

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



T E S I S

MICRO PROPAGACIÓN *in vitro* del kiwi (*Actinidia chinensis*)

Para optar el Título Profesional de:

INGENIERO AGRÓNOMO

Presentado por el Bachiller:

MARÍA ESTHER BECERRA HUAMÁN

Asesores:

Dr. BERARDO ESCALANTE ZUMAETA

Ing. MANUEL MALPICA RODRÍGUEZ

CAJAMARCA, PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
Norte de la Universidad Peruana
Fundada por Ley 14015 del 13 de febrero de 1962
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
Secretaría Académica



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

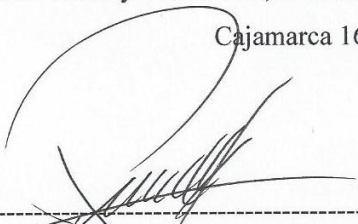
En Cajamarca, a los dieciséis días del mes de julio del Año dos mil diecinueve, se reunieron en el ambiente 2A – 201 de la Facultad de Ciencias Agrarias, los integrantes del Jurado designados por el Consejo de Facultad de Ciencias Agrarias, según Resolución de Consejo de Facultad N° 71 -2019-FCA-UNC, Fecha 12 de Abril del 2019, con el objeto de Evaluar la sustentación del Trabajo de Tesis titulado: “**MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DEL KIWI (*Actinidia chinensis*)**” de la Bachiller: **MARÍA ESTHER BECERRA HUAMÁN** en Cajamarca, para optar el Título Profesional de **INGENIERO AGRÓNOMO**.

A las 6 horas y 10 minutos y de acuerdo a lo estipulado en el Reglamento respectivo, el Presidente del Jurado dio por iniciado el acto. Después de la exposición del trabajo de Tesis, la formulación de preguntas y de la deliberación del Jurado, el Presidente anunció la aprobación por unanimidad con el calificativo de dieciséis (16)

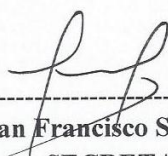
Por lo tanto, el graduando queda expedito para que se le expida el **Título Profesional** correspondiente.

A las 7 horas y 40 minutos, el Presidente del Jurado dio por concluido el acto.

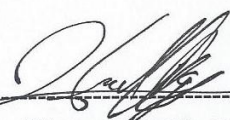
Cajamarca 16 de julio de 2019.



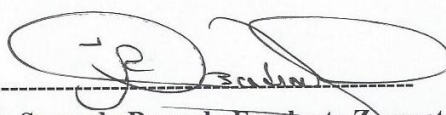
Dr. Manuel Salomón Roncal Ordóñez
PRESIDENTE




Dr. Juan Francisco Seminario Cunya
SECRETARIO



Ing. M.Sc. Víctor Eudelfio Torrel Pajares
VOCAL



Dr. Segundo Berardo Escalante Zumaeta
ASESOR



Ing. M.Sc. Manuel Malpica Rodríguez
ASESOR

DEDICATORIA

A mis padres Salomón Becerra Mendoza y Elvira Huamán Bazán, quienes con su cariño y dedicación me enseñaron las cosas más hermosas de la vida, por su apoyo incondicional, su esfuerzo y sacrificio hicieron de mí una profesional.

A mí querida hija Halelí Catalina y mi esposo Walter que son mi motor y motivo.

A mis hermanos Sonia, Carmen, Alicia y Manuel que de una u otra forma me brindaron su constante apoyo para cumplir mis logros profesionales.

EL AUTOR

AGRADECIMIENTO

Dejo expresado mi más sincero agradecimiento a:

Al Ingeniero Berardo Escalante Zumaeta, asesor de la presente tesis, por sus enseñanzas, orientación y apoyo.

Al Ingeniero Manuel Malpica Rodríguez, por su ayuda desinteresada en la conducción de dicho experimento.

Al Ingeniero Carlos Tirado Soto, por su apoyo incondicional.

A mis amigos, compañeros y a todos quienes de una u otra forma contribuyeron en mi formación profesional.

A la Universidad Nacional de Cajamarca (UNC), Facultad de Ciencias Agrarias por brindarme la facilidad del uso del Laboratorio de Biotecnología Vegetal para llevar a cabo el trabajo de investigación.

A la doctora Antonietta Ornella, por su apoyo incondicional y orientación.

EL AUTOR

INDICE

PÁGINA

| | |
|---|-----|
| DEDICATORIA | iii |
| AGRADECIMIENTO | iv |
| ÍNDICE | v |
| RESUMEN | vi |
| ABSTRACT..... | vii |
| | |
| CAPITULO | |
| | |
| I.- INTRODUCCIÓN | 1 |
| II.- REVISIÓN DE LITERATURA | 2 |
| III.- MATERIALES Y MÉTODOS | 19 |
| IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 29 |
| V.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 52 |
| VI.- BIBLIOGRAFIA | 53 |
| | |
| ANEXOS | 59 |

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo realizar la micro propagación *in vitro* del kiwi (*Actinidia chinensis*), y arrojó los siguientes resultados: En la fase de introducción del material experimental (semilla botánica) al sistema *in vitro* se ha obtenido el 89% de germinación en medio Murashige & Skoog (1962), complementado con 2 ppm BAP y 0.5 ppm ANA. En la fase de establecimiento *in vitro*, las plántulas con la mayor longitud promedio de eje caulinar (6.28 cm) fueron obtenidas con 0.8 ppm KIN; así mismo, el mayor número promedio de brotes por plántula (1.41) fue obtenido con 0.4 ppm KIN, mientras que los mayores números promedio de hojas (2.78) y yemas (2.93) se obtuvieron con las combinaciones de 0.4 ppm KIN y 8 ppm BAP. La combinación de KIN y BAP que mejor estimuló la rizogénesis *in vitro* del kiwi (2.78 raíces adventicias de primer orden por planta) estuvo formada por 0.4 ppm KIN y 4 ppm BAP. El aumento de las dosis de AG₃, de 0 a 0.2 y 0.4 ppm, incrementó el número promedio de raíces adventicias de primer orden de 5.18 a 5.61 y 6.41 raíces por planta, respectivamente. Contrariamente, en ausencia de AG₃, la longitud promedio de raíces adventicias de primer orden por planta, se optimizó y alcanzó un valor de 7.7 cm con 0.1 ppm de ANA.

Palabras claves: Micro propagación, *Actinidia chinensis* L., KIN, BAP, AG₃, ANA, raíces adventicias.

ABSTRACT

The objective of this research was to perform the *in vitro* micro propagation of kiwi (*Actinidia chinensis*), and yielded the following results: In the phase of introduction of the experimental material (botanical seed) to the *in vitro* system, 89% of germination in Murashige & Skoog medium (1962), supplemented with 2 ppm BAP and 0.5 ppm ANA was obtained. In the *in vitro* establishment phase, seedlings with the highest average length of caulin axis (6.28 cm) were obtained with 0.8 ppm KIN. Likewise, the highest average number of shoots per seedling (1.41) was obtained with 0.4 ppm KIN, while the highest average numbers of leaves (2.78) and buds (2.93) were obtained with the combinations of 0.4 ppm KIN and 8 ppm BAP. The combination of KIN and BAP that best stimulated the *in vitro* rhizogenesis of kiwi (2.78 first-order adventitious roots per plant) consisted of 0.4 ppm KIN and 4 ppm BAP. The increase in AG₃ doses, from 0 to 0.2 and 0.4 ppm, increased the average number of first-order adventitious roots from 5.18 to 5.61 and 6.41 roots per plant, respectively. On the contrary, in the absence of AG₃, the average length of first-order adventitious roots per plant was optimized and reached a value of 7.7 cm with 0.1 ppm of ANA.

Key words: Micro propagation, *Actinidia chinensis* L., KIN, BAP, AG₃, ANA, adventitious roots.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

El kiwi es una planta trepadora originaria de las montañas de China, fue llevada a Inglaterra donde crece libremente, en Francia fue introducido en 1903 como curiosidad científica, en 1906 en nueva Zelandia se inició el proceso de selección y la comercialización en las décadas de los 40 (Madiec y Sapin 1981, citado por Garcia, G. 2006).

Nuestro país (Perú), a pesar de no aparecer en la estadística de producción mundial, tiene las condiciones edafo – climáticas que satisfacen las exigencias agronómicas del kiwi. Por lo tanto, es responsabilidad de las entidades públicas y privadas dedicadas a la investigación, cumplir con su función para cerrar la brecha productiva que los países antes citados han establecido para satisfacer la demanda mundial de esta fruta. Sin embargo, una de las principales limitantes es la disponibilidad de plantones de calidad, a precios razonables. Frente a ello, debe considerarse la posibilidad de uso de la micro propagación *in vitro* para acelerar la disponibilidad de plantas con características genéticas estables y de garantizada calidad sanitaria. A diferencia de las técnicas tradicionales de cultivo, esta poderosa tecnología, permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo y espacios reducidos.

Considerando que Perú es un país importador de frutos de kiwi (55 000 Tm/año) y que la Universidad Nacional de Cajamarca dispone del recurso humano y de una adecuada infraestructura para la investigación en aspectos relacionados con la biotecnología, se propuso el desarrollo de la presente investigación con el **objetivo** de realizar la micro propagación *in vitro* del kiwi (*Actinidia chinensis*).

CAPITULO II

REVISION DE LITERATURA

2.1. Origen, distribución geográfica y requerimientos edafo – climáticos del Kiwi.

El centro de origen y evolución del género *Actinidia* se sitúa en las montañas y colinas del suroeste de China, crece silvestre produciendo frutos pequeños. Del genero abarca desde los trópicos (latitud 0°) hasta las regiones templado – frías (50° N). Todas son originarias de China, a excepción de 4 especies nativas de países Vietnam, Nepal y Japón. Riqueza genética del género, son herramientas potenciales para mejorar el cultivo y la industria mundial del kiwi. El testimonio más antiguo del kiwi se remonta al año 1200 d.c, en la dinastía de Ming y, la primera reseña de uso medicinal a 300 años a.c. en 1928 el científico y horticultor Hayward Wright obtuvo mediante cruzamientos un nuevo kiwi conocido como ahora el cultivar “Hayward” (García 2015).

Kiwi se desarrolla con temperaturas de 30 a 45°C, cuente con riego adecuado. Temperaturas altas de 40 a 45°C retiene su crecimiento. La humedad relativa cercana al 40% se tiende a detener su crecimiento, requiere de suelos fértiles de textura media, profundos sobre 1.2 m, bien drenados, sin estratificaciones ni compactaciones, con pH 5.8 a 7.2 y bajo contenido de sales, pH sobre 7.3, traen como consecuencia problemas nutricionales, planta susceptible a la pudrición de la corona y la raíz (Aquino 1988).

2.2. Descripción botánica

El kiwi es una planta trepadora, cuyos órganos muestran las siguientes características:

a. Hojas: alternas, simples, largas redondas y caducas, con seno peciolar pronunciado y abierto; tienen un diámetro transversal de 15 y 20 cm. El ápice es agudo y el borde dentado, verde opaco oscuro en el haz, más claro en el envés, áspera al tacto, coriácea, con nervaduras marcadas y presencia de vellosidades. El pecíolo es medianamente largo y rojizo (García 1975).

- b. Flores:** son hermafroditas pues en todas se aprecian ovarios y estambres, pues hay plantas masculinas y femeninas. Las flores se hallan sobre pedicelos generalmente largos, tienen 5 sépalos y de 4 a 8 pétalos blancos cremosos. Las femeninas alcanzan 5 a 7 cm de diámetro, siendo menores las masculinas. El ovario es súpero, plurilocular y de simetría radial. Las flores aparecen en las axilas de la 2^a a la 8^a hoja del brote mixto, y pueden ser solitarias o agrupadas (García 1975).
- c. Fruto:** el fruto es una baya que cuelga de un pedicelo largo y pardo. Es de forma ovoidal, elíptico o alargado. Tiene de 6 a 7 cm de diámetro longitudinal y 4 cm de diámetro transversal. Por fuera tiene una coloración verdosa. La pulpa es verde esmeralda, y rodea al eje central formado por el conjunto de los bordes carpelares. Es jugoso, blando, dulce acidulado y en conjunto con sabor delicado y agradable. Los sépalos persisten a la madurez del fruto. La parte comestible es el conjunto formado por la pulpa y semillas (Crisosto 1998 y Kader 1999).
- d. Raíz:** las raíces son axonomorfa, carnosas, con gruesa capa de floema; muy ramificadas y con tendencia a desarrollarse preferentemente en el estrato superior del terreno (García 1975).
- e. Tallo:** en las plantas jóvenes, el tallo es una simple guía flexible que a determinada longitud se curva para enroscarse como liana a un tutor. En las plantas adultas se forman troncos que superan los 20-30 cm de diámetro (García 1975).
- f. Brotes:** los brotes nuevos son herbáceos y suculentos, de rápido crecimiento, pudiendo alcanzar de 6 a 8 m de longitud en un año. Las ramas están cubiertas de finos pelos de color verdoso. En determinada fase del crecimiento, el extremo tiende a enroscarse a un tutor, valiéndose de movimientos rotatorios (García 1975).
- g. Yemas:** están situadas en las axilas de las hojas y pueden ser de tres tipos: mixtas, de madera y adventicias. De las yemas mixtas nacen los brotes portadores de los botones florales, mientras que las de madera sólo se

originan no fructíferos. Las adventicias evolucionan cuando se eliminan los brotes no fructíferos o de madera, bien por podas, en cuyo caso los nuevos brotes portaran yemas mixtas que pueden producir brotes fructíferos (García 1975).

Taxonomía

Chev (1984), Liang y Ferguson (1984), coinciden en clasificar al kiwi en los siguientes taxones:

| | |
|-------------------|--------------------------------|
| Familia | : <i>Actinidiaceae</i> |
| Género | : <i>Actinidia</i> |
| Especie | : <i>chinensis</i> |
| Nombre científico | : <i>Actinidia chinensis</i> . |
| Nombre común | : Kiwi |
| Variedad | : Hayward |

2.2. Cultivo *in vitro*

El cultivo de tejidos, como técnica, consiste en aislar una porción de la planta (explanta) y proporcionarle artificialmente las condiciones físico – químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana. Esta técnica es importante no sólo porque es el área de la biotecnología que tiene mayor aplicación práctica en la agricultura, sino por ser una herramienta versátil para el estudio de los problemas básicos y aplicados de la biología de las plantas; constituye, en efecto el puente necesario para realizar manipulaciones genéticas desde el laboratorio hasta el campo (Roca y Mroginski 1991).

Escalante (1989), cita tres ventajas del cultivo de tejidos: (1) permite multiplicar, en corto tiempo, plantas híbridas recientemente seleccionadas; (2) establece el flujo constante de plantas “libres” de patógenos; (3) la micro propagación, puede realizarse todo el año, y puede ser programada para los periodos en que haya mano de obra disponible.

El establecimiento o introducción, consiste en la selección adecuada del explanta y su desinfección para evitar la contaminación por patógenos (bacterias, hongos

y levaduras) que afectan el crecimiento y desarrollo del explanta (Fontúrbel 2002).

Una vez seleccionado el explanta, se procede a la desinfección. Se utilizan distintos desinfectantes de acción superficial, como bactericidas y fungidas de contacto, hipoclorito de sodio o calcio, en disoluciones (Sondahl et al. 1979). La reacción de los ácidos hipoclorosos y el cloro residual con el agua producen la oxidación de los grupos –SH, grupos aminos, hidroxifenol de la tirosina y grupos índoles, lo cual destruye las proteínas y ácidos nucleicos de los microorganismos; sin embargo, también puede provocar la oxidación de los tejidos vegetales (Auccasi 2003; Salisbury & Ross 1992), por lo que estos se aplican en bajas concentraciones y con tiempos de exposición específicos, según las características del tejido y el grado de contaminación. Finalizado este proceso, los explantas son trasladados a una cámara de flujo laminar (con aire filtrado, libre de microorganismos) donde se realiza la transferencia a un medio de cultivo apropiado a la especie (Kyte & Kleyn 1996).

Los explantas pueden ser de distintos tipos, desde porciones de tejido hasta células sueltas, granos de polen, semillas y protoplastos, entre otros. Este dependerá de la especie de interés y los objetivos de su propagación. Para obtener clones de la planta madre o mantener características particulares, se prefiere utilizar tejidos con alta estabilidad genética como meristemos apicales y yemas axilares (Fossard, citado por Fontúrbel 2002).

El medio de cultivo tiene dos funciones principales. La primera es proporcionar los nutrientes básicos para el crecimiento continuado de los explantas aislados y los propágulos subsiguientes; y la segunda, de dirigir el crecimiento y desarrollo mediante un control hormonal determinado por: a) La clase de hormona o regulador del crecimiento; b) La concentración y c) La secuencia en que se proporciona. Las diferentes plantas responden de un modo distinto a las diversas citoquininas y auxinas, en parte debido a su control hormonal natural. Las clases primarias de hormonas son auxinas y citoquininas; pero en situaciones específicas se utilizan las giberelinas y el ácido abscísico (Hartman y Kester 1987).

Los reguladores del crecimiento son compuestos orgánicos, diferentes de los nutrientes que en pequeñas cantidades fomentan, inhiben o modifican de alguna forma cualquier proceso fisiológico vegetal. Actualmente, se consideran cinco grupos reguladores del crecimiento: auxinas, giberelina, citoquininas, retardatorios e inhibidores (Escalante 1989). Cooper (1945) y Vastey (1962), afirman que los fito reguladores tienen especificidad, ya que la aplicación de determinada sustancia, arroja resultados que suelen variar con la especie, la concentración, el medio de cultivo y el método de aplicación.

2.3. Generalidades sobre cultivo *in vitro*:

El fundamento teórico del cultivo *in vitro* es el concepto de la totipotencialidad celular. Al respecto, Schleiden y Schwann (1887) en su teoría celular, sostienen que la célula es capaz de subsistir por si sola si las condiciones externas le son favorables. Morgan (1901) afirma que una célula es capaz de desarrollarse hasta formar un organismo completo si las condiciones ambientales le son favorables y si se le aplican los estímulos adecuados. Haberlandt (1902) con la idea de la totipotencialidad celular desarrolla el primer cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, desafortunadamente sus trabajos fueron inexitosos debido a que utilizó un medio de cultivo relativamente simple y, por otra parte, tejidos vegetales demasiado diferenciados.

White (1932) logró el primer cultivo *in vitro* estable utilizando en sus experimentos ápices de raíces de tomate (*Solanum lycopersicum*). Los tejidos meristemáticos del ápice radical propiciaron crecimiento en longitud en el medio de cultivo, sostiene, además, que la falla en los intentos realizados por varios investigadores entre 1902 y 1932 se debió, a la mala elección del material vegetativo y a la simplicidad de los medios de cultivo utilizados. El logro de White dio impulso al desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro*; sin embargo, en sus trabajos realizados no obtuvo proliferación celular, pues los ápices de raíz solo crecieron en longitud como lo harían normalmente como parte de la raíz de la planta intacta. En 1934, Gautheret logra la proliferación celular *in vitro* en tejidos cambiales provenientes de plantas adultas. En 1939 el mismo Gautheret, Nobecourt (en tejidos de zanahoria) y White (en tejidos de tabaco) publican casi simultáneamente la formación de una masa de células parenquimatosas (callo)

a partir de los explantas (tejidos) utilizados en sus experimentos, este hecho significativo constituye el despegue de las técnicas de cultivo *in vitro*.

Un factor importante en el desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, fue el descubrimiento de los reguladores de crecimiento. Overbeek (1941), observó el efecto de una sustancia presente en el agua de coco que estimulaba la división celular (efecto citocinínico). Cuando el agua de coco se combinó con 2,4-D, tuvo un efecto positivo en el desarrollo de tejidos de zanahoria y papa (Caplin y Steward 1948).

En 1926 dos científicos japoneses (Jokichi Takamine y Kurosawa) descubrieron un compuesto hormonal, actualmente de uso ordinario en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales denominado giberelina el cual es producido por un hongo *Gibberella fujikoro*; este compuesto fue descubierto cuando ellos estudiaban la causa de la pudrición en plántulas de arroz. El efecto que producía dicha sustancia era un alargamiento excesivo en los tallos, sin desarrollo proporcional de la raíz. Actualmente, se le atribuyen otros efectos como la inducción de germinación en semillas y brotación en algunos tubérculos como la papa.

Con la utilización de un sistema de control de los parámetros ambientales es posible optimizar las condiciones de cultivo *in vitro* del kiwi y estudiar las respuestas fisiológicas frente a alteraciones del microambiente. El cultivo de los explantas en condiciones de fotoautotrofia (enriquecimiento en CO₂, mayor irradiación, cultivo en medio líquido y eliminación de la sacarosa como fuente de energía) mejora la organogénesis y el posterior crecimiento en condiciones externas de los explantas de kiwi frente al sistema *in vitro* tradicional, aumentando la tasa fotosintética de los explantas, desarrollo del aparato fotosintético (altos contenidos en clorofilas), y reducción de la tasa de transpiración del explanta. Sin embargo, la utilización de atmósferas excesivamente enriquecidas en CO₂ produce una aclimatación negativa en los explantas y una pérdida de las ventajas obtenidas a través de la fotosíntesis. Además, el crecimiento en condiciones de autotrofia puede verse limitado por la desaparición casi completa del medio de cultivo de diversos iones, entre los que se encuentran el nitrato, magnesio y fosfato principalmente. El etileno es un inhibidor de la organogénesis en cultivo *in vitro* de kiwi, y la inhibición de su

síntesis mediante aminoethoxyvilglycine (AVG) o el bloqueo específico de sus receptores el 1-metilciclopropeno (1-MCP) es un inhibidor de la percepción de etileno resulta en un mayor desarrollo de los explantas, mientras que 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), precursor de la biosíntesis del etileno, produce una inhibición generalizada de todos los parámetros organogénicos estudiados, exceptuando la formación de raíces adventicias que se vio promovida en estos tratamientos. El aumento del contenido de poliaminas que ocurre al bloquear la biosíntesis de etileno parece favorecer el desarrollo y elongación de nuevos tallos, estableciéndose relaciones entre las dos rutas biosintéticas mediadas por S-allylmercaptocysteine (SAM). El cultivo en condiciones de autotrofia junto con la aplicación de un pulso de 24 horas de 6-bencilaminopurina (BAP) da lugar a plántulas con un mejor desarrollo organogénico y mayores tasas de enraizamiento, presentando estas explantas una supervivencia total al pasar de condiciones *in vitro* a invernadero sin paso previo por una etapa de aclimatación en túnel de niebla. Estos mayores crecimientos se corresponden con un incremento de los niveles de citoquininas endógenas, principalmente ribósido de zeatina, y unas relaciones acidoindolacético (AIA)/ABS e acidoindolacético (AIA)/citoquininas (CKs) totales claramente desplazadas hacia la auxina, pudiendo utilizarse estas relaciones como indicadores de calidad de planta en el kiwi (Arigita 2003).

