

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**



**T E S I S**

**EFFECTO DE LA CITOCININA (6-Benzil Amino Purina) Y AUXINA (Ácido Indol -3-Butírico) EN LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE TRES CLONES DE *Alstroemeria* spp.**

Para optar el título profesional de

**INGENIERO AGRÓNOMO**

Presentado por la Bachiller:

**KATHERINE ELIZABETH ROJAS CASANOVA**

Asesores:

**Dr. SEGUNDO BERARDO ESCALANTE ZUMAETA**

**Ing. MANUEL MALPICA RODRÍGUEZ**

**CAJAMARCA – PERÚ**

**2019**



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Cajamarca, a los once días del mes de noviembre del Año dos mil diecinueve, se reunieron en el ambiente 2C-211 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° 142-2019 -FCA-UNC, Fecha 31 de Mayo del 2019, con el objeto de Evaluar la sustentación del Trabajo de Tesis titulado: “EFECTO DE LA CITOCININA (6-Benzil Amino Purina) Y AUXINA (Ácido Indol -3-Butírico) EN LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE TRES CLONES DE *Alstroemeria spp*”, de la Bachiller: **ROJAS CASANOVA KATHERINE ELIZABETH** en Cajamarca, para optar el Título Profesional de **INGENIERO AGRÓNOMO**.

A las **diecisiete** horas y **nueve** 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.

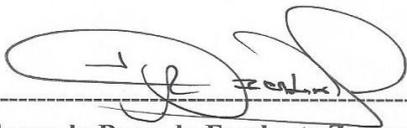
A las **dieciocho** horas y **veinticinco** minutos, el Presidente del Jurado dio por concluido el acto.

Cajamarca, **11** de **noviembre** de 2019.

  
-----  
**Dr. Juan Francisco Seminario Cunya**  
**PRESIDENTE**

  
-----  
**Dr. Manuel Salomón Roncal Ordóñez**  
**SECRETARIO**

  
-----  
**Ing. M. Sc. Víctor Eudelfio Torrel Pajares**  
**VOCAL**

  
-----  
**Dr. Segundo Berardo Escalante Zumaeta**  
**ASESOR**

  
-----  
**Ing. Manuel Malpica Rodríguez**  
**ASESOR**

## **DEDICATORIA**

*A mis padres Enrique Rojas Sánchez y Magna Noemí Casanova Gutiérrez, que en todo momento me supieron comprender y me brindaron su apoyo incondicional, para poder culminar mi carrera profesional.*

*A mis hermanos Diana y Enrique, que de una u otra forma contribuyeron con su apoyo moral para salir adelante y así cumplir mi bello sueño de ser profesional.*

**EL AUTOR**

## **AGRADECIMIENTO**

*Mi más sincero agradecimiento al Doctor Segundo Berardo Escalante Zumaeta y al Ingeniero Manuel Gregorio Malpica Rodríguez asesores de la presente tesis, por sus enseñanzas y orientación, al ingeniero Teresita del Niño Jesús Moreno Huamán por su apoyo incondicional. De igual manera a los docentes de la Escuela Académico Profesional de Agronomía de la Universidad Nacional de Cajamarca (UNC), ya que compartieron sus conocimientos a través de sus enseñanzas que sirvieron para concluir con éxito esta carrera profesional*

*A mis padres, hermanos, familiares, amigos y compañeros por su apoyo incondicional para alcanzar mi profesión con éxito.*

**EL AUTOR**

## ÍNDICE

	Pàg.
<b>DEDICATORIA</b>	iii
<b>AGRADECIMIENTO</b>	iv
<b>ÍNDICE</b>	v
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	viii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	xi
<b>RESUMEN</b>	xiii
<b>ABSTRACT</b>	xiv
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Generalidades de la <i>Altroemeria</i> spp.	4
2.3. Morfología	4
2.4. Propagación de la <i>Altroemeria</i> spp.	5
2.5. Cultivo de Tejidos Vegetales	5
2.5.1. Concepto	5
2.5.2. Ventajas de cultivo de tejidos vegetales	6
2.5.3. Desventajas de cultivo de tejidos vegetales	6
2.5.4. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales	7
2.5.4.1. Explanta.	7
2.5.4.2. Asepsia	7
2.5.4.3. Medio de cultivo	7
2.5.4.3.1. Sales minerales	8
2.5.4.3.2. Compuestos Orgánicos	8
2.5.4.3.3. Fuentes de Carbono	8
2.5.4.3.4. Sustancias hormonales	9
2.5.4.3.5. Las vitaminas	11
2.5.4.3.6. Aminoácidos y amidas	11
2.5.4.3.7. Materia inerte de soporte	11

2.5.4.3.8. pH del medio de cultivo	11
2.6. Micropropagación.	12
2.6.1. Fases de la micro propagación.	12
2.6.1.1. Fase de establecimiento	12
2.6.1.2. Fase de Multiplicación	12
2.6.1.3. Fase de enraizamiento y aclimatación	12
2.7. Organogénesis	13

