) de la Universidad Pública de El Alto, que gracias al apoyo de los recursos económicos que me otorgaron fue posible realizar en presente trabajo de investigación que sin su apoyo no hubiera sido posible realizarlo.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TEMAS.....	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE ANEXSOS.....	v
RESUMEN	vii

ÍNDICE DE TEMAS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Justificación	2
1.2. Objetivos.....	2
1.2.1. Objetivo general	2
1.2.2. Objetivos específicos	2
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Taxonomía y evolución del género <i>Polylepis</i>	3
2.2. Ecología de los bosques de <i>Polylepis</i>	3
2.3. Distribución y abundancia	4
2.4. Propagación.....	5
2.4.1. Propagación sexual.....	5
2.4.2. Propagación asexual.....	6
2.4.3. Propagación usando la técnica de cultivos <i>in vitro</i>	8
2.5. Cultivo <i>in vitro</i>	8
b) Ventajas y desventajas del cultivo <i>in vitro</i>	10
2.6. Propagación <i>in vitro</i> de especies leñosas	11
2.7. Reguladores de crecimiento	13
2.8. Mecanismos de acción de los reguladores de crecimiento vegetal	17

2.9.	Componentes del medio de cultivo	18
2.9.1.	Fases de la propagación cultivo <i>in vitro</i>	19
2.9.1.1.	Fase 1: Establecimiento	19
2.9.1.2.	Fase 2: Multiplicación	22
2.9.1.3.	Fase 3: Enraizamiento.....	24
2.9.1.4.	Fase 4: Aclimatación	25
2.9.2.	Factores que afectan el cultivo <i>in vitro</i>	26
2.9.2.1.	Contaminación	26
2.9.2.2.	Oxidación	27
2.9.2.3.	Vitrificación ó hiperhidratación.....	27
2.9.2.4.	Variación somaclonal	28
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1.	Localización	29
3.2.	Material vegetal	29
3.3.	Métodos.....	29
3.3.1.	Procedimiento experimental.....	29
3.3.1.1.	Fase de campo.....	29
3.3.1.2.	Identificación de la especie	30
3.3.1.3.	Fase 1: Establecimiento	30
3.3.1.4.	Fase 2: Multiplicación	31
3.3.1.5.	Fase 3: Enraizamiento.....	32
3.3.2.	Diseño experimental	32
3.3.3.	Tratamientos en estudio.....	33
3.3.4.	Variables de respuesta.....	34
3.3.5.	Análisis económico	35

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1.	Variables de respuesta en la fase de multiplicación	36
4.1.1.	Números de hojas	36
4.1.2.	Crecimiento de brotes	37
4.1.3.	Porcentaje de oxidación	39
4.1.4.	Porcentaje de necrosamiento	41
4.2.	Variables de respuesta en la fase de enraizamiento	44
4.3.	Variables económicas	46
4.3.1.	Análisis económico	46
5.	CONCLUSIONES	48
6.	RECOMENDACIONES	50
7.	BIBLIOGRAFÍA	51
8.	ANEXOS	61

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Rangos altitudinales donde se desarrollan las especies de <i>Polylepis</i> , ordenados según cota inferior.....	5
Cuadro 2.	Presencia de especies <i>Polylepis</i> por país.....	6
Cuadro 3.	Composición de medios de cultivo.....	20
Cuadro 4.	Descripción de los tratamientos con las concentraciones de bencil aminopurina (BAP).....	34
Cuadro 5.	Descripción de los tratamientos con las concentraciones de ácido indolbutírico (AIB).....	34
Cuadro 6.	Análisis de varianza para el número de hojas por el efecto de las diferentes concentraciones de BAP en las tres especies de keñua.....	37
Cuadro 7.	Análisis de varianza del crecimiento de brotes por el efecto de las diferentes concentraciones de BAP en las tres especies de keñua.....	38
Cuadro 8.	Análisis de varianza del porcentaje de oxidación por el efecto de las diferentes concentraciones de BAP en las tres especies de keñua.....	40
Cuadro 9.	Análisis de varianza del porcentaje de necrosamiento por el efecto de las diferentes concentraciones de BAP en las tres especies de keñua.....	42
Cuadro 10.	Análisis de varianza del número de raíces por el efecto de las diferentes concentraciones de AIB en las tres especies de keñua.....	45
Cuadro 11.	Análisis de varianza del crecimiento de las raíces en las vitroplantas por el efecto de las diferentes concentraciones de AIB en las tres especies de keñua.....	45
Cuadro 12.	Análisis de varianza del porcentaje de oxidación de las vitroplantas en las tres especies de keñua.....	46
Cuadro 13.	Análisis de varianza del porcentaje de necrosamiento de las vitroplantas en las tres especies de keñua.....	46
Cuadro 14.	Presupuesto parcial y beneficios netos de los tratamientos.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Comparación de medias del número de hojas en las tres especies de keñua Duncan 5%.....	38
Figura 2.	Comparación de medias del crecimiento de brotes de las tres especies de keñua Duncan 5%.....	39
Figura 3.	Comparación de medias del crecimiento de brotes de las diferentes especies de keñua por el efecto de tres concentraciones de BAP Duncan 5%.....	39
Figura 4.	Comparación de medias en el porcentaje de oxidación de las vitroplantas de las tres especies de keñua Duncan 5%.....	41
Figura 5.	Comparación de medias en el porcentaje de oxidación en las vitroplantas de keñua por el efecto de tres concentraciones de BAP Duncan 5%.....	41
Figura 6.	Comparación de medias del porcentaje de necrosamiento en las vitroplantas, en las tres especies keñua Duncan 5%.....	43
Figura 7.	Comparaciones múltiples de medias del porcentaje de necrosamiento en las vitroplantas de keñua por el efecto de la interacción de concentración por especies Duncan 5%.....	44
Figura 8.	Comparación de medias en el crecimiento de raíces de las vitroplantas de keñua Duncan 5%.....	46

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Descripción de niveles de BAP en las tres especies de keñua.....	62
Anexo 2.	Descripción de niveles de AIB en las tres especies de keñua	63
Anexo 3.	Promedio de las variables de respuesta en la fase de multiplicación de las tres especies de keñua (<i>Polylepis tomentella</i> , <i>Polylepis incana</i> , <i>Polylepis besser</i>).....	64
Anexo 4.	Promedio de las variables de respuesta en la fase de enraizamiento de las tres especies de keñua (<i>Polylepis tomentella</i> , <i>Polylepis incana</i> , <i>Polylepis besser</i>)... ..	65
Anexo 5.	Equipos y materiales de laboratorio usados para cultivos in vitro.....	66
Anexo 6.	Composición de medios basales: Chu et al (1975), TL (Tremblay & Lalonde, 1984) y WPM (Mc Cown % Lloyd, 1980) para las fases de establecimiento, multiplicación y enraizamiento.	68
Anexo 7.	Reactivos usados para la preparación de los medios basales: Chu et al (1975), TL (Tremblay & Lalonde, 1984) y WPM (Mc Cown % Lloyd, 1980) en las fases de establecimiento, multiplicación y enraizamiento.	69
Anexo 8.	Preparación de los medios cultivos para la fase de establecimiento	70
Anexo 9.	Recolección del material vegetal de keñua <i>Polylepis tomentella</i> spp. nana y <i>Polylepis besser</i> del Jardín Botánico del Campus Universitario en Cota Cota de la Universidad Mayor de San Andrés.	72
Anexo 10.	Recolección del material vegetal de keñua (<i>Polylepis incana</i>) del vivero forestal en el centro experimental en kallutaca de la carrera de ingeniería Agronómica de Universidad Pública de El Alto.....	72
Anexo 11.	Fase de establecimiento de las tres especies de keñua (<i>Polylepis tomentella</i> ssp. nana, <i>Polylepis incana</i> , <i>Polylepis besser</i>).....	73
Anexo 12.	Fase de multiplicación de las tres especies de keñua (<i>Polylepis tomentella</i> spp nana, <i>Polylepis incana</i> , <i>Polylepis besser</i>).....	74
Anexo 13.	Fase de enraizamiento de las tres especies de keñua (<i>Polylepis tomentella</i> , <i>Polylepis incana</i> , <i>Polylepis besser</i>).	76

RESUMEN

La keñua es una especie endémica de Bolivia, está considerada en peligro de extinción, por lo cual es necesario el desarrollo de iniciativas que promuevan su conservación; siendo una alternativa el uso de técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Se utilizaron yemas apicales que fueron desinfectadas en etanol al 70 por ciento e hipoclorito de sodio al 2 por ciento de su concentración, para su establecimiento *in vitro*. Los explantes obtenidos fueron sembrados en medio basal Chu *et al.*, (1975). En la fase de multiplicación, los brotes fueron subdivididos e introducidos en el medio de Tremblay y Lalonde (1984), variando la concentración del bencil aminopurina para incrementar el número de brotes por explantes. En la fase de enraizamiento se varió diferentes niveles de ácido indolbutírico usando el medio basal Mc Cown y Lloyd (1980), para el desarrollo de número y la longitud de las raíces generadas *in vitro*; por otra parte la aplicación de una solución de ácido cítrico/ácido ascórbico fue usada para el control de la oxidación. Para la multiplicación *in vitro* el mejor medio basal fue de Tremblay y Lalonde (1984) suplementado con $0.23 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de bencil aminopurina y $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de ácido indolbutírico en las especies de keñua (*Polylepis tomentella* ssp. *nana*, *Polylepis incana*, *Polylepis besserii*). En la fase enraizamiento para la formación y desarrollo radicular de las vitroplantas, el medio basal de cultivo Mc Cown y Lloyd (1980) al 50% de su concentración, con 50 g/l de sacarosa y las diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (AIB) no se tuvieron diferencias significativas, pero si en la longitud de raíces. En cuanto al análisis de los costos de producción y beneficios netos entre los tratamientos estudiados, y considerando todos los valores de operación. Los resultados permiten indicar que el tratamiento 2 ($0.3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP) es más rentables ante los demás tratamientos en la fase de multiplicación. Por otra parte, los tratamientos 1 y 3 ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$; $0.15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB), también pueden considerarse rentables en la fase de enraizamiento.

1. INTRODUCCIÓN

Los bosques de *Polylepis*, son cada vez más vulnerables a los efectos antrópicos y cambios climáticos por encontrarse en ecosistemas frágiles de altura. A pesar de ello, constituyen un recurso natural muy importante para la sostenibilidad de la biodiversidad, así como de las poblaciones rurales. El género *Polylepis* incluye aproximadamente 27 especies (Mendoza y Cano, 2011; Kessler y Schmidt-Lebuhn, 2006) que forman bosques de hoja perenne en poblaciones muy fragmentadas a lo largo de las alturas de los Andes tropicales y subtropicales. Se estima que quedan menos del 10% de su extensión original en las regiones altas de Bolivia y Perú (Fjeldså y Kessler, 1996).

Es importante mencionar que su reproducción a partir de semillas se da en una escala muy limitada, debido a su bajo poder germinativo y que solo se puede lograr a través del almácigo en sustrato de arena y con alto contenido de materia orgánica, inmediatamente después de su recolección. La producción de plantines a partir de estacas se ve limitado porque tiene un tiempo de desarrollo lento; además, que se debe realizar poda de raíces a los 4 meses esto para mejorar el crecimiento de las plantas, donde se debe tener mucho cuidado y evitar la pérdida del sustrato, el personal que realiza esta actividad debe ser experta esto para evitar la muerte de los plantines (Patterson, 1998).

Al no existir proyectos de producción de plantines de keñua para planes de reforestación y forestación de bosques sobre todo en especies nativas, se ve con mucha preocupación la reducción de poblaciones de árboles y arbustos de keñua, esto puede llegar a causar la desaparición de esta especie en Bolivia, y que su producción de plantines se ve limitado por tener problemas de renegación natural ya sean vía semillas o por estacas.

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 keñua. 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 de especies nativas.

1.1. Justificación

La especie *Polylepis* al tener una tasa baja en reproducción vegetativa por semilla y por la vía de esquejes y acodos son de ciclos largos de más 6 meses, la producción de plantines en viveros forestales es mínima. El cultivo *in vitro* podría ser una técnica que ayudaría a propagar esta especie. Con el presente trabajo de investigación se busca una tecnología adecuada usando reguladores de crecimiento para poder incrementar la multiplicación *in vitro* de keñua.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de bencil aminopurina (BAP), en la multiplicación y el ácido indolbutírico (AIB), en el enraizamiento de tres especies de Keñua (*Polylepis tomentella* ssp. *nana*, *Polylepis incana*, *Polylepis besseri*), en condiciones *in vitro*.

1.2.2. Objetivos específicos

- Determinar la concentración adecuada de bencil aminopurina (BAP), en la fase de multiplicación y el ácido indolbutírico (AIB), en la fase de enraizamiento en las tres especies de keñua.
- Evaluar el comportamiento morfológico *in vitro* de las tres especies de keñua por efecto de la aplicación de reguladores de crecimiento.
- Realizar un análisis económico de los tratamientos estudiados.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Taxonomía y evolución del género *Polylepis*

El género *Polylepis* pertenece a la tribu Sanguisorbeae de la familia Rosaceae, que se caracteriza por una polinización anemófila y por sus frutos secos. *Polylepis* incluye entre 15 y 28 especies (Bitter, 1911; Simpson, 1979; Kessler, 1995b; Kessler y Schmidt-Lebuhn, 2005), en su mayoría árboles de 5 a 10 metros de altura, pero también con algunas especies comúnmente arbustivas (*P. microphylla*, *P. pepeii*, *P. tarapacana*, *P. tomentella* ssp. *nana*) y otras que llegan a superar los 25 metros de altura (*P. lanata*, *P. pauta*).

El nombre *Polylepis* deriva de dos palabras griegas, poly (muchas) y letis (láminas), refiriéndose a la corteza compuesta por múltiples láminas que se desprenden en delgadas capas. Este tipo de corteza es común en todas las especies del género. La corteza es gruesa y cubre densamente el tronco, que protege contra bajas temperaturas e incendios. Algunas especies de *Polylepis* forman bosques que crecen a lo largo de la línea de árboles e incluso llegan a mayores elevaciones, rodeados por pastizales y arbustales. Algunos individuos de *Polylepis tarapacana* crecen por encima de 5000 msnm., situando a *Polylepis* como el género con la distribución más alta de árboles angiospermas en el mundo (García Nuñez *et al.*, 2004).

Todas las especies de *Polylepis* tienen adaptaciones a los hábitats fríos y áridos de los altos Andes. Aunque no haya datos exactos, donde la formación y origen de las montañas y por extensión, todo movimiento de la corteza terrestre andina relativamente reciente y la baja diferenciación genética de las especies sugieren que la evolución del género ha ocurrido en los pocos últimos millones de años (Simpson, 1986; Kessler, 1995a; Kerr, 2003; Schmidt Lebuhn *et al.*, 2006).

2.2. Ecología de los bosques de *Polylepis*

Las condiciones ecológicas de los bosques de *Polylepis* se pueden caracterizar principalmente en relación a condiciones de temperatura, humedad y suelos. Debido a su localización a grandes elevaciones en los Andes, los bosques de *Polylepis* están sujetos a amplias fluctuaciones diurnas de temperatura, comúnmente con diferencias de 20 - 30°C entre las temperaturas máximas del día y las heladas nocturnas. Estas fluctuaciones

representan un estrés enorme para las plantas. Sobre todo a altitudes por encima de los 4000 msnm. La gran mayoría de las especies muestra adaptaciones a temperaturas bajas. Estas pueden ser morfológicas como las gruesas cortezas de *Polylepis*, demás tienen una fisiología de resistencia al congelamiento que también se observa en *Polylepis* (Goldstein *et al.*, 1994, Körner 1999; Hoch y Körner 2005).

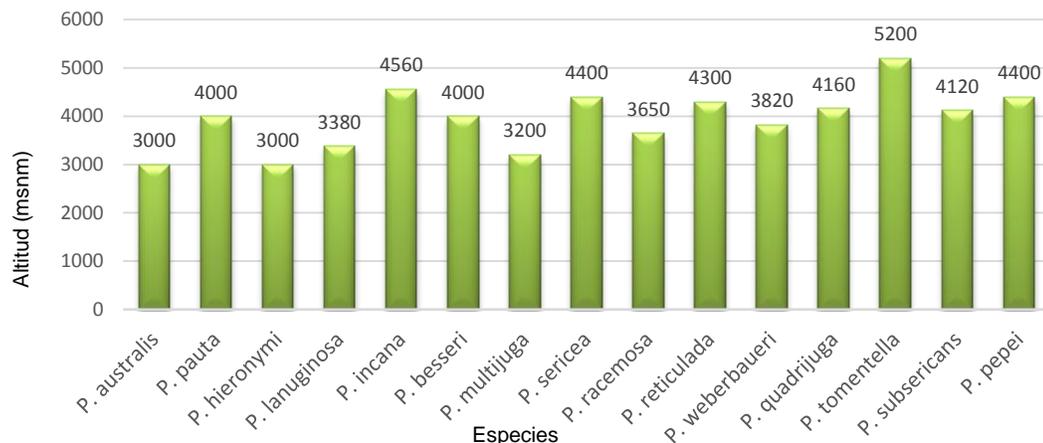
En el caso de *Polylepis*, el crecimiento vegetativo tiene lugar sobre todo en la época húmeda y relativamente caliente, mientras que la floración ocurre principalmente en la época seca y fría. Esto probablemente es una adaptación a una eficiente polinización por viento en la época seca y tiene efectos en las semillas que llegan a estar maduras al comienzo de la época de lluvias para aprovechar al máximo las condiciones favorables (Beck y Ellenberg, 1977; Geyger, 1985).

2.3. Distribución y abundancia

La mayoría de las especies se encuentran en el rango altitudinal de 3000 a 3200 msnm., hacia abajo y hacia arriba de este rango, el número de especies del género disminuye. La especie con registros a menores elevaciones es *Polylepis australis*, a poco menos de 1800 msnm. En Córdoba, Argentina, la especie registrada a mayor altitud es *Polylepis tomentella* en el volcán Sajama, Bolivia a 5200 msnm., detallada en el **Cuadro 1**.

Los datos del **Cuadro 1** son relativos, ya que existe un registro de colección de *Polylepis australis* a 1000 msnm., en Saladillo, Argentina (Mayer, 1984); citado por Simpson (1979); Kurtz (1904); Baez (1939) y Cabrera (1958, 1971, 1976); citados por Cantero y Blanco (1987) dan rangos altitudinales similares para esta especie: 1700 a 2000, 1000 a 2200 y 1900 a 3000 msnm., respectivamente. Con la información de Cantero y Blanco (1987) sugiere que la altitud mínima estaría a poco menos de 1800 msnm.

Cuadro 1. Rangos altitudinales donde se desarrollan las especies de *Polylepis*, ordenados según cota inferior



Fuente: Simpson, (1979)

Cuadro 2. Presencia de especies de *Polylepis* por país

Especie	Argentina	Bolivia	Colombia	Chile	Ecuador	Peru	Venezuela
<i>P. australis bitter</i>	x	x					
<i>P. besseri hieronymus</i>		x				x	
<i>P. hieronymi pilger</i>	x	x					
<i>P. incana</i>					x	x	
<i>P. lanuginosa</i>					*		
<i>P. multijuga pilger</i>						*	
<i>P. pauta hieronymus</i>					x	x	
<i>P. pepeii sympson</i>		x				x	
<i>P. quadrijuga bitter</i>			*				
<i>P. reticulada hieronymus</i>					*		
<i>P. racemosa</i>						*	
<i>P. sericea weddell</i>		x	x		x	x	x
<i>P. subseriacans macbride</i>						*	
<i>P. tormentella weddell</i>	x	x		x		x	
<i>P. weberbaueri pilger</i>					x	x	
Totales	3	6	2	1	6	10	1

Fuente: Simpson, (1979); Fjeldsa, (1987)

* = endemismo

2.4. Propagación

2.4.1. Propagación sexual

Ordoñez, Arbeláez y Prada (2004), citan la propagación sexual a partir de semillas, generadas en brinzales, siembra directa y almácigos.

a. Brinzal

Consiste en recolectar plantitas o plántulas que han germinado en forma natural (regeneración natural), directamente en el suelo debajo de las plantas. Una de sus ventajas es que se obvia el proceso de germinación. Su desventaja es que sus raíces no tienen forma adecuada ya que el suelo no tuvo preparación adecuada.

b. Siembra directa

Es cuando la semilla después de haber pasado por un tratamiento pre germinativo o ser tratada es depositada en el sustrato directamente, hay que tener cuidado en la profundidad al colocar la semilla enterrar solo el doble de su diámetro.

c. Almacigo

La reproducción a partir de semillas se da en una escala muy limitada debido a su bajo poder germinativo. Según investigaciones realizadas por Pretzell (1985) en Perú, *Polylepis incana* presentó valores de germinación 2 a 4% y un 3.1% de plántulas germinadas para *Polylepis tomentella*. Según Cruz (1999), el bajo poder germinativo podría estar relacionado a los fenómenos propios de la especie como la dicogamia (el androceo madura antes que el gineceo) y la dispersión anemófila (polinización por medio del viento).