2.4. Micro propagación

La propagación *in vitro*, llamada micro propagación, fue establecida por Boxus en 1974; como un sistema orientado a lograr el desarrollo de nuevas plantas en un medio artificial, en condiciones asépticas y a partir de porciones vegetales muy pequeñas tales como fracciones de tallo o semilla; ápices caulinares o radiculares, callos, células aisladas, granos de polen, etc. Actualmente su aplicación a plantas *in vitro* de papa, "libres" de patógenos, obtenida por cultivo de meristemas, abre las puertas de una importante vía de multiplicación y obtención de un considerable número de nuevas plántulas en un tiempo relativamente corto, las cuales reúnen los más altos niveles de pureza varietal y estado sanitario (Escalante 1989).

La micro propagación tiene una amplia aplicación en cultivos comerciales como plantas ornamentales, frutales, forestales y especies hortícolas comestibles. En

América Latina existen unos 180 laboratorios de micro propagación de variada capacidad. De éstos, sólo 50 desarrollan propagación de plantas a nivel comercial. Sin embargo, son pocos los que alcanzan niveles de producción superior al millón de plantas al año. Las plantas para las cuales se han desarrollado técnicas de micro propagación incluyen principalmente ornamentales, herbáceas, frutales y forestales, aunque la propagación masiva (a nivel comercial) es más utilizada con las ornamentales (Roca y Ramírez 2000).

La micro propagación es la técnica que ha logrado rápida aceptación en la industria y se está practicando tanto en especies hortícolas como en ornamentales y aun en leñosas. Esta metodología presenta importantes ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación tales como: reducción del tiempo de multiplicación, posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en un tiempo económicamente costeable, mayor control sanitario del material que se propaga, facilidad de transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduaneras y la posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual existen pocos individuos. Debido a que la micro propagación se refiere a un fenómeno de reproducción asexual, el riesgo de tener “variantes” fenotípicas o genéticas es bajo. Sin embargo, eso puede suceder cuando no se domina el proceso *in vitro*. Las plantas que vienen de un mismo meristemo, ápice, o estaca son llamadas “clones” (Abdelnour-Esquivel y Vincent 1994).

2.5. Técnicas de micro propagación

Roca y Mroginski (1991) sostienen que el cultivo de tejidos *in vitro* comprende un amplio y heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explanta se cultiva asépticamente, en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. En segundo término, los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo *in vitro*, son numerosos y diferentes y se puede resumir: Estudio básico de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines, bioconversión y producción de compuestos útiles, incremento de la variabilidad genética, obtención de plantas libre de patógenos, conversión e intercambio de germoplasma y propagación de plantas.

Según Villalobos y Thorpe (1991) las técnicas de micro propagación han contribuido no solo a un mejor entendimiento de los eventos de la diferenciación celular, y en consecuencia a un aprovechamiento de tales eventos en la explotación más eficiente de las plantas. En este último aspecto vale la pena mencionar los siguientes usos de las técnicas del cultivo *in vitro*: mejoramiento genético, obtención de plantas “libres” de virus y otros patógenos, conservación del germoplasma y micro propagación.

Las técnicas de micro propagación, no sólo permiten mantener la homogeneidad o constancia del genotipo (salvo excepciones), sino que también perpetúan la condición fisiológica de los explantas. Por ejemplo, expresar y mantener la condición de juvenilidad o madurez existente en los explantas maternos, o de poder mantener o de capturar rasgos poco comunes en una población. La micro propagación es, además, la herramienta central en la amplificación de material genético de alta calidad, permitiendo, además, el establecimiento y perpetuación de germoplasma o genotipos modificados a través de la ingeniería genética (Jordan 2005).

2.6. Etapas de la micro propagación

La micro propagación presenta cuatro etapas principales: preparación del material vegetal, establecimiento del cultivo, multiplicación, enraizamiento y aclimatación de las plántulas. En algunos casos tiene importancia considerar una etapa previa (Etapa 0) que es la etapa de preparación de los explantas para el establecimiento (Olmos *et al.* 2010).

a. Preparación del material vegetal

La correcta elección y preparación del explanta incide directamente sobre la calidad del mismo y su respuesta frente a los dos principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo, que son la contaminación con microorganismos y la oxidación del explanta. Los factores que influyen sobre la calidad del explanta son: el tipo de órgano que sirve como explanta, la edad ontogénica y fisiológica del mismo, la estación en la cual se colecta el material vegetal, el tamaño y el estado sanitario general de la planta donante (Olmos *et al.* 2010).

b. Establecimiento del cultivo

El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y axénicos. El éxito está determinado por la calidad del explanta a utilizar. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantas. Los materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, ya sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas en plantas herbáceas y aquellos tejidos meristemáticos que determinan el crecimiento en grosor, como el cambium en las plantas leñosas (Olmos *et al.* 2010).

c. Multiplicación

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos (sub cultivos) y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento). Ambas vías de regeneración, organogénesis y embriogénesis, pueden darse en forma directa o indirecta. Esta última implica la formación de callo (Olmos *et al.* 2010).

d. Enraizamiento y aclimatación

En esta etapa se produce la formación de raíces adventicias. En las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en muchas especies leñosas resulta más complicada por su limitada capacidad rizogénica. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (principalmente auxinas) para promover la rizogénesis. El enraizamiento *ex vitro* permite que el enraizamiento y aclimatación se logren simultáneamente y que raramente se forme callo en la base de las estacas, asegurando así una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz. Sin embargo, el estrés asociado a la transpiración acelerada de las plantas durante las etapas iniciales del trasplante puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia. Por ello, es conveniente contar con instalaciones de invernadero o cámaras de crecimiento adecuadas para brindar temperatura y humedad relativa moderadas que permitan lograr la rusticación de las plantas en forma progresiva. Bajo condiciones *ex vitro* se utilizan diferentes sustratos, mezclas de tierra y arena y/o abonos, los cuales convienen que estén debidamente desinfectados (Olmos *et al.* 2010).

2.7. Medios de cultivo

Para mantener la viabilidad de un cultivo de tejidos, estimular su diferenciación y guiar su crecimiento, se requiere de una dosificación balanceada de nutrientes y hormonas. Los medios de cultivo son combinaciones de sustancias químicas que los investigadores han descrito después de numerosas investigaciones y que permite que las plantas crezcan y se multipliquen *in vitro* (Abdelnour-Esquivel y Vincent 1994).

La composición del medio de cultivo garantiza que se le suministren los nutrientes al tejido vegetal *in vitro* y debe ser muy parecido a las condiciones nutricionales que ofrece el suelo a las plantas en su estado natural. Los componentes principales del medio son: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agentes gelificantes y hormonas o reguladores de crecimiento (Boeri 2015).

El éxito que obtenga el cultivo *in vitro* de especies vegetales depende del medio nutritivo adecuado, como también del empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, etc. (Hurtado y Merino 1988).

2.7.1. Componentes del medio de cultivo

a. Componentes inorgánicos

- **Agua:** es el componente más abundante de los seres vivos, pudiendo constituir aproximadamente hasta el 90 % del peso fresco de los mismos. Por eso, no sólo es fundamental en el medio nutritivo, sino que también es el componente principal de la planta. Sus propiedades físicas y químicas son resultantes de su estructura molecular. A pesar de ser eléctricamente neutra, es un dipolo que presenta carga positiva y negativa. Una consecuencia de esto, es su capacidad de disolver o neutralizar la atracción de cargas eléctricas de cristales como NaCl, los cuales son desarmados como tales para ser convertidos en iones hidratados aislados (Barrueto 2005).

Es importante tener en cuenta que la calidad del agua a utilizar en la preparación de los medios de cultivo, debe ser bi-destilada en destiladores de

vidrio y ser utilizada tan pronto como haya sido obtenida; de lo contrario, guardarla en envases de vidrio y en forma estéril, para así evitar una acumulación progresiva de bacterias y otros contaminantes que limitarían el éxito del cultivo (Escalante 1989).

- **Sales minerales:** el primer objetivo en la preparación del medio de cultivo es suministrar los elementos minerales en concentraciones adecuadas. Se deben incluir los macro elementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca y Mg) y los micro elementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe y Cl) (Krikorian 1991).

Los macronutrientes son elementos esenciales que la planta los requiere en cantidades del orden de g.L^{-1} (C, H, N, O, S, Mg, Ca, K, P). Quizá los requerimientos minerales más obvios son los de fósforo (necesario para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos), de azufre (aminoácidos, cisteína y metionina) o nitrógeno (el segundo elemento tras el carbono entre los que forman la célula). Aunque se pueden utilizar fuentes orgánicas, es común usar como fuente de fósforo un fosfato, la de azufre como un sulfato y la de nitrógeno como nitrato o una sal de amonio (Boeri 2015).

Los micronutrientes (nutrientes necesarios en pequeñas cantidades) son elementos que la planta requiere en cantidades del orden de mg.L^{-1} (Fe, Mo, Ni, Cu, Zn, Mn, B): son esenciales para el funcionamiento de varias enzimas, y deben estar incluidos en el medio de cultivo. Su requerimiento en muy bajo cantidad determina que frecuentemente no sea necesario añadirlos expresamente: es suficiente su presencia como contaminantes de otros componentes. No obstante, si se utilizan componentes y agua de pureza muy altas los medios de cultivo pueden ser deficientes en micronutrientes (Boeri 2015).

b. Compuestos orgánicos

- **Vitaminas:** los complejos vitamínicos contienen elementos esenciales para las plantas. Aunque las vitaminas normalmente son sintetizadas por ellas, son también requeridas para su crecimiento y diferenciación cumpliendo un rol catalítico en el metabolismo celular. Cuando las células de plantas superiores

son cultivadas *in vitro*, la ausencia de vitaminas constituye un factor limitante del crecimiento. No obstante, estas necesidades dependen de la especie considerada. Las vitaminas que son adicionadas más usualmente en medios de cultivo son: tiamina-HCl, ácido nicotínico, piridoxina-HCl, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, riboflavina (Boeri 2015).

- **Aminoácidos:** entre los aminoácidos y amidas que se han mostrado más frecuentemente como beneficiosos está la L-arginina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-ácido glutámico y L-tirosina. Otros compuestos comúnmente empleados en el cultivo de tejidos son el inositol, adenina, sulfato de adenina, el ácido cítrico y el ascórbico, para evitar la oxidación de los tejidos (Abdelnour-Esquivel y Vincent 1994).
- **Fuentes de carbono:** prácticamente todos los cultivos *in vitro* son heterótrofos (comparativamente unos pocos son autótrofos) y por ende necesitan del suministro de una fuente de carbono. La sacarosa, en concentraciones de 2 al 5 %, es el azúcar más utilizado. En algunos medios se la reemplaza por glucosa. En casos particulares se cita el empleo de maltosa o galactosa. También myo-inositol ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) suele ser incorporado a los medios resultando un mejor crecimiento de los cultivos (Mroginski *et al.* 2010).
- **Agentes solidificantes (Agar):** se añaden para preparar medios de cultivo sólidos y semisólidos. El agar-agar es el agente solidificante más utilizado. El agar-agar es un polisacárido de galactosa y galactomanano que se obtiene de las algas rojas (Echema, Gelidium, Gracilaria). Contiene un 70 % de agarosa y un 30 % de agarpectina. Su composición química es indefinida y solidifica con mayor dificultad a medida que desciende el pH. Es insoluble en agua fría, pero se funde y solubiliza en agua hirviendo y solidifica a 45 °C. Forma geles transparentes muy estables y es degradado por muy pocas bacterias. La concentración de agar en los medios de cultivo sólidos es variable y depende de la calidad, pero usualmente es de 0.7 a 1.5 %. Los medios que tienen altas concentraciones de sales requieren de un porcentaje alto de agar (Boeri 2015).

c. pH del medio de cultivo

Es necesario ajustar el pH de la solución con el fin de lograr una correcta gelificación del medio y considerando que el pH también incide en la capacidad de absorción de sales minerales. En general el pH no debe ser inferior a 5,8 y es ajustado con HCl o NaOH 1N, luego de agregar todos los ingredientes excluido el agente gelificante. En ocasiones se agrega soluciones tampón (MES), debido a que la capacidad tamponante de los medios de cultivo es baja y los valores de pH decrecen con el autoclavado y, en muchos casos, se altera por la absorción de iones durante el cultivo y con la excreción de metabolitos del explanta (Boeri 2015).

2.8. Reguladores del crecimiento

Weaver (1976) considera que los reguladores del crecimiento; son compuestos orgánicos, diferentes de los nutrientes, que en pequeñas cantidades fomentan, inhiben o modifican de alguna forma cualquier proceso fisiológico vegetal. Las hormonas de las plantas o (fitohormonas) son reguladores producidos por las mismas plantas que, en bajas concentraciones, regulan los procesos fisiológicos de aquellas. Por lo común las hormonas se desplazan en el interior de las plantas, de un lugar de producción a un lugar de acción.

Los reguladores del crecimiento vegetal son moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo eficaces a bajas concentraciones. A medida que se fueron identificando un mayor número de reguladores de crecimiento y se fueron estudiando sus efectos y concentraciones endógenas se hizo evidente que cada uno de ellos no sólo influye en las respuestas de muchas partes del vegetal, sino que tales respuestas dependen de la especie, del órgano del vegetal, del estado de desarrollo, de las concentraciones endógenas y exógenas, de las interacciones entre reguladores de crecimiento y de diversos factores ambientales. Por lo tanto, es riesgoso generalizar acerca de los efectos de los reguladores de crecimiento sobre los procesos de crecimiento y desarrollo en un tejido u órgano vegetal en particular (Salisbury y Ross 1994).

La mayoría de los cultivos de tejidos vegetales *in vitro* necesitan de estas biomoléculas. No obstante, la concentración y el tipo de regulador del crecimiento dependerán de cada caso. En general, son 3 grupos de reguladores de crecimiento los más empleados: auxinas, citoquininas y giberelinas. Existen otras 2 biomoléculas muy importantes; el etileno y el ácido abscísico, aunque son menos utilizados, juegan papeles importantes dentro del metabolismo del explanta *in vitro*. Por ejemplo, el etileno es capaz de activar enzimas relacionadas con la senescencia y oxidación fenólica del tejido y en cambio el ácido abscísico es un compuesto hormonal que tiene más acción inhibitoria que estimuladora (Barrueto 2005).

- a. Auxinas:** el término auxina designa cualquier hormona perteneciente al grupo auxínico pero a menudo se usa como sinónimo del ácido indolacético (AIA) que es la principal auxina natural y que posiblemente se sintetiza a partir del aminoácido triptófano. La auxina se sintetiza principalmente en el ápice del tallo y ramas jóvenes, en las yemas y hojas jóvenes y en general en los meristemos (Rojas y Ramírez 1993).

Las auxinas estimulan la división celular, alargamiento y agrandamiento celular en cultivos de tejidos. Se adicionan combinadas con citocininas durante la etapa de multiplicación o sin ellas, en la etapa de enraizamiento. Se transporta polarmente, a través del floema, desde los ápices (caulinares y radicales). Junto con las citocininas, son esenciales para la viabilidad de las plantas. Su estructura química es muy variable, pueden acumularse en formas inactivas conjugadas a oligosacáridos y aminoácidos. El ácido indolacético (AIA) es la única auxina natural que se localiza en las zonas de crecimiento. Es fotosensible, por lo que no es conveniente utilizarlo en cultivo en suspensión. Por ser hormona natural, su desaparición del tejido es muy rápido ya que en las plantas se encuentran las enzimas oxidasas de la que hidrolizan a la hormona de manera que su efecto es suave y de poca duración. Las auxinas sintetizadas químicamente son: el ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 – D) y ácido indolbutírico (AIB). Todos resultan esenciales para el cultivo de meristemos, en los procesos de morfogénesis directa e indirecta, en la inducción

de embriogénesis somática, y en el enraizamiento de microesquejes actúan promoviendo el crecimiento de ápices caulinares (Boeri 2015).

b. Citocininas: son sustancias del crecimiento de las plantas que provocan la división celular. Muchas citocininas exógenas y todas las endógenas derivan probablemente de la adenina, una base nitrogenada de purina. La primera citocinina fue descubierta en la década de 1950 en la Universidad de Wisconsin, por el grupo del profesor Folke Skoog, a partir de una muestra de DNA envejecido (Weaver 1976).

Las citocininas se sintetizan principalmente en la raíz, y su presencia en las yemas del tallo, (donde tienen efecto hormonal) puede ser por transporte vía floema desde la raíz, pero hay informes de su síntesis en las hojas por tener adenina en su molécula. Se cree que provenga parcialmente de productos de hidrólisis de fracciones de ácidos nucleicos (Rojas y Ramírez 1993).

Dentro de las citocininas naturales se encuentra la Zeatina, que se extrae del endospermo del maíz, y 6 isopentanol adenina (2iP), aislada de *Clostridium italicum*, ésta produce un sobre crecimiento de los tejidos. Las citocininas sintéticas son: 6-benciladenina (6 BA), también conocida como bencil aminopurina (6 BAP); la kinetina (KIN) también conocida como 6-furfurylamino purina (FAP). La kinetina fue la primera citocinina identificada producida por la degradación térmica del ADN (Boeri 2015).

c. Giberelinas: se encuentran naturalmente en las plantas y produce un alargamiento de las células, elongación de los entrenudos y el crecimiento meristemático. También inducen la ruptura de dormancia de embriones aislados o semillas. En general, inhiben la formación de tallos y raíces adventicias. De todas las giberelinas, es el Ácido giberélico (AG₃) el más utilizado en propagación *in vitro* (Boeri 2015).

Las giberelinas se sintetizan principalmente en las hojas jóvenes y en las semillas en cuyo endospermo se ha encontrado un receptor no identificado. El nivel de GA₃ aumenta conforme desarrolla el embrión y luego decrece cuando la

semilla madura. Las giberelinas actúan sobre el RNA desreprimiendo genes que en algunos casos se han identificado. A diferencia de las auxinas la acción estimulante del crecimiento se manifiesta en un rango muy amplio de concentraciones lo cual parece indicar que el número de receptores es muy grande o bien hay una continua síntesis de ellos (Rojas y Ramírez 1993).

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODO

3.1. Ubicación del experimento.

Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca la cual se ubica, a una altitud de 2 536 msnm, en las coordenadas a 07° 10' de Latitud Sur, 78° 30' de Longitud Oeste, con una Humedad Relativa de 72%, una precipitación de 760 mm y Temperatura Promedio Anual de 13.8 °C (SENAMHI, 1992). Dentro del laboratorio se registró una temperatura promedio 29 °C, con una máxima de 34 °C y una mínima de 24 °C. La humedad relativa promedio fue de 45% y el fotoperiodo de 16 horas de iluminación y 8 horas de oscuridad.

3.2. Materiales

a. Material experimental

- Semilla botánica manualmente extraída de frutos selectos de Kiwi (*Actinidia chinensis*, Variedad Hayward), obtenidos en el mercado local (Cajamarca).
- Medios de cultivo Murashige & Skoog (1962), al 100 % (Tabla 2), combinado con dieciséis tipos de balance hormonal (Tabla 3) y nueve tipos de balance hormonal (Tabla 5).

b. Equipos: autoclave vertical automático (Analógico, H.W KESSEL SAC, 220v – 1500w, de 30 L de capacidad), potenciómetro (THERMOLYNE), refrigeradora (COLDEX), agitador magnético (THERMOLINE NUOVA II), destilador de agua (WD 3 RK CAT), balanza analítica (OHAUS).

c. Otros Materiales: erlenmeyer (Pyrex) de 250,500 y 1000 mL, vasos de precipitación de 250; 500 y 1000 ml, placas Petri de 9 cm de diámetro, vaguetas, pipetas de 1,2,5 y 10 ml, probetas (Pyrex) de 10,50,100,500 y 1000 mL, frascos de vidrio de 1 L, mecheros de alcohol, papel aluminio, mango y

hoja de bisturí N° 7 y 11, respectivamente; picetas de 500ml, tijeras, pinzas, espátulas, alcohol de 96°, algodón, papel secante y guardapolvos.

d. Productos Químicos

Tabla 1. Componentes de medio de cultivo Murashige & Sookg, 1962 (MS, 1962).

| Sales Minerales y Vitaminas | Concentración (mg.L ⁻¹) |
|---|-------------------------------------|
| Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃) | 1650 |
| Nitrato de potasio (KNO ₃) | 1900 |
| Cloruro de calcio (Ca Cl ₂ 2H ₂ O) | 440 |
| Sulfato de magnesio (MgSO ₄ 7H ₂ O) | 740 |
| Fosfato monobásico de potasio (KH ₂ PO ₄) | 170 |
| Ioduro de potasio KI | 0.82 |
| Ácido bórico (H ₃ BO ₃) | 602 |
| Sulfato ferroso (Fe SO ₄ 7H ₂ O) | 55.7 |
| Sulfato de cobre (CuSO ₄ 5H ₂ O) | 0.025 |
| Cloruro de cobalto (CoCl ₂ 6H ₂ O) | 0.025 |
| Molibdato de sodio (Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O) | 0.025 |
| Sulfato de zinc (ZnSO ₄ 7H ₂ O) | 8.6 |
| Sulfato de manganeso (MnSO ₄ 4H ₂ O) | 10.9 |
| Ácido etilendiaminacético (EDTA) | 74.5 |
| Tiamina-HCl (C ₆ H ₁₈ C ₁₂ N ₄ OS.H ₂ O) | 1 |
| Myoinositol (C ₆ H ₁₂ O ₆) | 100 |
| Pyridoxina (C ₈ H ₁₂ CINO ₃), y | 1.25 |
| Glycina | 5 |

Reguladores de Crecimiento

Auxinas: ácido α -naftalenacético (ANA).