### **CAPÍTULO III**

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	14
3.1. Ubicación	14
3.2. Materiales	14
3.2.1. Material biológico	14
3.2.2. Reactivos	14
3.2.3. Material de vidrio	14
3.2.4. Equipos	15
3.2.5. Otros	15
3.3. Metodología	16
3.3.1. Obtención y traslado de explantas, del campo de producción de <i>Alstroemeria</i> sp. al Laboratorio de Biotecnología Vegetal.	16
3.3.2. Desinfección superficial de explantas	16
3.3.3. Fases de establecimiento y multiplicación	17
3.3.3.1. Preparación de medios de cultivo	17
3.3.3.2. Factores, niveles y tratamientos en estudio	18
3.3.3.3. Siembras <i>in vitro</i>	19
3.3.3.4. Incubación de cultivos <i>in vitro</i> .	20
3.3.4. Organogénesis directa a partir de hojas de <i>Alstroemeria</i> spp.	21
3.3.4.1. Factores, niveles y tratamientos en estudio	22
3.3.5. Evaluaciones realizadas.	23
3.3.5.1. Fase de establecimiento.	23
3.3.5.2. Fase de multiplicación.	23
3.3.5.3. Organogénesis directa a partir de hojas de <i>Alstroemeria</i> spp.	24

<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	25
4.1. Etapa experimental	25
4.1.1. Fase I. Establecimiento <i>in vitro</i>	25
4.1.1.1. Contaminación (%) de explantas	25
4.1.1.2. Longitud promedio de brotes.	26
4.1.1.3. Número promedio de hojas	27
4.1.2. Fase de multiplicación.	28
4.2. Organogénesis directa a partir de hojas de <i>Alstroemeria</i> spp.	30
<b>CAPÍTULO V</b>	
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	33
<b>CAPÍTULO VI</b>	
<b>LITERATURA CITADA</b>	34
<b>ANEXOS</b>	43
<b>APÉNDICE</b>	45
<b>GLOSARIO</b>	60

## ÍNDICE DE TABLAS

Nº		Pág.
1	Tratamientos ensayados en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> de explantas de <i>Alstroemeria</i> spp.	18
2	Tratamientos en estudio de la fase de enraizamiento vía organogénesis de explantas (segmentos basales de las láminas foliares) de <i>Alstroemeria</i> spp.	23
3	Porcentaje promedio de explantas no contaminados por tratamiento. Evaluación registrada a los 8 días de la siembra <i>in vitro</i> .	25
4	Análisis de varianza (ANVA) para la longitud promedio (mm) de brotes.	27
5	Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5 % de probabilidad para la variable longitud de plántula (mm) en el factor Clon. Evaluación realizada a los 23 días después de la siembra <i>in vitro</i>	27
6	Análisis de varianza (ANVA) para la variable número promedio de hojas (datos transformados con $Y = \sqrt{X + 0.5}$ )	28
7	Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5 % de probabilidad para la variable número promedio de hojas (datos transformados con $Y = \sqrt{X + 0.5}$ )	28
8	Efecto del tipo de explanta, medio de cultivo, y clon en la tasa de multiplicación de <i>Alstroemeria</i> spp.	29
9	Efecto del BAP y AIB en el proceso Organogénico directo de porciones basales de láminas foliares, acompañadas de sus respectivas zonas de diferenciación de la lígula. Evaluación registrada a los 15 y 30 de la siembra <i>in vitro</i>	30
10	Componentes del medio de cultivo MS (1962)	44

11	Tratamientos de la primera prueba de desinfección superficial de explantas: jabón, alcohol etílico e hipoclorito de sodio	46
12	Tratamientos de la segunda prueba de desinfección superficial de explantas: jabón, tween 20, hipoclorito de sodio y agua oxigenada	47
13	Tratamientos de la tercera prueba de desinfección superficial de explantas: jabón, tween 20, hipoclorito de sodio y Vitavax.	48
14	Porcentaje de contaminación de la primera prueba preliminar: Jabón, alcohol e hipoclorito de sodio.	51
15	Porcentaje de contaminación en la segunda prueba preliminar con jabón, tween 20, hipoclorito de sodio y agua oxigenada.	52
16	Porcentaje de contaminación de la tercera prueba preliminar con jabón, tween 20, hipoclorito de sodio 2% y Vitavax.	53
17	Prueba del Chi- cuadrado de Pearson, en la tercera prueba preliminar con jabón, tween 20, hipoclorito de sodio 2% y Vitavax.	53
18	Prueba pre eliminar en organogénesis directa	54
19	Resultados (números promedios) para la variable longitud de plántula (mm). Evaluación realizada a los 15 días después de la siembra <i>in vitro</i>	55
20	Resultados (números promedios) para la variable longitud de plántula (mm). Evaluación realizada a los 23 días después de la siembra <i>in vitro</i>	55
21	Resultados (números promedios) de la fase de estación para la variable número promedio de hojas. Evaluación realizada a los 15 días después de la siembra <i>in vitro</i>	56