2.4.2. Propagación asexual

La forma más común de propagación de la keñua es por esta vía. Se practican 4 métodos: por esquejes o ramillas, por estacas convencionales, por acodos y por recolección de plantones. Todos estos métodos de propagación asexual se lo realizan dentro de un vivero forestal (Chiclote, Ocaña, Barahona, 1985; CESA, 1984).

1. Esquejes

De los cuatro métodos, la propagación vía esquejes es más confiable y recomendable para propagar el género *Polylepis* es por medio de ramillas o esquejes que algunos llaman también estacas apicales. El prendimiento es alto cuando la técnica se aplica correctamente y porque no afecta a los árboles semilleros cuando de los mismos se toman las ramillas. Además, la ventaja es de un menor riesgo de entrada de patógenos

por heridas de menor tamaño, el desarrollo de los plantones es más rápido (Chiclote, Ocaña y Barahona, 1985).

Es más fácil encontrar los esquejes en árboles viejos, aislados, en las ramas que contengan humedad en la corteza y en los primeros meses de lluvia. Es conveniente plantar el mismo día de recolección, en caso contrario se debe conservar los esquejes en musgo o tierra húmeda. Para plantar, cada esqueje se corta un centímetro más debajo de las raíces preformadas y se podan las hojas dejando una sola (Ocaña, 1991).

2. Estacas

Para obtener el material vegetativo hay que seleccionar el árbol padre fijándose en las características fenotípicas; la época más recomendable es poco después de haber empezado la época invernal ya que esto estimula a las yemas para que emitan las protuberancias o raíces adventicias preformadas. Las estacas deben ser semi leñosas, de un diámetro mayor a un centímetro. Y una longitud de 15 a 20 cm; cortadas en forma de bisel y con por lo menos 2 a 3 yemas; luego estas se siembran ubicándolas en forma inclinada, introduciendo aproximadamente 1/3 de la estaca. Una vez establecidas estas, hay que ponerlas bajo sombra (Padilla, 1991).

3. Acodo

El acodado es un método de propagación en el cual se provoca la formación de raíces adventicias a un tallo que está todavía adherido a la planta madre. Luego, el tallo enraizado, acodado, se separa para convertirlo en una nueva planta que crece sobre sus propias raíces.

La rama acodada sigue recibiendo agua y minerales debido a que no se corta el tallo y el xilema permanece intacto. En consecuencia, el acodado no depende del período de tiempo que una rama separada (estaca) puede mantenerse antes de que se efectúe el enraizado. Este método se ha realizado en *Polylepis racemosa* obteniendo buenos resultados (Monografías, 2015).

4. Recolección de plantones

Plántulas de 3 a 15 cm., recolectadas en el bosque para un buen repique. Las experiencias demuestran que la plántula recién nacida con dos o tres hojas definitivas da

mejores resultados en prendimiento. Según la especie, se ha obtenido un prendimiento de 85-95% y una sobre vivencia de 85-90% Central Ecuatoriana de Servicios Agrícolas (CESA, 1984).

2.4.3. Propagación usando la técnica de cultivos *in vitro*

Según Gupta *et al.*, (1981) mencionado por Yang *et al.*, (1995) las técnicas de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*, son una alternativa para la propagación asexual de árboles selectos. Ellas consisten en incubar en condiciones asépticas: órganos, tejidos, células y protoplastos con el empleo de medios nutritivos artificiales en condiciones controladas de temperatura, luz y humedad, con la finalidad de que regenere una planta completa. Una de sus aplicaciones más exitosas es la propagación masiva o micropropagación, cuyas ventajas son: altas tasas de multiplicación, plantas genéticamente uniformes, sanas, que se obtienen en tiempo y espacio reducidos. Las vías mediante las cuales se regeneran las plantas son la organogénesis y la embriogénesis somática, cada una de las cuales tiene sus ventajas y desventajas

La micropropagación *in vitro* es el sistema de propagación vegetativa más recientemente implementado, pero que por razones de costo no ha desplazado el uso de los sistemas tradicionales, especialmente en árboles forestales; cuya reproducción masiva en viveros es más ventajosa desde un punto de vista económico. Estas técnicas modernas son un buen complemento de la producción de plantas en vivero, al permitir producir un material de alta calidad genética (Silva, 1992).

Respecto al cultivo *in vitro* del género *Polylepis* en Bolivia. Solo se tiene conocimiento de tres experiencias realizadas en Bolivia, las mismas que corresponden a investigaciones que avanzaron hasta su multiplicación y enraizamiento (Mamani, 1999; Vega, 2002; Rocabado y Quezada, 2005).

2.5. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* se basa en el principio de la totipotencia, el cual establece que las células son autosuficientes y que en principio tienen la capacidad de regenerar una planta completa. La división y desdiferenciación de las células puede inducirse si se colocan porciones de tejido (explantes) en un medio de cultivo adecuado que contenga los nutrientes y los aditivos necesarios (Pierik, 1988).

Además, consiste en reproducir plantas conformes a la planta madre por la estimulación de capacidades naturales de multiplicación vegetativa de la especie o por la inducción de una nueva organogénesis de brotes y raíces. Y se tiene los siguientes objetivos (Auge *et al.*, 1982):

- Adquisición a una gran velocidad de multiplicación y de propagación de “plantas idénticas” a la planta de inicio.
- Constitución de una colección de pies madres. Las técnicas de cultivo *in vitro* permiten efectivamente almacenar sobre pequeñas superficies, grandes cantidades de “microplantas” que serán utilizadas como pies madres.
- Recuperación de especies en vías de extinción.

En la actualidad la propagación *in vitro* se practica con éxito en especies hortícolas (Murashige, 1978), ornamentales (Hughes, 1981) y más recientemente en especies leñosas (Thorpe, 1983). En algunas especies, esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación; las más importantes son:

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

a) Etapas de la propagación *in vitro*

Murashige (1974; 1977a, b) y otros encontraron que era útil destacar la secuencia de eventos asociados con la multiplicación de plantas mediante las técnicas de cultivo aséptico, de la siguiente manera:

Etapa I. Es la etapa de iniciación o de establecimiento, en la cual se establece el cultivo inicial o primario.

Etapa II. Es la etapa de multiplicación de brotes, o multiplicación simplemente.

Etapa III. Corresponde al enraizamiento o etapa de pretrasplante; tiene como objetivo producir una planta autotrófica que pueda sobrevivir en las condiciones de trasplante al suelo.

Además de las tres etapas mencionadas (propuestas inicialmente por Murashige, 1974) pueden considerarse otras dos como parte integral del procedimiento:

Etapa IV. Transferencia final a la etapa de medio ambiente.

Etapa 0. Etapa inicial, que comprende la selección de la planta madre y la selección de una modalidad de pre tratamiento para volver funcional la estrategia que se adopte.

b) Ventajas y desventajas del cultivo *in vitro*

Ventajas:

- Permite sanear plantas con virus, mediante el cultivo de meristemos.
- Facilita la realización de una propagación clonal masiva de plantas idénticas en un corto tiempo.
- Permite la ampliación de la base genética de una especie.
- Los clones pueden ser propagados en cualquier época del año
- El costo de mantenimiento de un banco de germoplasma, en condiciones de laboratorio, es menor en comparación al mantenimiento en condiciones de campo, evitando el riesgo de pérdidas por factores climáticos (presencia de heladas, sequías prolongadas, granizadas o temperaturas elevadas) o sanitarios.
- Las plántulas se mantienen libres de plagas y enfermedades, por ser una técnica que requiere de mucha asepsia.
- Permite someter a una población de plántulas a pruebas de resistencia a factores de salinidad, temperaturas bajas (heladas) o altas (en condiciones tropicales). (Mejía, 1988).

Desventajas:

- Los materiales químicos empleados en la preparación de los medios de cultivos son costosos y poco disponibles en nuestro medio.
- Requiere de la implementación de una infraestructura y equipos costosos, como la cámara de flujo laminar.
- No es posible instalar laboratorios "*in vitro*" donde no se cuenta con fluido eléctrico o se presentan interrupciones periódicas.
- Escasa literatura relacionada al cultivo "*in vitro*" de especies forestales.
- Se requiere de personal de laboratorio especializado: biólogos, químicos fisiólogos, fitomejoradores, agrónomos y forestales. (Vittorelli, 1988).

Desde hace unos 120 años, en las investigaciones de fisiología vegetal, se vienen utilizando las técnicas del cultivo de tejidos *in vitro* de órganos o células vegetales, que consiste en regenerar plantas a partir de ápices de raíces o de tallos, primordios de hojas, o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo o de hojas, y algunas veces empleando ovarios, óvulos, anteras y polen cultivados en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica. (Hurtado, 1994).

2.6. Propagación *in vitro* de especies leñosas

Dentro de las especies leñosas, las más extensivamente estudiadas en los últimos años han sido las forestales y dentro de ellas las coníferas; por esa razón, las informaciones siguientes se referirán a los estudios realizados en arboles maderables.

Según datos recientes, la superficie mundial ocupada por los recursos forestales se estima entre 2500 a 2800 millones de hectáreas, lo que equivale a una cuarta parte de la superficie terrestre. No obstante, de continuar el mismo ritmo de explotación de los bosques sin reforestar las zonas taladas, esa superficie se reducirá en 70% en los próximos años (Keays, 1974). Villalobos *et al.* (1982a) indican que en las próximas décadas la demanda de madera para las industrias de muebles, de la construcción, química y papelera, así como los estragos causados por enfermedades, parásitos e incendios forestales seguirán limitando la existencia de los bosques.

La propagación *in vitro* ha tenido un papel importante en la multiplicación de árboles “elite” (Ivanova, 1981); sin embargo, se ha observado que las estacas pierden la capacidad para enraizar a medida que el árbol de origen es más viejo. Por otro lado, es necesario que los árboles usados como patrones sean lo suficientemente maduros para que expresen su potencial genético; así mismo, al emplear ramas maduras para el enraizamiento hay problemas de crecimiento plagiotrópico (formación de las ramas), (Sweet, 1973).

Las técnicas de propagación *in vitro* han demostrado ser una importante alternativa para la solución de alguno de los problemas anteriormente referidos. El método de diferenciación de brotes adventicios es más común que la embriogénesis somática, y tiene mayor potencialidad para una propagación masiva que el estímulo de yemas axilares. Actualmente no existen antecedentes que indiquen el éxito de la embriogénesis somática en especies forestales. La primera especie leñosa regenerada mediante el cultivo de tejidos fue *Populus tremuloides* (triploide) a partir de callos (Winton, 1968); la primera gimnosperma fue *Pinus palustris* a partir de embriones (Sommer *et al.*, 1975). Con posterioridad a esas investigaciones pioneras, se han publicado diversos trabajos que señalan la regeneración de plantas por sistemas similares. A la fecha existen 57 especies maderables a partir de las cuales se han podido regenerar plantas completas *in vitro* (Brown *et al.*, 1974; Mott, 1981, Patel *et al.*, 1984).

El explante es extremadamente importante; su influencia en el desarrollo *in vitro* ha sido demostrada (Villalobos *et al.*, 1984). La edad del explante es un factor crítico en las especies maderables (Bonga, 1982); en general, la micropropagación es relativamente fácil empleando tejidos juveniles, y es progresivamente más difícil con tejidos adolescentes y maduros. Sin embargo, aunque se haya delimitado la edad del material, el mejor explante se tiene que delimitar experimentalmente; los explantes más comunes en coníferas, por ejemplo, han sido los embriones, partes de plántulas, los cotiledones, y los hipocotilos provenientes de semillas germinadas asépticamente.

En muchos casos, se requiere el trasplante a un medio con otro balance hormonal y nutricional para la formación de brotes adventicios. En otras ocasiones, el trasplante a otro medio, después de formados los brotes, estimula el alargamiento de los tallos, los cuales se pueden separar y enraizar. En este caso, el trasplante continuo permite generalmente la formación de un gran número de brotes; por ejemplo, *Pinus radiata* el número de brotes capaces de ser enraizados se ha podido incrementar desde 180 a

1300, haciendo el trasplante a intervalos de tres semanas 12 a 24 semanas (Aitken *et al.*, 1981).

Los problemas más serios encontrados en la propagación de especies arbóreas *in vitro* son la variación genética en las respuestas de regeneración y el proceso de maduración; estos dos problemas dificultan considerablemente la ejecución de sistemas prácticos de propagación de fenotipos seleccionados. Entre otros problemas están la formación de órganos y plantas aberrantes, la dificultad para erradicar las infecciones internas, y la secreción de sustancias tóxicas como fenoles y sustancias volátiles (Leung, 1982).

2.7. Reguladores de crecimiento

Se entiende por reguladores de crecimiento a las hormonas vegetales, las mismas sintetizadas en un determinado lugar de la planta y se translocan a otro donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, desarrollo o metabolismo del vegetal. El término “sustancias reguladoras del crecimiento” es más general y abarca a las sustancias, tanto de origen natural como sintetizadas en laboratorio que determinan respuestas a nivel de crecimiento, metabolismo o desarrollo en la planta (López, 1990).

Las fitohormonas son las moléculas responsables del desarrollo, aunque no se sabe bien cómo actúan en las células. Se sabe que su mecanismo de acción es por interacción como un receptor específico (la sensibilidad de un tejido hace referencia a su número de receptores) y que su modo de acción una vez recibida la señal, es por transducción. Se denomina nivel activo de una hormona a las formas que desencadenan respuestas. Es necesario un control u homeostasis hormonal, el cual es importante para el control del crecimiento y la defensa ante situaciones eventuales como cerrar constantemente las estomas en sequía. Para ello existen diversos mecanismos (Gonzales, 2004):

- **Biosíntesis:** es la fabricación de hormonas para aumentar su concentración.
- **Degradación** catabólica: es la eliminación de las hormonas para conseguir el efecto contrario.
- **Transporte:** se trata de llevar hormonas de zonas de afloramiento a zonas de déficit o de transportarlas al lugar donde se necesita su acción.
- **Conjugación:** es la modificación de hormonas (añadiendo azúcares o aminoácidos principalmente u otras moléculas de bajo peso molecular). Sirve

como paso inicial en la degradación de estas, para poder almacenarlas, buscando su mayor eficacia en el transporte o para inactivarlas.

- **Compartimentación:** sirve para aumentar o disminuir los niveles hormonales.

a. Auxinas

Es una familia de sustancias químicas que tienen en común la capacidad de regular el crecimiento, la división celular y la diferenciación de raíces en los cultivos *in vitro*. En las plantas, las auxinas intervienen en el tropismo a la gravedad y a la luz, la dominancia apical, el crecimiento de las partes florales y la diferenciación de los tejidos vasculares (Davies, 1995).

Scott citado por Krikorina y Bequam (1991), menciona que son las primeras hormonas que se descubrieron. Su estructura es un derivado del fenol o el indol, y tiene anillos aromáticos con dobles enlaces conjugados. Todas las auxinas son ácidos. No se sabe el modo de acción pero está relacionado directamente con su estructura, ya que si se modifica pierde su función. Las auxinas pueden ser naturales o sintéticas, las principales son:

- **Naturales:** existen varias llamadas “naturales”, que incluyen ácido indol-acético (AIA), indol-3-acetonitrilo, etilindol-3-acetato, indol-3-carboxialdehído, indol-3-acetaldehído, indol-3-acetamina, ácido indol-3-carboxílico, ácido indol-3-propiónico, ácido 5-hidroxindol-3-acético, ácido indol-3-acetil-aspartico, y otras; es probable que, a medida que se realicen más investigaciones, se descubran más sustancias de esta naturaleza. De las auxinas “naturales”, el AIA es el compuesto de mayor utilización (Scott, 1984).
- **Sintéticas:** también se utilizan ampliamente un buen número de sustancias que provocan un efecto fisiológico similar y que se han producido sintéticamente; son las llamadas “auxinas sintéticas”, entre las cuales se encuentran los derivados indólicos, ácido indolbutírico (IBA), derivados del naftalenacético (NAA, NAA), derivados del fenoxiacético y del ácido benzoico: 2,4 diclorofenoxiacético (2, 4, D) y 2,6 diclorofenoxiacético (2, 6, D) y ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Picloram).

Efectos:

- **Crecimiento:** estimulan la elongación celular en tallos y coleoptilos (tallos jóvenes), incrementan la extensibilidad de la pared celular y estimulan la diferenciación de la xilema y el floema.
- **Tropismos:** responsables del fototropismo y gravitropismo positivo de las raíces (García *et al.*, 2008).
- **Dominancia apical:** la yema apical del tallo inhibe el crecimiento de yemas axilares cercanas.
- **Abscisión de órganos (hojas, flores y frutos):** retrasan la caída, aunque el etileno la induce.
- **Rizogénesis:** estimula la formación de raíces laterales o adventicias, inhiben la elongación de la raíz principal. George, (1993b), señala que las concentraciones óptimas de auxinas varían de 0.1 a 10 mg·l⁻¹.

En la práctica, el uso de las auxinas es un arte. No es posible establecer una concentración particular de la auxina que se debe utilizar en un solo caso. Sin embargo, en general se utiliza el AIA en concentraciones que varían de 0.001 a 10 mg/litro, con un punto óptimo alrededor de 0.1 a 1 mg/litro; el 2,4-D se utiliza en concentraciones que varían de 0.1 a 10 mg/litro, con un punto óptimo que frecuentemente se encuentra alrededor de 1 a 5 mg/litro; el ANA generalmente se utiliza en concentraciones levemente mayores (1 a 10 mg/litro), con un punto óptimo cerca de 2 mg/litro. Cabe mencionar que existe una gran cantidad de literatura sobre las concentraciones adecuadas de auxinas que pueden ser necesarias para iniciar un cultivo de tejidos o de células de una determinada especie de planta (Durbin, 1979; Pierik, 1979; Evans *et al.*, 1983; Sharp *et al.*, 1984; Altamirano *et al.*, 1984).

Generalmente solo se utiliza una auxina cada vez. Sin embargo, para algunos investigadores (Mahlberg, 1959) ocasionalmente ha sido útil el uso simultáneo de 2,4-D y ANA, por ejemplo, para el crecimiento de cultivos de *Euphorbia marginata*. Ya que varias auxinas parecen tener sitios de acción, ciertos casos podrían ser conveniente ensayarlas, incluso en combinaciones más extensivas.

En cuanto al mecanismo de acción de las auxinas, se conoce que ellas aumentan la plasticidad de la pared celular, lo que permite la expansión de la célula (Abel y Theologis,

1996). La elongación inducida por auxinas se inicia al unirse esta hormona al receptor, probablemente localizado en la cara externa de la membrana plasmática, lo que desencadena una cascada de eventos que determinan la secreción de protones por la célula. Como resultado de esta acidificación, se activan proteínas que rompen los enlaces cruzados entre las moléculas de celulosa y permiten la elongación cuando aumenta la presión de turgencia. Durante este proceso se han detectado cambios en las concentraciones del trifosfato de inositol y del calcio iónico citoplasmático, los que actuarían como segundos mensajeros (Cleland, 1995).

b. Citoquininas

Skoog *et al.* (1955) propusieron el cinina como un nombre genérico para sustancias naturales y sintéticas que presentaban los mismos tipos de actividad biológica que la KIN (6-furfuril-aminopurina) (Miller *et al.*, 1956). Con el fin de evitar confusión con el término cinina, según se utiliza en los sistemas animales, un poco más tarde se adoptó la palabra citoquinina para designar las sustancias de división celular. Son un grupo más reducido de hormonas que deben su nombre a su función (citoquinesis). En conjunto con las auxinas estimulan la división celular. Derivan de adeninas y las más frecuentes son:

- **Naturales:** la zeatina N6 (N6-4 Hidroxi, 3 metil, 2 butiril), posee un doble enlace en el centro de la cadena y tiene isómeros cis y trans que parecen ser formas naturales. La zeatina puede estar en la base siguiente al 3 del anticodon del ARNt. No purinas como el Thidiazuron, (TDZ) y el CPPU N-(2-cloro-4-piridil)-N-fenil urea. Estos compuestos tienen una actividad histoquímica muy alta y son muy eficientes en la propagación *in vitro* de las plantas maderables (Del Solar, 1985).
- **Sintéticas:** la quinetina (KIN), N6 bencil aminopurina (BAP), N6benciladenina (BA), N6 dimetil alil aminopurina (2ip) (Mejía, 1994).