Citoquininas: bencilaminopurina (BAP), Kinetina (KIN).

Giberelina: ácido Giberélico (AG_3).

Fuentes de energía: sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$).

Modificadores de solución de pH: soluciones de Hidróxido de sodio NaOH (0.5N) y ácido clorhídrico HCl (0.5N).

Agente Solidificante: agar (Bacto Agar Difco).

3.3 Metodología

3.3.1 Fase de Introducción:

Frutos de kiwi, comercialmente maduros, fueron partidos en dos mitades y con la ayuda de un bisturí se extrajo la parte central del mesocarpio conteniendo semillas fisiológicamente maduras. Estas fracciones de mesocarpio fueron licuadas a baja velocidad hasta observar el desprendimiento de la semilla, la cual fue colectada en un vaso de precipitación y repetidamente lavada con agua destilada estéril hasta eliminar los residuos de mesocarpio y obtener la semilla. Seguidamente, la semilla fue trasladada a una solución de detergente (Ace) al 4%, agitada por diez minutos y enjuagada repetidas veces con agua destilada estéril. Finalmente, la semilla fue superficialmente desinfectada utilizando soluciones de alcohol etílico al 70 % por 10 minutos e hipoclorito de sodio al 2 % por 5 minutos. Entre un desinfectante y el otro, las semillas fueron enjuagadas repetidas veces con agua destilada estéril e inmediatamente sembradas en la superficie del medio de cultivo Murashige & Skoog (1962), previamente preparado con reguladores de crecimiento, 2 ppm BAP y 0.5 ppm ANA, depositado en envases de vidrio (30 mL/envase), esterilizado en autoclave a 121°C y 15 Psi por 30 minutos y enfriado a temperatura ambiente (Fig 1-A). En cada envase se sembraron 50 semillas. Realizada la siembra, los cultivos se incubaron en oscuridad (T° : 38° C) por espacio de 15 días, tiempo en el cual se produjo la germinación (Fig. 1-B).

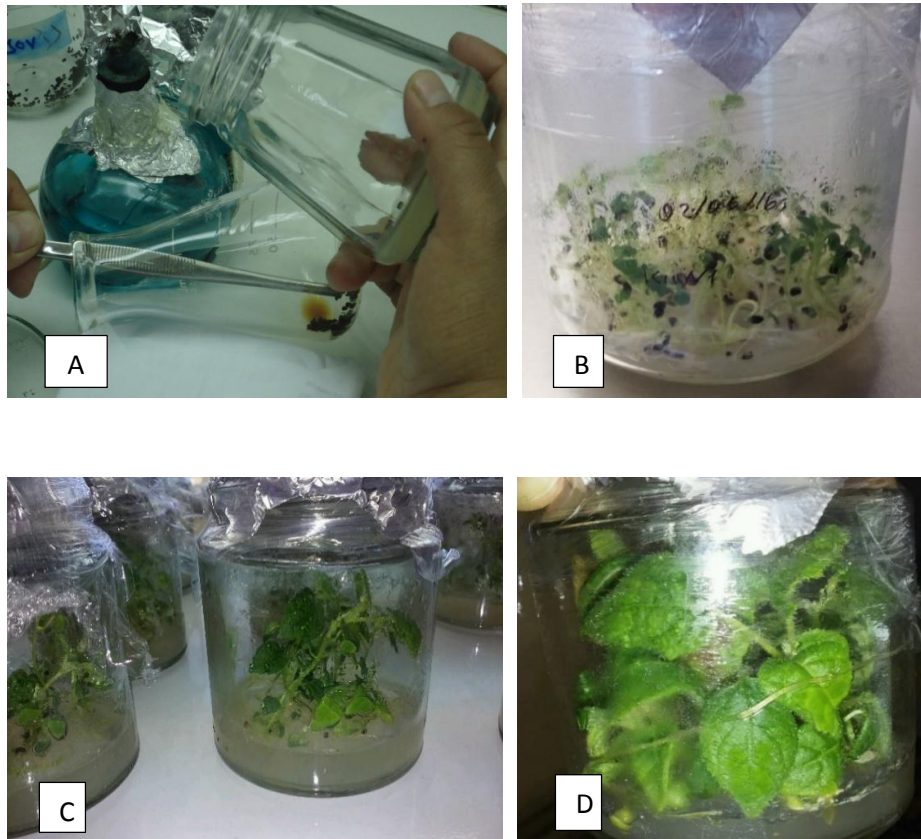


Figura 1. Imagen Fase de Introducción del kiwi al sistema *in vitro*: (A) siembra aséptica de semilla botánica en medio MS, (B) Germinación de las semillas a los quince días de sembradas, (C) y (D) Crecimiento de las plántulas; (D) Plántula “donantes” de explantas para las Fases de Establecimiento y Enraizamiento.

Posteriormente, los cultivos fueron trasladados a una cámara de crecimiento con fotoperiodo (16 horas luz y 8 horas oscuridad) y temperatura (23° C) regulada, condiciones que propiciaron el crecimiento de las plántulas (plántulas – madres) a partir de las cuales se aislaron asépticamente los explantas (microestacas) compuestos por un segmento de tallo (longitud $\bar{x}=0.5$ cm) y una yema vegetativa, tanto para la fase de Establecimiento como para la fase Enraizamiento (Figs. 1- C, 1-D). En la cámara de crecimiento, las plántulas permanecieron 90 días.

3.3.2 Fase de Establecimiento:

Se inició con el aislamiento aséptico de microestacas las cuales fueron sembradas en dieciséis tipos de medio de cultivo (Tabla 3, Fig. 2) resultantes de la combinación de cuatro niveles de Kinetina y cuatro niveles de Benzil Amino Purina (Tabla 2). Ambas citocininas fueron incorporadas al medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) durante su preparación.

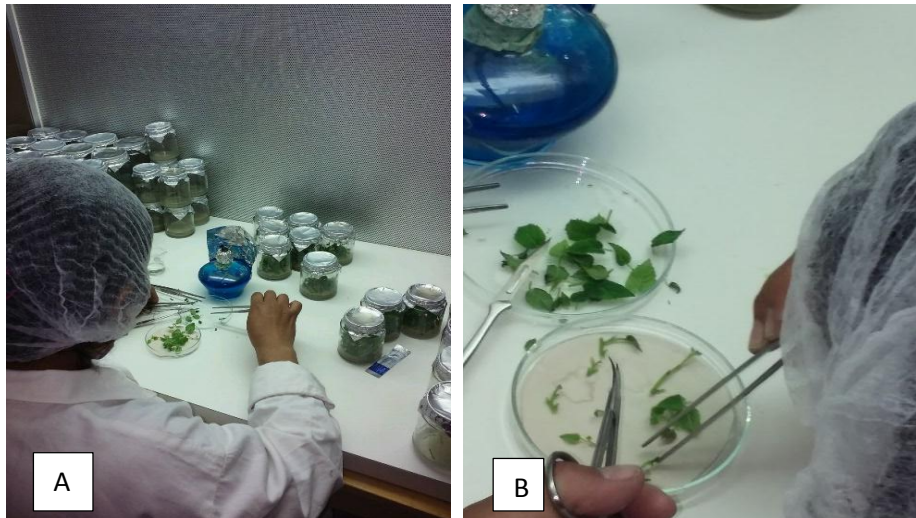


Figura 2: Imagen de la preparación de explantas: (A) Segmentación de tallos y (B) Aislamiento de micro estacas compuestas de un segmento de tallo y una yema axilar.

Tabla 2: Factores y niveles de estudio.

| |
|--|
| Factor K: concentración de Kinetina (Kin): |
| k₀: 0 (Testigo) |
| k₁: 0.4ppm Kin |
| k₂: 0.8ppm Kin |
| k₃: 1.6ppm Kin |
| Factor B: concentración de Benzil Amino Purina (Bap): |
| b₀: 0 (Testigo) |
| b₁: 2ppm Bap |
| b₂: 4ppm Bap |
| b₃: 8ppm Bap |

Tabla 3: Combinación de tratamientos.

| N° | Clave | Tratamientos/Descripción |
|----|-------------------------------|--------------------------|
| 1 | b ₀ k ₀ | 0 ppm Bap + 0 ppm Kin |
| 2 | b ₁ k ₀ | 2 ppm Bap + 0 ppm Kin |
| 3 | b ₂ k ₀ | 4 ppm Bap + 0 ppm Kin |
| 4 | b ₃ k ₀ | 8 ppm Bap + 0 ppm Kin |
| 5 | b ₀ k ₁ | 0 ppm Bap + 0.4 ppm Kin |
| 6 | b ₁ k ₁ | 2 ppm Bap + 0.4 ppm Kin |
| 7 | b ₂ k ₁ | 4 ppm Bap + 0.4 ppm Kin |
| 8 | b ₃ k ₁ | 8 ppm Bap + 0.4 ppm Kin |
| 9 | b ₀ k ₂ | 0 ppm Bap + 0.8 ppm Kin |
| 10 | b ₁ k ₂ | 2 ppm Bap + 0.8 ppm Kin |
| 11 | b ₂ k ₂ | 4 ppm Bap + 0.8 ppm Kin |
| 12 | b ₃ k ₂ | 8 ppm Bap + 0.8 ppm Kin |
| 13 | b ₀ k ₃ | 0 ppm Bap + 1.6 ppm Kin |
| 14 | b ₁ k ₃ | 2 ppm Bap + 1.6 ppm Kin |
| 15 | b ₂ k ₃ | 4 ppm Bap + 1.6 ppm Kin |
| 16 | b ₃ k ₃ | 8 ppm Bap + 1.6 ppm Kin |

Diseño: completamente randomizado bajo arreglo factorial 4 x 4, con 16 tratamientos, 4 repeticiones y 10 unidades experimentales.

- **Preparación del Medio de Cultivo:** se realizó mezclando las sales que componen el medio de cultivo MS 1962, según las cantidades indicadas en la (Tabla 1), cuyos constituyentes fueron disueltos en agua destilada estéril, a la cual también se le adicionó los factores en estudio (Tabla 2) y sacarosa (30 g/L). El pH de la solución fue regulado a un valor un valor de 5.6. Seguidamente, el medio fue calentado para facilitar la dilución del agar (6 gr/L), dispensado en envases de vidrio (50 ml/envase de 470 mL de capacidad). Finalmente, los envases conteniendo al medio de cultivo fueron apropiadamente tapados con papel aluminio y autoclavados a 121° C y 15 Psi, por 30 minutos.

- **Incubación:** realizada la siembra aséptica de microestacas, los cultivos fueron incubados en una Cámara de Crecimiento de condiciones reguladas: fotoperiodo: 16 horas luz; temperatura: 29° C; intensidad lumínica 2 000 lux.
- **Evaluaciones:** con intervalos de 15 días, a partir de la tercera semana de haber realizado la siembra *in vitro*, las plántulas regeneradas fueron objeto de las siguientes evaluaciones:
 - a.- Longitud (cm) de tallo.
 - b.- Número de brotes por explanta.
 - c.- Número de hojas por planta.
 - d.- Número de yemas por tallo.

3.3.3 Fase de Enraizamiento

- **Preparación del Medio de Cultivo:** se realizó disolviendo, en agua destilada estéril, las sales que componen el medio de cultivo MS 1962 (Tabla 1), sacarosa (30 g/L) y los constituyentes de los factores en estudio (Tabla 4). El pH de la solución fue regulado a un valor de 5.6. Seguidamente, el medio de cultivo fue calentado para favorecer la disolución del agar (6 g/L), dispensado en envases de vidrio (30 ml/envase). Los envases conteniendo al medio de cultivo fueron tapados con papel aluminio y autoclavados a 121° C y 15 Psi, por 30 minutos.
- **Siembra *in vitro*:** micro estacas compuestas de una yema axilar y un segmento de tallo con una longitud promedio de 0.5 cm fueron asépticamente aisladas de plántulas de kiwi obtenidas en la fase de Introducción. Estas explantas fueron sembrados en la superficie de nueve tipos de medio de cultivo (Tratamientos, Tabla 5).
- **Incubación:** realizada la siembra aséptica de microestacas, los cultivos fueron incubados en una Cámara de Crecimiento de condiciones reguladas: fotoperiodo: 16 hrs luz; temperatura: 29° C; intensidad lumínica 2 000 lux, condiciones bajo las cuales se las mantuvo por noventa días.

Tabla 4: Factores y niveles de estudio.

Factor A: concentración de Ácido Giberélico (AG₃):

a₀: 0 (Testigo)

a₁: 0.2 ppm AG₃

a₂: 0.4 ppm AG₃

Factor N: concentración de Ácido Naftalenacético (ANA):

n₀: 0 (Testigo)

n₁: 0.01 ppm ANA

n₂: 0.1 ppm ANA

Tabla 5: Combinación de tratamientos.

| Nº | Clave | Tratamientos/Descripción |
|----|-------------------------------|--|
| 1 | a ₀ n ₀ | 0 ppm AG ₃ + 0 ppm ANA |
| 2 | a ₀ n ₁ | 0 ppm AG ₃ + 0.01 ppm ANA |
| 3 | a ₀ n ₂ | 0 ppm AG ₃ + 0.1 ppm ANA |
| 4 | a ₁ n ₀ | 0.2 ppm AG ₃ + 0 ppm ANA |
| 5 | a ₁ n ₁ | 0.2 ppm AG ₃ + 0.01 ppm ANA |
| 6 | a ₁ n ₂ | 0.2 ppm AG ₃ + 0.1 ppm ANA |
| 7 | a ₂ n ₀ | 0.4 ppm AG ₃ + 0 ppm ANA |
| 8 | a ₂ n ₁ | 0.4 ppm AG ₃ + 0.01 ppm ANA |
| 9 | a ₂ n ₂ | 0.4 ppm AG ₃ + 0.1 ppm ANA |

Diseño: completamente randomizado bajo arreglo factorial 3 x 3, con 9 tratamientos, 3 repeticiones y 10 unidades experimentales por tratamiento.

- **Evaluaciones:** con intervalos de 15 días, a partir de la tercera semana de haber realizado la siembra *in vitro*, las plántulas regeneradas fueron objeto de las siguientes evaluaciones:

- a.- Número promedio de raíces por plántula.
- b.- Longitud (cm) de la raíz adventicia de cada plántula.
- c.- Número promedio de raíces adventicias por planta.

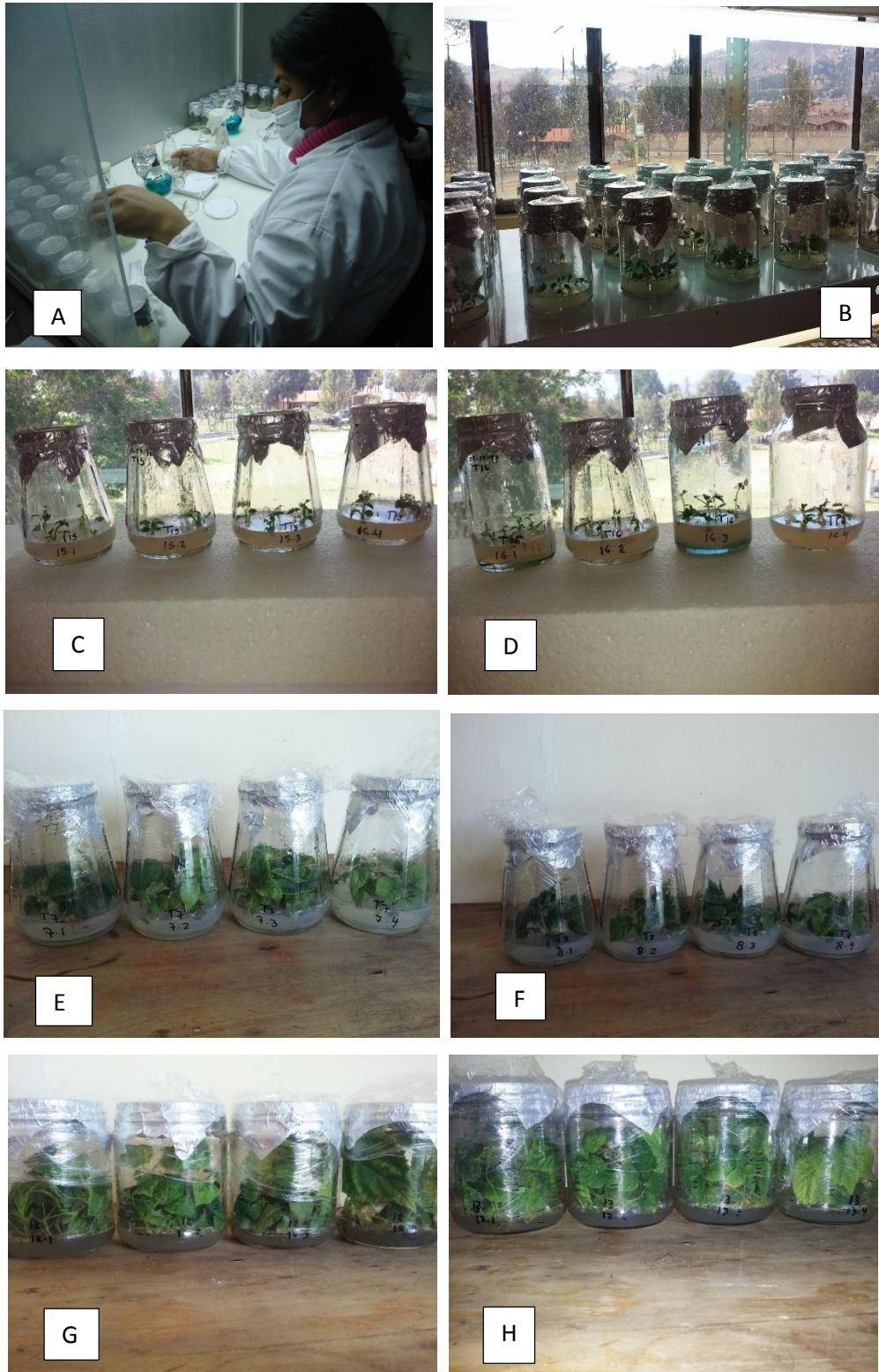


Figura 3: Imagen de la Fase de Establecimiento de explantas del kiwi: (A) Siembra *in vitro* de explantas (B) Incubación de explantas sembrados en el cuarto de cultivo, (C) y (D) Explantas sembradas en medio de cultivo por cada tratamiento, (E) y (F) Brotes obtenidos a los 45 días de la siembra *in vitro* y (G) y (H) Brotes obtenidos a los 75 días de la siembra *in vitro*.

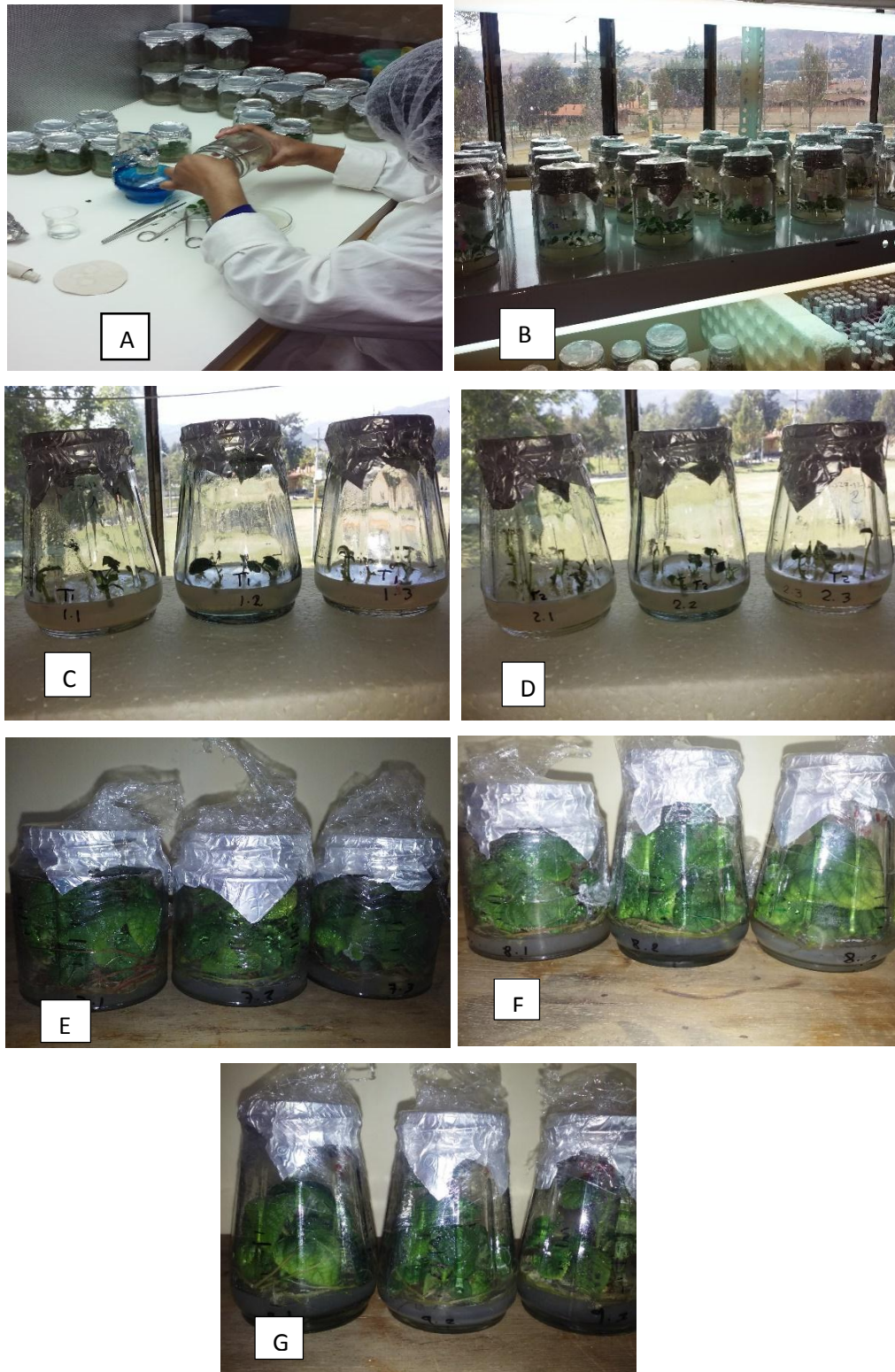


Figura 4: Imagen de la Fase de Enraizamiento de explantas del kiwi: (A) Siembra *in vitro* de explantas, (B) Incubación de explantas sembrados en el cuarto de cultivo, (C) y (D) Explantas sembradas en medio de cultivo por cada tratamiento, (E), (F) y (G) Brotes obtenidos a los 75 días de la siembra *in vitro*.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Fase de Introducción

La Tabla 6, muestra que la semilla botánica de kiwi, superficialmente desinfectada y sembrada en medio de cultivo M.S. 1962, complementado con 2 ppm BAP y 0.5 ppm ANA, registró un porcentaje promedio de germinación de 89%. Se consideró que una semilla ha germinado cuando mostró la presencia de radícula y plúmula; es decir, ha diferenciado una *plántula normal*, sin deformaciones en su estructura física, hecho que se inició a los quince días y concluyó a los noventa días de la siembra *in vitro*.