22	Resultados de la fase de estación para la variable número promedio de hojas. Evaluación realizada a los 23 días después de la siembra <i>in vitro</i>	56
23	Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 0.05 de probabilidad para la variable longitud de plántula (mm) en el factor Clon de planta. Evaluación realizada a los 15 días después de la siembra <i>in vitro</i>	58
24	Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5 % de probabilidad para la variable longitud de plántula (mm) en el factor Clon. Evaluación realizada a los 23 días después de la siembra <i>in vitro</i>	59
25	Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5 % de probabilidad para la variable número promedio de hojas (datos transformados con $Y = \sqrt{X + 0.5}$ )	58
26	Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5 % de probabilidad para la variable número promedio de hojas (datos transformados con $Y = \sqrt{X + 0.5}$ )	58
27	Registro de temperatura y humedad relativa durante la investigación	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

N°		Pág.
1	Desinfección superficial de los explantas: (A) explantas con solución de jabón Bolívar Bebé 8 000 ppm (w/v), (B) explantas con solución de hipoclorito de sodio al 2.0% (v/v) y dos a tres gotas de Tween- 20	17
2	Preparación del medio de cultivo: (A) Mezcla de los componentes del medio de cultivo, (B) Y (C) medición y ajuste del pH del medio de cultivo a un valor de 5.7.	18
3	Proceso del establecimiento de plántulas de <i>Alstroemeria</i> : (A) Aislamiento aséptico de explantas, (B) Explantas aislado y recién sembrado, (C) Brote regenerado, de 15 días de edad, (D) Brotes regenerados, de 23 días de edad	19
4	Tipos de explanta utilizados en la Fase de multiplicación de plántulas de <i>Alstroemeria</i> : (A) yemas terminales (B) entrenudo más nudo.	20
5	Proceso de organogénesis de <i>Alstroemeria</i> sp., a partir de segmentos basales de lámina foliar: (A) Explantas recién sembrados, (B) Explanta <i>in vitro</i> después de 15 días de sembrado, (C) Explanta <i>in vitro</i> después de 30 días de sembrado.	21
6	Explantas compuestos por la base de la lámina acompañada de la zona de diferenciación de la lígula	22
7	Proceso de Organogénesis directa a partir de hojas de <i>Alstroemeria</i> spp.	31
8	Primera prueba preliminar de desinfección superficial de explantas: (A) explantas con solución de jabón Bolívar bebe 4160 ppm (w/v), (B) explantas con solución de hipoclorito de sodio al 2.0% (v/v) (C) explantas en solución de alcohol etílico al 70%.	47

- 9 Segunda prueba preliminar de desinfección superficial de explantas: (A) explantas con solución de hipoclorito de sodio al 2.0% (v/v) y dos gotas de Tween-20 (B) explantas con solución de jabón Bolívar bebe 4160 ppm (w/v). 48
- 10 Tercera prueba preliminar de desinfección superficial de explantas: (A) explantas con soluciones de jabón Bolívar bebe (2000 ppm, 4000 ppm y 8000 ppm w/v), (B) explantas con solución de hipoclorito de sodio al 2.0% (v/v) y dos gotas de Tween-20, (C) explantas en solución de Vitavax 2000ppm. 49

## RESUMEN

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional de Cajamarca, con el objetivo de determinar el efecto de la citocinina (6-benzil amino purina) y auxina (ácido indol -3-butírico) en la propagación *in vitro* de tres clones de *Alstroemeria* spp. Realizadas las evaluaciones, se concluye que la longitud de brote, está influenciado estadísticamente por el factor clon, más no por la dosis de BAP ni por la interacción BAP x clon. El clon blanco es el que generó plántulas *in vitro* con la mayor longitud promedio de brotes (12.29 mm) y mayor número promedio de hojas (1.98 hojas por plántula). En la fase de la multiplicación se utilizó Murashigue y Skoog (MS) más 5 ppm de BAP para el clon amarillo, MS para el clon blanco y MS más 10 ppm de BAP para el clon rosado con blanco), utilizando dos tipos de explantas (YT= yema terminal y N= nudo), en la medida que a ocho días de iniciada la fase de multiplicación, los explantas se tornaron cloróticos, luego se pardearon y finalmente, se necrosaron. Esta secuencia de eventos, fijó una tasa de multiplicación de 1:0. Se realizaron estudios de organogénesis directa de los explantas donde el balance hormonal compuesto de elevados niveles de citocinina (10 ppm de BAP) y reducidos niveles de auxina (0.1 ppm de AIB), bajo condiciones de oscuridad, propician el inicio de la diferenciación de explantas y la regeneración de tallos.