Efectos:

- **Crecimiento:** en conjunto con las auxinas, las citoquininas estimulan la proliferación de células meristemáticas, también estimulan la expansión de los cotiledones tras el primer haz de luz que reciben (George, 1993 b).
- **Dominancia lateral:** estimulan el crecimiento de yemas laterales inhibiendo la apical (contrario a las auxinas, por lo que deben estar en equilibrio).

- **Diferenciación y morfogénesis:** provocan cambios en la morfología según el tipo de crecimiento. Junto a las auxinas estimulan la formación de raíces y tallos.
- **Senescencia:** son anti-senescentes (García *et al.*, 2006).

La proporción entre auxinas y citoquininas permite regular la organogénesis o la desdiferenciación, por lo que se deben programar las concentraciones de auxinas y citoquininas a través de diseños factoriales para cada especie y variedad vegetal y según el objetivo del trabajo. En general, cuando la relación auxina/citoquinina es alta se forman raíces, cuando es baja se producen vástagos y con relaciones cercanas a 1 se producen callos (Krikorian, 1995).

2.8. Mecanismos de acción de los reguladores de crecimiento vegetal

El desarrollo de las plantas es el resultado de un intrincado control hormonal múltiple (espacial y temporal) a través de la regulación y expresión de varios sistemas de genes. La complejidad de los efectos pleiotrópicos de los reguladores de crecimiento vegetales puede ser el resultado de una acción primaria simple o de un efecto sobre la expresión génica. Aunque las sustancias reguladoras del crecimiento vegetal sean reconocidas como importantes compuestos señal, que están directa o indirectamente involucradas en el control de la actividad génica, la vía de transducción de señales, los sitios de percepción y los receptores son aún poco conocidos. Recientes estudios genético-moleculares con mutantes hormonales, especialmente de *Arabidopsis thaliana*, han demostrado la participación de quinasas y fosfatasa en las vías de transducción de algunos reguladores de crecimiento de plantas (Barendse y Peeters, 1995).

Han sido identificadas algunas proteínas específicas que se unen a los reguladores de crecimiento y que actuarían como receptores. Varias proteínas ligantes de auxinas (ABPs) han sido halladas en diferentes localizaciones celulares tales como el retículo endoplásmico, la membrana plasmática, el núcleo y también como ABPs solubles. Las ABPs del retículo producirían proteínas de la membrana plasmática y de la pared celular; las de la membrana plasmática podrían estar involucradas en la percepción de auxinas; las del núcleo, en la regulación de la expresión génica y las solubles podrían estar comprometidas en mantener gradientes de concentración (Jones, 1994).

En este sentido, Marten *et al.*, (1991) encontraron en frijoles una interacción directa de las auxinas con la cara extracelular de los canales aniónicos de la membrana plasmática de

las células oclusivas de las estomas. También hay evidencias de la presencia en la membrana plasmática de proteínas ligantes de GAs que al interactuar inducen la síntesis de α -amilasa y de ligantes de ABA que regulan el cierre de las estomas (Libbenga y Mennes, 1995). En general, si ABA y GA3 son percibidas por receptores de la cara externa de la membrana se producen respuestas rápidas de las células, mientras que la percepción citoplasmática produciría efectos tardíos y prolongados (Allen y Trewavas, 1994). Los reguladores de crecimiento además pueden interactuar directamente con el ADN e influenciar la transcripción (Barendse y Peeters, 1995). Por este mecanismo parecen actuar las proteínas nucleares y citoplasmáticas ligantes de auxinas identificadas en células del tabaco y las proteínas que unen citoquininas en hojas de cebada (Libbenga y Mennes, 1995).

2.9. Componentes del medio de cultivo

Las diferencias entre los medios de cultivo se relacionan con los diferentes compuestos utilizados para estimular la división celular. Para esto, se emplean generalmente: AC (5-15% v/w), o también 2,4-D, ANA, AIA, AIB, o benzotiazol-2-oxiacético (BTOA) solos o en combinación con el AC; estos han resultado, generalmente, adecuados para iniciar y mantener cultivos de callos de la mayoría de los tejidos de plantas. Sin embargo, se sabe que es un problema mayor estudiar todas las interacciones de los componentes (orgánicos e inorgánicos) de un medio de cultivo, y generalmente no es rentable hacerlo en esta etapa del conocimiento. No obstante, normalmente se puede utilizar un medio sencillo y luego complementarlo de diferentes formas; el “arte” consiste en llegar empíricamente a la fórmula que le brinde al tejido la mejor oportunidad de desplegar su capacidad intrínseca (propio de la planta que se expresa sin depender de ninguna circunstancia) para crecer. En el siguiente cuadro se detalla la composición que contiene un medio de cultivo.

Cuadro 3. Composición de medios de cultivo

Componentes	Características y ejemplos
Agua destilada	Representa el 95% del medio nutriente
Fuente de carbono	Generalmente se usa sacarosa. La fuente de carbono se necesita porque los explantes no son completamente autótrofos, y no pueden cubrir sus necesidades con la fotosíntesis que pueden realizar <i>in Vitro</i>
Sustancias inorgánicas	Macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) y microelementos (Fe, Co, zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I), en una proporción adecuada para la planta elegida.
Vitaminas	Vitaminas B1, B2, B6, vitamina H, vitamina E, ácido fólico, ácido nicotínico, entre otras.
Hormonas y reguladores del crecimientos	Auxinas: promueven la elongación celular, la formación de callos y raíces adventicias, inhiben la formación de brotes axilares adventicios y, a veces, inhiben la embriogénesis. Citoquininas: promueven la división celular, regulan el crecimiento y el desarrollo de los tejidos vegetales Otras: giberelinas, ácido absícico, etileno.
Mezclas de sustancias poco definidas	Ejemplos: extracto de levadura, extractos vegetales.
Materiales inertes	Usados como soporte. Incluyen agar, sacarosa, otros polisacáridos, lana de vidrio, papel de filtro, arena.

Fuente: Radice, 2010

2.9.1. Fases de la propagación cultivo *in vitro*

Murashinge (1974), ha propuesto tres fases fundamentales de la propagación *in vitro*: 1) el establecimiento aséptico del cultivo; 2) su multiplicación; 3) el enraizamiento y la preparación de la vitroplanta para su trasplanta al suelo denominado aclimatación.

2.9.1.1. Fase 1: Establecimiento

Grattapaglia y Machado (1997), menciona que el objetivo de esta fase es obtener un cultivo aséptico de la especie que se quiere multiplicar. El establecimiento, incluye la selección previa del explante más adecuado, su desinfección y la siembra en condiciones asépticas en medio de cultivo. Esta fase termina con la obtención de un cultivo libre de

contaminaciones visibles y suficientemente adaptada a las condiciones *in vitro*, de modo que pueda presentar una reacción favorable a la aplicación de fitoreguladores en la fase siguiente de multiplicación.

a. Selección del explante

Diversos explantes pueden ser utilizados para iniciar la propagación *in vitro* de una planta. Teóricamente cualquier tejido puede ser utilizado como explante, en vista de la totipotencia de las células vegetales. Sin embargo, es importante considerar el tipo de explante, la edad fisiológica de la planta madre del cual se extraerá el material vegetal, y el estado sanitario (Roca y Mroginski, 1991).

- **Tipo de explante.** Se debe procurar utilizar explante que contengan mayor proporción de tejido meristemáticas o que tengan mayor capacidad de expresar la totipotencia. Las yemas apicales normalmente presentan mayor capacidad de crecimiento que las que las yemas axilares, que se encuentran bajo el efecto de dominancia apical. Esto es común en plantas herbáceas ornamentales, mientras que lo contrario, en general es válido para especies arbóreas (Grattapaglia y Machado, 1997).
- **Edad fisiológica de la planta madre o planta donadora del explante.** El estado fisiológico de la planta de donde se extraen los explantes tiene gran influencia en el posterior comportamiento de los cultivos (Villalobos y Thorpe, 1991). La primera consideración es el estado nutricional de la planta y la fase de crecimiento en que se encuentra. Plantas bien nutridas, sin síntomas de deficiencia nutricional o híbridadas, en general, donan mejores explantes. Se recomienda también utilizar explantes colectados de regiones meristemáticas juveniles.
- **Estado sanitario.** El estado sanitario de la planta madre es un factor importante que ira a determinar la facilidad de descontaminar el explante durante el aislamiento. La primera medida es el mantenimiento de la planta madre en un ambiente más limpio, en un invernadero o en cámara de crecimiento, ya que, en campo, está expuesta a todo tipo de clima e insectos que provocan heridas y permiten la entrada de microorganismos (Roca y Mroginsky, 1991).

b. Época de recolección de los explantes

La extracción de los explantes debe ser realizada de preferencia a partir de brotaciones nuevas que son formadas durante la fase activa de crecimiento de la planta, al final de la fase de dormancia, durante los meses más calientes del año (primavera y verano). En la primavera, los órganos crecen y los análisis muestran la presencia de reguladores como la auxina, las giberelinas y citoquininas; a lo largo del verano, estos flujos de sustancias disminuyen, ya que en otoño aparecen ciertos inhibidores (Auge *et al.*, 1982)

c. Tamaño del explante

El tamaño del fragmento puesto en cultivo tiene una gran importancia; en efecto, mientras más grande sea el explante, los equilibrios endógenos serán más determinantes. De este hecho, el medio no tendrá más que una influencia limitada. Por lo contrario un explante de tamaño pequeño será más fácilmente orientado por las sustancias contenidas en el medio de cultivo (Auge *et al.*, 1982).

d. Desinfección

La principal dificultad en la etapa de establecimiento reside en poder obtener tejido descontaminado sin conducirlo a la muerte después de aislarlo. Los pretratamientos aplicados a la planta madre son determinantes para el éxito de esta etapa de trabajo, principalmente en lo que refiere a los microorganismos endógenos. Varias sustancias con acción germicida pueden ser utilizadas en la desinfección de explantes. Los más comunes y menos nocivos, son los compuestos en base a cloro como el hipoclorito de sodio o de calcio, el etanol generalmente utilizado a 70 80% (v/v), mayores concentraciones son menos eficientes y pueden deshidratar los tejidos (Dodd y Roberts, 1985; Pierick, 1987; Bocón, 1989; Roca y Mroginski, 1991).

e. Aislamiento de explante

Tanto la desinfección como el aislamiento de los explantes deben ser realizados en la cámara de flujo laminar. La manipulación del explante en esta primera etapa determina, en parte su sobrevivencia y posterior desarrollo. Es importante evitar la deshidratación de los tejidos por lo que la operación de aislamiento del explante debe ser rápida y precisa. El tiempo del proceso de desinfección varía de acuerdo a la especie y el tipo de explante,

los instrumentos utilizados incluyen bisturíes, pinzas, agujas de jeringas hipodérmicas, frascos y cajas Petri (Thomas *et al.*, 1975).

f. Condiciones de incubación

Las condiciones de incubación en esta fase pueden variar mucho. Oscuridad total o intensidades de luz reducidas son útiles los primeros días después del aislamiento. Para reducir la oxidación fenólica la luz involucra varios componentes como intensidad, fotoperiodo y calidad. La luz es otorgada por tubos fluorescentes tipo blanca fría (Grolux); el fotoperiodo tiende a ser de días largos para evitar la inducción de dormancia. En general, se utilizan 16 horas de luz por 8 de oscuridad. La mayor parte de la especie crece satisfactoriamente en temperaturas que varían de 20-27°C; algunas especies son favorecidas con una incubación inicial a temperaturas bajas lo que puede contribuir a romper la dormancia de yemas (Franclet y Boulay, 1982).

2.9.1.2. Fase 2: Multiplicación

La fase II se refiere a la multiplicación del propágulo a través de cultivos sucesivos en un medio adecuado para la multiplicación. Se inicia con la obtención de un cultivo de partes aéreas y yemas libres de contaminación y que están suficientemente establecidas y receptivas a la aplicación de fitoreguladores. El principal objetivo de esta fase es de producir el mayor número de plantas posibles, en el menor espacio de tiempo. Otro aspecto esencial es la calidad y homogeneidad de las partes aéreas producidas, lo que va a determinar en gran medida el éxito de una fase siguiente de enraizamiento. Los factores que determinan la multiplicación, que pueden ser manipulados para optimizar esta fase, son (Dodds y Roberts, 1997):

a. Composición del medio de cultivo

Diversos medios básicos son utilizados en la fase de multiplicación, es común la utilización de la misma composición básica en la fase de establecimiento y la multiplicación: macro y micronutrientes, vitaminas, inositol, una fuente de carbohidrato (generalmente sacarosa) y eventualmente otros compuestos orgánicos como aminoácidos y sustancias químicamente idénticas como el agua de coco (AC) y extracto de malta. Las variaciones en la composición de los medios dependerán de la especie, las más frecuentes están relacionadas a la concentración de macronutrientes, la fuente de nitrógeno del medio

básico utilizada y el balance entre los iones de nitrato amonio so aspectos merecen mayor atención, respecto a los fitoreguladores, las citoquininas constituyen un grupo indispensable para la quiebra de la dominancia apical y la inducción de la proliferación de yemas axilares, la bencil aminopurina (BAP) en concentraciones de 0.1-0.5 mg*^l es la citoquinina más eficaz para promover la multiplicación en diversas especies, siendo además la más económica de todas (Hasewaga, 1980; Hu y Wang, 1983; Zaerr y Mapes, 1985).

b. Condiciones de incubación

La fase de multiplicación es evidentemente la más larga durante el proceso de propagación *in vitro*, donde el rango de temperatura óptima para la mayoría de las especies se encuentra entre 20 y 27°C. Temperaturas por encima o debajo de este rango puede ser desfavorables para el desarrollo de algunas especies, los principales factores que determinan la calidad del microambiente son los tipos de tapa y frascos utilizados y la cantidad de medio presente en el frasco, el tipo de tapa utilizado tiene gran influencia en el desarrollo del cultivo, pues es este que va a determinar el nivel de intercambio gaseoso con el ambiente externo, tapas totalmente herméticas, pueden ser buenas para evitar la contaminación, sin embargo no permiten un intercambio gaseoso adecuado, pudiendo existir un aumento en la acumulación de CO₂ y etileno trayendo como consecuencia una disminución del contenido de clorofila a lo largo de la incubación (Boulay, 1984).

c. Cuidados en la manipulación del material durante los subcultivos

La posición del explante en el cultivo de origen y el tamaño del mismo son características importantes. El aislamiento de las partes aéreas, principalmente la subdivisión en yemas axilares y apicales, que puede introducir una fuerte variación de explante a explante como resultado de la posición original de la yema en cultivo, el tamaño del explante inicial es importante, al preparar explantes muy pequeños conteniendo una o pocas yemas apenas ocurren, muchas veces, una excesiva demora para el inicio de la fase de crecimiento activo del subcultivos siguiente, o que reduce drásticamente la tasa de multiplicación (Grattapaglia y Machado, 1997).

2.9.1.3. Fase 3: Enraizamiento

El proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente del trasplante a un medio de cultivo de menor concentración de sales. El medio de Murasgine *et al.*, por ejemplo, diluido al 50% ha dado resultados positivos en diferentes especies. Asimismo, se requiere cambiar el balance hormonal, esto es, disminuir las citoquininas y aumentar las auxinas exógenas. En algunas especies, la eliminación de las citoquininas exógenas ha sido suficiente estímulo para la diferenciación del sistema radical (Thorpe, 1980).

La fase de enraizamiento, es la preparación de las plántulas para el establecimiento en el suelo, es decir las partes aéreas producidas *in vitro* son transferidas a medio de enraizamiento para el subsecuente trasplante al suelo de las plantas obtenidas. La opción por uno sistemas de enraizamiento depende fundamentalmente de la calidad de las partes aéreas obtenidas en la multiplicación de la especie y del genotipo en cuestión. Los factores que determinan el enraizamiento son (Hasewaga, 1980):

a. Influencia del material vegetal

El enraizamiento de especies herbáceas es generalmente fácil con relación al de especies leñosas, donde el enraizamiento se torna más difícil. Este problema se agrava a medida que se utiliza material menos juvenil. La calidad de las partes aéreas provenientes de la fase de multiplicación determina en gran parte, el éxito del enraizamiento.

b. Medio de cultivo

Las diversas especies, principalmente las herbáceas, enraízan en la presencia de niveles muy reducidos de auxina, o simplemente en medio básico sin hormonas (Anderson, 1984; Hasegawa, 1980). La situación más común es aquella en la cual las partes aéreas provenientes de multiplicación necesitan de una auxina exógena para estimular la rizogénesis; aunque tenores endógenos residuales de citoquinina pueden dificultar el enraizamiento en estos casos; los tipos y concentraciones de auxina son variables; diversas auxinas solas o en combinación pueden ser utilizadas en el enraizamiento, variando las concentraciones de acuerdo a la especie. Las auxinas más comúnmente usadas son: el AIB, el ANA y el AIA (Grattapaglia *et al.*, 1987).

Una buena disponibilidad de fuente de energía es indispensable para la rizogénesis. La concentración de sacarosa en el medio de enraizamiento es generalmente mantenida en los mismos niveles del medio de multiplicación (entre 2 y 3% p/v). Medios sólidos son utilizados en la gran mayoría de las veces para la fase de enraizamiento, con concentraciones de agar semejantes a aquellas usadas en micropropagación. Medios excesivamente sólidos, con concentraciones por encima de 0,6% de agar pueden llevar a problemas de enraizamiento. Sustratos inertes como la vermiculita pueden ser utilizados con resultados superiores a los obtenidos en agar (Hasewaga, 1980).

c. Condiciones de incubación

Las condiciones de temperatura semejantes aquellas adoptadas en la multiplicación, estimulan un enraizamiento satisfactorio. Alteraciones más frecuentes son hechas en el régimen de luz, sometiendo a las partes aéreas a intensidades luminosas reducidas o al oscuro absoluto durante algunos días, correspondiendo a la fase de inducción o iniciación. Otros factores ambientales como la temperatura y la humedad en la sala de incubación, pueden influenciar el enraizamiento, pero de una manera menos drástica. Generalmente la temperatura utilizada coincide con aquella utilizada en la fase de multiplicación. El rango más común en el cual enraízan bien la mayoría de las especies va de 20 a 30°C (Roca y Mrosginsky, 1991)

d. Tamaño del explante

Partes aéreas pequeñas en general no enraízan bien y necesitan de una fase intermedia de elongamiento. Así mismo, la edad y estado de desarrollo de la planta, la posición del explante sobre la planta y el cultivar, son factores que influyen en el enraizamiento (Hasewaga, 1980).

2.9.1.4. Fase 4: Aclimatación

En la fase de aclimatación se pretende que las plantas que han crecido *in vitro* y por lo tanto sólo han estado expuestas a un microambiente escogido por ofrecer unas condiciones mínimas de estrés y cuasi óptimas condiciones para la multiplicación de las plantas, se adapten a condiciones *ex vitro* donde las condiciones no son asépticas, ni la luz, temperatura y humedad están controladas, y donde el crecimiento a ser autotrófico y no heterotrófico como *in vitro*. Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los

cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. La etapa de trasplante involucra la transferencia de la planta de condiciones *in vitro* a condiciones *in vivo* en invernadero, donde es sometida a una fase de aclimatación y endurecimiento. Este pasaje es bastante crítico y representa en algunos casos un factor limitante en el proceso de micropropagación. Esto se debe básicamente a los siguientes factores (Grattapaglia y Machado, 1997):

- La planta pasa de una situación de reducción flujo transpiratorio debido a la baja intensidad de luz y elevada humedad relativa a un ambiente que demanda un incremento en la tasa de transpiración, quedando muy susceptible al estrés hídrico.
- La planta pasa de una condición heterotrófica, en la cual depende de un suplemento externo de energía (sacarosa en el medio), para un estado autotrófico, en el cual precisa realizar fotosíntesis para sobrevivir.
- La planta pasa de una condición de alta disponibilidad de nutrientes en el medio hacia otra donde precisa rápidamente incrementar la absorción de sales y minerales.
- La planta sale de un estado aséptico hacia un ambiente donde está sujeta al ataque de microorganismos saprofitos y eventualmente patogénicos.