De lo expuesto, se deduce que, el sistema *in vitro* ha generado adecuadas condiciones de temperatura, humedad relativa y luminosidad, entre otras, las que asociadas con las características físicas y madurez fisiológica de la semilla se traducen en este elevado porcentaje de germinación y *plántulas normales*. Denominamos *plántulas normales* a aquellas que al final del período de análisis (90 días), presentaron el potencial para continuar desarrollándose en plantas con características satisfactorias, bajo condiciones *in vitro*.

La ISTA (2016), considera al proceso de germinación de una semilla como el establecimiento de un estado metabólicamente activo, fisiológicamente manifestado por la división y diferenciación celular. La primera expresión de este proceso es la emergencia de la radícula y normalmente concluye con la obtención de plántulas normales, plántulas anormales, semillas latentes, semillas duras y semillas muertas.

Para nuestras condiciones de experimentación, el sistema *in vitro* que comprende el uso de medios de cultivo M. S. 1962, complementado con reguladores del crecimiento, brinda buenas condiciones para la germinación de la semilla botánica de kiwi, hecho que corrobora los reportes de otros investigadores, quienes trabajaron con diferentes especies vegetales. Por ejemplo, Bhattacharya, J. y Khuspe (2001), utilizaron semilla de *Carica papaya* y diferentes reguladores de crecimiento, entre ellos el ácido naftalenacético

(ANA) y encontraron que, a mayores concentraciones de ANA, se presentaron menores porcentajes de germinación. Weaver (1989), expresa que en ocasiones las citocininas potencian la germinación, ilustrando los efectos de la cinetina en la terminación del reposo de semillas de bardana. Yldefonzo (2013), menciona que *Oreaocallis grandiflora*, se propaga sexualmente por semilla botánica en medio M.S, a mitad de la concentración normal y suplementado con sacarosa 2,0 % y phytigel 0,3% con pH 5,67, permitiendo el 100% de germinación. En cactáceas, Ruvalcaba Ruíz et al. (2010), sostienen que las altas tasas de germinación *in vitro*, están relacionadas con el ambiente creado por el medio de cultivo, como alta humedad relativa y la adecuada presión osmótica. Kitsaki et al. (2004) encontraron que el medio de cultivo enriquecido con agua de coco es más adecuado para la germinación *in vitro* de semilla de moringa (*Moringa oleífera* Lam.). Respecto al agua de coco, Taiz y Zeiger (1998), destacan su contenido de citocinina, una fitohormona que entre otras funciones promueve la ruptura de la dormancia y la germinación de semillas de moringa al estimular la elongación de las células de los cotiledones en respuesta a la luz.

Tabla 6. Número y porcentaje de semillas germinadas bajo el efecto del medio de cultivo M.S. 1962 complementado con 2 ppm BAP y 0.5 ppm ANA. Datos registrados a los quince días de la siembra *in vitro*.

| | N° Semillas Sembradas | N° Semillas Germinadas | Porcentaje de Germinación |
|--------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| Total | 600 | 534 | 89 |
| \bar{x} | 50 | 44.5 | 89 |

4.2. Fase de Establecimiento

4.2.1. Longitud del eje caular

El análisis de varianza (ANVA, Tabla 7) para la longitud del eje caular, a los noventa días de la siembra *in vitro*, preparado con los datos de la Tabla 16 del anexo, muestra la existencia de una alta significación estadística para los factores en estudio (KIN y BAP) y su interacción. Por lo tanto, podemos decir que existe influencia de las dosis de kinetina (KIN) y Benzil Amino Purina (BAP), así

como de su efecto combinado, en la longitud promedio (cm) del eje caulinar. El valor del coeficiente de variabilidad (CV = 3.71 %), nos indica tanto la heterogeneidad de los valores de las variables, como la confiabilidad de los datos.

Tabla 7. Análisis de varianza (ANVA) para el efecto de la kinetina (KIN) y Benzil Amino Purina (BAP) en la longitud promedio (cm) del eje caulinar. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| FV | GL | SC | CM | FC | Pr>F |
|-----------|----|--------|-------|----------|---------|
| Kin | 3 | 0.592 | 0.197 | 4.60 ** | 0.006 |
| BAP | 3 | 3.165 | 1.55 | 24.59 ** | <0.0001 |
| Kin x BAP | 9 | 10.187 | 1.131 | 26.38 ** | <0.0001 |
| Error | 48 | 2.059 | 0.043 | | |
| Total | 63 | 16.004 | | | |

CV: 3.71%. NS = No significativo. **= Altamente significativo al 99% de probabilidades.

En la prueba de Duncan al 5 % (Tabla 17 del Anexo) observamos que los tratamientos 9, 4, 8 y 10 tienen la más alta significación estadística; y entre ellos, el tratamiento 9 expresa su máximo nivel frente al resto de tratamientos.

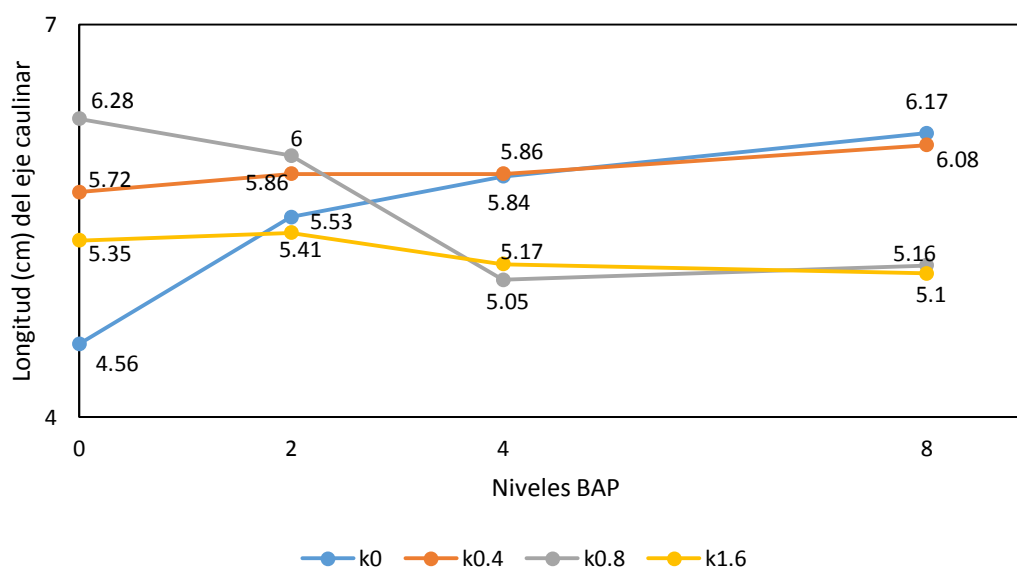


Figura 5. Representación del efecto de cuatro dosis de kinetina (KIN) en cada nivel de benzil aminopurina (BAP) en la longitud promedio (cm) del eje caulinar en plántulas de kiwi (*Actinidia chinensis*). Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

La Figura 5, permite comparar el efecto de los niveles de los tratamientos en estudio en la longitud promedio del eje caulinar (cm). Se determinó que las citocininas empleadas (kinetina y Benzil Amino Purina) tienen efectos fisiológicos excluyentes entre sí. En ausencia de KIN (0 ppm), el aumento de la dosis de BAP de 2 a 4 y 8 ppm tiene una relación directa con el crecimiento del eje caulinar, el cual registró longitudes de 5.53; 5.84 y 6.17 cm de largo, respectivamente. Sin embargo, cuando la KIN está presente en el medio de cultivo (0.4; 0.8 y 1.6 ppm), todo incremento en el nivel de BAP (2; 4 y 8 ppm) no se traduce en una mayor longitud del eje caulinar. El eje caulinar reprime su crecimiento en presencia de ambas citocininas y este efecto es más notorio cuando se combinan las mayores dosis kinetina y BAP. Contrariamente, en ausencia de BAP, la KIN mejora el crecimiento del eje caulinar hasta que éste registra su valor máximo (6.28 cm de largo) con 0.8 ppm de esta citocinina.

La información disponible muestra que el efecto de las citocininas en el crecimiento del tallo es variable en función a especies vegetales, tipo de citocinina y dosis de la misma. Por ejemplo, Calderón (1994) encontró que la mayor elongación de microtallos de *Eucalyptus globulus* Labill. correspondió a un medio con menor concentración de citocininas, hecho que difiere de nuestros resultados, pues ellos evidencian que la mayor longitud de eje caulinar (6.28 cm) se obtiene con 0 ppm de BAP y 0.8 ppm de KIN, seguido del tratamiento con 0 ppm de kinetina y la máxima dosis de BAP (8 ppm). Esta última afirmación es consistente con los resultados de Viñas et al. (2012) quien obtuvo una mayor altura de brotes de pitajaya (*Hylocereus costaricensis*) en medios que sólo contenían BAP, resultados que a su vez sustentan la afirmación de Verma et al. (2011) quien califica a la citocinina como el *detonador* para la formación de brotes en el cultivo *Digitalis lamarckii*, ya que el aumento de citocininas fue proporcional a la producción de brotes, los que en seis semanas alcanzaron de 1.5 a 2 cm de longitud. Además, en el cultivo *Gomortega keule* los mayores promedios de longitud de brotes se lograron con las concentraciones 0.5 y 1 ppm de BAP mientras que, al aumentar la concentración de esta citocinina a 1,5 ppm, la longitud se redujo.

4.2.2. Número promedio de brotes

El ANVA para el número de promedio de brotes (Tabla 8) muestra alta significación estadística para los factores en estudio (KIN y BAP); por tanto, se puede asegurar que existe influencia de las dosis de ambas citocininas en el número promedio de brotes. Lo contrario ocurre para la interacción de estos factores. El valor del coeficiente de variabilidad (CV = 3.37 %), confiere confiabilidad a los datos e indica la respuesta heterogénea de los explantas frente al efecto de las citocininas empleadas en la investigación.

Tabla 8. ANVA para el efecto de la KIN y BAP en el número promedio de brotes.

Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| FV | GL | SC | CM | FC | Pr>F |
|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------|----------------|
| Kin | 3 | 0.151 | 0.05 | 6.78 ** | 0.0007 |
| BAP | 3 | 0.232 | 0.077 | 10.39 ** | <0.0001 |
| Kin x BAP | 9 | 0.082 | 0.009 | 1.23 NS | <0.3007 |
| Error | 48 | 0.357 | 0.007 | | |
| Total | 63 | 0.822 | | | |

CV: 3.37%. NS = No significativo. **= Altamente significativo al 99% de probabilidades.

La ausencia de significación estadística para la interacción de los factores en estudio (Tabla 8), sugiere el estudio e interpretación del efecto de cada factor en estudio (BAP y KIN) en el número promedio de brotes (Figuras 6 y 7, respectivamente).

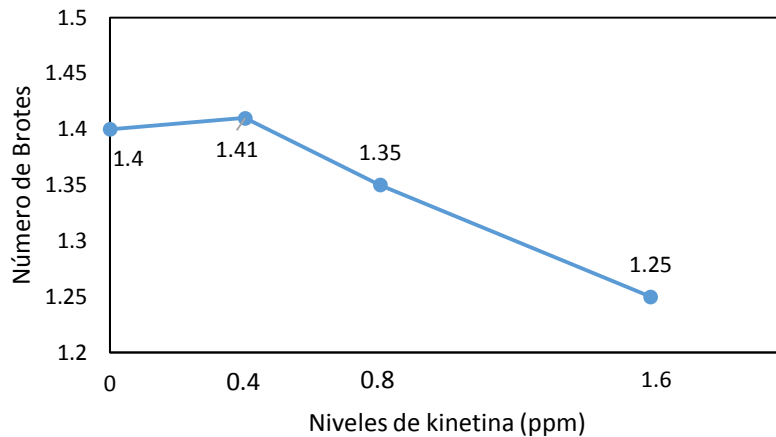


Figura 6. Representación del efecto de cuatro dosis de KIN en el número de brotes en plántulas de kiwi (*Actinidia chinensis*). Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

El potencial de ramificación de las plántulas *in vitro* de kiwi, expresado como número promedio de brotes (Fig. 6), es ligeramente estimulado por dosis de KIN comprendidas entre 0 y 0.4 ppm. Dosis superiores a ésta (0.8 y 1.6 ppm), tienen un efecto negativo. Una curva respuesta semejante ha sido obtenida frente a la incorporación de BAP en el medio de cultivo (Fig. 7), pues la respuesta ha sido optimizada con 2 ppm de BAP.

La ausencia de citocinina exógena (KIN y BAP) no anula el potencial de ramificación, lo que nos permite suponer que los brotes se forman en respuesta al efecto predominante de la citocinina endógena en el balance hormonal del explanta. En consecuencia, la KIN y BAP complementan el rol de la citocinina endógena, rompen el efecto de dominancia apical y mejoran la capacidad del explanta para formar nuevos brotes.

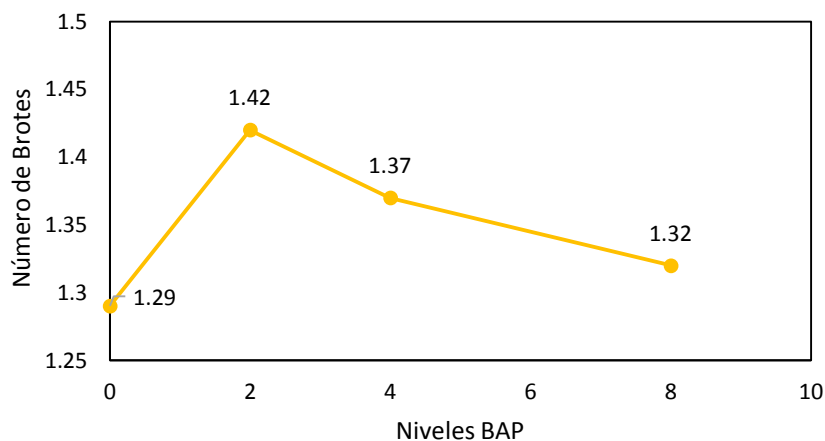


Figura 7. Representación del efecto de cuatro dosis de BAP en el número de brotes en plántulas de kiwi (*Actinidia chinensis*). Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

Estos resultados se correlacionan con los niveles óptimos de citocininas reportados por otros investigadores; por ejemplo, Shah *et al.* (2008) señalan que cuando se añade, al medio de cultivo, el BAP solo o en combinación con otras citoquininas se obtienen mayores valores promedios de número de brotes en el cultivo de guava (*Psidium guajava* L.). Nasib *et al.* (2008) cultivó kiwi utilizando el medio Murashige y Skoog (1962) con diferentes concentraciones de benzil adenina (1.5, 2.0, 2.5 mg/L) y agua de coco (15, 20 y 25%) y determinó que ambos elementos tienen un efecto sinérgico siendo el medio complementado con 2 mg/L de benzil adenina y 20% de agua de coco el que produjo mayor multiplicación, brotes más largos y mayor número de nudos por explanta. Mishra *et al.* (2007) observaron que la adición de 2 mg/L de BAP al medio de cultivo, produjo los máximos valores de número de brotes en guayabo; y, Nikam (1997), reportó la regeneración de 5.7 brotes por explanta de *Agave sisalana*, con 0.5 mg/L de kinetina.

Las evidencias antes presentadas constituyen un sustento de nuestros resultados, en el sentido que el número de brotes por explanta, independientemente del genotipo, es mejorado con la incorporación en el medio de cultivo, de KIN y BAP, en dosis de 0.5 y 2 ppm, respectivamente.

4.2.3. Número promedio de hojas

El ANVA para el efecto de los tratamientos en el número promedio de hojas (Tabla 9), preparado con los datos de la Tabla 18 del anexo, muestra una alta significación estadística para los factores KIN y BAP y su interacción. El valor del coeficiente de variabilidad (CV = 1.94 %) indica la confiabilidad en los datos analizados y la heterogeneidad en la respuesta de los explantas frente al efecto de las citocininas antes citadas.

Tabla 9. Análisis de varianza (ANVA) para el número promedio de hojas. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| FV | GL | SC | CM | FC | Pr>F |
|-----------|----|-------|-------|----------|---------|
| Kin | 3 | 0.037 | 0.012 | 4.65 ** | 0.006 |
| BAP | 3 | 0.104 | 0.035 | 13.17 ** | <0.0001 |
| Kin x BAP | 9 | 0.105 | 0.012 | 4.41 ** | 0.0003 |
| Error | 48 | 0.127 | 0.003 | | |
| Total | 63 | 0.373 | | | |

CV: 1.94%. NS = No significativo. **= Altamente significativo al 99% de probabilidades.

La prueba de significación de Duncan (Tabla 21 del Anexo) indica que los tratamientos 8, 7, 9 y 5 son superiores a los demás tratamientos.

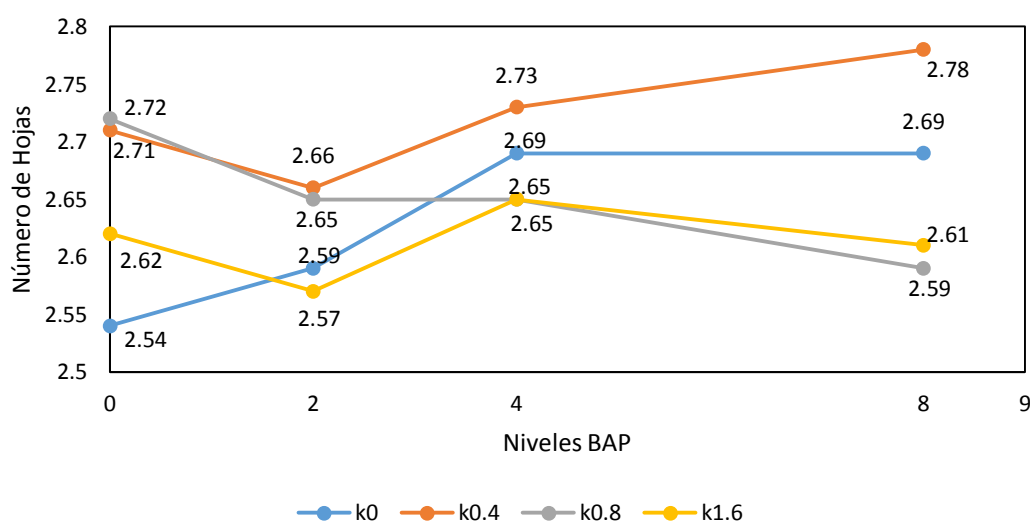


Figura 8. Representación del efecto de cuatro dosis de kinetina (KIN) en cada nivel de benzil aminopurina (BAP) en el número de hojas en plántulas de kiwi (*Actinidia chinensis*). Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

Dada la existencia de una alta significación estadística para la interacción de los factores KIN x BAP, se procedió a analizar el comportamiento de la KIN en cada nivel de BAP y sus efectos en el número promedio de hojas (Fig. 8). Se encontró que, en ausencia de KIN, la incorporación de 2 y 4 ppm de BAP en el medio de cultivo, incrementan el número promedio de hojas en 2 y 6% respectivamente, en comparación con el tratamiento testigo (0 ppm BAP). Estos ligeros aumentos, reflejan el efecto complementario del suministro exógeno de citocinina (BAP) sobre la citocinina endógena del explanta. Concentraciones superiores de BAP (8 ppm), no producen mejoras adicionales en el número promedio de hojas.

La mejor respuesta en términos de número promedio de hojas por explanta ha sido obtenida con 0.4 ppm de KIN. Al combinar éste nivel de KIN con 2, 4 y 8 ppm de BAP, el número promedio de hojas pasó de 2.66 a 2.73 y 2.78 hojas por explanta, respectivamente. No sucede lo mismo cuando se combinan los otros niveles de KIN (0.8 y 1.6 ppm) con 2, 4 y 8 ppm de BAP, pues el número promedio de hojas es menor y decreciente a la vez. Finalmente, se determinó que, en ausencia de BAP, el número promedio de hojas se incrementa conforme se eleva la dosis de KIN de 0 a 0.4 ppm (2.71 hojas por explanta), se optimiza con 0.8 ppm (2.72 hojas por explanta) y desciende con 1.16 ppm (2.62 hojas por explanta) de KIN.

Nuestros resultados confirman lo afirmado por Werner et al. (2001) y Huan et al. (2004) en el sentido que las citocininas juegan un papel fundamental en la organogénesis vegetal, ya que inducen la formación de hojas y brotes y aumentan la velocidad de desarrollo y la germinación de la semilla. Sin embargo, contradicen las afirmaciones de estos mismos autores quienes afirman que concentraciones superiores de citoquininas, permiten aumentar significativamente el número de hojas por explante en michay rojo (*Berberidopsis corallina*). En nuestro caso, concentraciones superiores a 0.8 ppm de kin reprimen al proceso de formación de hojas.