## ABSTRACT

The present research was carried out in the Plant Biotechnology laboratory of the National University of Cajamarca, with the objective of determining the effect of cytokinin (6-benzyl amino purine) and auxin (indole-3-butyric acid) on in vitro propagation of three clones of *Alstroemeria* spp. Once the evaluations have been carried out, it is concluded that the sprout length is statistically influenced by the clone factor, but not by the BAP dose or by the BAP x clone interaction. The white clone is the one that generated in vitro seedlings with the highest average length of shoots (12.29 mm) and the highest average number of leaves (1.98 leaves per seedling). In the multiplication phase, Murashigie and Skoog (MS) plus 5 ppm of BAP for the yellow clone, MS for the white clone and MS plus 10 ppm of BAP for the pink and white clone were used), using two types of explants (YT = terminal yolk and N = knot), to the extent that eight days after the multiplication phase began, the explants became chlorotic, then browned and finally, necrotized. This sequence of events set a multiplication rate of 1: 0. Direct organogenesis studies of the explants were carried out where the hormonal balance composed of high levels of cytokinin (10 ppm of BAP) and reduced levels of auxin (0.1 ppm of AIB), under dark conditions, led to the initiation of de-differentiation of explants and stem regeneration.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

La Astromelia, también llamada “lirio de campo”, “lirio del Perú” o “lirio de los Incas”, es una ornamental herbácea perteneciente a la especie *Alstroemeria* spp., familia de las Astromeriaceae, de amplia distribución en América del Sur. En el Perú, es importante como cultivo de flor cortada, la cual es principalmente destinada al mercado internacional, pues el nacional es relativamente nuevo, pero con una demanda creciente por el atractivo y elegancia de las flores. El problema de la demanda creciente, induce a los agricultores a ampliar las áreas cultivadas y a una sobre explotación del recurso vegetal existente, lo que podría poner en riesgo de extinción a las especies o variedades más requeridas por el mercado. Esta es una realidad que lo está enfrentando Chile, uno de los países de mayor cultivo y producción de *Alstroemeria* en América del Sur. En el primer caso, la ampliación de áreas cultivadas, requiere de una adecuada disponibilidad de semilla botánica o vegetativa en el momento oportuno; y en el segundo caso, un posible riesgo de extinción, exige el desarrollo de medidas preventivas y de bajo o nulo impacto en las poblaciones vegetales existentes, tal como la producción masiva de plantas de *Alstroemeria* a nivel de laboratorio y a través de cultivo de tejidos vegetales. Ambas exigencias técnicas aún no han sido atendidas en nuestro país, razón por la cual se propuso desarrollar la presente investigación, relacionada con el manejo hormonal del proceso de propagación de tres clones de *Alstroemeria*, con los siguientes objetivos:

### **Objetivo General**

Determinar el efecto de la citocinina (6-Benzil Amino Purina) y auxina (Ácido Indol - 3Butírico) en la propagación *in vitro* de tres clones de *Alstroemeria* spp.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar el efecto de tres dosis de 6-Benzil Amino Purina (0,5 y 10 ppm) en la regeneración y crecimiento *in vitro* de brotes y raíces de tres clones de *Alstroemeria* spp.

2. Determinar el efecto de tres dosis de 6-Benzil Amino Purina (0,5 y 10 ppm) y Ácido Indol Butírico (0.1; 0.2 y 0.3 ppm) en el proceso organogénico de la *Alstroemeria* spp.

## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1. Antecedentes

Vásquez (2016), realizó estudios con diferentes medios de cultivo en distintas concentraciones de agar y citocininas en forma de BAP, con el fin de determinar las mejores condiciones de estos factores para desarrollar un método eficiente de micro propagación para astromelia. Y obtuvo que a concentración de agar 3,5 g/L y mayores concentraciones de BAP 2,0 mg/L presentaron explantas sanos con mayores pesos, mayores largos de rizoma, una mayor cantidad y homogeneidad en sus brotes. Concluyó que las citocininas, son fundamentales para la propagación *in vitro*, pues afectan directamente el desarrollo del largo de rizoma y la cantidad de sus brotes diferenciados con diferencias significativas.

Bridgen (1999), Utilizó como material vegetativo, rizomas de astromelias y por medio de cultivo Murashige y Skoog con 30 g de sacarosa/L y varias dosis de citocinina, obtuvo el mejor resultado con 2mg/L de bencilaminopurina. Además llegó a la conclusión que los niveles altos de citocinina para acelerar la producción vegetativa pueden causar mutaciones *in vitro*.

Pérez et al. (2007), realizaron trabajos en rescate de embriones *in vitro* de la *Alstroemeria* spp., y obtuvo que, para germinar sus embriones necesitó un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a mitad de concentración de sales, pH 5.7 y los mantuvo en oscuridad por un periodo de 2 meses. Luego, los embriones germinados fueron llevados a un segundo medio de cultivo MS a ¼ de concentración de sales, pH 5.7, más 0,02 mg/L de BAP por 2 a 4 semanas adicionales hasta alcanzar el estado de plántula.

Hamidoghlin et al. (2007), realizaron un estudio sobre la capacidad de regeneración de las plántulas, utilizando brotes de rizomas cultivadas en un medio MS medio basal, con 0.2 mg/L de ANA, con 1mg/L de BAP, obteniendo un mayor número de rizomas pequeños y raíces.

Letelier et al. (2012), extrajeron rizomas de *Alstroemeria* para ser desinfectados y cultivados en medio MS con la adición de 6 BAP, con el objetivo de activar y desarrollar brotes *in vitro*, lográndose la iniciación después de 25 días, alcanzando 5cm de longitud.