2.9.2. Factores que afectan el cultivo *in vitro*

2.9.2.1. Contaminación

La presencia de microorganismos en los cultivos *in vitro* reduce el éxito de los resultados, especialmente durante las primeras etapas. Esta situación se genera por las condiciones físicas del cultivo que conforman un ambiente propicio para su desarrollo. La mayor fuente de contaminación en el cultivo de tejidos vegetales se produce por la presencia de microorganismos superficiales y sistémicos de la planta donadora. Para controlar la contaminación superficial se deben descartar los individuos que estén en mal estado fitosanitario, realizar procedimientos de desinfección adecuados, utilizando desinfectantes superficiales y fungicidas. A pesar de esto, el material puede no quedar completamente estéril, ya que es probable que se presenten microorganismos sistémicos como virus, bacterias y hongos. Algunos de estos contaminantes se pueden tratar con el uso de antibióticos o de tratamientos de quimioterapia y termoterapia (Razdan, 2003).

Adicional al uso de sustancias químicas de desinfección, es necesario trabajar en ambientes adecuados, esterilizar los medios de cultivo, y realizar los cultivos siguiendo ciertas normas de asepsia (Roca y Mroginski, 1991).

2.9.2.2. Oxidación

Durante el cultivo *in vitro* el explante sufre siempre en mayor o menor medida situaciones de estrés, ocasionadas por daños mecánicos o por las condiciones del cultivo (como la composición del medio). Estas situaciones estimulan el metabolismo de los compuestos fenólicos. La síntesis de fenoles va a producir una serie de reacciones de hipersensibilidad, tales como la exudación al medio del contenido de las células deterioradas. De igual forma, las células vecinas de las que inicialmente fueron lesionadas se ven afectadas, llevando finalmente a una muerte prematura (George, 2008).

Teniendo en cuenta que, los fenoles pueden alterar eventos morfogénicos y/o de crecimiento y desarrollo, en el cultivo de tejidos se hace necesario controlar el efecto de la oxidación. Métodos que han dado buen resultado cuando la síntesis de fenoles no puede evitarse son: el lavado, con sustancias como el carbón activado (CA) o la polivinilpirrolidona (PVP); la modificación del potencial redox (disminuyendo los agentes redox), o la disponibilidad de oxígeno; la inactivación de enzimas de tipo fenolasa (quelantes), y otros sistemas como la incubación en condiciones de oscuridad, bajo pH, incubación a temperaturas más bajas, entre otros. En general lo que se busca al proporcionar éstas condiciones es reducir la actividad fenolasa y la disponibilidad de sustratos para esta enzima (Pérez y Ponce, 1998; Razdan, 2003).

2.9.2.3. Vitrificación ó hiperhidratación

La vitrificación ó hiperhidratación, es un desorden fisiológico que se presenta en los tejidos cultivados *in vitro*, especialmente en las hojas, que incide sobre dos de los procesos más importantes que realizan estas estructuras: la fotosíntesis y el intercambio gaseoso. En menor medida los tallos y raíces también resultan afectados por estas anomalías anatómicas, que en ciertos casos van a impedir el establecimiento de plantas micropropagadas en condiciones *ex vitro* (Razdan, 2003).

2.9.2.4. Variación somaclonal

La variación somaclonal se caracteriza por la aparición de nuevos caracteres diferentes a los de las plantas madre debidos al cultivo *in vitro*. Suelen consistir en la aparición de plantas más pequeñas, cambios de color o mosaicos (clorosis, perdida de quimeras), cambios en el hábito de crecimiento (vigor, forma de las hojas, porte erecto) y cambios en la productividad (esterilidad, juvenilidad más prolongada). En ocasiones estos cambios pueden llegar a crear nuevas variedades (Razdan, 2003).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización

El presente trabajo de investigación se realizó en los ambientes del laboratorio de Biotecnología de la Carrera de Ingeniería Agronómica de la Universidad Pública de El Alto.

3.2. Material vegetal

- Brotes apicales de *Polylepis tomentella* ssp. nana.
- Brotes apicales de *Polylepis incana*
- Brotes apicales de *Polylepis besseri*

3.3. Métodos

3.3.1. Procedimiento experimental.

3.3.1.1. Fase de campo.

Para obtener el material vegetal, se procedió a la elección *in situ* de varios árboles de *Polylepis tomentella* ssp. nana, *Polylepis besseri*, *Polylepis incana*; los cuales presentaban las mejores características fenotípicas (follaje perenne y denso, numeroso renuevo de yemas apicales) y que, además, no se encuentren en estado de floración. La obtención de las muestras se realizó mediante colecta manual, a través del corte de ramas de 10-26 cm de longitud, conteniendo entre 3 a 5 yemas apicales y/o terminales.

Una vez recolectadas las ramas se colocaron en bolsas de polietileno para luego ser selladas con parafina en la base del corte a fin de evitar la pérdida de humedad y reducir el proceso de deterioro fisiológico del material vegetal. Las bolsas se empacaron en una conservadora para evitar daños (mecánicos) durante su transporte al laboratorio.

La recolección de material vegetal fue traída de dos diferentes lugares porque estas especies no pueden ser encontradas en un solo lugar en los meses de febrero y marzo porque en estos meses los arboles de que keñua tienen nuevos brotes los cuales contienen yemas apicales jóvenes, para realizar la propagación *in vitro* se debe trabajar con brotes jóvenes esto porque tienen un alto grado de actividad de división celular. La

especie *Polylepis incana* se recolectó del vivero forestal de la carrera Ingeniería Agronómica de la Universidad Pública de El Alto **ver Anexo 10 fotos 1 y 2**. La especie *Polylepis tomentella* ssp. *nana* y la especie *Polylepis besseri* fueron recolectadas del jardín botánico dentro del campus universitario en Cota Cota de la Universidad Mayor de San Andrés **ver Anexo 9 fotos 1 y 2**.

Por otra parte, se eligió recolectar el material vegetal de estos lugares porque los árboles de keñua se encontraban en lugares libres de contaminación, además que los árboles de keñua no tenían signos de ataque de plagas o enfermedades, lo cual es un factor muy importante a tomar en cuenta al momento de la recolección del material vegetal ya que de esto dependerá el éxito del trabajo de investigación.

3.3.1.2. Identificación de la especie

Con el fin de verificar la identidad taxonómica del material vegetal recolectado, se recurrió al Herbario Nacional de Bolivia, donde las muestras fueron identificadas por especialistas de dicha institución. Mediante las diferencias morfológicas que tiene cada especie de keñua.

3.3.1.3. Fase 1: Establecimiento

La introducción *in vitro* del material vegetal (yemas apicales) en los medios de cultivo (Chu *et al.*, 1975), se realizó dentro de una cabina de flujo laminar, la cual fue previamente esterilizada mediante la aplicación de radiación ultravioleta por 20 minutos. Los instrumentales requeridos como ser: medios de cultivo (Chu *et al.*, 1975), en tubos de ensayo, solución antioxidante (ácido ascórbico/ácido cítrico) cajas petri, envases de vidrio conteniendo agua destilada, mango de bisturí, pinza bayoneta, fueron esterilizados en autoclave a 120°C de presión por 20 minutos **ver Anexo 8 fotos 1 al 8**.

Los 60 explantes de cada especie de keñua (*Polylepis tomentella* ssp. *nana*, *Polylepis incana*, *Polylepis besseri*) fueron desinfectados en una solución de etanol al 70% (v/v) durante 1 minuto y posteriormente en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% por 15 minutos, se realizaron tres enjuagues consecutivos en agua destilada estéril, cada uno de cinco minutos. En una placa Petri esterilizada y con la ayuda de una pinza y bisturí, se seleccionaron los explantes axénicos eliminando los folíolos hasta obtener yemas apicales de 5-10 mm de longitud, antes de ser sembradas fueron sumergidas en una solución

antioxidante esterilizada (ácido ascórbico/ácido cítrico $300 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) por 1 minuto posteriormente se los puso dentro de una caja petri que tenía papel absorbente esterilizada para que escure el antioxidante y luego ser sembradas en tubos de ensayo conteniendo 5 ml de medio de cultivo consistente en macronutrientes y micronutrientes de Chu *et al.* (1975), vitaminas de Kao y Michayluck (1975) o KM (en el **anexo 6** se detalla la composición de este medio basal), $1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de bencil aminopurina (BAP), $1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de ácido giberélico (AG3) y $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de ácido indolbutírico (AIB) ver **Anexo 11 fotos 1 al 8**. Se sembró un explante por tubo de ensayo, sellándolos con papel aluminio y biofilm para facilitar una iluminación directa sobre el material vegetal; posteriormente fueron trasladados a la sala de crecimiento donde tuvo un fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad), controlada por un temporizador automático y a una temperatura promedio registrada de 25°C . Debido a las condiciones del cultivo *in vitro*, la humedad relativa dentro de los tubos es cercana al 100%.

3.3.1.4. Fase 2: Multiplicación

Luego del establecimiento de los explantes a condiciones *in vitro* para obtener partes aéreas y yemas libres de contaminación, se realizó la selección del material establecido que presentó mejor respuesta vegetativa y no esté contaminada con agentes patógenos (hongos o bacterias) antes de ser llevados a la sala de establecimiento. Dentro de la cámara de flujo laminar se procedió a seccionar la parte basal de los explantes, precautelando la asepsia para evitar la contaminación del material vegetal para luego ser repicados al medio basal de multiplicación Tremblay y Lalonde (1984), (en el **anexo 6** se detalla la composición de este medio basal), con diferentes concentraciones de bencil aminopurina (BAP), (0.23 , 0.3 , $0.4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de ácido indolbutírico (AIB). Luego fueron llevados a la sala de crecimiento donde se continuó con el fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad), ver **Anexo 12 fotos 1 al 12**.

Las vitroplantas de keñua (*Polylepis tomentella* ssp. *nana*, *Polylepis incana*, *Polylepis besseri*) fueron subdivididas en tratamientos donde se varió la concentración de bencil aminopurina (BAP), ver **Anexo 1**. Las evaluaciones y toma de datos se realizaron cada semana hasta los 30 días ver **Anexo 3**.

3.3.1.5. Fase 3: Enraizamiento.

Al obtener vitroplantas con un buen desarrollo de las partes aéreas después de la fase de multiplicación, son aptas para ser repicados a la siguiente de fase de enraizamiento, donde se realizó la selección de vitroplantas en las especies de keñua (*Polylepis tomentella* ssp. *nana*, *Polylepis incana*, *Polylepis besserii*), que tuvieron un buen desarrollo de las partes aéreas que no presenten contaminación de patógenos (hongos y bacterias), esta selección se realizó en la sala de crecimiento antes ser llevados las vitroplantas a la sala de establecimiento, para ser repicados al medio basal de enraizamiento Mc Cown y Lloyd (1980), (en el **anexo 6** se detalla la composición de este medio basal), al 50 por ciento de su concentración con 50 g/l de sacarosa y las diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (AIB), (0.5, 0.1, 0.15 mg*l⁻¹), dentro de la cámara de flujo laminar y posteriormente llevados a la sala de crecimiento **ver Anexo 13 fotos 1 al 16**.

Las vitroplantas de keñua (*Polylepis tomentella* ssp. *nana*, *Polylepis incana*, *Polylepis besserii*) fueron subdividas en tratamientos donde se varió la concentración de ácido indolbutírico (AIB), **ver Anexo 2**. Las evaluaciones y toma de datos se realizaron después de dos semanas esto porque en esta fase de enraizamiento la asimilación y la respuesta para el desarrollo de raíces no son inmediatas por el proceso de osmosis (proceso por el cual la raíz absorbe los nutrientes de su entorno para repartirlos posteriormente a la planta), y por esta razón se hizo la toma de datos y evaluaciones después de ese tiempo **ver Anexo 4**.

3.3.2. Diseño experimental

El presente trabajo de investigación fue evaluado estadísticamente bajo el diseño completamente al azar con arreglo factorial de dos factores. En cada tratamiento se trabajó con diferentes concentraciones de bencil aminopurina (BAP) y ácido indolbutírico (AIB) En las fases de: multiplicación y enraizamiento cada una con 5 repeticiones, haciendo un total de 45 unidades experimentales. En ambas fases se evaluó independientemente, pero usando el mismo diseño estadístico.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} = Una observación cualquiera

μ = Media poblacional

α_i = Efecto del j-esimo nivel del factor A (especies de keñua).

β_j = Efecto del k-esimo nivel del factor B (concentraciones de BAP y AIB).

$\alpha\beta_{ij}$ = Efecto del i-esimo nivel del factor A con el j-esimo nivel del factor B (interacción A x B) (especies de Keñua x concentraciones de BAP y AIB).

ϵ_{ijk} = Error experimental

3.3.3. Tratamientos en estudio

a) Fase de multiplicación:

Los tratamientos de estudio en la fase de multiplicación fueron las diferentes concentraciones de bencil aminopurina (BAP) en el medio basal Tremblay y Lalonde (1984) más 0.1 mg*l⁻¹ de AIB que permanecieron en un periodo aproximadamente 30 días.

Cuadro 4. Descripción de los tratamientos con las concentraciones de bencil aminopurina (BAP).

Especie	Concentración de BAP mg*l ⁻¹	Tratamiento	Descripción del tratamiento
<i>Polylepis tomentella</i>	0.23	T1	Especie 1 x concentración 1
	0.3	T2	Especie 1 x concentración 2
	0.4	T3	Especie 1 x concentración 3
<i>Polylepis incana</i>	0.23	T1	Especie 2 x concentración 1
	0.3	T2	Especie 2 x concentración 2
	0.4	T3	Especie 2 x concentración 3
<i>Polylepis besseri</i>	0.23	T1	Especie 3 x concentración 1
	0.3	T2	Especie 3 x concentración 2
	0.4	T3	Especie 3 x concentración 3

b) Fase de enraizamiento:

Para esta fase se usó el 50 por ciento de la concentración del medio basal Mc Cown y Lloyd (1980) con 50g/l de sacarosa y diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (AIB) donde se evaluó el crecimiento radicular.

Cuadro 5. Descripción de los tratamientos con las concentraciones de ácido indolbutírico (AIB).

Especie	Concentración de AIB mg·l ⁻¹	Tratamiento	Descripción del tratamiento
<i>Polylepis tomentella</i>	0.5	T1	Especie 1 x concentración 1
	0.1	T2	Especie 1 x concentración 2
	0.15	T3	Especie 1 x concentración 3
<i>Polylepis incana</i>	0.5	T1	Especie 2 x concentración 1
	0.1	T2	Especie 2 x concentración 2
	0.15	T3	Especie 2 x concentración 3
<i>Polylepis besseri</i>	0.5	T1	Especie 3 x concentración 1
	0.1	T2	Especie 3 x concentración 2
	0.15	T3	Especie 3 x concentración 3

3.3.4. Variables de respuesta

Las siguientes variables evaluadas son:

a) Fase de multiplicación:

No	Nombre	Tipo	Operación
1	Números de hojas	Cuantitativo	Se contaron las hojas verdaderas desarrolladas a los 30 días que surgieron de los explantes de keñua dentro de la cámara de flujo laminar.
2	Crecimiento de brote	Cuantitativo	Se midió en milímetros con un calibrador el crecimiento que alcanzo los explantes a los 30 días dentro de cámara flujo laminar.
3	Porcentaje de oxidación	Cualitativo	Se observó el empardecimiento del medio de cultivo <i>in vitro</i> cada semana hasta los 30 después del establecimiento.
4	Porcentaje de necrosis	Cuantitativo	Se evaluó cuantos explantes presentaron necrosis cada semana ya sea a nivel de las hojas verdaderas o en todo el explante en general.

b) Fase de enraizamiento:

No	Nombre	Tipo	Operación
1	Numero de raíces	Cuantitativo	Se contó el número de raíces desarrollados a los 40 días después del repique en condiciones <i>in vitro</i> dentro de la cámara de flujo laminar.
2	Longitud de raíces	Cuantitativo	Se hizo la medición de longitud que alcanzo a tener en mm las raíces que surgieron de las vitro plantas de keñua desarrollados a los 40 días dentro de la cámara de flujo laminar.
3	Porcentaje de oxidación	Cualitativo	Se observó el empardecimiento del medio de cultivo <i>in vitro</i> cada semana hasta los 40 días.
4	Porcentaje de necrosis	Cuantitativo	Se evaluó cuantas vitro plantas presentaron necrosis cada semana ya sea a nivel de las hojas o en todo la vitro planta en general.

3.3.5. Análisis económico

El análisis económico del ensayo se utilizó el método de Perrin con el cual se analizó los costos de producción, los beneficios netos, el análisis de dominancia.

$$\text{Producción Ajustada 5\%} = \frac{\text{Producción de Plantas} * 5}{100\%}$$

$$\text{Beneficio de Campo} = \text{Valor actual} * \text{Producción Ajustada 5\%}$$

$$\text{Beneficio Neto} = \text{Total de Costos} - \text{Beneficio Campo}$$

3.3.6. Análisis estadístico de los datos de las variables de respuesta

Para el análisis estadístico de las variables de respuesta del presente trabajo de investigación, se lo realizó con el uso del paquete estadístico SPSS (Statistical Product and Service Solutions) versión 22. En base a los datos obtenidos en el laboratorio de biotecnología, con el cual se hizo el análisis de varianza, comparación de medias y las pruebas de significancia.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Variables de respuesta en la fase de multiplicación

En esta fase de multiplicación se evaluaron las siguientes variables de respuesta

- Número de hojas
- Crecimiento de brotes
- Porcentaje de oxidación
- Porcentaje de necrosamiento

Una vez realizado el análisis estadístico de los datos del trabajo de investigación se llegaron a los siguientes resultados y discusiones que se detallan a continuación:

4.1.1. Números de hojas

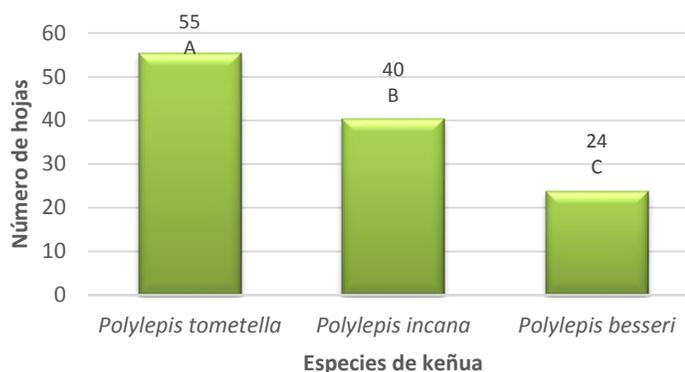
Cuadro 6. Análisis de varianza para el número de hojas por el efecto de las diferentes concentraciones de BAP en las tres especies de keñua.

FV	GL	SC	CM	F	Significancia
Especie	2	7431.51	3715.76	12.52	0.0001*
Concentración	2	1792.31	896.16	3.02	0.0614 NS
Especie*Concentración	4	1921.16	480.29	1.62	0.1909 NS
Error	36	10686.8	296.86		
Total	44	21831.78			

** = Altamente significativo, * = Significativo, NS = No significativo

En el cuadro 6 se observa el análisis de varianza del número de hojas por efecto de diferentes concentraciones de BAP de las tres especies de keñua, donde el factor especie fue significativo, y no así la concentración y la interacción especie por concentración.

Figura 1. Comparación de medias del número de hojas en las tres especies de keñua Duncan 5%.



En la figura 1 se observa la comparación de medias del número de hojas en las tres especies de keñua y la prueba de significancia Duncan al 5%, donde la especie *Polylepis tomentella* ssp. nana desarrollo la mayor cantidad de hojas (55), respecto a *Polylepis besseri* que alcanzó a tener 24 hojas.

Estos resultados son similares a los reportados por Vega *et al.*, (2007) donde se usó esta especie de keñua (*Polylepis tomentella* ssp. nana), que tuvo un desarrollo eficiente en cantidad de hojas. A pesar que no hubo diferencias significativas en las concentraciones de BAP en la cantidad de hojas, la presencia de citoquinina en el medio de cultivo fue determinante para la etapa de multiplicación. Los tratamientos estudiados presentaron valores diferentes entre las especies de keñua en brotación y cantidad de hojas, coincidiendo con lo señalado por Cline, 1996; Roca y Mroginski, 1998 y George *et al.*, 2008; que confirman que para obtener morfogénesis, iniciación y crecimiento de brotes se requiere la presencia de ésta citoquinina y su efecto es variante entre cada especie.