Sánchez *et al.* (2009) sostienen que la 6-bencilaminopurina es una citocinina sintética que se utiliza en concentraciones de 0,1 a 1 mg/l para promover la división celular y la inducción de yemas y nuevas hojas. En consistencia con esta afirmación, Saire Apaza (2012) determinó que con la aplicación de 0.5 mg/L de

Bencil Amino Purina se logra el mayor número promedio de hojas (4.65 hojas) en yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl). Por su parte, Mamani Beatriz (2005) también sostiene que el uso de 0.5 mg/L de BAP reduce el tiempo de formación de dos hojas a 17 días para la fresa, variedad Sweet Charlie. En la presente investigación, la sola presencia de 4 ppm BAP en el medio provocó la formación de 2.69 hojas por explanta en el lapso de 90 días, promedio que además de ser inferior a los arriba señalados, no mejora con dosis superiores de esta misma citocinina. Es posible entonces que los mayores requerimientos de BAP para la formación de hojas en las plantas *in vitro* de kiwi estén asociadas al genotipo y la característica leñosa de sus tejidos que dificultan el proceso organogénico en comparación con las especies vegetales inicialmente mencionadas.

4.2.4. Número promedio de yemas

La KIN no tiene efecto estadístico alguno en el número promedio de yemas por explanta. Contrariamente, la BAP y la interacción de los factores KIN x BAP afectan significativamente a esta variable. El coeficiente de variabilidad (CV = 2.06 %), además de la confiabilidad de los datos, indica la heterogeneidad en la respuesta de los explantas frente al efecto de las citocininas aplicadas.

Tabla 10. ANVA para el número promedio de yemas. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| FV | GL | SC | CM | FC | Pr>F |
|-----------|----|-------|-------|------|-----------|
| Kin | 3 | 0.007 | 0.002 | 0.71 | NS 0.5479 |
| BAP | 3 | 0.071 | 0.024 | 7.04 | ** 0.0005 |
| Kin x BAP | 9 | 0.111 | 0.012 | 3.64 | ** 0.0016 |
| Error | 48 | 0.162 | 0.003 | | |
| Total | 63 | 0.351 | | | |

CV: 2.06% NS = No significativo. ** = Altamente significativo al 99% de probabilidades.

En la Tabla 23 del anexo, el tratamiento 8 es numéricamente superior con respecto al resto de tratamientos.

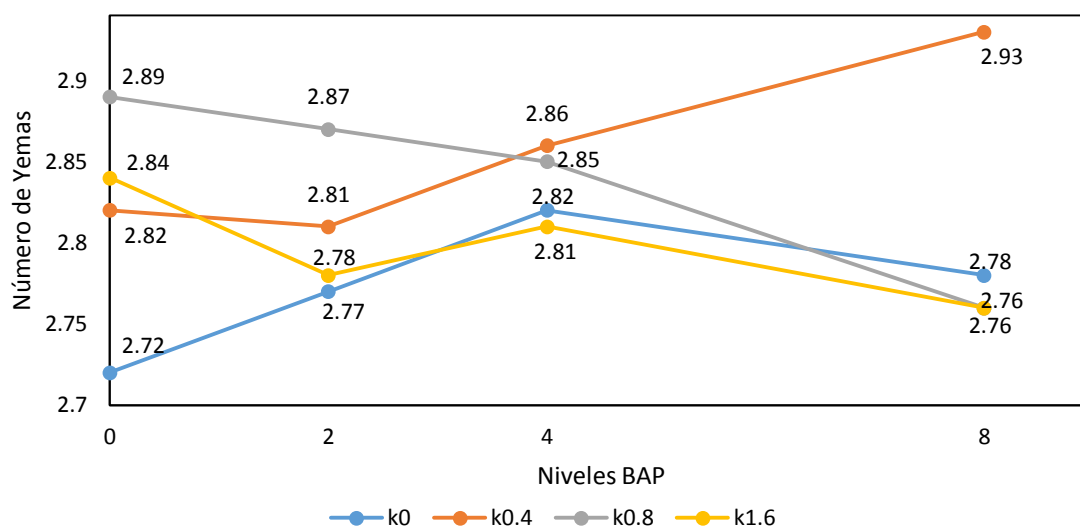


Figura 9. Representación del efecto de cuatro dosis de kinetina (KIN) en cada uno de los niveles de benzil aminopurina (BAP) en el número de yemas en plántulas de kiwi (*Actinidia chinensis*). Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

En ausencia de KIN, el aumento de la dosis de BAP en el medio de cultivo, de 0 a 2 y 4 ppm genera una respuesta creciente en el número promedio de yemas por explanta, el cual se incrementa de 2.72 a 2.77 y 2.82 yemas por planta, respectivamente (Fig. 9). Dosis superiores a 4 ppm (8 ppm) reprimen la formación de yemas y reducen su número promedio a 2.78 por planta. Un efecto similar al descrito fue observado en el cultivo de Taya (*Caesalpinia spinosa*), por Nuñez (2017) quien califica como mejor tratamiento para la fase de multiplicación la concentración 0,25 ppm de BAP, pues le permitió obtener 96.6% brotación y en 30 días logró un explanta establecido, vigoroso y con un promedio 2.07 yemas.

De modo semejante, en ausencia de BAP, el número promedio de yemas por planta se incrementa de 2.72 a 2.82 y 2.89 conforme el nivel de KIN en el medio se aumenta de 0 a 0.4 y 0.8 ppm, respectivamente. Niveles superiores de KIN (1.6 ppm) reprimen la formación de yemas y reducen su número a 2.84 yemas por planta. Con menores concentraciones de KIN, Martínez (2012), observó una tendencia a la formación de yemas múltiples en la base de los explantas de sorgo (*Sorghum bicolor*) cultivados en medio de cultivo con 0,10 y 0,21 ppm de KIN.

Estos resultados coinciden con los de Baskarana y Jayabalan, (2005) quienes sostienen que la KIN incrementa la formación de yemas múltiples.

Con excepción de la combinación 0.4 ppm de KIN y 8 ppm de BAP, que optimizan el número promedio de yemas por planta, ubicándolo en 2.93, todas las demás combinaciones de estas citocininas tienden a disminuir el número promedio de yemas por planta de kiwi.

4.3. Fase de Enraizamiento

Nuestros resultados ponen en evidencia que la inclusión de las citocininas (KIN, BAP) en el medio de cultivo tienen un efecto positivo en el enraizamiento *in vitro* del kiwi, pues no solo mejoran el número de raíces adventicias sino también la longitud de las mismas. Aparentemente estos resultados serían contradictorios a lo señalado por la literatura respecto al rol fisiológico de las citocininas, pues el análisis de sus efectos individuales muchas veces deja entrever el traslape de sus efectos con el de las giberelinas y auxinas, lo cual incluye su rol en la estimulación de la división y elongación celular, iniciación de tallos y/o formación de yemas y expansión foliar, eliminación de la dominancia apical y retraso de la senescencia (Öpik and Rolfe 2005), pero en ningún caso se cita a la promoción del proceso rizogénico. Este traslape es probablemente el resultado de sus interacciones con otras fitohormonas y no el de una duplicidad de funciones (Öpik and Rolfe 2005).

En consecuencia, debe considerarse que las respuestas morfogénicas de las especies vegetales resultan de la interacción hormonal a nivel celular; es decir que, dentro de las células se encuentran los diferentes tipos de hormonas y la respuesta visible de su acción deriva del balance hormonal entre promotores e inhibidores del crecimiento y desarrollo vegetal. Dentro de los primeros debe tomarse en cuenta el balance entre auxinas, giberelinas y citocininas. Si en el balance predomina la auxina, obviamente el resultado más claro será la emisión de raíces adventicias. Por su parte, el predominio de la citocinina en el balance hormonal desencadena una serie de procesos que concluyen con el brotamiento y mejoramiento de la biomasa aérea. En todos los casos estas respuestas pueden ser mejoradas y/o modificadas con la incorporación de reguladores del crecimiento en los medios de cultivo.

Quizás uno de los ejemplos mejor estudiados de tales interacciones son las relaciones establecidas entre las concentraciones de las auxinas y las citocininas en la determinación del desarrollo de tejidos vegetales *in vitro* dados por Miller en 1957, quien demostró que la relación auxina: citocinina, y no sus concentraciones absolutas, determina el tipo de tejidos que serán producidos (Öpik and Rolfe 2005).

Desde esta perspectiva, la incorporación de citocininas puede contribuir al mejoramiento del proceso rizogénico, no como resultado de su propio rol fisiológico sino como consecuencia de su participación en el balance hormonal auxina: citocinina que las células del explanta requieren para la formación de raíces adventicias. En efecto, algunas investigaciones muestran que el pre tratamiento con auxinas puede sobre regular la expresión de los receptores de las citocininas (Gordon et al. 2009); por tal motivo, una concentración más o menos igual de las dos hormonas hace que las células sigan indiferenciadas, formando masas de tejido llamadas callos. Cuando la concentración de auxina es superior, el tejido indiferenciado organiza raíces; y, con una concentración superior de citocinina, se forman yemas. Por tanto, con un cuidadoso equilibrio de las dos hormonas se puede producir raíces y yemas, y, por lo tanto, una planta (Rost et al. 1998).

4.3.1. Número promedio de raíces adventicias de primer orden.

El ANVA obtenido a partir de los datos de la Tabla 20 del anexo, indica que, tanto la KIN como la BAP y su interacción, tienen efectos estadísticos altamente significativos en el número promedio de raíces adventicias de primer orden por planta (Tabla 11).

Tabla 11. ANVA para el número promedio de raíces adventicias de primer orden.

Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| FV | GL | SC | CM | FC | Pr>F |
|-----------|----|-------|-------|----------|---------|
| Kin | 3 | 0.051 | 0.017 | 3.84 ** | 0.0152 |
| BAP | 3 | 0.213 | 0.071 | 15.98 ** | <0.0001 |
| Kin x BAP | 9 | 0.214 | 0.024 | 5.37 ** | <0.0001 |
| Error | 48 | 0.214 | 0.004 | | |
| Total | 63 | 0.691 | | | |

CV: 2.53% NS = No significativo. **=Altamente significativo al 99% de probabilidades.

La prueba de significación Duncan, evidencia que la mejor respuesta fue obtenida con el tratamiento 7 (Tabla 25 del anexo)

El análisis de la interacción (Fig. 10) evidencia que en ausencia de KIN, el número promedio de raíces por planta se optimiza y alcanza un valor de 2.6, con 4 ppm de BAP. En Ilacón, Saire Apaza (2012), logró un mayor número de raíces (5.40 raíces por planta) con la aplicación de 0.5 ppm de BAP. En fresa variedad Sweet Charlie, Mamani (2005), obtuvo un mayor número de raíces (1.6 raíces por explanta) en el medio que contenía 0.5 ppm de BAP.

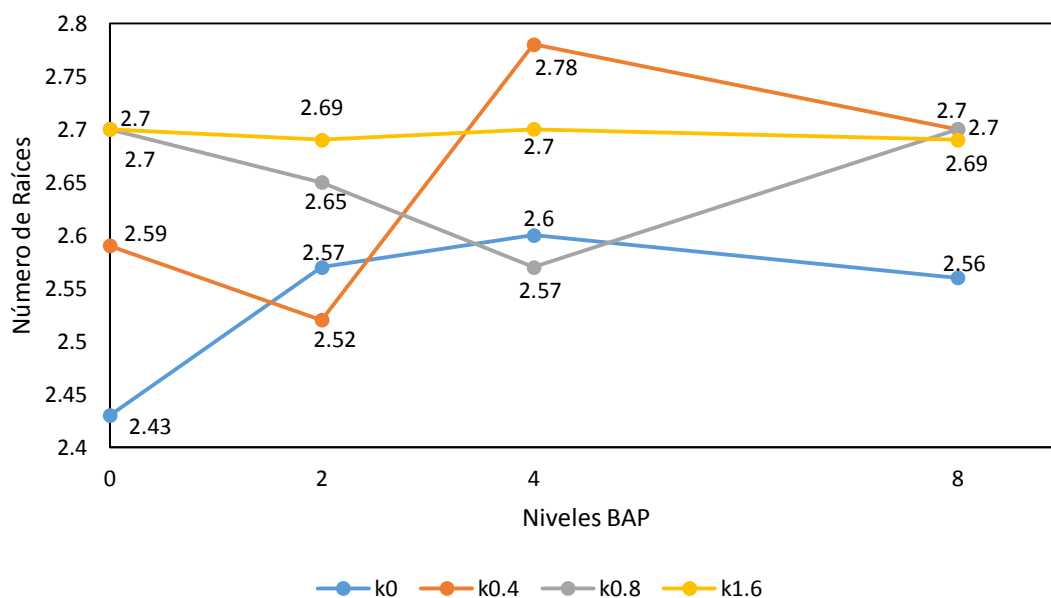


Figura 10. Representación del efecto de cuatro dosis de kinetina (KIN) en cada uno de los niveles de benzilaminopurina (BAP) en el número de raíces adventicias de primer orden en plántulas de kiwi (*Actinidia chinensis*). Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

De otro lado, en ausencia de BAP, el número promedio de raíces adventicias de primer orden por planta de kiwi, alcanza su máximo valor (2.7 raíces por planta) con 0.8 y 1.6 ppm de KIN. Esto indica que concentraciones de KIN superiores a 0.8 ppm, no mejoran la capacidad de enraizamiento *in vitro* del kiwi.

De todas las combinaciones de KIN y BAP probadas en la presente investigación, la que mejor estimula la rizogénesis *in vitro* del kiwi, es la formada por 0.4 ppm de KIN y 4 ppm de BAP, pues ha permitido obtener un promedio de 2.78 raíces por planta. Otras citocininas tienen efectos parecidos al descrito; por ejemplo, García Ramírez et al. (2012), determinó que al adicionar 0.6 ppm de tiadiazurón (TDZ) al medio de cultivo se obtuvieron los mayores porcentajes de formación de raíces (88.2%) en explantas de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* (bambú) y estas fueron emitidas mostrando un geotropismo positivo. El TDZ a pesar de ser una citocinina del grupo de las fenilureas, ha sido empleada en los medios de cultivo de enraizamiento *in vitro* de *Bambusa atra*, *Dendrocalamus giganteus* y *Dendrocalamus hookeri* incrementando los porcentajes de enraizamientos en estas especies (Ramanayake et al. 2006).

4.3.2. Número promedio de raíces adventicias de primer orden

El ANVA para la variable número promedio de raíces adventicias de primer orden (Tabla 12) muestra una alta significación estadística para el factor AG₃. Lo contrario ocurre para la interacción de factores. El coeficiente de variabilidad (CV = 3.06 %), confiere confiabilidad a los datos.

Tabla 12. Análisis de varianza (ANVA) para el número promedio de raíces adventicias de primer orden. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| FV | GL | SC | CM | FC | Pr>F |
|---------------------|----|-------|-------|----------------|--------|
| AG ₃ (a) | 2 | 0.258 | 0.129 | 20.54 ** | 0.0001 |
| Ana (n) | 2 | 0.015 | 0.008 | 1.20 NS | 0.324 |
| a x n | 4 | 0.294 | 0.007 | 1.17 NS | 0.356 |
| Error | 8 | 0.113 | 0.006 | | |
| Total | 26 | 0.415 | | | |

CV: 3.06%

NS = No significativo.

** Altamente significativo al 99% de probabilidades.

La ausencia de significación estadística para la interacción de los factores en estudio (Tabla 12) sugiere el estudio e interpretación del efecto de cada factor en estudio (AG₃ y ANA) en el número promedio de raíces adventicias de primer orden (Figuras 11 y 12).

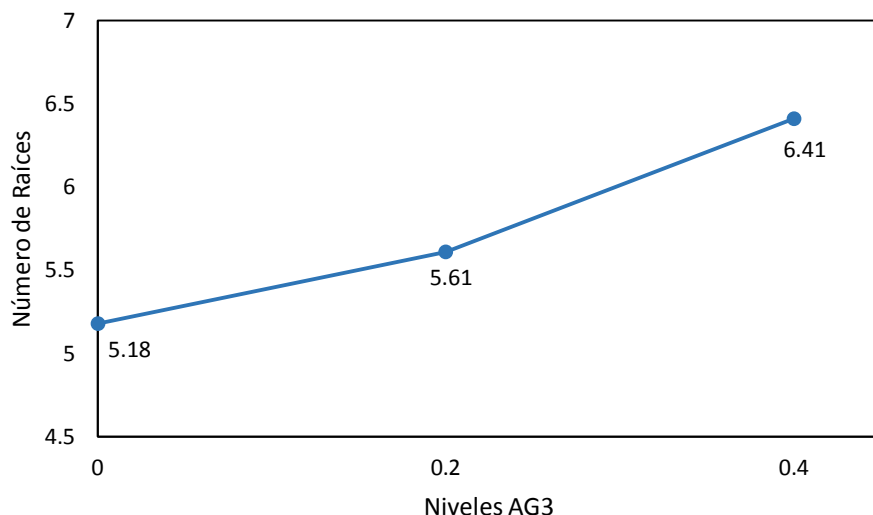


Figura 11. Representación del efecto de tres dosis de ácido giberélico (AG₃) en el número de raíces adventicias de primer orden en plántulas de kiwi (*Actinidia chinensis*). Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

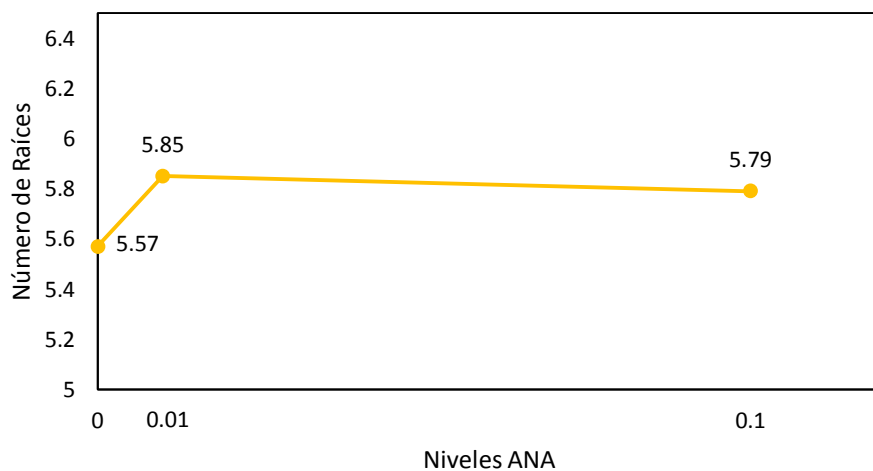


Figura 12. Representación del efecto de tres dosis de ácido naftalenacético (ANA) en el número de raíces adventicias de primer orden en plántulas de kiwi (*Actinidia chinensis*). Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

El aumento de las dosis de AG₃ en el medio de cultivo, de 0 a 0.2 y 0.4 ppm genera una respuesta creciente en el número promedio de raíces adventicias de primer orden, el cual se incrementa de 5.18 a 5.61 y 6.41 raíces por planta, respectivamente (Figura 11). La incorporación de ANA en el medio de cultivo (Figura 12) 0 a 0.01 ppm genera una respuesta creciente, el cual se incrementa de 5.57 a 5.85, dosis superiores a esta (0.1 ppm) tienen un efecto negativo.

En este sentido, los resultados obtenidos se pueden relacionar con investigaciones similares de otros investigadores, quienes trabajaron con diferentes especies vegetales. Por ejemplo, Taiz y Zeiger (2006), mencionan que la relación auxina/citoquinina regula la morfogénesis en cultivos de tejidos de la siguiente manera: relaciones altas de auxina/citoquinina estimulan la formación de raíces.

El efecto del ANA de incrementar el número de raíces y de acelerar la inducción de las mismas ha sido ampliamente estudiado en numerosos estudios de fisiología vegetal (Hartmann y Kester, 2001; Salisbury y Ross, 2000).

Quero (2004) en el cultivar de piña Española Roja experimentó con cuatro dosis de ANA 0,0; 0,25; 0,5 y 1,0 mg/l logrando el proceso de rizogénesis en todos los tratamientos, pero el mayor número de raíces lo alcanzó con 0,5 mg/l de ANA.

Viola y Franz (1989) utilizaron un medio MS con NAA (0,3 – 0,5 mg/L) e indujo a un nivel alto de enraizamiento 40 – 80% en el cultivo de *Gentiana lutea*.

Suárez et al. (2006) reporta el uso de dosis de 0 a 1 mg/l de ANA en la fase de enraizamiento *in vitro* de roble (*Tabebuia rosea bertol DC*) con un 100% de enraizamiento.

Quintero et al. (2003) en *Dioscorea sp* indican que a medida que aumentó la dosis de ANA, el número de raíces fue mayor hasta registrar 3.6 raíces por planta con dosis de 0.9 mg/L., menor a las utilizadas en esta investigación. Se encontró que en otros estudios realizados en donde han utilizado el ANA para el desarrollo de raíces, las concentraciones utilizadas son menores o iguales a 1.0 mg/L. (Kalimuthu et al. (2006).

4.3.3. Longitud de raíces adventicias de primer orden

El ANVA para la variable longitud promedio de raíces adventicias de primer orden (cm) (Tabla 12), muestra una alta significación estadística para el factor BAP e interacción KIN x BAP.

Tabla 13. ANVA para el número promedio (cm) de longitud de raíces adventicias de primer orden. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| FV | GL | SC | CM | FC | Pr>F |
|---------|----|--------|-------|-------|------------|
| Kin (a) | 3 | 1.614 | 0.538 | 2.18 | NS 0.1028 |
| Bap (b) | 3 | 8.083 | 2.694 | 10.91 | ** <0.0001 |
| a x b | 9 | 9.934 | 1.104 | 4.47 | ** 0.0003 |
| Error | 48 | 11.856 | 0.247 | | |
| Total | 63 | 31.487 | | | |

CV: 10.25% NS = No significativo. ** Altamente significativo al 99% de probabilidades.