## **2.2. Generalidades sobre la *Alstroemeria* spp.**

La astromelia es una especie que se cultiva principalmente por la belleza de sus flores. En base a este criterio se ha producido un intenso proceso de selección, de tal forma que actualmente el mercado dispone de diversos colores de flor, entre los cuales destacan el púrpura, lavanda, rojo, rosado, blanco, naranja, amarillo y bicolors (Bridgen 1999). Su cultivo comercial comenzó en la década del setenta y fueron los ingleses, quienes desarrollaron las primeras variedades a partir de especies chilenas. Científicos holandeses han recolectado plantas silvestres de *Alstroemeria*, que fueron mejoradas, patentadas e importadas por Chile (Torres 2007).

En el mercado mundial, la flor de *Alstroemeria* es un producto relativamente nuevo, que cobra un interés mayor, ya que no exige cuidados especiales. Holanda está a la vanguardia de su explotación, pues cultiva unas 100 hectáreas (ha), mientras en el resto del mundo esta ornamental ocupa un área de 400 ha (Osorio 2009).

## **2.3. Morfología.**

La *Alstroemeria* es una herbácea perenne que mide 40 cm de alto, presentan rizoma, raíces abundantes, cilíndricas, con el ápice terminado en un tubérculo de color blanco de 1,5 a 2 cm de largo (Eyzaguirre 2008).

Bridgen (1999) y Freire (2012), consideran que las astromelias son plantas con rizomas alargados, de crecimiento sipondial, de color blanco o crema; las raíces nutricias son carnosas y alargadas.

Aker y Healy (1990), las astromelias son especies de reproducción sexual (mediante semilla) y asexual (mediante rizomas). Las raíces de los rizomas varían de gruesas y tuberosas (2.5 cm) a delgadas y fibrosas (1cm), además presentan engrosamientos cilíndricos de almacenamiento que principalmente contienen almidón. Los rizomas se ramifican simpondialmente. El ápice del rizoma es la yema axilar de primer grado de un brote previo, por lo tanto cada brote aéreo sucesivo que crece de un rizoma, es un brote que se originó en una yema axilar del brote aéreo precedente. La yema axilar, que también tiene ubicación subterránea, es la hoja de segundo grado del brote aéreo y tiene el potencial de producir otro rizoma. Las otras hojas no tienen el meristemo especial para producir rizomas.

Sus hojas son lineares, resupinadas, crespas, glaucas, de 5 cm de largo por 3 mm de ancho; las hojas del tallo fértil son más cortas (Eyzaguirre 2008).

La inflorescencia consta de una corona de pedúnculos florales, con uno a cinco botones, cada flor presenta seis pétalos, tres internos y tres externos, además tienen forma de embudo, con las puntas de los sépalos doblados hacia afuera, cuentan con seis estambres y un estilo con tres estigmas ramificados (INTA 2017).

La astromelia pertenece a la familia botánica Astromeriaceae, anteriormente perteneció a las familias Amaryllidaceae y Liliaceae. El nombre del género viene de Klas von Astroemer, quien llevó la primera semilla de América del Sur a Europa (Bridgen 1999).

#### **2.4. Propagación de *Alstroemeria* spp**

El método tradicional de propagación clonal de *Alstroemeria*, es la división del rizoma por división continua de 10 a 12 semanas en un plantel de propagación. Si las plantas son divididas de una cama que se usó para la producción de flor de corte, éstas se cortan aproximadamente 10-15 cm de altura. En el momento de la división, las partes viejas de los rizomas se eliminan porque no presentan valor, debido a que tienen rizomas laterales débiles (Bridgen 1999). La planta de *Alstroemeria* crece bien en terrenos fértiles, con buen drenaje, preferentemente ácido. Requiere riego frecuente (2 o 3 veces a la semana) y de lugares con clima fresco. Preferiblemente en lugares parcialmente sombreados (Culqui 2012).

Los rizomas, presentan una baja tasa de proliferación, obteniéndose sólo dos o tres individuos por año, a partir de cada planta madre, hecho que además produce un alto costo en mano de obra (Pedersen et al. 1996).

La propagación por semilla se evita debido a la variabilidad genética y las dificultades ocurridas en la germinación de la semilla. Hay algunas líneas homogéneas obtenidas a través de semillas, pero las semillas son caras. Las semillas germinarán si se les provee cuatro semanas de calor húmedo, (18-25°C), seguidas de cuatro semanas de estratificación en húmedo y fresco (7°C), y de temperaturas calurosas (Bridgen 1999).

#### **2.5. Cultivo de Tejidos Vegetales.**

##### **2.5.1. Concepto.**

Los principios básicos del cultivo de tejidos vegetales fueron determinados a principios del siglo XX. Haberlandt, en el año 1902, enunció el concepto de la totipotencia, pero quienes desarrollaron las bases de los métodos actuales fueron White 1943, 1963 y Gautheret 1934, 1942 a mediados del siglo XX (Allcaco 2016).