4.1.2. Crecimiento de brotes

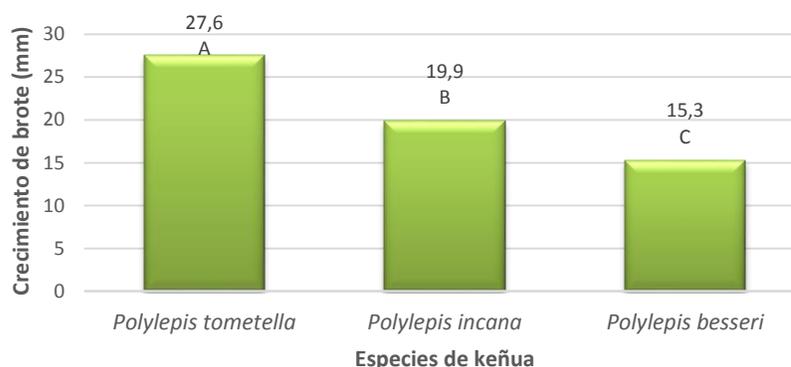
Cuadro 7. Análisis de varianza del crecimiento de brotes por el efecto de las diferentes concentraciones de BAP en las tres especies de keñua.

FV	GL	SC	CM	F	Sig
Especie	2	1164.55	582.27	19.09	0.0001*
Concentración	2	371.06	185.53	6.08	0.0053*
Especie*concentración	4	218.70	54.67	1.79	0.1517 NS
Error	36	1097.968	30.499		
Total	44	2852.27			

** = Altamente significativo, * = Significativo, NS = No significativo

En el **cuadro 7** se observa el análisis de varianza del crecimiento de brotes por efecto de diferentes concentraciones de BAP en las tres especies de keñua, donde los factores especie y la concentración fueron significativas, y no así la interacción especie por concentración.

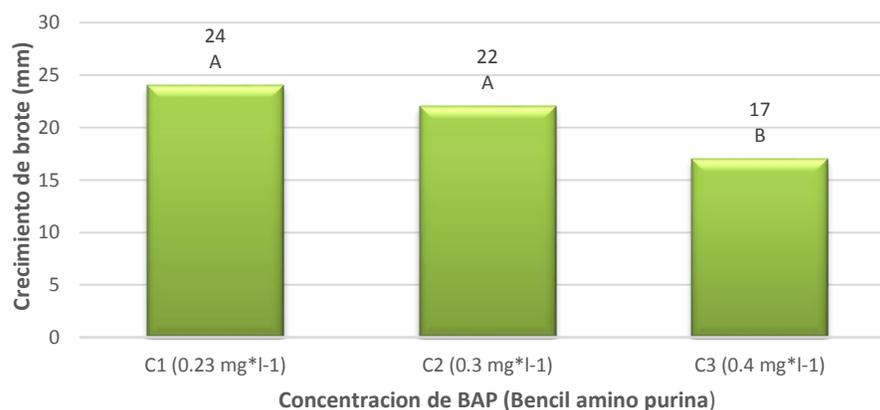
Figura 2. Comparación de medias del crecimiento de brotes de las tres especies de keñua Duncan 5%.



En la figura 2, se observa la comparación de medias del crecimiento de brotes en las tres especies de keñua y la prueba de significancia Duncan al 5%, donde la especie *Polylepis tomentella* ssp. nana alcanzó la mayor altura de brotes con 27.6 milímetros, respecto a *Polylepis besseri* que alcanzó 15.3 milímetros.

La altura de los brotes puede estar influenciada por el genotipo del explante, es posible que el lento crecimiento de los brotes pueda ser debido a un desbalance en el nivel endógeno de citoquininas o auxinas, lo que puede resultar inhibitorio para su crecimiento (Gomes y Canhoto, 2009).

Figura 3. Comparación de medias del crecimiento de brotes de las diferentes especies de keñua por el efecto de tres concentraciones de BAP Duncan 5%.



En la figura 3 se observa en la comparación de medias en altura de brotes en las especies de keñua por el efecto de tres concentraciones de BAP y la prueba de significancia Duncan al 5%, donde la concentración 1 ($0.23 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP) alcanzó la mayor altura de brotes con 24 milímetros en las especies de keñua, respecto a la concentración 3 ($0.4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP) que alcanzó 17 milímetros.

Según Lundergan y Janick, (1979), citados por Hu y Wang (1979), las auxinas en la multiplicación, anula el efecto inhibitorio que tienen las citoquininas sobre el alargamiento de los cultivos. Donde en el caso de las tres especies de keñua se ve esta diferencia de respuesta de elongación o crecimiento de los brotes de las vitroplantas, por otra Quezada (2014) menciona que el uso de la auxina es como un estimulante para el crecimiento de las partes aéreas además que son usadas en una concentración frecuentemente baja a comparación de las citoquininas esto para mantener un balance auxina/citoquinina, ya que concentraciones excesivas de auxina pueden inhibir la multiplicación y favorecer demasiado el enraizamiento o la formación de callos.

4.1.3. Porcentaje de oxidación

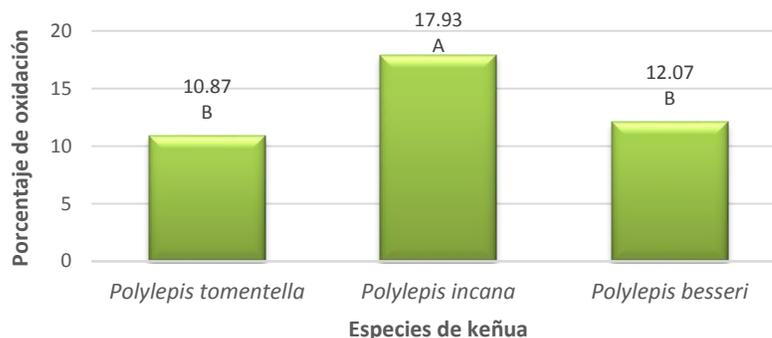
Cuadro 8. Análisis de varianza del porcentaje de oxidación por el efecto de las diferentes concentraciones de BAP en las tres especies de keñua.

FV	GL	SC	CM	F	Sig.
Especie	2	428.98	214.49	4.20	0.0230*
Concentración	2	652.31	326.16	6.38	0.0042*
Especie*concentración	4	447.69	111.92	2.19	0,0897 NS
Error	36	1839,60	51,10		
Total	44	3368,58			

** = Altamente significativo, * = Significativo, NS = No significativo

En el cuadro 8 se observa el análisis de varianza del porcentaje de oxidación por efecto de diferentes concentraciones de BAP en las tres especies de keñua, donde el factor especie y la concentración fue significativas, y no así la interacción especie por concentración.

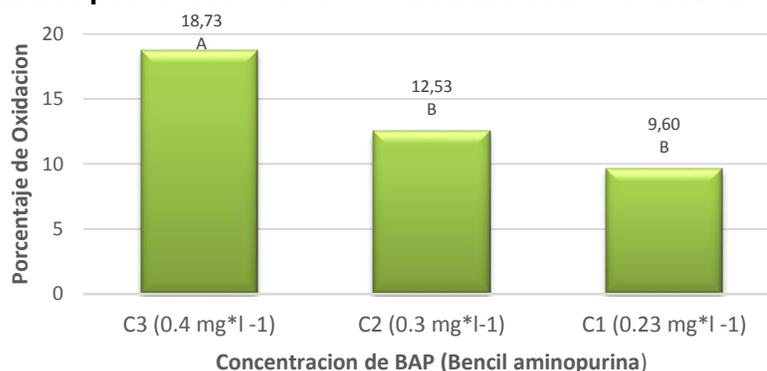
Figura 4. Comparación de medias en el porcentaje de oxidación de las vitroplantas de las tres especies de keñua Duncan 5%.



En la figura 4 se observa en la comparación de medias en el porcentaje de oxidación en las tres especies de keñua y la prueba de significancia Duncan al 5%, donde la especie *Polylepis incana* alcanzó el mayor porcentaje de oxidación, respecto a *Polylepis tomentella* ssp. nana que alcanzó 10.87 por ciento de oxidación.

Por otra parte Azofeita (2009), menciona que el oscurecimiento y la oxidación de tejidos cultivados *in vitro* puede ser el resultado de la oxidación de algunos componentes celulares por radicales libres o de compuestos fenólicos, que al reaccionar pueden generar daño y hasta muerte celular. En cultivo de tejidos *in vitro*, la oxidación puede presentarse en cualquier etapa del proceso donde se produzca estrés al material; durante el establecimiento, como resultado del efecto abrasivo de los desinfectantes y en las siguientes etapas como resultado de los cortes que se realizan al explante. También pueden influir la composición del medio de cultivo, el tipo de envase, la hiperhidricidad, la aireación, la edad, y el genotipo del material, las especies leñosas son las más propensas a sufrir oxidaciones severas.

Figura 5. Comparación de medias en el porcentaje de oxidación en las vitroplantas de keñua por el efecto de tres concentraciones de BAP Duncan 5%.



En la figura 5 se observa en la comparación de medias en el porcentaje de oxidación en las vitroplantas de keñua por el efecto de las tres concentraciones de BAP y la prueba de significancia Duncan al 5%, donde la concentración 3 (0.4 mg·l⁻¹ de BAP) alcanzó el mayor porcentaje de oxidación del 18.73% en las vitroplantas de keñua, respecto a la concentración 1 (0.23 mg·l⁻¹ de BAP) que alcanzó 9.60 % de oxidación en las vitroplantas de keñua.

Según Boulay M. (1984), este problema es particularmente serio en el aislamiento de explantes de especies leñosas como es en el caso de la keñua, los tejidos de estas especies son más ricos en compuestos fenólicos. Laukkanen *et al.*, 2000; Murkute; Shanti y Patil, 2003; Tang y Newton, 2004) mencionan que el desarrollo de este problema está estrechamente relacionado al estrés oxidativo y nitrosativo que sufren las células del explante cultivado. Por ejemplo, en células de *Pinus virginiana*, Tang *et al.* (2004), correlacionaron la muerte celular con altos contenidos de H₂O₂. Asimismo, en la etapa de establecimiento *in vitro*, luego de ser cortados, muchos de los explantes empiezan a perder el color verde e inician un oscurecimiento, liberando frecuentemente exudados oscuros al medio de cultivo, cuya naturaleza no es precisa, aunque se conoce que son una mezcla compleja de sustancias fenólicas (metabolitos secundarios que modulan el desarrollo de la planta y su respuesta a estreses bióticos y abióticos).

4.1.4. Porcentaje de necrosamiento

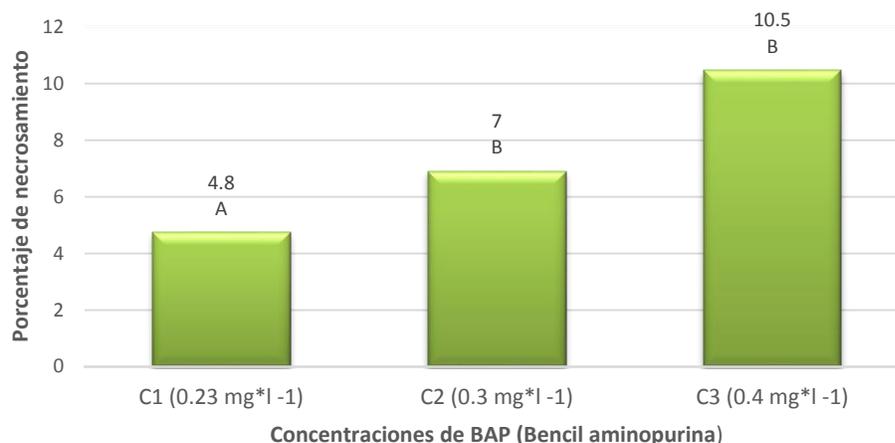
Cuadro 9. Análisis de varianza del porcentaje de necrosamiento por el efecto de las diferentes concentraciones de BAP en las tres especies de keñua.

FV	GL	SC	CM	F	Sig.
Especie	2	77.08	38.54	1.83	0.1744 NS
Concentración	2	251.00	125.50	5.97	0.0058*
Especie*concentración	4	292.67	73.17	3,48	0.0167*
Error	36	756.68	21.02		
Total	44	1377.43			

** = Altamente significativo, * = Significativo, NS = No significativo

En el cuadro 9 se observa el análisis de varianza del porcentaje de necrosamiento por efecto de diferentes concentraciones de BAP en las tres especies de keñua, donde los factores concentración y la interacción especie por concentración fueron significativas, y no así la especie.

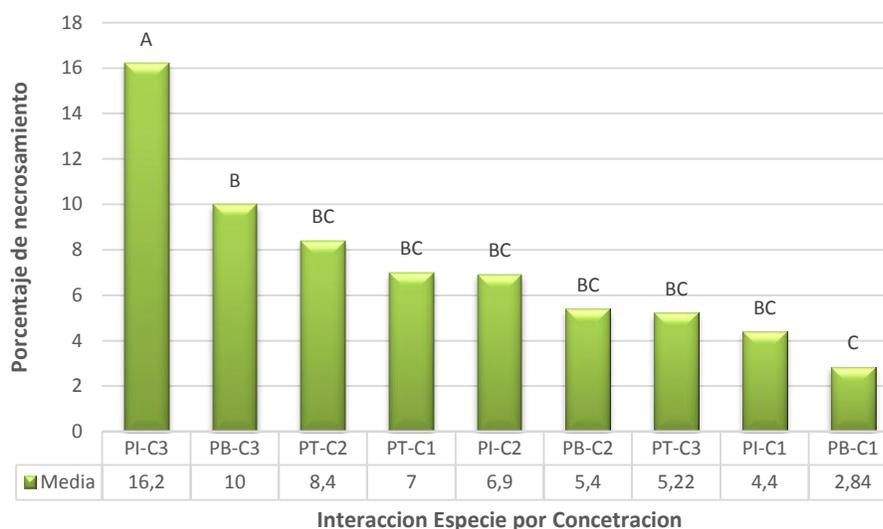
Figura 6. Comparación de medias del porcentaje de necrosamiento en las vitroplantas de keñua Duncan 5%.



En la figura 6 se observa en la comparación de medias en el porcentaje de necrosamiento en las vitroplantas de keñua por el efecto de las tres concentraciones de BAP y la prueba de significancia Duncan al 5%, donde la concentración 3 (0.4 mg·l⁻¹ de BAP) alcanzo el mayor porcentaje de necrosamiento del 10.5% en las vitroplantas de keñua, respecto a la concentración 1 (0.23 mg·l⁻¹ de BAP) que alcanzo a tener 4.74 % de necrosamiento en las vitroplantas de keñua.

El factor que se ha relacionado con el proceso de necrosamiento es el tipo de medio y la concentración de sus componentes, de manera que Bairu *et al.* (2009) concluyen que es la disponibilidad de los elementos del medio y no su concentración en el mismo lo que es importante. La ventilación de los cultivos, relacionada con la transpiración de los brotes, actuaron en este contexto de dos maneras, bien aumentando el flujo de nutrientes hacia la parte superior del brote, o bien evitando la acumulación en el frasco de cultivo de gases y compuestos volátiles que pueden afectar al brote, como el CO₂ o el etileno (De Proft *et al.*, 1985; Podwyszynska y Goszczynska, 1998). Otro factor entre los relacionados con la necrosis apical es la frecuencia de subcultivos (Jain *et al.*, 2009), que proporciona los nutrientes necesarios a los brotes evitando su agotamiento y favorece la eliminación de posibles compuestos exudados por los brotes con una posible acción nociva.

Figura 7. Comparaciones múltiples de medias del porcentaje de necrosamiento en las vitroplantas de keñua por el efecto de la interacción de concentración por especies Duncan 5%.



En la figura 7 se observa la comparación múltiple de medias del porcentaje de necrosamiento en las vitroplantas de keñua por el efecto de la interacción especie por concentración, y la prueba de significancia Duncan al 5%, donde la especie *Polylepis incana* alcanzó el mayor porcentaje de necrosamiento del 16.20% con la concentración 3 ($0.4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), respecto a *Polylepis besseri* que tuvo 2.84 % de necrosamiento con la concentración 1 ($0.23 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$).

Por otra parte, la necrosis apical en los brotes es considerada como un desorden fisiológico común en algunas especies forestales cultivadas *in vitro* (Vengadesan y Pijut, 2009) que puede llegar a causar la muerte del explante generando severas pérdidas; algunos de los explantes cultivados. Además, el oscurecimiento de explantes, se debe al estrés oxidativo se le ha relacionado con el desencadenamiento de otros desordenes fisiológicos, morfológicos, epigenéticos y genéticos que ocurren en los explantes cultivados, tales como recalcitrancia, hiperhidricidad, variación somaclonal y habituación (Cassells y Curry 2001, van Staden *et al.*, 2006). La necrosis va asociada con un complejo conjunto de factores que van desde la formulación de sales, reguladores de crecimiento, uso de aditivos como carbón, fuente de azúcar, entre otros (Chiruvella *et al.*, 2011).

4.2. Variables de respuesta en la fase de enraizamiento

En esta fase de enraizamiento se evaluaron las siguientes variables de respuesta

- Número de raíces
- Crecimiento de raíces
- Porcentaje de oxidación
- Porcentaje de necrosamiento

Una vez realizado el análisis estadístico de los datos del trabajo de investigación se llegaron a los siguientes resultados y discusiones que se detallan a continuación:

Cuadro 10. Análisis de varianza para el número de raíces por el efecto de las diferentes concentraciones de AIB en las tres especies de ñeña.

FV	GL	SC	CM	Fc	F t (5%)	Sig.
Especie	2	201,0	100,50	4,05	0,1406	NS
Concentración	2	174,0	87,0	3,50	0,1642	NS
Especie*concentración	0	0.00				
Error	2	74,5	24,83			
Total	3	304,0				
Promedio (raíces)	7					

** = Altamente significativo, * = Significativo, NS = No significativo

Cuadro 11. Análisis de varianza de longitud de las raíces en las vitroplantas por el efecto de las diferentes concentraciones de AIB en las tres especies de ñeña.

FV	GL	SC	CM	Fc	F t (5%)	Sig.
Especie	2	769,5	384,75	17,49	0,0222	*
Concentración	2	280,5	141,08	6,41	0,0825	NS
Especie*concentración	0	0.00				
Error	3	66,0	22,0			
Total	7	841,5				
Promedio (Long. Raíces)	21,75					

** = Altamente significativo, * = Significativo, NS = No significativo

Cuadro 12. Análisis de varianza del porcentaje de oxidación de las vitroplantas en las tres especies de keñua.

FV	GL	SC	CM	Fc	F t (5%)	Sig.
Especie	2	67,0	33,50	1,50	0,3536	NS
Concentración	2	34,16	17,08	0,76	0,5390	NS
Especie*concentración	0	0,00				
Error	3	67,0	22,33			
Total	7	184,0				
Promedio (Oxidación)	18,00					

** = Altamente significativo, * = Significativo, NS = No significativo

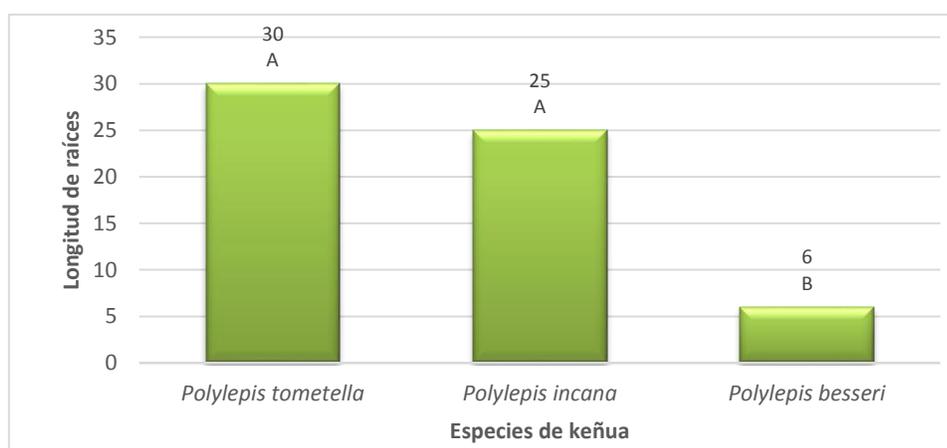
Cuadro 13. Análisis de varianza del porcentaje de necrosamiento de las vitroplantas en las tres especies de keñua.