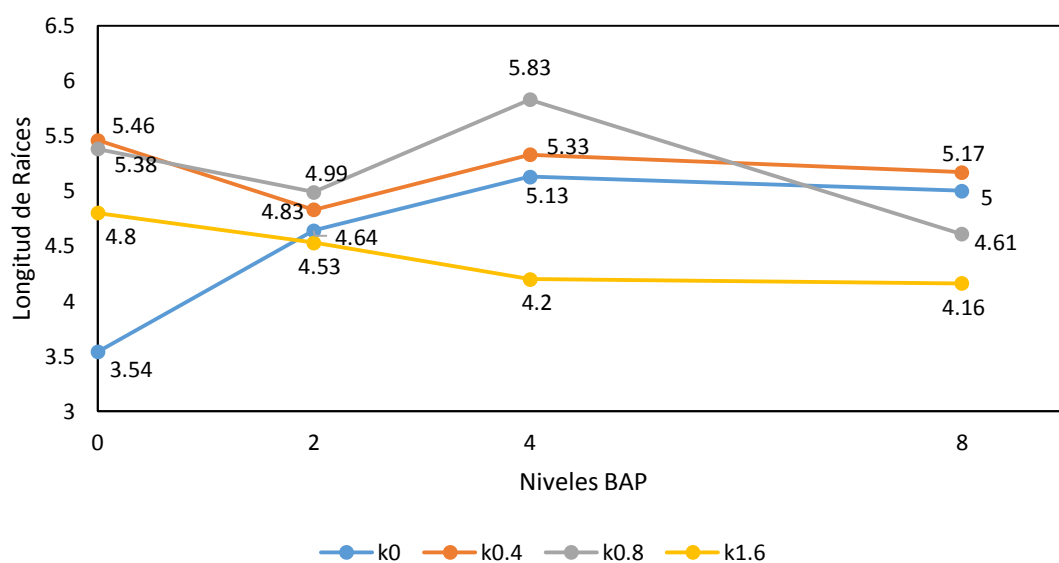


Figura 13. Representación del efecto de cuatro dosis de kinetina (KIN) en cada uno de los niveles de benzil aminopurina (BAP) en la longitud (cm) de raíces adventicias de primer orden. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

El análisis estadístico de la interacción de los factores en estudio (Fig. 13) muestra que en ausencia de KIN, las raíces adventicias de primer orden con la mayor longitud promedio (5.13 cm) fueron formadas bajo el efecto de 4 ppm de BAP. Contrariamente, en ausencia de BAP, las raíces adventicias de primer orden con la mayor longitud promedio (5.46 cm) fueron formadas bajo el efecto de 0.4 ppm de KIN, ello demuestra que la KIN es diez veces más efectiva que la BAP como promotora del proceso de alargamiento radicular *in vitro* del kiwi.

La combinación hormonal de mayor efectividad en la promoción del alargamiento radicular del kiwi estuvo compuesta de 0.8 ppm de KIN y 4 ppm de BAP, con la cual se obtuvieron raíces con una longitud promedio de 5.83 cm, la cual representa un incremento del 65 % en comparación con el tratamiento testigo (0 ppm BAP +0 ppm KIN), cuya longitud promedio (cm) fue de 3.54 cm.

El efecto estimulante de la BAP en el alargamiento radicular también ha sido descrito por otros investigadores, tales como Apaza (2012), quien afirma que la incorporación de 0.5 ppm de BAP en el medio de cultivo incrementó la longitud promedio de raíces de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) a 6.14 cm.

4.3.4 Longitud de raíces adventicias de primer orden

Tanto el AG₃ y la interacción de factores en estudio (AG₃ y ANA), tienen efectos estadísticos altamente significativos (Tabla 14) para la longitud (cm) promedio de raíces adventicias de primer orden, datos que son base para el análisis de este estudio (Tabla 23 del anexo). Lo contrario ocurre para el factor en estudio ANA donde no existe significación estadística. El valor del coeficiente de variabilidad (CV = 8.95 %) lo cual nos indica confiabilidad en los datos analizados.

Tabla 14. Análisis de varianza (ANVA) para la longitud (cm) promedio de raíces adventicias de primer orden. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| FV | GL | SC | CM | FC | Pr>F |
|---------------------|----|--------|-------|----------|--------|
| AG ₃ (a) | 2 | 7.226 | 3.613 | 27.96 ** | 0.0001 |
| Ana (n) | 2 | 0.096 | 0.048 | 0.37 NS | 0.694 |
| a x n | 4 | 1.753 | 0.438 | 3.39 ** | 0.031 |
| Error | 8 | 2.326 | 0.129 | | |
| Total | 26 | 11.402 | | | |

CV: 8.95%

NS = No significativo. **= Altamente significativo al 99% de probabilidades.

El análisis de la interacción de los factores en estudio (AG₃ y ANA) (Figura 14) evidencia que en ausencia AG₃, la longitud (cm) promedio de raíces adventicias de primer orden por planta, se optimiza y alcanza un valor de 7.7 cm, con 0.1 ppm de ANA.

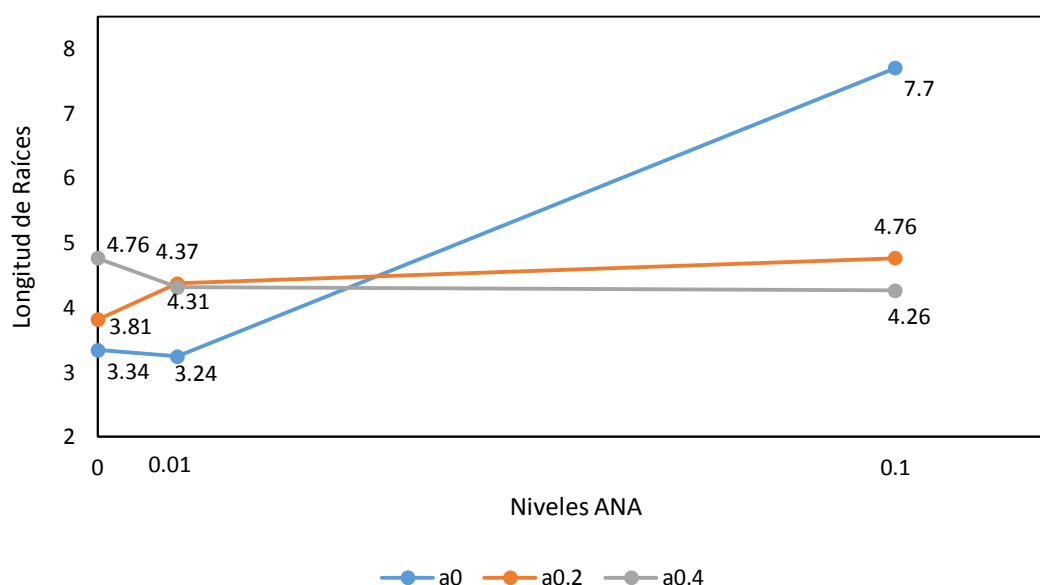


Figura 14. Representación del efecto de tres dosis del ácido giberélico (AG₃) en cada uno de los niveles de ácido naftalenacético (ANA) en la longitud (cm) de raíces adventicias de primer orden en plántulas de kiwi (*Actinidia chinensis*). Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

De otro lado, en ausencia de ANA, la longitud (cm) promedio de raíces adventicias de primer orden por planta, alcanza su máximo valor 4.76 cm bajo el efecto de 0.4 ppm de AG₃.

En este sentido, los resultados obtenidos se pueden relacionar con investigaciones similares de otros investigadores, quienes trabajaron con diferentes especies vegetales. Por ejemplo, George, 2008. Con el incremento de la auxina activa en relación favorable con el alargamiento de la raíz en sábila (*Aloe vera*).

4.3.5 Número promedio de raíces adventicias de segundo orden

El ANVA para la variable número promedio de raíces adventicias de segundo orden (Tabla 15), muestra una alta significación estadística para los factores en estudio AG₃ y ANA. Lo contrario ocurre para la interacción de factores. El coeficiente de variabilidad (CV = 3.15 %) nos indica confiabilidad en los datos analizados.

Tabla 15. Análisis de varianza (ANVA) para el número promedio de raíces adventicias de segundo orden. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| FV | GL | SC | CM | FC | Pr>F |
|---------------------|----|-------|-------|----------------|--------|
| AG ₃ (a) | 2 | 0.66 | 0.33 | 41.60 ** | 0.0001 |
| Ana (n) | 2 | 0.095 | 0.047 | 5.98 ** | 0.01 |
| a x n | 4 | 0.068 | 0.17 | 2.14 NS | 0.118 |
| Error | 8 | 0.143 | 0.008 | | |
| Total | 26 | 0.965 | | | |

CV: 3.15% NS = No significativo. **= Altamente significativo al 99% de probabilidades

La ausencia de significación estadística para la interacción de factores en estudio (Tabla 15), sugiere el estudio e interpretación del efecto de cada factor en estudio (AG₃ y ANA), en el número promedio de raíces adventicias de segundo orden (Figuras 15 y 16).

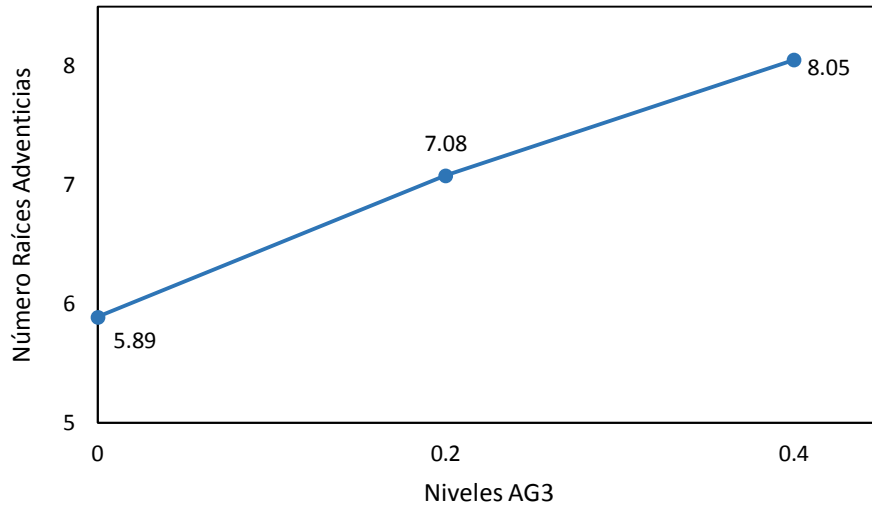


Figura 15. Representación del efecto de tres dosis de ácido giberélico (AG₃) en el número de raíces adventicias de segundo orden en plántulas de kiwi (*Actinidia chinensis*). Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

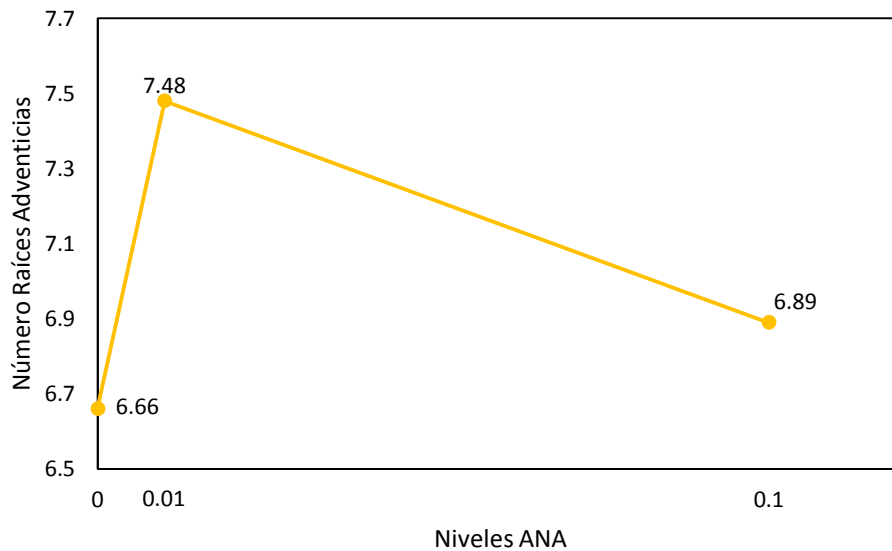


Figura 16. Representación del efecto de tres dosis de ácido naftalenacético (ANA) en el número de raíces adventicias de segundo orden en plántulas de kiwi (*Actinidia chinensis*). Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

El aumento de las dosis de AG₃ en el medio de cultivo, de 0 a 0.2 y 0.4 ppm genera una respuesta creciente en el número promedio de raíces adventicias de segundo orden, el cual se incrementa de 5.89 a 7.08 y 8.05 raíces por planta, respectivamente (Figura 15). La incorporación de BAP en el medio de cultivo (Figura 16) 0 a 0.01 ppm ANA genera una respuesta creciente, el cual se incrementa de 6.66 a 7.48, dosis superiores a esta (0.1 ppm) tienen un efecto negativo.

En este sentido, los resultados obtenidos se pueden relacionar con investigaciones similares de otros investigadores, quienes trabajaron con diferentes especies vegetales. Por ejemplo, Raven et al. (1992) el ácido naftalenacético (ANA) es una auxina sintética utilizada normalmente para inducir la formación de raíces adventicias.

Gaspar y Couman (1987); Gaspar y Hofinger (1988) y Hartmann et al. (1997) quienes indican que las auxinas son las que presentan mayores efectos en la formación de raíces adventicias ya que las yemas son la principal fuente de auxinas endógenas y permiten la rizogénesis en ausencia de la auxina exógena.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. En la fase de introducción del material experimental (semilla botánica) al sistema *in vitro* se ha obtenido el 89% de germinación en medio Murashige & Skoog (1962), complementado con 2 ppm BAP y 0.5 ppm ANA.
2. En la fase de establecimiento *in vitro*, las plántulas con la mayor longitud promedio de eje caulinar (6.28 cm) fueron obtenidas con 0.8 ppm KIN; así mismo, el mayor número promedio de brotes por plántula (1.41) fue obtenido con 0.4 ppm KIN, mientras que los mayores números promedio de hojas (2.78) y yemas (2.93) se obtuvieron con las combinaciones de 0.4 ppm KIN y 8 ppm BAP.
3. La combinación de KIN y BAP que mejor estimuló la rizogénesis *in vitro* del kiwi (2.78 raíces adventicias de primer orden por planta) estuvo formada por 0.4 ppm KIN y 4 ppm BAP. El aumento de las dosis de AG₃, de 0 a 0.2 y 0.4 ppm, incrementó el número promedio de raíces adventicias de primer orden de 5.18 a 5.61 y 6.41 raíces por planta, respectivamente. Contrariamente, en ausencia de AG₃, la longitud promedio de raíces adventicias de primer orden por planta, se optimizó y alcanzó un valor de 7.7 cm con 0.1 ppm de ANA.

CAPITULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abdelnour-Esquivel, A; Vincent, J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. C.A.T.I.E. Costa Rica. 37 p.
- Aquino, F. 1988. Manual del cultivo del kiwi (*Actinidia chinensis*), CIREN N° 73, Santiago – Chile. 64 pág.
- Auccasi, M. 2005. "Principios de desinfección y esterilización". Disponible en: (<http://www.enfermeriaperu.com/mistrabajos/prindesinfeccion.htm>) lima, Perú.
- Arigita, L. 2003. Fotoautotrofia, Nutrición y Reguladores de Crecimiento en el Cultivo *in vitro* de Kiwi Mediante Control Ambiental. Tesis Mag. Sc. México. Oviedo. 73 pág.
- Apaza, Sonia Saire. 2012. Efecto del ácido indol acético y bencil amino purina en el desarrollo de yemas de yácon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl) en donciones *in vitro*, La Paz – Bolivia, 115 p.
- Barrueto, L. 2005. El cultivo de tejidos en: Biotecnología Vegetal. PROGRAF impresores. Santiago, Chile. 31 – 46 p.
- Boeri, P. 2015. Medios de cultivo – Reguladores de crecimiento en: PLANTAS DE PROBETA, Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Editorial de la Universidad de La Plata. Primera Edición. Buenos Aires, Argentina. 47 – 63 p.
- Crisosto, H; Kader, A. 1999. Kiwifruit. In: Postharvest Quality Maintenance Guidelines, University of California Davis, CA 95616. consulta: 6 de abril de 2010.
- Debenham, C; Seelye, F; Mullan, C. 2014. An *in vitro* repository for clonal kiwi fruit. In XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014): 1113 (pp. 93-98).
- Delvin, A. 1975. Fisiología Vegetal. Segunda Edición. Editorial Omega. Barcelona – España. 468 págs.

- Escalante Zumaeta, B. 1989. Cultivo *in vitro* de Papa: Principios y Metodología, Vol. I. Primera Edición. Editorial e Imprenta El Rosario. Cajamarca – Perú. 107 pág.
- Fontúrbel, F. 2002. “Micropropagación de un cultivo perenne”. Biología y Ciencias de la Salud: 7. Disponible en: <<http://www.biologia.org/?pid=5001&id=47>> (14/10/11).
- García, Y; Freire-Seijo, M; Pérez, B; Hurtado, O. 2012. Efecto del AIB y el TDZ en el enraizamiento *in vitro* de plantas de *Bambusa vulgaris* var. *Vulgaris* Schrad. Ex Wendl. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co>article>view>.
- García Rubio, J.1975. “El Cultivo Kiwi”. Editorial María del Pilar Oro García. España. 142p.
- George, EF. 2008. Plant Tissue Culture Procedure-Background. En: George EF, Hall MA, de Klerk GJ (Eds) Plant Propagation by Tissue Culture -3rd. Edition. Vol 1. The Background, pp. 1-28. Springer. Dordrecht
- Gordon, P; Chickarmane, S; Ohno, C; Meyerowitz, M. 2009. Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within Arabidopsis shoot meristem. Proc. Natl Acad Sci USA. 106: 16529-34.
- Hartmann, H; D, Kester. 2001. Propagación de Plantas. Principios y Prácticas. 8ª Reimpresión. Editorial Continental. México. 760 p.
- Hurtado, D; Merino, M. 1994. Cultivo de tejidos vegetales. Edit. Trillas tercera reimpresión. México. 232 p.
- International Seed Testing Association (ISTA). 2016. Reglas Internacionales para el Análisis de las semillas. Zürichstr. 50, CH-8303 Bassersdorf, Suiza.
- Jordan, M. 2005. Aplicaciones de la Técnica de Cultivo de Tejidos en: Biotecnología Vegetal. PROGRAF impresores. Santiago, CHILE. 55 – 71 p.
- Kalimuthu, K; R, Senthilkumar; N, Murugalatha. 2006. Regeneration and mass multiplication of *Vainilla planifolia* Andr. – a tropical orchid. *Current Science*. Vol. 91(10).

- Kitsaki, C; Zygouraki, S; Ziobora, M; Chintziest, S. 2004. *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several Ophrys species (Orchidaceae). *Plant Cell Reports*. 23:284-290.
- Krikorian, D. 1991. Propagación clonal *in vitro*. En: Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Ed. Centro Internacional de Agricultura Tropical 6: 127-143.
- Kyte; Kleyn. 1996. "Plants from test tubes: an introduction to Micropropagation" Tercera Edición. Editorial Timber Press EUA.
- Martínez, S; Gómez, R; Posada, L; Barbón, R; Acosta, M. 2012. Efecto de dos citoquininas, ácido ascórbico y sacarosa en la obtención de plantas *in vitro* de *Sorghum bicolor* para la formación de callos. *Rev. Colombia Biotecnología*. Vol XIV N° 2 diciembre 2012 101-110.
- Minuzzi, A; Mora, F; Antonio, M; Rangel, S; Lucca, A; Scapim, A. 2007. Características fisiológicas, contenido de aceite y proteína en genotipos de soya, evaluadas en diferentes sitios y épocas de cosecha, Brasil physiologic characteristics, oil and protein content in soybean genotypes across site and harvest period, Brazil, 67(4), 353–361.
- Mishra, M; Chandra, R; Pati, R; Bajpai, A. 2007. Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.). *Acta Horticulturae* 735: 155-158.
- Mroginski, L; Sansberro, P; Flaschland, E. 2010. Establecimiento de Cultivo de Tejidos Vegetales. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Ediciones INTA. Segunda Edición. Argentina. 17 – 25 p.
- Muñoz, A. 2006. Biotecnología. Editorial Universidad Nacional de Quilmes, argentina 448 p 2012.
- Nasib, A; Ali, K; Khan, S. 2008. An optimized and improved method for the *in vitro* propagation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) using coconut water. *Pak. J. Bot.* 40(6), 2355-2360.
- Núñez, E; Quiala, E; Mestanza, S; Teanga, S. 2017. Propagación *in vitro* de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz a partir de yemas axilares de árboles plus seleccionados. *Biotecnología Vegetal Vol. 17, No. 2: 67 - 75, abril - junio, 2017* Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV. MES. eISSN 2074-8647, RNPS: 2154

- Olmos, S; Luciani, G; Galdeano, E. 2010. Métodos de propagación y conservación de germoplasma en: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Ediciones INTA. Segunda Edición. ARGENTINA. 353 – 357 p.
- Öpik, H; Rolfe, A. 2005. The physiology of flowering plants. Cambridge University Press. Fourth Edition. 404 pp.
- Quintero, I; Polo, J; Jarma, A; Espitia, A. 2003. Enraizamiento *in vitro* de *Dioscoreas* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol V No. 2. Pp 51-56.
- Quero, P. 2004. Propagación *in vitro* y evaluación en la fase de vivero de la piña (*Ananas comosus* L. Merr). C.V Española Roja. Disponible en línea: www.bibagr.ucla.edu.ve. revisada el 23 de marzo del 2008. 1p.
- Ramanayake, S; Meemaduma, V; Weerawardene; T. 2006. *In vitro* shoot proliferation and enhancement of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* “Striata”). *Scientia Horticulturae*. 110: 109-113.
- Raven, P; Ray, E; Eichhorn, S. 1992. Biología de las plantas. Reverte Editorial. Volumen 2, España – Barcelona, 777 pág.
- Rojas, M; Ramírez, H. 1993. Control Hormonal del Desarrollo de las Plantas. Fisiología – Tecnología – Experimentación. Segunda Edición. Edit. LIMUSA, S.A. México. 29 –34 p.
- Roca, W; Mroginski, L. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. En: cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT. Colombia. 19 – 40 p.
- Roca, W; Ramírez, H. 2000. Introducción a la Biotecnología Vegetal. Coordinador de la Producción de Documentos Originales: Vicente Zapata S., Ed. D., Cali, Colombia. 174 p.
- Rossi, C; González, S. 2006. Problemas en la calidad de semillas de soja. *Revista INIA*, (9), 34–36.
- Rost, L; Michael, G; Ralph, S; Terence, M. 1998. Plant Biology. Wadsworth Publishing Company. 537 pp.
- Ruvalcaba, D; Rojas, D; Valencia, A. 2010. Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12 (1): 139-143.