Los primeros trabajos en cultivo de tejidos vegetales tuvieron limitaciones debido a tres factores fundamentales: el primero fue el desconocimiento de los requerimientos nutricionales de los tejidos cultivados *in vitro*; segundo, el uso frecuente de tejidos vegetales maduros para iniciar el cultivo; y tercero, el desconocimiento de la existencia y función de las fitohormonas o reguladores de crecimiento en el desarrollo vegetal. Estas sustancias eran desconocidas hasta 1928 cuando Went y Timan descubrieron el ácido indolacético (AIA), y en 1955 Skoog descubrió la kinetina. En 1975, Skoog y Miller fueron los primeros que lograron la formación *in vitro* de brotes, raíces y tejido calloso mediante el uso de diferentes combinaciones de auxina y citocinina, en 1962 Murashigue y Skoog desarrollaron un medio de cultivo (MS) que reunía las características apropiadas para ser utilizado en el cultivo de una variedad de tejidos de diferentes especies vegetales (Allcaco 2016).

El cultivo de tejidos vegetales consiste en aislar una porción de tejido, órgano o célula de una planta, llamado explanta, para cultivarlo en un medio nutritivo bajo condiciones artificiales, asépticas y controladas. El objetivo es conseguir que las células expresen su totipotencialidad, es decir, su capacidad para regenerar una planta completa cuando son separadas del organismo (CEFAF 2000).

### **2.5.2. Ventajas del cultivo de tejidos vegetales.**

Arrué (1986), establece las siguientes ventajas:

- Ahorro y ganancia de espacio: es posible mantener cantidades considerables de clones que servirán como semilla. Permite hacer uso del área vertical, acumulando varios niveles para el efecto.
- Propagación acelerada: es posible, teóricamente, obtener en un año de una sola planta, un millón de clones.
- Disponibilidad inmediata y permanente del material: permite el acceso oportuno a la micro propagación en épocas en que las condiciones del campo no son favorables.
- Ausencia de infecciones y factores climáticos adversos debido a las condiciones asépticas en que se tienen los ex plantas.

### **2.5.3. Desventajas de cultivo de tejidos vegetales**

Hartmann (2002), menciona las siguientes desventajas:

- Requerimiento de costoso y sofisticado material de trabajo

- Requerimiento de personal entrenado para la técnica de trabajo
- Alto costo inicial de las labores.
- La contaminación puede causar altas pérdidas en corto tiempo.

#### **2.5.4. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales.**

##### **2.5.4.1. Explanta.**

Los explantas son porciones de tejido, células sueltas, protoplastos, esporas, granos de polen o semillas (Fossard 1999). Su elección constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos y determina el objetivo perseguido (Roca y Mroginski 1993). Por ejemplo, los meristemos apicales y las yemas axilares como explantas son genéticamente estables y sirven para reproducir múltiples clones o variedades manteniendo las características de la especie. Otros explantas como las yemas adventicias son genéticamente inestables y producen un alto grado de variabilidad en los clones, este procedimiento no es útil para la producción de plántulas con una determinada característica de cultivo, pero si para el fitomejoramiento, ya que mediante esta variación semi-natural, es posible obtener nuevas líneas de cultivo (Fontúrbel 2001).

##### **2.5.4.2. Asepsia.**

La asociación explanta- medio y las condiciones físicas en que se incuban los cultivos, forman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (Roca y Mroginski 1993), que afectan el crecimiento y desarrollo del explanta (Fontúrbel 2001) y compiten con el mismo, deteriorándolo y haciéndolo inservible para el cultivo (Klye y Kleyn 1996).

Para establecer cultivos asépticos se debe trabajar en ambientes adecuados, con medios de cultivo esterilizados y explantas superficialmente desinfectadas, libres de bacterias, hongos y virus. Hay una variedad de compuestos químicos utilizados como desinfectantes para los explantas, pero en la actualidad es frecuente el empleo de etanol (70% v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1% al 3% contenido en productos de uso doméstico. En algunos casos resulta útil el agregar algún agente tensoactivo (Twenn-20, del 0.01% al 0.1%). Después de tratar el explanta con las soluciones desinfectantes se debe remover los restos del producto con agua destilada estéril (Roca y Mroginski 1993).

##### **2.5.4.3. Medio de cultivo.**

Los medios de cultivo son combinaciones de sustancias químicas que los investigadores han desarrollado después de numerosos experimentos y que permite que las plantas

crezcan y se multipliquen *in vitro* (Abdelnour y Vicent 1994). A la fecha se dispone de un gran número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales *in vitro* que constan de sales minerales, compuestos orgánicos y reguladores de crecimiento (Abdelnour y Vicent 1994).

Los medios de cultivo que producen mejores resultados son los que contienen hormonas que pueden manipularse variando su nivel relativo (Locy 1984).

#### **2.5.4.3.1. Sales minerales:**

**Macronutrientes:** los macronutrientes son elementos esenciales que la planta requiere en mayores cantidades (g/L), para el crecimiento, debido a que intervienen en la conservación del equilibrio iónico en las plantas (Bengoa 1990). Los seis elementos indispensables son: Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Azufre (S), cuya concentración varía dependiendo a las especies y la finalidad del cultivo (De Fossard 1984).