FV	GL	SC	CM	Fc	F t (5%)	Sig.
Especie	2	45,37	22,68	2,03	0,2768	NS
Concentración	2	17,70	8,85	0,79	0,5291	NS
Especie*concentración	0	0,00				
Error	3	33,50	11,16			
Total	7	100,87				
Promedio (Necrosamiento)	10,87					

** = Altamente significativo, * = Significativo, NS = No significativo

En el análisis de varianza de las variables de respuesta evaluadas en la fase de enraizamiento no se tuvieron diferencias significativas; por otra parte se tuvo diferencias significativas en el crecimiento de las raíces en las vitroplantas de keñua como se observa en el **cuadro 11**.

Figura 7. Comparación de medias en crecimiento de raíces de las vitroplantas de keñua Duncan 5%.



En la figura 7 se observa en la comparación de medias en la longitud de raíces de las vitroplantas de keñua y la prueba de significancia Duncan al 5%, donde la especie *Polylepis tomentella* spp. nana alcanzó la mayor longitud de raíces con 30 milímetros, respecto a *Polylepis besseri* que alcanzó 6 milímetros.

Brown y Sommer (1974), menciona que la inducción del sistema radical en especies forestales ha presentado más problemas en general, la reducción en la concentración de sales minerales y el uso de auxinas asociado generalmente con la disminución de la temperatura ha demostrado resultados positivos. No obstante, la tendencia actual es la de enraizar en condiciones no estériles, esto es, estimulado en brotes diferenciados *in vitro* la formación de raíces en sustratos como la agrolita, la vermiculita y otros esta medida simple, más económica y frecuentemente produce mejores raíces.

Silva *et al.* (2010) indican que no todas las auxinas naturales o sintéticas pueden inducir primordios radicales *in vitro*. En algunas especies vegetales se dificulta el arraigado aún en presencia de auxinas, siendo otros factores los que influyen en la inducción de raíces. Durante el cultivo *in vitro* el explante sufre siempre en mayor o menor medida situaciones de estrés, ocasionadas por daños mecánicos o por las condiciones del cultivo (como la composición del medio). Estas situaciones estimulan el metabolismo de los compuestos fenólicos.

Según Bairu *et al.* (2009), explica que la necrosis apical aparece de forma habitual durante el cultivo *in vitro* de plantas leñosas. A pesar de existir diferentes hipótesis sobre las causas que provocan la necrosis apical, no se ha podido determinar su origen de forma definitiva lo que indica la complejidad del problema.

4.3. Variables económicas

4.3.1. Análisis económico

Con el fin de conocer los costos de producción por cada uno de los tratamientos se usó método de Perrin con el cual se analizó los costos de producción, beneficios netos, para lo cual se ha considerado todos los valores de operación. Los resultados permiten indicar que el tratamiento 2 ($0.3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP) es más rentables ante los demás tratamientos en la fase de multiplicación. Por otra parte los tratamientos 1 y 3 ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$; $0.15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB), también pueden considerarse rentables en la fase de enraizamiento.

Cuadro 14. Presupuesto parcial y beneficios netos de los tratamientos en Bs.

Fases	Especies de keñua	Concentraciones de BAP y AIB (mg ⁻¹ l ⁻¹)	Tratamientos	Producción de Vitroplantas	Producción ajustada al 5%	Beneficio campo (14bs/pl)	Total de Costos	Beneficios Netos
M u l t i p l i c a c i o n	<i>Polylepis tomentella</i>	0.23 BAP	T1 (PT x 0.23BAP)	36	34,2	478,8	318,82	159,98
	<i>Polylepis tomentella</i>	0.3 BAP	T2 (PT x 0.3BAP)	45	42,75	598,5	306,83	291,67
	<i>Polylepis tomentella</i>	0.4 BAP	T3 (PT x 0.4BAP)	36	34,2	478,8	318,83	159,97
	<i>Polylepis incana</i>	0.23 BAP	T1 (PI x 0.23BAP)	36	34,2	478,8	318,82	159,98
	<i>Polylepis incana</i>	0.3 BAP	T2 (PI x 0.3BAP)	36	34,2	478,8	306,86	171,94
	<i>Polylepis incana</i>	0.4 BAP	T3 (PI x 0.4BAP)	18	17,1	239,4	318,83	-79,43
	<i>Polylepis besseri</i>	0.23 BAP	T1 (PB x 0.23BAP)	27	25,65	359,1	318,82	40,28
	<i>Polylepis besseri</i>	0.3 BAP	T2 (PB x 0.3BAP)	27	25,65	359,1	306,83	52,27
	<i>Polylepis besseri</i>	0.4 BAP	T3 (PB x 0.4BAP)	18	17,1	239,4	318,83	-79,43
E n r a i z a m i e n t o	<i>Polylepis tomentella</i>	0.5 AIB	T1 (PT x 0.5AIB)	18	17,1	239,4	112,1	127,3
	<i>Polylepis tomentella</i>	0.1 AIB	T2 (PT x 0.1AIB)	18	17,1	239,4	112,03	127,37
	<i>Polylepis tomentella</i>	0.15 AIB	T3 (PT x 0.15AIB)	0	0	0	112,04	-112,04
	<i>Polylepis incana</i>	0.5 AIB	T1 (PI x 0.5AIB)	0	0	0	112,1	-112,1
	<i>Polylepis incana</i>	0.1 AIB	T2 (PI x 0.1AIB)	0	0	0	112,03	-112,03
	<i>Polylepis incana</i>	0.15 AIB	T3 (PI x 0.15AIB)	18	17,1	239,4	112,04	127,36
	<i>Polylepis besseri</i>	0.5 AIB	T1 (PB x 0.5AIB)	9	8,55	119,7	112,1	7,6
	<i>Polylepis besseri</i>	0.1 AIB	T2 (PB x 0.1AIB)	0	0	0	112,03	-112,03
	<i>Polylepis besseri</i>	0.15 AIB	T3 (PB x 0.15AIB)	9	8,55	119,7	112,04	7,66

5. CONCLUSIONES

- Para la multiplicación *in vitro* de brotes caulinares en las tres especies de keñua (*Polylepis tomentella ssp. nana*, *Polylepis incana*, *Polylepis besseri*), el tratamiento óptimo para esta fase consistió en el uso del medio TL (Tremblay y Lalonde 1984), suplementado con 0.23 mg·l⁻¹ de bencil aminopurina (BAP) y 0.1 mg·l⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), que resultó ser el balance hormonal adecuado (citoquinina/auxina), para la multiplicación de explantes establecidos en las tres especies de keñua en condiciones de cultivo *in vitro*, por cuanto permitió obtener vitroplantas, con una importante tasa de brotes y mayor número de hojas por explante.
- En el enraizamiento para la formación y desarrollo radicular de las vitroplantas de keñua, se estableció que el medio Mc Cown y Lloyd (1980) al 50% de su concentración, con 50 g/l de sacarosa y las diferentes concentraciones (0.5, 0.1, 0.15 mg·l⁻¹) de ácido indolbutírico (AIB) no tuvieron diferencias significativas, sin embargo con este medio basal se pudo desarrollar raíces y que tuvieron diferencias significativas en la longitud de las raíces en la vitroplantas de keñua demostrando que este medio basal fue efectivo en el desarrollo radicular, ya que muchas veces no llega a tener resultados usando medios basales para el desarrollo de raíces y que este es el principal problema en la producción de vitroplantas en especies leñosas.
- La especie ***Polylepis tomentella ssp. nana*** en la fase de multiplicación con el medio basal TL suplementado con 0.23 mg·l⁻¹ de BAP y 0.1 mg·l⁻¹ de AIB desarrollo una cantidad mayor en vitroplantas con buenas características fenotípicas (cantidad de hojas, longitud de brotes, menor porcentaje de oxidación y necrosamiento), por otra parte, se tuvo un resultado similar, pero con una cantidad menor en vitroplantas con el mismo medio basal con una concentración de 0.23 mg·l⁻¹ de BAP. En la fase de enraizamiento el medio basal Mc Cown y Lloyd (1980) al 50 por ciento de su concentración con 50 g/l de sacarosa y 0.1 mg·l⁻¹ de AIB se tuvo vitroplantas con buen desarrollo radicular en longitud y cantidad de raíces además de ser vitroplantas con buenas características en cantidad de hojas y brotes sin la presencia de oxidación y necrosamiento en las vitroplantas.

En la especie *Polylepis incana* en la fase de multiplicación con el medio basal TL suplementado con $0.23 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP y $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB desarrollo una cantidad mayor en vitroplantas con buenas características fenotípicas (cantidad de hojas, longitud de brotes, menor porcentaje de oxidación y necrosamiento), por otra parte se tuvo un resultado similar pero con una cantidad menor en vitroplantas con el mismo medio basal con una concentración de $0.3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP. En la fase de enraizamiento el medio basal Mc Cown y Lloyd (1980) al 50 porciento de su concentración con 50 g/l de sacarosa y $0.15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB solo con esta concentración de auxina se pudo tener vitroplantas con buen desarrollo radicular en longitud y cantidad de raíces además de ser vitroplantas con buenas características en cantidad de hojas y brotes sin la presencia de oxidación y necrosamiento en las vitroplantas.

La especie *Polylepis bessi* en la fase de multiplicación con el medio basal TL suplementado con $0.23 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP y $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB desarrollo una cantidad mayor en vitroplantas con buenas características fenotípicas (cantidad de hojas, longitud de brotes, menor porcentaje de oxidación y necrosamiento), por otra parte se tuvo un resultado similar pero con una cantidad menor en vitroplantas con el mismo medio basal con una concentración de $0.3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP. En la fase de enraizamiento con el medio basal Mc Cown y Lloyd (1980) al 50 porciento de su concentración con 50 g/l de sacarosa y 0.5 y $0.15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB solo con estas concentraciones de auxina se pudo tener vitroplantas con buen desarrollo radicular en longitud y cantidad de raíces además de ser vitroplantas con buenas características en cantidad de hojas y brotes sin la presencia de oxidación y necrosamiento en las vitroplantas.

- En cuanto al análisis de los costos de producción y beneficios netos entre los tratamientos estudiados, y considerando todos los valores de operación. Los resultados permiten indicar que el tratamiento 2 ($0.3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP) es más rentables ante los demás tratamientos en la fase de multiplicación. Por otra parte los tratamientos 1 y 3 ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$; $0.15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB), también pueden considerarse rentables en la fase de enraizamiento.

6. RECOMENDACIONES

El presente trabajo de investigación, realiza las siguientes recomendaciones:

- Se recomienda para mejorar la multiplicación *in vitro* de la keñua utilizar el medio basal Tremblay y Lalonde, 1984 (TL) suplementado con $0.23 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de bencil aminopurina (BAP) y $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de ácido indolbutírico (AIB) para trabajos de producción vitroplantas o nuevos trabajos de investigación en keñua a partir de los resultados obtenidos con el presente trabajo de investigación porque presentó mejores resultados en la producción de vitroplantas con buenas características fenotípicas (desarrollo de brotes, número de hojas, y menor presencia de oxidación fenólica y necrosamiento).
- Se sugiere optimizar la fase de enraizamiento *in vitro* de la especie *Polylepis* evaluando diferentes reguladores de crecimiento como el ácido neczoico, AIA, Picloran Tidiazuron, usados en especies forestales, y otros medios basales de enraizamiento para obtener mayor cantidad de vitroplantas con desarrollo radicular.
- Para trabajos de investigación se recomienda recolectar los esquejes de keñua entre los meses de Abril y Mayo porque se vio que en estos meses está en pleno desarrollo fisiológico además que se tiene brotes jóvenes, la propagación de *in vitro* en especies leñosas se requiere de la utilización de explantes provenientes de materiales juveniles siendo este un factor importante para tener éxito en un trabajo de investigación.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aitken, J.; Horgan, K. y Thorpe, T. A. 1981. Influence of explant selection on the shoot-forming capacity of juvenile tissue radiata pine. *Can. J. For. Res.* 11:112-117.
- Alvarado, C.Y.; Portal N.; Garcia, L. Martinez, Y.; Freire, M. & Quiala, E. 2001. Control de la Contaminación bacteriana en la semilla artificial de la caña de azúcar a través de métodos de detección temprana. *Biotecnología Vegetal* No 1: 57-60, enero – abril 2001. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas Cuba.
- Ammirato, P. V.; Evans, D. A.; Sharp, W. R. y Yamada, Y. (eds.). 1984. *Handbook of plant cell culture; 3: Crop species.* MacMillan Publishing, New York.
- Antunez de Mayolo, S. 1981. La nutrición en el antiguo Perú. Lima. Banco Central de Reserva del Perú. 187 p.
- Auge R., Beauchesne J., Boccon- Gibod J., Decourtye L., Digat B., Minier R., Morad J.c., Oudin Y. & Vidalie H. 1982. *La Culture in vitro et ses Applications Horticolas. Technique et documentation,* Paris. 151 p.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20:153-175.
- Beck, S. G. 1998. Floristic inventory of Bolivia – An indispensable contribution to sustainable development. pp 243-268. En: W. Barthlott & M. Winiger (eds). *Biodiversity. A Challenge for Development Research and Policy.* Springer-Verlag, Berlin.
- Bitter, G. 1911. Revision der Gattung *Polylepis*. *Bot. Jahrb. Syst.* 45: 564-656.
- Boccon, G. J. 1989. La technologie de la culture *in vitro*. La culture in vitro et ses applications horticolas. H. Vidalie (ed.). 3ra Ed. Paris, Francia, Jb. Bailliee, p. 31-47.
- Bonga, J. M. 1982. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. En: Bonga, J. M. y Durzan, S. N. (end.). *Tissue culture in forestry.* Martinus Nijhoff, Holanda. p. 387-412.

- Boulay M. 1984. Aspects Pratiques de la multiplication *in vitro* des essences forestiers. Ann. AFOCEL. p. 7-43.
- Brown, C. y Sommer, H. 1974. Tissue culture technique for plantlet formation and propagation of difficult to root forest tree. Forest Research Progress, University of Georgia, E. U.
- Cantero. J.; Bianco, C. 1987. El límite austral de *Polylepis anstralls* Bitter (Tabaquillo) en la República Argentina. Parodiana (Arg.) 5(1): 65-71.
- Cárdenas, M. 1989. Manual de plantas económicas de Bolivia. 2nd ed. Los Amigos del Libro, La Paz.
- C.E.S.A. Especies forestales nativas en los Andes Ecuatorianos resultados preliminares de algunas experiencias Quito. Editorial Mendieta 1984. 50p.
- Conservación Internacional (C.I.) y la Fundación Protección y Uso Sostenible del Medio Ambiente (Fundación PUMA), La Paz. 36 p.
- Cruz, A.S. 1999. Efecto de sustratos orgánicos en la reproducción vegetativa de la queñua (*P. incana*, H.B.K y *P. tomentella*) Rosoideae. Tesis de ingeniería agronómica, Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. 112 p.
- Chiruvella K, Mohammed A, Damuri G, Ghanta G. *In vitro* Shoot Regeneration and Control of Shoot Tip Necrosis in Tissue Cultures of *Soymida febrifuga* (Roxb.) A. Juss. Plant Tissue Cult. & Biotech. 21(1): 11-25, 2011.
- Del solar C. 1985. Usando tecnicas del cultivo de tejido. Micropropagación de plantas. ICTA-JOCV. Guatemala- México.
- Dodds, J. H. y Roberts, L. W. 1987. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press. 232 p.
- Durbin, R. D. (ed.) 1979. Nicotiana, procedures for experimental use. Technical bulleting 1586. U. S. Department of agriculture, Beltsville, Maryland, E. U.

- Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). 1983. Handbook of plant cell culture; 1: Techniques and applications. MacMillan Publishing, New York.
- Fjeldså, J. 1995. Geographical patterns of neoendemic and relict species of Andean forest birds: the significance of ecological stability areas. pp. 89-102. En: S. P. Churchill, H. Balslev, E. Forereo & J. L. Luteyn (eds). Biodiversity and conservation of Neotropical montane forests. New York Botanical Gardens, Bronx.
- Fjeldså J. & M. Kessler. 1996. Conserving the biological diversity of *Polylepis* forests of the highlands of Peru and Bolivia. Nordic Foundation for Development and Ecology (NORDECO), Copenhagen.
- Fjeldså J. 2002. *Polylepis* forests - vestiges of a vanishing ecosystem in the Andes. *Ecotropica* 8: 111-123.
- Fjeldså, J. & M. Kessler. 2004. Conservación de la biodiversidad de los bosques de *Polylepis* de las tierras altas de Bolivia: Una contribución al manejo sustentable en los Andes. Centro para la Investigación de la Diversidad Cultural y Biológica de los Bosques Pluviales Andinos (DIVA), Dinamarca.
- Francllet, A. & Boulay M. 1982. Micropropagation of frost resistant *Eucaliptus* clones. *Aust. For. Res.*, 13:83-89.
- Frimer, O.; Moller, S. 1989. The Status of *Polylepis* Forests and their Avifauna in Cordillera Blanca, Perú. Zoological Museum/University of Copenhagen, Dinamarca. 58 p.
- Gamborg. O. L.; Miller, R. A. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- García M., Hernández R., Bustos S., Estevez M., Echevarría Y., Cruz R., León L. y Bustos L., 2008. "Nuevas alternativas en la preparación de los medios de cultivo con la utilización del extracto de Aloe vera L". Departamento de Biología, Departamento Agropecuario de la Universidad de Pinar del Río. Cuba. Fecha de consulta (2014, enero). En: <http://www.monografias.com/trabajos-pdf/medios-cultivo-aloe/medios-cultivos-aloe.pdf>

- García-Nuñez C., F. Rada, C. Boero, J. González, M. Gallardo, A. Azócar, M. Liberman-Cruz, M. Hilal & F. Prado. 2004. Leaf gas exchange and water relations in *Polylepis tarapacana* at extreme altitudes in the Bolivian Andes. *Photosynthetica* 42: 133-138.
- Gautheret, R. J. 1955. The nutrition of plant tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 6: 433-484.
- Gautheret, R. J. 1959. *La culture des tissus vegetaux*. Masson, Paris.
- George E. 1993 (b). *Plant propagation by tissue culture the technology exegetics ltd*, 2nd ed, England.
- Geyger, E. 1985. Untersuchungen zum Wasserhaushalt der Vegetation im nordwestargentinischen Andenhochland. *Dissertationes Botanicae* 88: 1-134.
- Goldstein, G., Meinzer, F. y F. Rada. 1994. Environmental biology of a tropical treeline species, *Polylepis sericea*. p. 129-149. En: P. W. Rundel, A. P. Smith & F. C. Meinzer (eds). *Tropical alpine environments: Plants form and function*. Cambridge University Press, Cambridge.
- GOMES, F. y CANHOTO J. M. Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant.* 45:72–82. 2009.
- Gonzaes S. 2004. *Bioteconología vegetal métodos de propagación in vitro en plantas*. Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba.
- Grattapaglia D. y Machado M. A. 1997. Micropropagación. Curso sistemas de micropropagación. Brasilia-DF, 20-30 de octubre.
- Grattapaglia, D., Assis T. F. y Caldas L. S. 1987. Efeito residual de BAP (6-benzilaminopurina) e NAA (ácido nafteleno acético) na multiplicación e enraizamiento in vitro de Eucaliptus. En: *Resumo do 2do. Simposio Nacional de cultura de Tecidos Vegetales*. Brasilia. p. 8.
- Hasewaga, P. M. 1980. Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 105: 216-220.

- Hensen, I. 1991. La flora de la comunidad de Chorojo, su uso, taxonomía científica y vernacular. AGRUCO, Cochabamba. 26 p.
- Hoch, G. y C. Körner. 2005. Growth, demography and carbon relations of *Polylepis* trees at the world's highest treeline. *Functional Ecology* 19: 941-951. Beck, S. G. & H. Ellenberg. 1977. Entwicklungsmöglichkeiten im Andenhochland in ökologischer Sicht. Göttingen.
- Hensen, I. 1991. La flora de la comunidad de Chorojo, su uso, taxonomía científica y vernacular. AGRUCO, Cochabamba. 26 p.
- Hu, C. Y. y Wang, P. J. 1983. Meristem shoot tip and bud culture. In: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.) *Handbook of plant Cell Culture*. Vol. 1 Techniques for propagation and Breeding. New York, Macmillan Publishing Company. p. 117-227.
- Ivanova, Z. 1981. Rapid vegetative propagation of conifers. *Scientia Horticulturae* 14:347-355.
- Keays, M. L. 1974. Full-tree and complete-tree utilization for pulp and paper. *For. Prod. J.* 24:13-16.
- Kessler, M. 1995a. *Polylepis*-Wälder Boliviens: Taxa, Ökologie, Verbreitung und Geschichte. *Dissertationes Botanicae* 246, J. Cramer, Berlin. 303 p.
- Kessler, M. 1995b. The genus *Polylepis* (Rosaceae) in Bolivia. *Candollea* 42: 31-71.
- Kessler M. 2002. The *Polylepis* problem: Where do we stand. *Ecotropica* 8: 97-110.
- Kessler, M. & A. N. Schmidt-Lebuhn. 2005. Taxonomic and distributional notes on *Polylepis* (Rosaceae). *Organisms, Diversity and Evolution* 6: 67-70.
- Kessler M. & A.N. Schmidt-Lebuhn. 2006. Taxonomical and distributional notes on *Polylepis* (Rosaceae). *Organisms, Diversity & Evolution* 6: 67-69.
- Kessler, M. & J. Fjeldså. 2004. Conservación de la biodiversidad de los bosques de *Polylepis* de las tierras altas de Bolivia: Una contribución al manejo sustentable en los Andes. Centro para la Investigación de la Diversidad Cultural y Biológica de

los Bosques Pluviales Andinos. DIVA Technical Report 11. FAN, Santa Cruz de la Sierra. 214 p.