- Sánchez, M; Sánchez, C; Villanueva, C; Gil, I; Jiménez, M; Sánchez, I. 2009. Multiplicación *in vitro* vía organogénesis en calabaza. *Agronomía mesoamericana* 20(1). p.5.
- Salisbury, F; Ross, C. 1992. *Fisiología Vegetal*. Primera Edición. Editorial Iberoamérica. México, D.F. pp. 423-435.
- Salisbury, F; Ross, C. 2000. *Fisiología de las Plantas*. Desarrollo de las plantas y Fisiología ambiental. Edit. Paraninfo. 988 p.
- Shah, R; Zamir, J; Ali, H; Lutfullah, G. 2008. *In vitro* regeneration of plantlets from seedlings explants of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Safeda. *Pakistan Journal of Botany* 40(3): 1195-1200.
- Soberón, J; Quiroga, E; Sampietro, A; Vattuone, M. 2005. "Citocininas". Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán. Argentina. Disponible en:
<http://www.biologia.edu.ar/plantas/reguladores_vegetales_2005/Citocinas.htm> (27/09/11).
- Soberón, J; Quiroga, E; Sampietro, A; Vattuone, M. 2005. "Giberalinas". Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán. Argentina. Disponible en:
<http://www.biologia.edu.ar/plantas/reguladores_vegetales_2005/giberelinas.htm> (27/07/11).
- Suárez, I; Jarma, A; Ávila, M. 2006. Desarrollo de un protocolo para la propagación *in vitro* de Roble (*Quercus robur* L.). Universidad de Córdoba.
- Taiz, L; Zeiger, E. 1998. *Plant physiology*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers. 792 págs.
- Taiz, L; Zeiger, E. 2006. *Fisiología Vegetal*. Valencia, España: Universitat Jaume I, 2(1), pp. 1129-1130.
- Villalobos, V; Thorpe, T. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Centro internacional de agricultura tropical. CIAT. Colombia. 128 p.

- Viñas, M; Fernández-Brenes, M; Azofeifa, A; Jiménez, V. 2012. *In vitro* propagation of purple pitahaya (*Hylocereus costaricensis* [F. A. C. Weber] Britton & Rose) cv. Cebra. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 48 (5): 469-477; doi:10.2307/23326875.
- Viola, U; Franz, C. 1989. *In vitro* propagation of *Gentiana lutea*. *Planta medica*; 55(7): 290.
- Morgan, W. 1901. Cultivo de tejidos vegetales. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina.
- Weaver, R. 1976. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Editorial Trillas. México. 621 pág.
- Werner, T; Motyka, V; Strnad, M. 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:10487 - 10492.
- White, P. 1932. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plantphysiology* 3. 184 pág.
- Yldefonzo, M. 2013. Influencia de la Bencilaminopurina (BAP) en la multiplicación *in vitro* de *Oreocallis grandiflora* (Lam) R. Br. (Chacpá). Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo. Huaraz, Perú. 45pp.

ANEXOS

ANEXO 1. Datos obtenidos en la evaluación de los resultados

Tabla 16. Resultados de la Fase de Establecimiento para la variable longitud promedio (cm) del eje caulinar. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| Datos Originales | | | | | | | |
|------------------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|------|
| Trat | R1 | R2 | R3 | R4 | Total | Prom | Prom |
| 1 | 4.71 | 4.67 | 4.51 | 4.33 | 18.22 | 4.56 | 5.57 |
| 2 | 5.25 | 5.64 | 5.73 | 5.5 | 22.12 | 5.53 | |
| 3 | 5.84 | 6.02 | 5.75 | 5.73 | 23.34 | 5.84 | |
| 4 | 6.17 | 5.82 | 6.69 | 6 | 24.68 | 6.17 | |
| 5 | 5.98 | 5.73 | 5.33 | 5.85 | 22.89 | 5.72 | |
| 6 | 5.91 | 5.6 | 6.03 | 5.88 | 23.42 | 5.86 | |
| 7 | 5.93 | 5.67 | 5.85 | 5.97 | 23.42 | 5.86 | |
| 8 | 6.4 | 5.84 | 6 | 6.06 | 24.30 | 6.08 | |
| 9 | 6.24 | 6.31 | 6.24 | 6.31 | 25.10 | 6.28 | |
| 10 | 6 | 6.08 | 5.77 | 6.16 | 24.01 | 6.00 | |
| 11 | 4.84 | 5 | 5.24 | 5.12 | 20.20 | 5.05 | |
| 12 | 5.17 | 5.07 | 5.27 | 5.11 | 20.62 | 5.16 | |
| 13 | 5.51 | 5.46 | 5.22 | 5.19 | 21.38 | 5.35 | |
| 14 | 5.21 | 5.05 | 5.55 | 5.81 | 21.62 | 5.41 | |
| 15 | 5.24 | 4.88 | 5.37 | 5.2 | 20.69 | 5.17 | |
| 16 | 4.97 | 5.03 | 5.26 | 5.14 | 20.40 | 5.10 | |
| Total | 89.37 | 87.87 | 89.81 | 89.36 | 356.41 | 89.10 | |

Promedios de los niveles de KIN en cada uno de los niveles de BAP

| Niveles de | Niveles de k | | | |
|------------|--------------|------|------|------|
| b | k0 | K0.4 | K0.8 | K1.6 |
| 0 | 4.56 | 5.72 | 6.28 | 5.35 |
| 2 | 5.53 | 5.86 | 6 | 5.41 |
| 4 | 5.84 | 5.86 | 5.05 | 5.17 |
| 8 | 6.17 | 6.08 | 5.16 | 5.1 |

Tabla 17. Prueba de significación de Duncan al 5 % de probabilidades en la Fase de Establecimiento para la longitud promedio (cm) del eje caulinar. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| TRT | KIN | BAP | MEDIA | SIGNIFICACION | | | |
|-----|-----|-----|--------|---------------|---|---|---|
| 9 | 0.8 | 0 | 6.2750 | | | | A |
| 4 | 0 | 8 | 6.1700 | B | | | A |
| 8 | 0.4 | 8 | 6.0750 | B | | A | C |
| 10 | 0.8 | 2 | 6.0025 | B | D | A | C |
| 6 | 0.4 | 2 | 5.8550 | B | D | E | C |
| 7 | 0.4 | 4 | 5.8550 | B | D | E | C |
| 3 | 0 | 4 | 5.8350 | | D | E | C |
| 5 | 0.4 | 0 | 5.7225 | | D | E | |
| 2 | 0 | 2 | 5.5300 | F | | E | |
| 14 | 1.6 | 2 | 5.4050 | F | | G | |
| 13 | 1.6 | 0 | 5.3450 | F | | G | H |
| 15 | 1.6 | 4 | 5.1725 | | | G | H |
| 12 | 0.8 | 8 | 5.1550 | | | G | H |
| 16 | 1.6 | 8 | 5.1000 | | | G | H |
| 11 | 0.8 | 4 | 5.0500 | | | | H |
| 1 | 0 | 0 | 4.5550 | | | | I |

Tabla 18. Resultados de la Fase de Establecimiento para la variable número promedio brotes.
 Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| Datos Originales | | | | | | |
|------------------|------|-----|------|------|-------|-------|
| TRAT | R1 | R2 | R3 | R4 | TOTAL | PROM |
| 1 | 0.7 | 0 | 1.2 | 1 | 2.9 | 0.73 |
| 2 | 1.6 | 0.9 | 1.4 | 1.3 | 5.2 | 1.30 |
| 3 | 1.4 | 1.4 | 1.1 | 0.6 | 4.5 | 1.13 |
| 4 | 0.7 | 0.9 | 0.7 | 0.8 | 3.1 | 0.78 |
| 5 | 0.9 | 0.7 | 0.8 | 0.8 | 3.2 | 0.80 |
| 6 | 1.1 | 1 | 1 | 1.3 | 4.4 | 1.10 |
| 7 | 1 | 0.9 | 1.1 | 1 | 4 | 1.00 |
| 8 | 1.1 | 0.9 | 1 | 1.1 | 4.1 | 1.03 |
| 9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.6 | 2.7 | 0.68 |
| 10 | 1.3 | 1.1 | 0.8 | 1.4 | 4.6 | 1.15 |
| 11 | 0.9 | 0.6 | 1.2 | 0.6 | 3.3 | 0.83 |
| 12 | 0.6 | 0.6 | 0.8 | 0.6 | 2.6 | 0.65 |
| 13 | 0.7 | 0.4 | 0.8 | 0.3 | 2.2 | 0.55 |
| 14 | 0.7 | 0.7 | 0.5 | 0.4 | 2.3 | 0.58 |
| 15 | 0.6 | 0.6 | 0.8 | 0.6 | 2.6 | 0.65 |
| 16 | 0.7 | 0.6 | 0.4 | 0.5 | 2.2 | 0.55 |
| Total | 14.8 | 12 | 14.2 | 12.9 | 53.9 | 13.48 |

Datos Transformados $Y = \sqrt{X + 1}$

| Trat | R1 | R2 | R3 | R4 | Total | Prom | Prom |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| 1 | 1.304 | 1 | 1.4832 | 1.414 | 5.20 | 1.30 | 1.35 |
| 2 | 1.612 | 1.37840488 | 1.5492 | 1.517 | 6.06 | 1.51 | |
| 3 | 1.549 | 1.54919334 | 1.4491 | 1.265 | 5.81 | 1.45 | |
| 4 | 1.304 | 1.37840488 | 1.3038 | 1.342 | 5.33 | 1.33 | |
| 5 | 1.378 | 1.30384048 | 1.3416 | 1.342 | 5.37 | 1.34 | |
| 6 | 1.449 | 1.41421356 | 1.4142 | 1.517 | 5.79 | 1.45 | |
| 7 | 1.414 | 1.37840488 | 1.4491 | 1.414 | 5.66 | 1.41 | |
| 8 | 1.449 | 1.37840488 | 1.4142 | 1.449 | 5.69 | 1.42 | |
| 9 | 1.342 | 1.30384048 | 1.2649 | 1.265 | 5.18 | 1.29 | |
| 10 | 1.517 | 1.44913767 | 1.3416 | 1.549 | 5.86 | 1.46 | |
| 11 | 1.378 | 1.26491106 | 1.4832 | 1.265 | 5.39 | 1.35 | |
| 12 | 1.265 | 1.26491106 | 1.3416 | 1.265 | 5.14 | 1.28 | |
| 13 | 1.304 | 1.18321596 | 1.3416 | 1.14 | 4.97 | 1.24 | |
| 14 | 1.304 | 1.30384048 | 1.2247 | 1.183 | 5.02 | 1.25 | |
| 15 | 1.265 | 1.26491106 | 1.3416 | 1.265 | 5.14 | 1.28 | |
| 16 | 1.304 | 1.26491106 | 1.1832 | 1.225 | 4.98 | 1.24 | |
| Total | 22.14 | 21.08 | 21.93 | 21.42 | 86.56 | 21.64 | |

Promedios de los niveles de KIN en cada uno de los niveles de BAP

| Niveles de | Niveles de k | | | |
|-------------------|---------------------|-------------|-------------|-------------|
| b | k0 | K0.4 | K0.8 | K1.6 |
| 0 | 1.3 | 1.34 | 1.29 | 1.24 |
| 2 | 1.51 | 1.45 | 1.46 | 1.25 |
| 4 | 1.45 | 1.41 | 1.35 | 1.28 |
| 8 | 1.33 | 1.42 | 1.28 | 1.24 |

| Niveles k | |
|-----------|------|
| k | p |
| 0 | 1.4 |
| 0.4 | 1.41 |
| 0.8 | 1.35 |
| 1.6 | 1.25 |

| Niveles b | |
|-----------|------|
| b | y |
| 0 | 1.29 |
| 2 | 1.42 |
| 4 | 1.37 |
| 8 | 1.32 |

Tabla 19. Prueba de significación de Duncan al 5 % de probabilidades en la Fase de Establecimiento para las dosis de KIN y BAP en el número promedio de brotes. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| DOSIS KIN | MEDIA | SIGNIFICACION | |
|-----------|-------|---------------|---|
| 4 | 1.420 | A | |
| 8 | 1.374 | B | A |
| 1.6 | 1.320 | B | C |
| 0 | 1.294 | C | |

| DOSIS BAP | MEDIA | SIGNIFICACION | |
|-----------|-------|---------------|--|
| 2 | 1.406 | A | |
| 0 | 1.399 | A | |
| 4 | 1.347 | A | |
| 8 | 1.256 | B | |

Tabla 20. Resultados de la Fase de Establecimiento para la variable número promedio de hojas. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| Datos Originales | | | | | | |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| Trat | R1 | R2 | R3 | R4 | Total | Prom |
| 1 | 5.7 | 5.5 | 5.4 | 5.3 | 21.9 | 5.48 |
| 2 | 5.7 | 5.3 | 6.2 | 5.7 | 22.9 | 5.73 |
| 3 | 6.2 | 6.3 | 6.4 | 6.1 | 25 | 6.25 |
| 4 | 6.3 | 6.7 | 5.9 | 6.1 | 25 | 6.25 |
| 5 | 6.3 | 6.4 | 6.5 | 6.1 | 25.3 | 6.33 |
| 6 | 5.9 | 6.2 | 6 | 6.2 | 24.3 | 6.08 |
| 7 | 6.3 | 6.2 | 6.5 | 6.9 | 25.9 | 6.48 |
| 8 | 6.9 | 7.1 | 6.7 | 6.2 | 26.9 | 6.73 |
| 9 | 6.6 | 6.6 | 6.3 | 6.1 | 25.6 | 6.40 |
| 10 | 6.5 | 6 | 5.6 | 5.9 | 24 | 6.00 |
| 11 | 5.9 | 6.5 | 5.7 | 6.1 | 24.2 | 6.05 |
| 12 | 5.9 | 5.3 | 5.7 | 5.9 | 22.8 | 5.70 |
| 13 | 6.1 | 6.1 | 5.7 | 5.6 | 23.5 | 5.88 |
| 14 | 5.4 | 5.8 | 5.6 | 5.7 | 22.5 | 5.63 |
| 15 | 6.1 | 5.7 | 6.1 | 6.1 | 24 | 6.00 |
| 16 | 5.8 | 5.7 | 6.2 | 5.6 | 23.3 | 5.83 |
| Total | 97.6 | 97.4 | 96.5 | 95.6 | 387.1 | 96.78 |

Datos transformados $Y = \sqrt{X + 1}$

| Trat | R1 | R2 | R3 | R4 | Total | Prom | Prom |
|-------|-------|------------|--------|-------|--------|-------|------|
| 1 | 2.588 | 2.54950976 | 2.5298 | 2.51 | 10.18 | 2.54 | 2.65 |
| 2 | 2.588 | 2.50998008 | 2.6833 | 2.588 | 10.37 | 2.59 | |
| 3 | 2.683 | 2.70185122 | 2.7203 | 2.665 | 10.77 | 2.69 | |
| 4 | 2.702 | 2.77488739 | 2.6268 | 2.665 | 10.77 | 2.69 | |
| 5 | 2.702 | 2.7202941 | 2.7386 | 2.665 | 10.83 | 2.71 | |
| 6 | 2.627 | 2.68328157 | 2.6458 | 2.683 | 10.64 | 2.66 | |
| 7 | 2.702 | 2.68328157 | 2.7386 | 2.811 | 10.93 | 2.73 | |
| 8 | 2.811 | 2.84604989 | 2.7749 | 2.683 | 11.11 | 2.78 | |
| 9 | 2.757 | 2.75680975 | 2.7019 | 2.665 | 10.88 | 2.72 | |
| 10 | 2.739 | 2.64575131 | 2.569 | 2.627 | 10.58 | 2.65 | |
| 11 | 2.627 | 2.73861279 | 2.5884 | 2.665 | 10.62 | 2.65 | |
| 12 | 2.627 | 2.50998008 | 2.5884 | 2.627 | 10.35 | 2.59 | |
| 13 | 2.665 | 2.66458252 | 2.5884 | 2.569 | 10.49 | 2.62 | |
| 14 | 2.53 | 2.60768096 | 2.569 | 2.588 | 10.29 | 2.57 | |
| 15 | 2.665 | 2.58843582 | 2.6646 | 2.665 | 10.58 | 2.65 | |
| 16 | 2.608 | 2.58843582 | 2.6833 | 2.569 | 10.45 | 2.61 | |
| Total | 42.62 | 42.57 | 42.41 | 42.24 | 169.84 | 42.46 | |

Promedios de los niveles de KIN en cada uno de los niveles de BAP

| Niveles de | Niveles de k | | | |
|------------|--------------|------|------|------|
| b | k0 | K0.4 | K0.8 | K1.6 |
| 0 | 2.54 | 2.71 | 2.72 | 2.62 |
| 2 | 2.59 | 2.66 | 2.65 | 2.57 |
| 4 | 2.69 | 2.73 | 2.65 | 2.65 |
| 8 | 2.69 | 2.78 | 2.59 | 2.61 |

Tabla 21. Prueba de significación de Duncan al 5 % de probabilidades en la Fase de Establecimiento para el número promedio de hojas. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| TRT | KIN | BAP | MEDIA | SIGNIFICACION | | | | |
|-----|-----|-----|-------|---------------|---|---|---|---|
| 8 | 0.4 | 8 | 2.778 | A | | | | |
| 7 | 0.4 | 4 | 2.733 | B | A | | | |
| 9 | 0.8 | 0 | 2.720 | B | A | C | | |
| 5 | 0.4 | 0 | 2.706 | B | A | C | | |
| 3 | 0 | 4 | 2.692 | B | D | C | | |
| 4 | 0 | 8 | 2.692 | B | D | C | | |
| 6 | 0.4 | 2 | 2.659 | B | E | D | C | |
| 11 | 0.8 | 4 | 2.654 | F | B | E | D | C |
| 15 | 1.6 | 4 | 2.645 | F | E | D | C | |
| 10 | 0.8 | 2 | 2.645 | F | E | D | C | |
| 13 | 1.6 | 0 | 2.621 | F | G | E | D | |
| 16 | 1.6 | 8 | 2.612 | F | G | E | D | |
| 2 | 0 | 2 | 2.592 | F | G | E | | |
| 12 | 0.8 | 8 | 2.588 | F | G | E | | |
| 14 | 1.6 | 2 | 2.573 | F | G | | | |
| 1 | 0 | 0 | 2.544 | G | | | | |

Tabla 22. Resultados de la Fase de Establecimiento para la variable número promedio de yemas. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| Datos originales | | | | | | |
|-------------------------|--------------|------------|------------|------------|--------------|-------------|
| Trat | R1 | R2 | R3 | R4 | Total | Prom |
| 1 | 6.4 | 6.7 | 6.3 | 6.1 | 25.5 | 6.38 |
| 2 | 6.4 | 6.5 | 7.1 | 6.7 | 26.7 | 6.68 |
| 3 | 7.5 | 6.8 | 7 | 6.6 | 27.9 | 6.98 |
| 4 | 6.8 | 7.1 | 6.4 | 6.6 | 26.9 | 6.73 |
| 5 | 7 | 6.9 | 7.2 | 6.7 | 27.8 | 6.95 |
| 6 | 6.6 | 7 | 6.8 | 7.2 | 27.6 | 6.90 |
| 7 | 7.1 | 6.9 | 7.2 | 7.5 | 28.7 | 7.18 |
| 8 | 7.5 | 8.2 | 7.6 | 7.1 | 30.4 | 7.60 |
| 9 | 7.5 | 7.2 | 7.4 | 7.3 | 29.4 | 7.35 |
| 10 | 7.7 | 7.1 | 7 | 7.2 | 29 | 7.25 |
| 11 | 6.9 | 7.6 | 6.8 | 7.1 | 28.4 | 7.10 |
| 12 | 6.7 | 5.9 | 6.7 | 7.1 | 26.4 | 6.60 |
| 13 | 7.1 | 7.6 | 6.6 | 7 | 28.3 | 7.08 |
| 14 | 6.6 | 7.3 | 6.6 | 6.5 | 27 | 6.75 |
| 15 | 7 | 6.4 | 7.3 | 6.8 | 27.5 | 6.88 |
| 16 | 6.7 | 6.5 | 6.6 | 6.6 | 26.4 | 6.60 |
| Total | 111.5 | 112 | 111 | 110 | 443.9 | 111 |

Datos transformados $Y = \sqrt{X + 1}$

| Trat | R1 | R2 | R3 | R4 | Total | Prom | Prom |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|-------------|
| 1 | 2.72 | 2.77488739 | 2.7019 | 2.665 | 10.86 | 2.72 | 2.82 |
| 2 | 2.72 | 2.73861279 | 2.846 | 2.775 | 11.08 | 2.77 | |
| 3 | 2.915 | 2.79284801 | 2.8284 | 2.757 | 11.29 | 2.82 | |
| 4 | 2.793 | 2.84604989 | 2.7203 | 2.757 | 11.12 | 2.78 | |
| 5 | 2.828 | 2.81069386 | 2.8636 | 2.775 | 11.28 | 2.82 | |
| 6 | 2.757 | 2.82842712 | 2.7928 | 2.864 | 11.24 | 2.81 | |
| 7 | 2.846 | 2.81069386 | 2.8636 | 2.915 | 11.44 | 2.86 | |
| 8 | 2.915 | 3.03315018 | 2.9326 | 2.846 | 11.73 | 2.93 | |
| 9 | 2.915 | 2.86356421 | 2.8983 | 2.881 | 11.56 | 2.89 | |
| 10 | 2.95 | 2.84604989 | 2.8284 | 2.864 | 11.49 | 2.87 | |
| 11 | 2.811 | 2.93257566 | 2.7928 | 2.846 | 11.38 | 2.85 | |
| 12 | 2.775 | 2.62678511 | 2.7749 | 2.846 | 11.02 | 2.76 | |
| 13 | 2.846 | 2.93257566 | 2.7568 | 2.828 | 11.36 | 2.84 | |
| 14 | 2.757 | 2.88097206 | 2.7568 | 2.739 | 11.13 | 2.78 | |
| 15 | 2.828 | 2.7202941 | 2.881 | 2.793 | 11.22 | 2.81 | |
| 16 | 2.775 | 2.73861279 | 2.7568 | 2.757 | 11.03 | 2.76 | |
| Total | 45.15 | 45.18 | 45.00 | 44.91 | 180.23 | 45.06 | |