**Micronutrientes:** son elementos que la planta requiere en menores cantidades (mg/L). Tienen un papel esencial en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas. Los principales micronutrientes son: Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Zinc (Zn), Boro (B), Cobre (Cu) y Molibdeno (Mo). Algunos medios contienen Cobalto (Co), Yodo (Y) y Cloro (Cl), aunque no son esenciales para el crecimiento vegetal (George y Sherington 1984).

#### **2.5.4.3.2. Compuestos Orgánicos:**

Podemos clasificarlos en tres grupos: carbohidratos, sustancias hormonales y vitaminas. Se han obtenido buenos resultados frecuentemente cuando se empleando ciertos aminoácidos y/o amidas, purinas y pirimidinas, hexitoles y ácidos orgánicos (Hurtado y Merino 1991).

#### **2.5.4.3.3. Fuentes de Carbono**

La mejor y más utilizada fuente de carbono y energía, es la sucrosa llamada también sacarosa (Mejía y Vittorelli 1988). En algunos medios es reemplazada por glucosa, en casos particulares se emplea maltosa o galactosa, también el myo-inositol (100 mg/L) obteniendo un mejor crecimiento de los cultivos (Mroginski et al. 2010).

#### **2.5.4.3.4. Sustancias hormonales:**

La adición de hormonas al medio, en diferentes proporciones puede estimular o detener el crecimiento y manipular algunos procesos morfogénéticos de la planta. Las principales sustancias hormonales son: Auxinas, citocininas, giberelinas (Rojas et al. 2004).

**Auxinas:** El nombre auxina proviene del griego auxein, que significa crecer, proceso que resulta estimulado por una sustancia reguladora del crecimiento producida en el ápice del coleótilo de avena (Hurtado y Merino 1991).

Las auxinas son hormonas vegetales que regulan el desarrollo y crecimiento de las plantas; pueden ser naturales como el AIA (Ácido indolacético), o sintéticas como el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), ANA (ácido naftalenacético) y AIB (Ácido Indol -3-Butírico), cuyo efecto es similar al de las auxinas naturales. También existen muchos compuestos que son derivados de los ácidos fenilacético o fenoxiacético (Rangel 2014).

Entre los efectos fisiológicos de las auxinas se encuentran, la formación de las raíces adventicias, dominancia apical, promoción de biosíntesis del etileno, extensión y elongación celular, inducción, división celular y regulación de cambios en el citoesqueleto (Becerra 2003).

Con la adición de auxinas en la micropropagación, se busca principalmente estimular el crecimiento y formación de raíces. Sin embargo, la respuesta del explanta al aplicar auxinas depende del estado fisiológico del material vegetativo, la naturaleza de la auxina, tiempo de aplicación y de la superficie del contacto (Becerra 2003).

**Citocininas:** El nombre genérico de las citocininas es empleado para aquellas sustancias químicas que pueden estimular principalmente la división celular o citocinesis. Son hormonas esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, las cuales derivan de la adenina. Fueron descubiertas en los trabajos realizados por Haberlandt, quien demostró cultivando embriones y tejidos in vitro, que existía un factor difusible, el cual afectaba a las células parenquimatosas de la papa, que eran revertidas a un estado organizado (meristemático). A partir de tal descubrimiento se empezó a investigar sobre los factores de estimulación de la división celular (Jordán y Cassareto 2006).

Entre los efectos fisiológicos de las citocininas, se encuentran: Aumento de los niveles de Ca- calmodulina, la producción de etileno, el incremento de la relación tallo/ raíz y expansión foliar (Raven et al. 1999).

A nivel *in vitro* la combinación de dos citocininas puede ser eficiente para la proliferación de brotes (Peña 2000).

Los efectos generales de las citocininas en cultivo de tejidos son: Modificación de la dominancia apical (INIA 2002), estimulación de la división celular, síntesis de proteína, proliferación de callo proveniente de tejidos de dicotiledóneas, requiere la presencia tanto de auxina como de citocinina, pero la aplicación continua es más provechosa (Del Cid 2009).

Las citocininas naturales aisladas e identificadas han sido muy pocas, entre ellas tenemos a la zeatina, extraída del endospermo del maíz, algas, hongos y bacterias, la cual es considerada la citocinina natural más potente (Hurtado y Merino 1991).

Las citocininas sintéticas de tipo purínico más utilizadas son: BA (6 Benciladenina), BAP (6-Bencilaminopurina) estimula la proliferación de yemas axilares, 2ip (Isopentanilaminopurina) (Del Cid 2009).

La Kinetina ha recibido mucha atención como una sustancia estimuladora de la división celular; sin embargo, no se ha demostrado que esté presente como un compuesto natural (Rangel 2014).