Körner, Ch. 1999. *Alpine Plant Life: functional plant ecology of high mountain ecosystems*. Springer. Berlin, Heidelberg, Nueva York.

Krikorina A. D. & BEQUAM D. L. 1991. Plant cell and tissue culture: the role of Haberlandt. *Botanical Review*, 35: 59-88.

Leung, A. W. D. 1982. *In vitro* propagation of gymnosperms. En: Bonga y Durzan. (eds.). *Tissue culture in forestry*. Martinus Nijhoff, Holanda. p. 72-108.

Linsmaier, E. M. y Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.

Mahlberg, P. G. 1959. Development of the non-articulated laticifer in proliferated embryos of *Europhia marginata* Pursh. *Phytomorphology* 9: 156-162.

Mamani, E. 1999. Regeneración y micropropagación masiva de Keñua (*Polylepis besseri* Hieron.) a partir de yemas apicales mediante técnicas *in vitro*. Tesis ingeniería agronómica, Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias, Universidad Técnica de Oruro, Oruro. 75 p.

Mejia A. 1994. Propagación comercial de 312 especies de plantas por cultivos *in vitro*. Costa Rica Turrialba. CATIE.

Meins, F. y Binns, A. N. 1978. Epigenetic variation in the requeriment of plant cells for cytokinins. En: Subtelny, S. y Sussex, I. M. (eds.). *The clonal basis of development: Symposium of the Society for Developmental Biology, 35th Memorias*. Academic Press, New York. p. 185-201.

Mendoza W. & A. Cano. 2011. Diversidad del género *Polylepis* (Rosaceae, Sanguisorbeae) en los Andes peruanos: Diversity of the genus *Polylepis* (Rosaceae, Sanguisorbeae) in the Peruvian Andes. *Revista Peruana de Biología* 18: 197-200.

Meneses, R.I. & S. Beck. 2005 *Especies amenazadas de la flora de Bolivia*.

- Mott, R. L. 1981. Trees. En: Conger, B. V. (ed.). Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. CRC Press, Boca Raton, Florida, E. U. p. 217-254.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, 15(3): 473-497.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135–166.
- Murashige, T. 1977a. Manipulation of organ initiation in plant tissue cultures. *Botanical Bulletin of the Academia Sinica* 18: 1:24.
- Murashige, T. 1977b. Clonal crops through tissue culture. En: Barz, W.; Reinhard, E. y Zenk. M. H. (eds.). *Tissue culture and its biotechnological application*. New York. p. 392-403.
- Patel, K. R. y Thorpe, T. A. 1984. *In vitro* differentiation of plantlets from embryonic explants of lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl. ex Loud). *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 3(2): 131-142.
- Perez y Ponce, J. N. 1998. Propagacion y mejora de las plantas por biotecnología. Ed. Santa Clara. Instituto de Biotecnología de las plantas. Cuba.
- Pierik, R. L. M. 1979. *In vitro* culture of higher plants: Bibliography. Kniphorst Scientific Bookshop, Wageningen, Holanda.
- Prettell, J. 1985. Apuntes sobre algunas especies forestales nativas de la sierra peruana. Proyecto FAO/Holanda/INFOR, Lima. 113 p.
- PROINPA. 1996. Informe annual 1995-1996. Instituto Boliviano de Tecnología Agropecuaria (IBTA); Programa de Investigación de la Papa (PROINPA).
- Razdam, M. K. 2003. Introduction to plant tissue culture. 2da ed. Enfield. New Hampshire, U.S.A. 375 p.
- Rocabado, P. & J. Quezada. 2005. Inducción del enraizamiento *in vitro* de brotes caulinares de *Polylepis racemosa* a través del manejo de la concentración de ácido indolacético (AIA) y sacarosa. *BIOFARBO* (13): 83-86.

- Roca, M. y Mroginsky, L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. 953 p.
- Roca, W. 1997. Uso actual y potencial del cultivo de tejidos. Experiencia en el CIAT. En: Conferencia de planificación. Programa Nacional para el Desarrollo de la Biotecnología Agropecuaria y Forestal de Chile.
- Scott, T. K. (ed.). 1984. Hormonal regulation of development; 2: The function of hormones from the level of the cell to the whole plant. Encyclopedia of plant physiology, new series. Springer – Veriag, New York. v. 10.
- Schmidt-Lebuhn, A. N., Kessler, M. & M. Kumar. 2006. Promiscuity in the Andes: a phylogenetic analysis of the genus *Polylepis* (Rosaceae) based on morphology and AFLP data. Systematic Botany 31: 547-559.
- Seilleur, P. 1989. Culture in vitro d' explants vegetaux. Faculte des Sciences Agronomiques del'Etat. Bélgica. 132 p.
- Servat G.P., C.W. Mendoza & J.A. Ochoa C. 2002. Flora y fauna de cuatro bosques de *Polylepis* (Rosaceae) en la Cordillera del Vilcanota (Cusco, Peru). Ecología Aplicada 1: 25-35.
- Sharp, W. R.; Evans, D. A.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). 1984. Handbook of plant cell culture; 2: Crop species. MacMillan Publishing, New York.
- Silvia Radice. 2010. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II, Argenbio, INTA. pags.: 26-33.
- Simpson, B. B. 1979. A revision of the genus *Polylepis* (Rosaceae: Sanguisorbeae). Smithsonian Contr. Bot. 43: 1-62.
- Simpson, B. B. 1986. Speciation and specialization of *Polylepis* in the Andes. pp. 304-316 En: F. Vuillemier & M. Monasterio (eds). High Altitude Tropical Biogeography. Oxford University Press, Nueva York.
- Kerr, M. 2003. A phylogenetic and biogeographic analysis of the Sanguisorbeae (Rosaceae) with emphasis on the pleistocene radiation of the high Andean genus *Polylepis*. PhD thesis, Univ. Maryland, Maryland. 189 p.

- Sommer, H. E.; Brown, C. L. y Kormatik, P. P. 1975. Differentiation of plantlets in long-leaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue cultured *in vitro*. Bot. Gaz. 136: 196-200.
- Skoog, F. y Miller, C. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: 118-131.
- Steward y Caplin, S. M. 1951. A tissue culture from potato tuber: The synergistic action of 2,4-D and coconut milk. Science 113: 518- 520.
- Sweet, G. B. 1973. Effect of maturation on growth and form of vegetative propagules of radiata pine. N. Z. J. For. Scie. 3: 191.210.
- Tarifa, T. & E. Yensen. 2001. 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.
- Thomas, E. y Davey, M. R. 1975. From single cells to plants. Wykeham Publications, Londres. 171 p.
- Vega, C. 2002. Capacidad de regeneración de cuatro especies de keñua (*Polylepis* spp.) por medio de propagación *in vitro*. Tesis ingeniería agronómica, Carrera de Ingeniería Agronómica, Universidad Loyola, La Paz. 120 p.
- Vengadesan G, Pijut P. *In vitro* propagation of northern red oak (*Quercus rubra* L.). *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 45:474–482. 2009.
- Villalobos A, V. M.; Thorpe, T. A. y Yeung, E. C 1982a. El papel del cultivo de tejidos en especies forestales. Ciencia y Desarrollo, CONACYT (Mexico) 51: 43-59.
- Villalobos A, V. M.; Leung, D. W. M. y Thorpe, T. A. 1984. Light-cytokinin interaction in shoot formation in cultured cotyledon explants of radiata pine. *Physiol. Plant.* 61: 497-504.
- Villalobos A, V. M. y Thorpe T. A. 1991. Micropropagacion, conceptos, metodologia y resultados. En: Roca, M. y Mroginsky (Eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y Aplicaciones Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. Pp. 128-140.

- White, P. R. 1963. The cultivation of animal and plant cells 2 ed. Ronald Press, New York.
- Winton, L. L. 1968. Plantlets from aspen tissue cultures. Science 160: 1234-1235.
- Young, K.; León, B. 1988. Vegetación de la zona alta del Parque Nacional Río Abiseo, San Martín. Revista Forestal del Perú 15(1):3-20.
- Zaerr, J. B. y Mapes, M. O. 1985. Action of growth regulators. In: Bonga, J. M. y Durzan, D. J. (Eds.). Tissue Culture in Forestry, 2da ed. Dordrecht, Martnus Nijhoff Publishers. p. 231-255.

8. ANEXOS

Anexo 1. Descripción de niveles de BAP en las tres especies de keñua

No	Especie	Tratamiento	(Concentraciones de BAP mg*l-1)	No	Especie	Tratamiento	(Concentraciones de BAP mg*l-1)	No	Especie	Tratamiento	(Concentraciones de BAP mg*l-1)
1	<i>Polylepis incana</i>	1	0.23	1	<i>Polylepis bessereri</i>	1	0.23	1	<i>Polylepis tomentella</i>	1	0.23
2	<i>Polylepis incana</i>	1	0.23	2	<i>Polylepis bessereri</i>	1	0.23	2	<i>Polylepis tomentella</i>	1	0.23
3	<i>Polylepis incana</i>	1	0.23	3	<i>Polylepis bessereri</i>	1	0.23	3	<i>Polylepis tomentella</i>	1	0.23
4	<i>Polylepis incana</i>	1	0.23	4	<i>Polylepis bessereri</i>	1	0.23	4	<i>Polylepis tomentella</i>	1	0.23
5	<i>Polylepis incana</i>	1	0.23	5	<i>Polylepis bessereri</i>	1	0.23	5	<i>Polylepis tomentella</i>	1	0.23
6	<i>Polylepis incana</i>	1	0.23	6	<i>Polylepis bessereri</i>	1	0.23	6	<i>Polylepis tomentella</i>	1	0.23
7	<i>Polylepis incana</i>	1	0.23	7	<i>Polylepis bessereri</i>	1	0.23	7	<i>Polylepis tomentella</i>	1	0.23
8	<i>Polylepis incana</i>	1	0.23	8	<i>Polylepis bessereri</i>	1	0.23	8	<i>Polylepis tomentella</i>	1	0.23
9	<i>Polylepis incana</i>	1	0.23	9	<i>Polylepis bessereri</i>	1	0.23	9	<i>Polylepis tomentella</i>	1	0.23
10	<i>Polylepis incana</i>	1	0.23	10	<i>Polylepis bessereri</i>	1	0.23	10	<i>Polylepis tomentella</i>	1	0.23
1	<i>Polylepis incana</i>	2	0.3	1	<i>Polylepis bessereri</i>	2	0.3	1	<i>Polylepis tomentella</i>	2	0.3
2	<i>Polylepis incana</i>	2	0.3	2	<i>Polylepis bessereri</i>	2	0.3	2	<i>Polylepis tomentella</i>	2	0.3
3	<i>Polylepis incana</i>	2	0.3	3	<i>Polylepis bessereri</i>	2	0.3	3	<i>Polylepis tomentella</i>	2	0.3
4	<i>Polylepis incana</i>	2	0.3	4	<i>Polylepis bessereri</i>	2	0.3	4	<i>Polylepis tomentella</i>	2	0.3
5	<i>Polylepis incana</i>	2	0.3	5	<i>Polylepis bessereri</i>	2	0.3	5	<i>Polylepis tomentella</i>	2	0.3
6	<i>Polylepis incana</i>	2	0.3	6	<i>Polylepis bessereri</i>	2	0.3	6	<i>Polylepis tomentella</i>	2	0.3
7	<i>Polylepis incana</i>	2	0.3	7	<i>Polylepis bessereri</i>	2	0.3	7	<i>Polylepis tomentella</i>	2	0.3
8	<i>Polylepis incana</i>	2	0.3	8	<i>Polylepis bessereri</i>	2	0.3	8	<i>Polylepis tomentella</i>	2	0.3
9	<i>Polylepis incana</i>	2	0.3	9	<i>Polylepis bessereri</i>	2	0.3	9	<i>Polylepis tomentella</i>	2	0.3
10	<i>Polylepis incana</i>	2	0.3	10	<i>Polylepis bessereri</i>	2	0.3	10	<i>Polylepis tomentella</i>	2	0.3
1	<i>Polylepis incana</i>	3	0.4	1	<i>Polylepis bessereri</i>	3	0.4	1	<i>Polylepis tomentella</i>	3	0.4
2	<i>Polylepis incana</i>	3	0.4	2	<i>Polylepis bessereri</i>	3	0.4	2	<i>Polylepis tomentella</i>	3	0.4
3	<i>Polylepis incana</i>	3	0.4	3	<i>Polylepis bessereri</i>	3	0.4	3	<i>Polylepis tomentella</i>	3	0.4
4	<i>Polylepis incana</i>	3	0.4	4	<i>Polylepis bessereri</i>	3	0.4	4	<i>Polylepis tomentella</i>	3	0.4
5	<i>Polylepis incana</i>	3	0.4	5	<i>Polylepis bessereri</i>	3	0.4	5	<i>Polylepis tomentella</i>	3	0.4
6	<i>Polylepis incana</i>	3	0.4	6	<i>Polylepis bessereri</i>	3	0.4	6	<i>Polylepis tomentella</i>	3	0.4
7	<i>Polylepis incana</i>	3	0.4	7	<i>Polylepis bessereri</i>	3	0.4	7	<i>Polylepis tomentella</i>	3	0.4
8	<i>Polylepis incana</i>	3	0.4	8	<i>Polylepis bessereri</i>	3	0.4	8	<i>Polylepis tomentella</i>	3	0.4
9	<i>Polylepis incana</i>	3	0.4	9	<i>Polylepis bessereri</i>	3	0.4	9	<i>Polylepis tomentella</i>	3	0.4
10	<i>Polylepis incana</i>	3	0.4	10	<i>Polylepis bessereri</i>	3	0.4	10	<i>Polylepis tomentella</i>	3	0.4

Anexo 2. Descripción de niveles de AIB en las tres especies de keñua

No	Especie	Tratamiento	(Concentraciones de AIB mg*l-1)	No	Especie	Tratamiento	(Concentraciones de AIB mg*l-1)	No	Especie	Tratamiento	(Concentraciones de AIB mg*l-1)
1	<i>Polylepis incana</i>	1	0.5	1	<i>Polylepis besseri</i>	1	0.5	1	<i>Polylepis tomentella</i>	1	0.5
2	<i>Polylepis incana</i>	1	0.5	2	<i>Polylepis besseri</i>	1	0.5	2	<i>Polylepis tomentella</i>	1	0.5
3	<i>Polylepis incana</i>	1	0.5	3	<i>Polylepis besseri</i>	1	0.5	3	<i>Polylepis tomentella</i>	1	0.5
4	<i>Polylepis incana</i>	1	0.5	4	<i>Polylepis besseri</i>	1	0.5	4	<i>Polylepis tomentella</i>	1	0.5
5	<i>Polylepis incana</i>	1	0.5	5	<i>Polylepis besseri</i>	1	0.5	5	<i>Polylepis tomentella</i>	1	0.5
6	<i>Polylepis incana</i>	1	0.5	6	<i>Polylepis besseri</i>	1	0.5	6	<i>Polylepis tomentella</i>	1	0.5
7	<i>Polylepis incana</i>	1	0.5	7	<i>Polylepis besseri</i>	1	0.5	7	<i>Polylepis tomentella</i>	1	0.5
8	<i>Polylepis incana</i>	1	0.5	8	<i>Polylepis besseri</i>	1	0.5	8	<i>Polylepis tomentella</i>	1	0.5
9	<i>Polylepis incana</i>	1	0.5	9	<i>Polylepis besseri</i>	1	0.5	9	<i>Polylepis tomentella</i>	1	0.5
10	<i>Polylepis incana</i>	1	0.5	10	<i>Polylepis besseri</i>	1	0.5	10	<i>Polylepis tomentella</i>	1	0.5
1	<i>Polylepis incana</i>	2	0.1	1	<i>Polylepis besseri</i>	2	0.1	1	<i>Polylepis tomentella</i>	2	0.1
2	<i>Polylepis incana</i>	2	0.2	2	<i>Polylepis besseri</i>	2	0.2	2	<i>Polylepis tomentella</i>	2	0.2
3	<i>Polylepis incana</i>	2	0.3	3	<i>Polylepis besseri</i>	2	0.3	3	<i>Polylepis tomentella</i>	2	0.3
4	<i>Polylepis incana</i>	2	0.4	4	<i>Polylepis besseri</i>	2	0.4	4	<i>Polylepis tomentella</i>	2	0.4
5	<i>Polylepis incana</i>	2	0.5	5	<i>Polylepis besseri</i>	2	0.5	5	<i>Polylepis tomentella</i>	2	0.5
6	<i>Polylepis incana</i>	2	0.6	6	<i>Polylepis besseri</i>	2	0.6	6	<i>Polylepis tomentella</i>	2	0.6
7	<i>Polylepis incana</i>	2	0.7	7	<i>Polylepis besseri</i>	2	0.7	7	<i>Polylepis tomentella</i>	2	0.7
8	<i>Polylepis incana</i>	2	0.8	8	<i>Polylepis besseri</i>	2	0.8	8	<i>Polylepis tomentella</i>	2	0.8
9	<i>Polylepis incana</i>	2	0.9	9	<i>Polylepis besseri</i>	2	0.9	9	<i>Polylepis tomentella</i>	2	0.9
10	<i>Polylepis incana</i>	2	0.10	10	<i>Polylepis besseri</i>	2	0.10	10	<i>Polylepis tomentella</i>	2	0.10
1	<i>Polylepis incana</i>	3	0.15	1	<i>Polylepis besseri</i>	3	0.15	1	<i>Polylepis tomentella</i>	3	0.15
2	<i>Polylepis incana</i>	3	0.15	2	<i>Polylepis besseri</i>	3	0.15	2	<i>Polylepis tomentella</i>	3	0.15
3	<i>Polylepis incana</i>	3	0.15	3	<i>Polylepis besseri</i>	3	0.15	3	<i>Polylepis tomentella</i>	3	0.15
4	<i>Polylepis incana</i>	3	0.15	4	<i>Polylepis besseri</i>	3	0.15	4	<i>Polylepis tomentella</i>	3	0.15
5	<i>Polylepis incana</i>	3	0.15	5	<i>Polylepis besseri</i>	3	0.15	5	<i>Polylepis tomentella</i>	3	0.15
6	<i>Polylepis incana</i>	3	0.15	6	<i>Polylepis besseri</i>	3	0.15	6	<i>Polylepis tomentella</i>	3	0.15
7	<i>Polylepis incana</i>	3	0.15	7	<i>Polylepis besseri</i>	3	0.15	7	<i>Polylepis tomentella</i>	3	0.15
8	<i>Polylepis incana</i>	3	0.15	8	<i>Polylepis besseri</i>	3	0.15	8	<i>Polylepis tomentella</i>	3	0.15
9	<i>Polylepis incana</i>	3	0.15	9	<i>Polylepis besseri</i>	3	0.15	9	<i>Polylepis tomentella</i>	3	0.15
10	<i>Polylepis incana</i>	3	0.15	10	<i>Polylepis besseri</i>	3	0.15	10	<i>Polylepis tomentella</i>	3	0.15

Anexo 3. Promedio de las variables de respuesta en la fase de multiplicación de las tres especies de Keñua (*Polylepis tomentella* ssp. *nana*, *Polylepis incana*, *Polylepis besseri*).