Promedios de los niveles de KIN en cada uno de los niveles de BAP

| Niveles de | Niveles de k | | | |
|-------------------|---------------------|-------------|-------------|-------------|
| b | k0 | K0.4 | k0.8 | k1.6 |
| 0 | 2.72 | 2.82 | 2.89 | 2.84 |
| 2 | 2.77 | 2.81 | 2.87 | 2.78 |
| 4 | 2.82 | 2.86 | 2.85 | 2.81 |
| 8 | 2.78 | 2.93 | 2.76 | 2.76 |

Tabla 23. Prueba de significación de Duncan al 5 % de probabilidades en la Fase de Establecimiento para el número promedio de yemas. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| TRT | KIN | BAP | MEDIA | SIGNIFICACION | | | | |
|-----|-----|-----|-------|---------------|---|---|---|---|
| 8 | 0.4 | 8 | 2.931 | | | | | A |
| 9 | 0.8 | 0 | 2.889 | | B | | | A |
| 10 | 0.8 | 2 | 2.872 | | B | | A | C |
| 7 | 0.4 | 4 | 2.858 | | B | D | A | C |
| 11 | 0.8 | 4 | 2.845 | E | B | D | A | C |
| 13 | 1.6 | 0 | 2.840 | E | B | D | A | C |
| 3 | 0 | 4 | 2.823 | E | B | D | | C |
| 5 | 0.4 | 0 | 2.819 | E | B | D | | C |
| 6 | 0.4 | 2 | 2.810 | E | B | D | F | C |
| 15 | 1.6 | 4 | 2.805 | E | B | D | F | C |
| 14 | 1.6 | 2 | 2.783 | E | | D | F | C |
| 4 | 0 | 8 | 2.779 | E | | D | F | C |
| 2 | 0 | 2 | 2.769 | E | | D | F | |
| 16 | 1.6 | 8 | 2.756 | E | | | F | |
| 12 | 0.8 | 8 | 2.755 | E | | | F | |
| 1 | 0 | 0 | 2.715 | | | | | F |

Tabla 24. Resultados de la Fase de Enraizamiento para la variable número promedio de raíces adventicias de primer orden. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| Datos originales | | | | | | |
|------------------|------|------|------|------|-------|-------|
| Trat | R1 | R2 | R3 | R4 | Total | Prom |
| 1 | 5.1 | 5.4 | 4.3 | 4.9 | 19.7 | 4.93 |
| 2 | 5.3 | 5.2 | 6.3 | 5.6 | 22.4 | 5.60 |
| 3 | 5.5 | 6 | 5.7 | 5.8 | 23 | 5.75 |
| 4 | 5.5 | 5.6 | 5.7 | 5.4 | 22.2 | 5.55 |
| 5 | 6.1 | 5.8 | 5.6 | 5.4 | 22.9 | 5.73 |
| 6 | 5.3 | 5.4 | 5.8 | 5 | 21.5 | 5.38 |
| 7 | 6.8 | 6.9 | 6.9 | 6.4 | 27 | 6.75 |
| 8 | 6.1 | 6.5 | 6.6 | 6 | 25.2 | 6.30 |
| 9 | 6.4 | 6.6 | 6 | 6.2 | 25.2 | 6.30 |
| 10 | 5.8 | 5.8 | 5.9 | 6.6 | 24.1 | 6.03 |
| 11 | 5.4 | 5.3 | 6 | 5.8 | 22.5 | 5.63 |
| 12 | 6.4 | 6.1 | 6.3 | 6.3 | 25.1 | 6.28 |
| 13 | 5.8 | 6.8 | 6.2 | 6.3 | 25.1 | 6.28 |
| 14 | 6.2 | 6.2 | 6.3 | 6.2 | 24.9 | 6.23 |
| 15 | 6.8 | 6.1 | 6.1 | 6.2 | 25.2 | 6.30 |
| 16 | 7.1 | 5.6 | 5.8 | 6.5 | 25 | 6.25 |
| Total | 95.6 | 95.3 | 95.5 | 94.6 | 381 | 95.25 |

Datos transformados $Y = \sqrt{X + 1}$

| Trat | R1 | R2 | R3 | R4 | Total | Prom | Prom |
|-------------|-----------|------------|-----------|-----------|--------------|-------------|-------------|
| 1 | 2.47 | 2.52982213 | 2.3022 | 2.429 | 9.73 | 2.43 | 2.63 |
| 2 | 2.51 | 2.48997992 | 2.7019 | 2.569 | 10.27 | 2.57 | |
| 3 | 2.55 | 2.64575131 | 2.5884 | 2.608 | 10.39 | 2.60 | |
| 4 | 2.55 | 2.56904652 | 2.5884 | 2.53 | 10.24 | 2.56 | |
| 5 | 2.665 | 2.60768096 | 2.569 | 2.53 | 10.37 | 2.59 | |
| 6 | 2.51 | 2.52982213 | 2.6077 | 2.449 | 10.10 | 2.52 | |
| 7 | 2.793 | 2.81069386 | 2.8107 | 2.72 | 11.13 | 2.78 | |
| 8 | 2.665 | 2.73861279 | 2.7568 | 2.646 | 10.81 | 2.70 | |
| 9 | 2.72 | 2.75680975 | 2.6458 | 2.683 | 10.81 | 2.70 | |
| 10 | 2.608 | 2.60768096 | 2.6268 | 2.757 | 10.60 | 2.65 | |
| 11 | 2.53 | 2.50998008 | 2.6458 | 2.608 | 10.29 | 2.57 | |
| 12 | 2.72 | 2.66458252 | 2.7019 | 2.702 | 10.79 | 2.70 | |
| 13 | 2.608 | 2.79284801 | 2.6833 | 2.702 | 10.79 | 2.70 | |
| 14 | 2.683 | 2.68328157 | 2.7019 | 2.683 | 10.75 | 2.69 | |
| 15 | 2.793 | 2.66458252 | 2.6646 | 2.683 | 10.81 | 2.70 | |
| 16 | 2.846 | 2.56904652 | 2.6077 | 2.739 | 10.76 | 2.69 | |
| Total | 42.22 | 42.17 | 42.20 | 42.04 | 168.63 | 42.16 | |

Promedios de los niveles de KIN en cada uno de los niveles de BAP

| Niveles de | Niveles de k | | | |
|-------------------|---------------------|------|------|------|
| b | k0 | K0.4 | K0.8 | K1.6 |
| 0 | 2.43 | 2.59 | 2.7 | 2.7 |
| 2 | 2.57 | 2.52 | 2.65 | 2.69 |
| 4 | 2.6 | 2.78 | 2.57 | 2.7 |
| 8 | 2.56 | 2.7 | 2.7 | 2.69 |

Tabla 25. Prueba de significación de Duncan al 5 % de probabilidades en la Fase de Establecimiento para el número promedio de raíces adventicias de primer orden. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| TRT | KIN | BAP | MEDIA | SIGNIFICACION | | |
|-----|-----|-----|-------|---------------|---|---|
| 7 | 0.4 | 4 | 2.783 | A | | |
| 8 | 0.4 | 8 | 2.701 | B | A | |
| 15 | 1.6 | 4 | 2.701 | B | A | |
| 9 | 0.8 | 0 | 2.701 | B | A | |
| 12 | 0.8 | 8 | 2.697 | B | A | |
| 13 | 1.6 | 0 | 2.696 | B | A | |
| 16 | 1.6 | 8 | 2.690 | B | A | |
| 14 | 1.6 | 2 | 2.687 | B | A | |
| 10 | 0.8 | 2 | 2.650 | B | C | |
| 3 | 0 | 4 | 2.598 | B | C | D |
| 5 | 0.4 | 0 | 2.593 | B | C | D |
| 11 | 0.8 | 4 | 2.573 | | C | D |
| 2 | 0 | 2 | 2.567 | | C | D |
| 4 | 0 | 8 | 2.559 | | C | D |
| 6 | 0.4 | 2 | 2.524 | | E | D |
| 1 | 0 | 0 | 2.432 | | E | |

Tabla 26. Resultados de la Fase de Enraizamiento para la variable número promedio de raíces adventicias de primer orden. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

Datos originales

| Trat | R1 | R2 | R3 | Total | Prom |
|-------|-----|------|------|-------|-------|
| 1 | 5 | 4.7 | 5.2 | 14.9 | 4.97 |
| 2 | 5.2 | 5.5 | 5.1 | 15.8 | 5.27 |
| 3 | 5.4 | 5.3 | 5.2 | 15.9 | 5.30 |
| 4 | 5.2 | 5.2 | 5.5 | 15.9 | 5.30 |
| 5 | 5.5 | 5.6 | 5.7 | 16.8 | 5.60 |
| 6 | 5.1 | 5.8 | 6.9 | 17.8 | 5.93 |
| 7 | 7.1 | 6 | 6.2 | 19.3 | 6.43 |
| 8 | 6.9 | 6.6 | 6.5 | 20 | 6.67 |
| 9 | 5.6 | 6.5 | 6.3 | 18.4 | 6.13 |
| Total | 51 | 51.2 | 52.6 | 154.8 | 51.60 |

Datos transformados $Y = \sqrt{X + 1}$

| Trat | R1 | R2 | R3 | Total | Prom | Prom |
|-------|---------|--------|--------|-------|-------|------|
| 1 | 2.44949 | 2.3875 | 2.49 | 7.33 | 2.44 | 2.59 |
| 2 | 2.48998 | 2.5495 | 2.4698 | 7.51 | 2.50 | |
| 3 | 2.52982 | 2.51 | 2.49 | 7.53 | 2.51 | |
| 4 | 2.48998 | 2.49 | 2.5495 | 7.53 | 2.51 | |
| 5 | 2.54951 | 2.569 | 2.5884 | 7.71 | 2.57 | |
| 6 | 2.46982 | 2.6077 | 2.8107 | 7.89 | 2.63 | |
| 7 | 2.84605 | 2.6458 | 2.6833 | 8.18 | 2.73 | |
| 8 | 2.81069 | 2.7568 | 2.7386 | 8.31 | 2.77 | |
| 9 | 2.56905 | 2.7386 | 2.7019 | 8.01 | 2.67 | |
| Total | 23.20 | 23.25 | 23.52 | 69.98 | 23.33 | |

Promedios de los niveles de AG₃ en cada uno de los niveles de ANA

| Niveles de n | Niveles de a | | |
|--------------|--------------|------|------|
| | a0 | A0.2 | A0.4 |
| 0 | 4.97 | 5.3 | 6.43 |
| 0.01 | 5.27 | 5.6 | 6.67 |
| 0.1 | 5.3 | 5.93 | 6.13 |

| Niveles a | |
|-----------|------|
| a | p |
| 0 | 5.18 |
| 0.2 | 5.61 |
| 0.4 | 6.41 |

| Niveles n | |
|-----------|------|
| n | p |
| 0 | 5.57 |
| 0.01 | 5.85 |
| 0.1 | 5.79 |

Tabla 27. Prueba de significación de Duncan al 5 % de probabilidades en la Fase de Enraizamiento para el número promedio de raíces adventicias de primer orden. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| DOSIS AG ₃ | MEDIA | SIGNIFICACION | DOSIS ANA | MEDIA | SIGNIFICACION |
|-----------------------|-------|---------------|-----------|-------|---------------|
| 0.4 | 6.41 | A | 0.01 | 5.85 | A |
| 0.2 | 5.61 | B | 0.1 | 5.79 | B A |
| 0 | 5.18 | B | 0 | 5.57 | B A |

Tabla 28. Resultados de la Fase de Enraizamiento para la variable promedio (cm) de longitud de raíces adventicias de primer orden. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| Datos originales | | | | | | | |
|------------------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|------|
| Trat | R1 | R2 | R3 | R4 | Total | Prom | Prom |
| 1 | 3.95 | 3.37 | 3.65 | 3.18 | 14.15 | 3.54 | 4.85 |
| 2 | 4.22 | 4.72 | 4.97 | 4.63 | 18.54 | 4.64 | |
| 3 | 5.29 | 5.02 | 5.16 | 5.04 | 20.51 | 5.13 | |
| 4 | 5.3 | 5.18 | 4.77 | 4.76 | 20.01 | 5.00 | |
| 5 | 5.36 | 5.47 | 5.19 | 5.81 | 21.83 | 5.46 | |
| 6 | 4.87 | 4.67 | 4.99 | 4.78 | 19.31 | 4.83 | |
| 7 | 5.36 | 5.37 | 5.29 | 5.31 | 21.33 | 5.33 | |
| 8 | 4.99 | 5.07 | 5.28 | 5.33 | 20.67 | 5.17 | |
| 9 | 5.72 | 5.49 | 5.31 | 5.01 | 21.53 | 5.38 | |
| 10 | 4.72 | 4.84 | 5.11 | 5.29 | 19.96 | 4.99 | |
| 11 | 8.44 | 4.63 | 5.2 | 5.05 | 23.32 | 5.83 | |
| 12 | 4.17 | 4.52 | 4.93 | 4.83 | 18.45 | 4.61 | |
| 13 | 4.9 | 4.96 | 4.56 | 4.77 | 19.19 | 4.80 | |
| 14 | 4.66 | 4.7 | 4.61 | 4.16 | 18.13 | 4.53 | |
| 15 | 4.02 | 4.05 | 4.5 | 4.21 | 16.78 | 4.20 | |
| 16 | 4.1 | 3.93 | 4.31 | 4.28 | 16.62 | 4.16 | |
| Total | 80.07 | 75.99 | 77.83 | 76.44 | 310.33 | 77.58 | |

Promedios de los niveles de KIN en cada uno de los niveles de BAP

| Niveles de | Niveles de k | | | |
|------------|--------------|------|------|------|
| b | k0 | K0.4 | K0.8 | K1.6 |
| 0 | 3.54 | 5.46 | 5.38 | 4.8 |
| 2 | 4.64 | 4.83 | 4.99 | 4.53 |
| 4 | 5.13 | 5.33 | 5.83 | 4.2 |
| 8 | 5 | 5.17 | 4.61 | 4.16 |

Tabla 29. Prueba de significación de Duncan al 5 % de probabilidades en la Fase de Establecimiento para longitud (cm) de raíces adventicias de primer orden. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| TRT | KIN | BAP | MEDIA | SIGNIFICACION | | | | |
|-----|-----|-----|-------|---------------|---|---|---|---|
| 11 | 0.8 | 4 | 5.830 | | | | A | |
| 5 | 0.4 | 0 | 5.457 | B | | | A | |
| 9 | 0.8 | 0 | 5.382 | B | | A | C | |
| 7 | 0.4 | 4 | 5.332 | B | D | A | C | |
| 8 | 0.4 | 8 | 5.167 | B | D | A | C | |
| 3 | 0 | 4 | 5.127 | B | D | A | C | |
| 4 | 0 | 8 | 5.002 | B | D | E | C | |
| 10 | 0.8 | 2 | 4.990 | B | D | E | C | |
| 6 | 0.4 | 2 | 4.827 | F | B | D | E | C |
| 13 | 1.6 | 0 | 4.797 | F | B | D | E | C |
| 2 | 0 | 2 | 4.635 | F | B | D | E | C |
| 12 | 0.8 | 8 | 4.612 | F | | D | E | C |
| 14 | 1.6 | 2 | 4.532 | F | | D | E | |
| 15 | 1.6 | 4 | 4.195 | F | G | | E | |
| 16 | 1.6 | 8 | 4.155 | F | G | | | |
| 1 | 0 | 0 | 3.537 | | G | | | |

Tabla 30. Resultados de la Fase de Enraizamiento para la variable promedio de longitud (cm) de raíces adventicias de primer orden. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| Datos originales | | | | | | |
|------------------|-------|-------|-------|--------|-------|------|
| Trat | R1 | R2 | R3 | Total | Prom | Prom |
| 1 | 3.33 | 3.24 | 3.46 | 10.03 | 3.34 | 4.01 |
| 2 | 3.27 | 3.18 | 3.28 | 9.73 | 3.24 | |
| 3 | 3.08 | 3.35 | 3.39 | 9.82 | 3.27 | |
| 4 | 3.74 | 4.08 | 3.6 | 11.42 | 3.81 | |
| 5 | 3.43 | 4.37 | 5.32 | 13.12 | 4.37 | |
| 6 | 4.62 | 4.61 | 5.05 | 14.28 | 4.76 | |
| 7 | 5.01 | 4.55 | 4.72 | 14.28 | 4.76 | |
| 8 | 4.17 | 4.53 | 4.22 | 12.92 | 4.31 | |
| 9 | 4.37 | 4.17 | 4.25 | 12.79 | 4.26 | |
| Total | 35.02 | 36.08 | 37.29 | 108.39 | 36.13 | |

Promedios de los niveles de AG₃ en cada uno de los niveles de ANA

| Niveles de n | Niveles de a | | |
|--------------|--------------|------|------|
| | a0 | A0.2 | A0.4 |
| 0 | 3.34 | 3.81 | 4.76 |
| 0.01 | 3.24 | 4.37 | 4.31 |
| 0.1 | 3.27 | 4.76 | 4.26 |

Tabla 31. Prueba de significación de Duncan al 5 % de probabilidades en la Fase de Enraizamiento para longitud (cm) de raíces adventicias de primer orden. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| TRT | AG ₃ | ANA | MEDIA | SIGNIFICACION | |
|-----|-----------------|------|-------|---------------|---|
| 6 | 0.2 | 0.1 | 4.760 | A | |
| 7 | 0.4 | 0 | 4.760 | A | |
| 5 | 0.2 | 0.01 | 4.373 | B | A |
| 8 | 0.4 | 0.01 | 4.306 | B | A |
| 9 | 0.4 | 0.1 | 4.263 | B | A |
| 4 | 0.2 | 0 | 3.806 | B | C |
| 1 | 0 | 0 | 3.343 | C | |
| 3 | 0 | 0.1 | 3.273 | C | |
| 2 | 0 | 0.01 | 3.243 | C | |

Tabla 32. Resultados de la Fase de Enraizamiento para la variable número promedio de raíces adventicias de segundo orden. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

Datos originales

| Trat | R1 | R2 | R3 | Total | Prom |
|-------|-----|------|------|-------|-------|
| 1 | 6.1 | 5.5 | 5.4 | 17 | 5.67 |
| 2 | 5.4 | 6.3 | 6.4 | 18.1 | 6.03 |
| 3 | 6 | 6.1 | 5.8 | 17.9 | 5.97 |
| 4 | 6.1 | 6.5 | 7.2 | 19.8 | 6.60 |
| 5 | 7.3 | 7.4 | 7.4 | 22.1 | 7.37 |
| 6 | 7.1 | 7.5 | 7.2 | 21.8 | 7.27 |
| 7 | 8.1 | 7.1 | 7.9 | 23.1 | 7.70 |
| 8 | 9 | 9.5 | 8.6 | 27.1 | 9.03 |
| 9 | 6.9 | 8.6 | 6.8 | 22.3 | 7.43 |
| Total | 62 | 64.5 | 62.7 | 189.2 | 63.07 |

Datos transformados $Y = \sqrt{X + 1}$

| Trat | R1 | R2 | R3 | Total | Prom | Prom |
|-------|---------|--------|--------|-------|-------|------|
| 1 | 2.66458 | 2.5495 | 2.5298 | 7.74 | 2.58 | 2.82 |
| 2 | 2.52982 | 2.7019 | 2.7203 | 7.95 | 2.65 | |
| 3 | 2.64575 | 2.6646 | 2.6077 | 7.92 | 2.64 | |
| 4 | 2.66458 | 2.7386 | 2.8636 | 8.27 | 2.76 | |
| 5 | 2.88097 | 2.8983 | 2.8983 | 8.68 | 2.89 | |
| 6 | 2.84605 | 2.9155 | 2.8636 | 8.63 | 2.88 | |
| 7 | 3.01662 | 2.846 | 2.9833 | 8.85 | 2.95 | |
| 8 | 3.16228 | 3.2404 | 3.0984 | 9.50 | 3.17 | |
| 9 | 2.81069 | 3.0984 | 2.7928 | 8.70 | 2.90 | |
| Total | 25.22 | 25.65 | 25.36 | 76.23 | 25.41 | |

Promedios de los niveles de AG₃ en cada uno de los niveles de ANA

| Niveles de n | Niveles de a | | |
|--------------|--------------|------|------|
| | a0 | a0.2 | a0.4 |
| 0 | 5.67 | 6.6 | 7.7 |
| 0.01 | 6.03 | 7.37 | 9.03 |
| 0.1 | 5.97 | 7.27 | 7.43 |

| Niveles a | |
|-----------|------|
| a | p |
| 0 | 5.89 |
| 0.2 | 7.08 |
| 0.4 | 8.05 |

| Niveles n | |
|-----------|------|
| n | p |
| 0 | 6.66 |
| 0.01 | 7.48 |
| 0.1 | 6.89 |

Tabla 33. Prueba de significación de Duncan al 5 % de probabilidades en la Fase de Enraizamiento para el número promedio de raíces adventicias de segundo orden. Datos registrados a los noventa días de la siembra *in vitro*.

| DOSIS AG ₃ | MEDIA | SIGNIFICACION | DOSIS ANA | MEDIA | SIGNIFICACION |
|-----------------------|-------|---------------|-----------|-------|---------------|
| 0.4 | 8.05 | A | 0.01 | 7.48 | A |
| 0.2 | 7.08 | B | 0.1 | 6.89 | B A |
| 0 | 5.89 | C | 0 | 6.66 | B |

ANEXO 2. Cambio o repique del kiwi del medio MS 1962 a sustrato (aserrín de pino)



Figura 17. Imagen del proceso de repique o cambio de sustrato del kiwi: (A) Desinfección de la planta, (B) Planta completa con sus raíces, (C) Colocando la planta dentro del vaso con sustrato, (D) Llenado de sustrato hasta cubrir las raíces, (E) y (F) Tapado y sellado de frascos y (G) y (H) Adaptación en el cuarto de cultivo por quince días.-