U n i d a d e s	Especies de keñua	Concentraciones de bencil aminopurina	Número de hojas			Altura de brote			Porcentaje de oxidación			Porcentaje de necrosis		
			Semana de evaluación			Semana de evaluación			Semana de evaluación			Semana de evaluación		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	<i>Polylepis tomentella</i>	0.23	16	27	37	9	12	24	5	10	17	7	7	15
2	<i>Polylepis tomentella</i>	0.3	12	25	47	5	9	24	5	7	12	1	2	7
3	<i>Polylepis tomentella</i>	0.4	11	27	45	7	13	27	2	5	19	1	2.1	12
4	<i>Polylepis incana</i>	0.23	9	15	33	6	10	20	2	5	7	1	2	5
5	<i>Polylepis incana</i>	0.3	10	21	57	7	15	27	4	9	15	1	3	5
6	<i>Polylepis incana</i>	0.4	7	12	21	6	9	15	12	32	45	6	15	32
7	<i>Polylepis besseri</i>	0.23	6	12	24	5	8	18	1	1	7	0.2	1	3
8	<i>Polylepis besseri</i>	0.3	6	9	21	5	10	14	1	3	7	0.5	1	4
9	<i>Polylepis besseri</i>	0.4	6	9	11	4	7	9	9	12	22	6	8	16
10	<i>Polylepis tomentella</i>	0.23	12	22	37	7	15	24	2	5	8	1	3	5
11	<i>Polylepis tomentella</i>	0.3	17	38	62	10	16	24	4	7	10	1	3	5
12	<i>Polylepis tomentella</i>	0.4	15	32	60	12	18	30	1	3	5	0.5	2.1	2
13	<i>Polylepis incana</i>	0.23	16	35	50	8	12	27	5	8	12	1.2	3	5
14	<i>Polylepis incana</i>	0.3	20	42	48	14	21	28	2	5	25	1	3	11
15	<i>Polylepis incana</i>	0.4	6	10	18	4	6	11	6	15	27	2	2	15
16	<i>Polylepis besseri</i>	0.23	6	12	21	4	7	15	1	0	1	0.5	1	0.2
17	<i>Polylepis besseri</i>	0.3	12	23	47	9	15	27	4	7	10	1	3	5
18	<i>Polylepis besseri</i>	0.4	6	9	14	4	8	9	7	15	32	4	7	12
19	<i>Polylepis tomentella</i>	0.23	17	33	45	12	21	32	2	5	2	1	2	1
20	<i>Polylepis tomentella</i>	0.3	21	45	60	14	27	35	5	15	17	3	10	12
21	<i>Polylepis tomentella</i>	0.4	19	30	67	12	17	27	6	15	7	4	10	4
22	<i>Polylepis incana</i>	0.23	12	21	73	8	14	27	1	2	5	0.5	1	1
23	<i>Polylepis incana</i>	0.3	6	11	21	4,5	11	12	3	8	15	1.5	5	9
24	<i>Polylepis incana</i>	0.4	6	9	12	4	7	9.4	1,2	15	22	0.7	11	14
25	<i>Polylepis besseri</i>	0.23	9	15	33	6	12	24	1	2	7	0.3	0.7	5
26	<i>Polylepis besseri</i>	0.3	6	9	18	4	7	12	1	2	7	0.3	1	4
27	<i>Polylepis besseri</i>	0.4	3	6	11	4	6	9	0.7	2	21	0.2	1	14
28	<i>Polylepis tomentella</i>	0.23	15	31	85	12	18	32	4	10	12	1.2	4.7	9
29	<i>Polylepis tomentella</i>	0.3	21	57	65	15	27	28	4	7	17	2.6	4	11
30	<i>Polylepis tomentella</i>	0.4	19	32	47	11	20	26	4.6	7.8	11	1.9	3.4	5
31	<i>Polylepis incana</i>	0.23	23	42	90	14	24	32	3	7	11	1.6	5	4
32	<i>Polylepis incana</i>	0.3	6	12	18	4	7	15	1	3	7	0.6	1.4	4.5
33	<i>Polylepis incana</i>	0.4	3	6	15	3	5	9	4	9	17	2.6	5	9
34	<i>Polylepis besseri</i>	0.23	6	9	15	4	7	11	2	5	9	1.5	2	3
35	<i>Polylepis besseri</i>	0.3	6	12	24	4	10	12	4	10	21	1.9	5	9
36	<i>Polylepis besseri</i>	0.4	12	21	31	8	16	22	3	6	9	1.7	4	5
37	<i>Polylepis tomentella</i>	0.23	21	55	48	16	25	25	2	6	8	1.2	3.8	5
38	<i>Polylepis tomentella</i>	0.3	24	57	67	17	26	32	2	8	10	1.1	3.1	7
39	<i>Polylepis tomentella</i>	0.4	17	35	57	12	21	24	3	5	8	1.9	3	3.1
40	<i>Polylepis incana</i>	0.23	9	15	24	7	16	20	11	24	27	5.2	9	7
41	<i>Polylepis incana</i>	0.3	11	35	87	8	20	29	2	5	7	0.4	3	5
42	<i>Polylepis incana</i>	0.4	11	20	37	7	17	17	14	22	27	5	12	11
43	<i>Polylepis besseri</i>	0.23	15	27	55	16	24	27	6	9	11	2.6	5	3
44	<i>Polylepis besseri</i>	0.3	6	9	15	4	6	9	3	5	8	1.9	2	5
45	<i>Polylepis besseri</i>	0.4	6	11	17	4	9	11	4	6	9	2.9	5	3

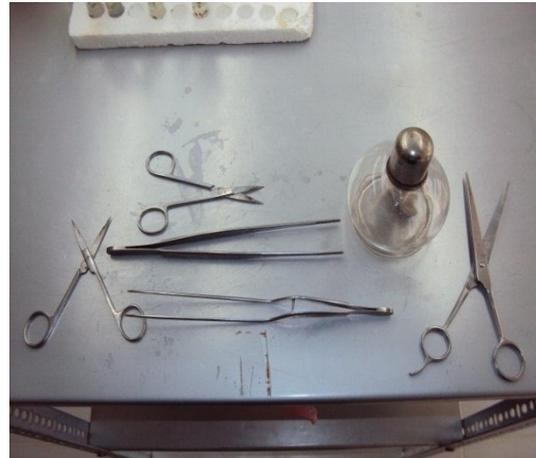
Anexo 5. Equipos y materiales de laboratorio usados para cultivos *in vitro***Foto 1.** Autoclave**Foto 2.** Cámara de flujo laminar**Foto 3.** Sala de crecimiento**Foto 4.** Tijeras, pinzas bayonetas y mechero**Foto 9.** Papel filtro, papel aluminio y biofilm**Foto 10.** Envases de vidrio con agua destilada



Foto 11. (alcohol al 70%, NaClO al 2%)



Foto 12. Balanza analítica

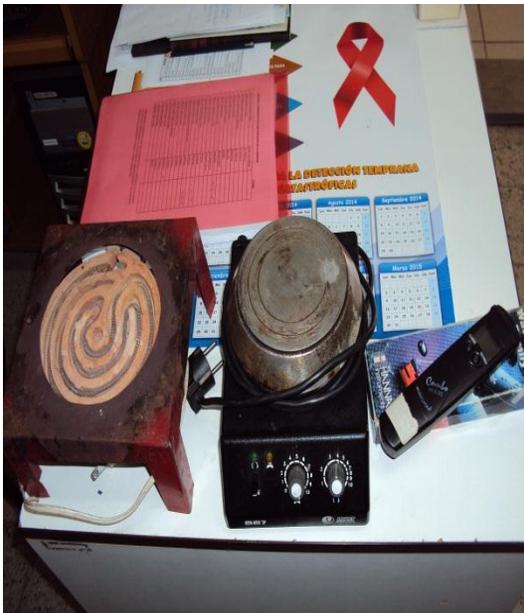


Foto 13. Hornilla eléctrica, agitador magnético, Medidor de Ph



Foto 14. Probetas, vasos precipitados, tubos de ensayo y cajas petri

Anexo 6. Composición de medios basales: Chu et al (1975), TL (Tremblay y Lalonde, 1984) y WPM (Mc Cown % Lloyd, 1980) para las fases de establecimiento, multiplicación y enraizamiento.

Componentes	Componentes de los medios de cultivo en (mg/L)		
	Chu <i>et al.</i> , (1975)	TL (1984)	WPM (1980)
Macroelementos			
KNO ₃	2830	1900	-----
KH ₂ PO ₄	400	170	170
CaCl ₂ .2H ₂ O	166	440	96
MgSO ₄ .7H ₂ O	185	370	370
NH ₄ NO ₃	-----	1650	400
NH ₄ SO ₄	463	-----	-----
Microelementos			
FESO ₄ .7H ₂ O	27,80	24,9	27,8
Na ₂ EDTA	37,30	33,3	37,3
KI	0,80	0,83	-----
H ₃ BO ₃	1,60	6,2	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	4,40	22,3	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,50	8,6	8,6
CuSO ₄ .5H ₂ O	-----	0,025	250*
NaMoO ₄ .2H ₂ O	-----	0,25	250*
CoCl ₂ .6H ₂ O	-----	0,025	
	Kao y Michayluck, (1975)		
Vitaminas			
myo-inositol	100	100	100
HCL-tiamina	3,00	0,1	1,0
HCL-piridoxina	1,50	0,5	0,5
glicina	2,00	2	-----
pantotenato de calcio	1,00	2	-----
biotina	0,01	-----	-----
ácido nicotínico	1,50	0,5	0,5
ácido fólico	0,40	-----	-----
ácido ascórbico	2,01	-----	-----
cloruro de colina	1,00	-----	-----
riboflavina	0,20	-----	-----
sacarosa (g/L)	30	30	40
agar (g/L)	6	6	8
pH	5,7	5,5	5,6

TL = Tremblay y Lalonde, 1984.

WPM = Mc Cown y Lloyd, 1980.

* = µg/L

Anexo 7. Reactivos usados para la preparación de los medios basales: Chu et al (1975), TL (Tremblay y Lalonde, 1984) y WPM (Mc Cown % Lloyd, 1980) en las fases de establecimiento, multiplicación y enraizamiento.



Foto 1. Reactivos para preparar medios de cultivo



Foto 2. Solución A (KNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NH_4NO_3)



Foto 3. Solución B (KI , H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)



Foto 4. Solución D ($\text{FESO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2EDTA)



Foto 5. Solucion E (Myo-inositol, tiamina, piridoxina, Glicina, Pantotenato de calcio, biotina, acido nicotinico)

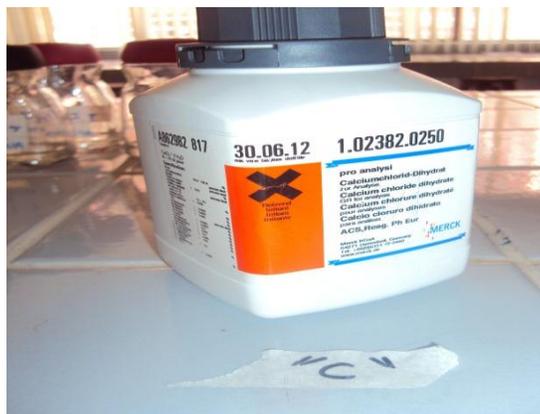


Foto 6. Solucion C ($\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

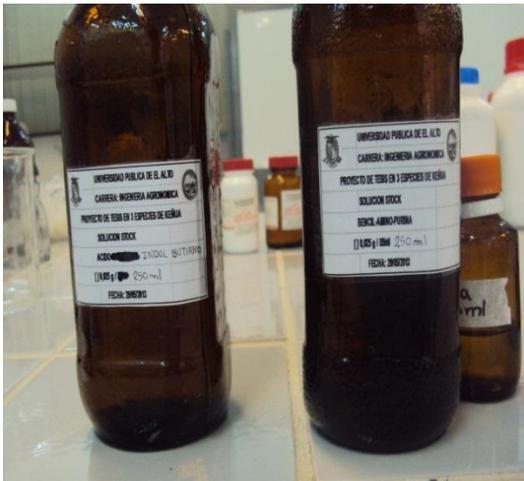


Foto 7. Solución stock de bencil aminopurina y ácido indolbutírico



Foto 8. Medios basales Chu *et al.*, 1975



Foto 9. Medios basales Tremblay y Lalonde, 1984



Foto 10. Medios basales Mc Cown y Lloyd, 1980

Anexo 8. Preparación de los medios cultivos para la fase de establecimiento



Foto 1. Agitador magnético, hornilla eléctrica, balanza, medidor de pH, vaso precipitado, tubos de ensayo, medios basales, agar agar, azúcar.



Foto 2. Extracción de alícuotas de los medios basales



Foto 3. Dilución de los medios basales en el agitador magnético

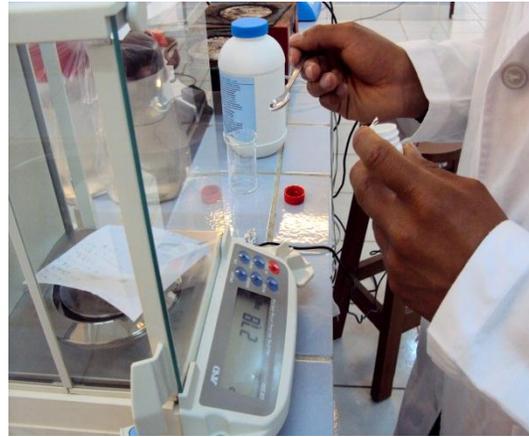


Foto 4. Pesado del agar agar



Foto 5. Dilución del agar agar en el agitador magnético



Foto 6. Mezcla del agar agar diluido con el medio basal



Foto 7. Llenado con 5ml de medio de cultivo y sellado con papel aluminio los tubos de ensayo



Foto 8. Esterilización de tubos de ensayo con medio cultivo, cajas petri, pinzas bayonetas.

Anexo 9. Recolección del material vegetal de keñua *Polylepis tomentella* spp. nana y *Polylepis besseri* del Jardín Botánico del Campus Universitario en Cota Cota de la Universidad Mayor de San Andrés.



Foto 1. *Polylepis tomentella* ssp. Nana
(Planta fuente del material vegetal)

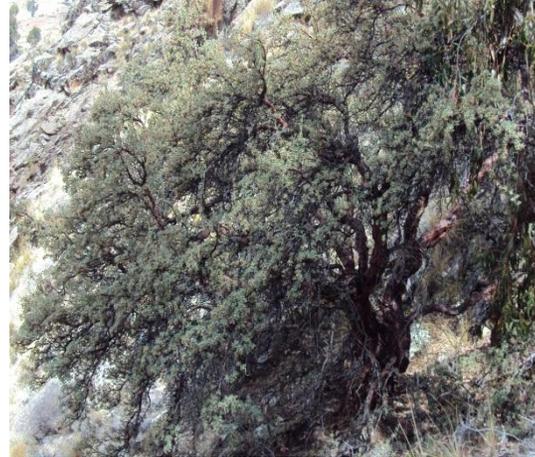


Foto 2. *Polylepis besseri*
(Planta fuente del material vegetal)

Anexo 10. Recolección del material vegetal de keñua (*Polylepis incana*) del vivero forestal en el centro experimental en kallutaca de la carrera de ingeniería Agronómica de Universidad Pública de El Alto.



Foto 1. *Polylepis incana*
(Planta fuente del material vegetal)



Foto 2. *Polylepis incana*
(Corte de ramas de 15cm de longitud, conteniendo entre 3 a 5 yemas apicales y/o terminales)

Anexo 11. Fase de establecimiento de las tres especies de keñua (*Polylepis tomentella* ssp. *nana*, *Polylepis incana*, *Polylepis besser*).



Foto 1. Desinfección de la mano y antebrazo con al 70% antes de empezar la introducción *in vitro*



Foto 2. Flameado con mechero los materiales metálicos (pinza bayoneta, hoja de visturi)

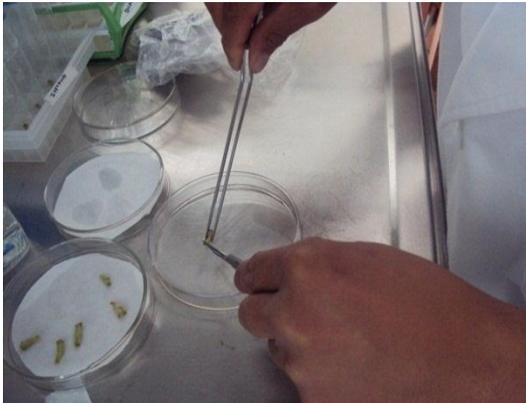


Foto 3. Corte con del material vegetal con bisturí desinfectado con alcohol 70% y Na ClO 2%



Foto 4. Introducción del material vegetal dentro del tubo de ensayo cerca del mechero de alcohol



Foto 5. Material vegetal dentro de tubo de ensayo y sellado herméticamente con papel aluminio y biofilm para evitar el ingreso de patógenos



Foto 6. *Polylepis incana* en condiciones *in vitro* dentro de la sala de crecimiento



Foto 7. *Polylepis tomentella* en condiciones *in vitro* dentro de la sala de crecimiento



Foto 8. *Polylepis besseri* en condiciones *in vitro* dentro de la sala de crecimiento

Anexo 12. Fase de multiplicación de las tres especies de keñua (*Polylepis tomentella* spp *nana*, *Polylepis incana*, *Polylepis besseri*).



Foto 1. Frascos de vidrio con medio de cultivo TL mechero, pinza bayoneta, tijera, explantes de keñua, papel aluminio, biofilm



Foto 2. Cortes del material vegetal necrosado de keñua con tijera para introducir en el medio de cultivo TL



Foto 3. Vitroplantas de keñua en medio basal TL (1984) con diferentes niveles de BAP



Foto 4. *Polylepis tomentella* en medio basal TL (1984) con 0,3 mg*l⁻¹ de BAP



Foto 5. *Polylepis tomentella* en medio basal TL (1984) con $0,23 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP



Foto 6. *Polylepis tomentella* en medio basal TL (1984) con $0,4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP



Foto 7. *Polylepis besseri* en medio basal TL (1984) con $0.3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP



Foto 8. *Polylepis besseri* en medio basal TL (1984) con $0.4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP



Foto 9. *Polylepis besseri* en medio basal TL (1984) con $0.23 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP



Fotos 10. *Polylepis incana* en medio basal TL (1984) con $0.23 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP



Foto 11. *Polylepis incana* en medio basal TL (1984) con $0.3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP



Foto 12 *Polylepis incana* en medio basal TL (1984) con $0.4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP

Anexo 13. Fase de enraizamiento de las tres especies de keñua (*Polylepis tormentella*, *Polylepis incana*, *Polylepis besseri*).



Foto 1. Frascos con medio basal WPM (1980), mechero, pinza bayoneta, tijera



Foto 2. Vitroplantas de keñua en medio basal WPM (1980) dentro la sala de crecimiento



Foto 3. *Polylepis besseri* en medio basal WPM, (1980) con $0.15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB



Foto 4. Raíces de *Polylepis besseri* en medio basal WPM (1980) con $0.15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB



Foto 5. *Polylepis besseri* en medio basal WPM (1980) con $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB



Foto 6. Raíces de *Polylepis besseri* en medio basal WPM (1980) con $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB



Foto 7. *Polylepis tomentella* en medio basal WPM (1980) con $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB



Foto 8. Raíces de *Polylepis tomentella* en medio basal WPM (1980) con $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB



Foto 9. *Polylepis tomentella* en medio basal WPM (1980) con $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB



Foto 10. Raíces de *Polylepis tomentella* en medio basal WPM (1980) con $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB



Foto 11. *Polylepis tomentella* en medio basal WPM (1980) con $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB



Foto 12. Raíces de *Polylepis tomentella* en medio basal WPM (1980) con $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB



Foto 13. *Polylepis tomentella* en medio basal WPM (1980) con $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB



Foto 14. Raíces de *Polylepis tomentella* en medio basal WPM (1980) con $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB

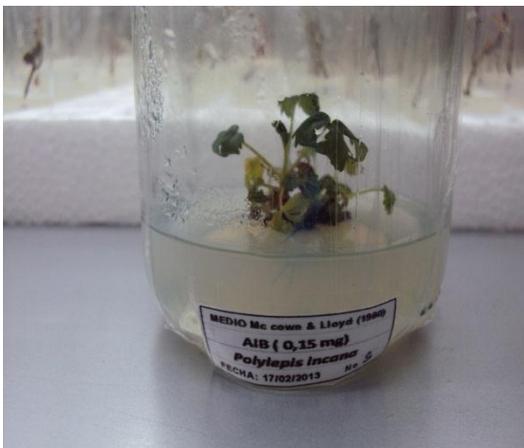


Foto 15. *Polylepis incana* en medio basal WPM (1980) con $0.15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB



Foto 16. Raíces de *Polylepis incana* en medio basal WPM (1980) con $0.15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AIB