**Giberelinas:** Son hormonas del crecimiento, diterpenoides, tetracíclicos involucrados en varios procesos de desarrollo vegetal. A pesar de ser más de 100 el número hallado en plantas, son pocas las que demuestran actividad biológica. Su descubrimiento en plantas se remonta a los años 30, cuando científicos japoneses aislaron una sustancia promotora del crecimiento a partir de cultivos de hongos que parasitaban plantas de arroz causando la enfermedad del “bakanoe” o “subida de las plantas”. El compuesto activo se aisló del hongo *Gibberella fujikoroi* por Eichi Kurosawa en 1926 por lo que se denominó “giberelina”. El efecto del hongo sobre las plantas afectadas consistía en un notable incremento de altura, aunque con fuerte merma en la producción de grano. El mayor crecimiento se debió al alto contenido de este factor de crecimiento producido por el ataque fúngico (Jordán y Cassareto 2006). El crecimiento y la diferenciación ocurren sin giberelinas en cultivo de células en bajas densidades, sin embargo, son esenciales ya que influyen en el efecto sobre la morfogénesis, inhiben la formación de embriones somáticos, tienen poco o ningún efecto en la diferenciación de células, estimulan el crecimiento y el desarrollo de órganos preformados (meristemas), generalmente impiden la formación de raíces. En el cultivo de ápices estimulan el crecimiento y su presencia permite la elongación de los tallos formados (Del Cid 2009).

En la naturaleza existen muchas giberelinas, denominadas como giberelina GA1, GA2, GA3 y así sucesivamente, llegando más allá de la GA40, la primera giberelina purificada y estructuralmente identificada fue el ácido giberélico (AG3), posteriormente se han aislado todas las demás de hongos, estando más difundidas en la naturaleza el GA1, GA3 y GA4 (Hurtado y Merino 1991).

#### **2.5.4.3.5. Las vitaminas:**

La clase y concentración de vitaminas, dependen del objetivo del experimento y del tipo de tejidos que se está cultivando in vitro. Con el suministro de vitaminas se cubren las necesidades del tejido por co-factores enzimáticos (Escalante 1989). Las vitaminas que son más utilizadas en medios de cultivo son: tiamina-HCl, ácido nicotínico, piridoxina HCl, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, riboflavina (Boeri 2015).

#### **2.5.4.3.6. Aminoácidos y amidas:**

Entre los más beneficiosos, está la de L-arginina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-ácido glutámico y L-tirosina. Otros compuestos utilizados son: adenina, sulfato de adenina, el ácido cítrico y el ascórbico, para evitar la oxidación de los tejidos (Abdelnour y Vicent 1994).

#### **2.5.4.3.7. Materia inerte de soporte:**

El Agar es un Polisacárido, semejante al almidón o celulosa pero químicamente diferente. Es utilizado en la preparación de medios de cultivos (0,6-1% w/v) como agente solidificante donde su concentración tiene relación inversa con la cantidad de agua disponible para el tejido. Aun cuando se ha determinado la presencia de contaminantes, son muchas las compañías que expenden este producto, siendo el principal Difco (Bacto Agar, Noble Agar, y Agar Purificado) (Escalante 1989).

#### **2.5.4.3.8. pH del medio de cultivo:**

Es un factor limitante para el crecimiento y desarrollo de los explantas, y debe estar entre los valores 5 y 6, valores superiores a 6 presentan problemas de precipitación de nutriente y valores inferiores a 3,5 manifiestan mala gelificación. (Aguirre et al. 2016).

El pH se debe regular antes o después de adicionar el gelificante y es ajustado con HCl o NaOH 1N. En ocasiones se agrega soluciones tampón, debido a que la capacidad tamponante de los medios de cultivo es baja y los valores de pH decrecen con el autoclavado, en muchos casos, se altera por la absorción de iones durante el cultivo y con la excreción de metabolitos del explanta (Boeri 2015).

## **2.6. Micropropagación.**

La micropropagación clonal es la técnica de propagación vegetativa *in vitro* que implica la producción de plantas fenotípicas y genotípicamente idénticas a las planta de la que se derivan (Vargas 2012). Un explanta (yemas o microesquejes) es cultivado en condiciones asépticas, generando individuos con una descendencia uniforme, denominados clones (INIA 2004).

La micropropagación tiene una amplia aplicación en cultivos comerciales: Plantas ornamentales, frutales, forestales y especies hortícolas comestibles (CEFAF 2000).

### **2.6.1. Fases de la micro propagación.**

El cultivo *in vitro* presenta cuatro etapas: Establecimiento de material en medio aséptico, multiplicación del material vegetal, enraizamiento y ambientación de las plantas a las condiciones ambientales normales (George y Sherrington 1984).

#### **2.6.1.1. Fase de establecimiento.**

Lo que se busca es establecer cultivos viables. El éxito está determinado por la calidad del explanta a utilizar. Los principales procesos a controlar son la selección, aislamiento y esterilización de los explantas. El material vegetativo que demuestra tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes: yemas axilares o adventicias, embriones o semillas en plantas herbáceas y el cambium en las plantas leñosas (Olmos et al. 2010).

#### **2.6.1.2. Fase de Multiplicación.**

El objetivo es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación (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).

Es recomendable no subcultivar por más de diez veces del mismo explanta, dado que puede presentar variación somaclonal, es decir plantas *in vitro* con genotipo diferente al de la planta original (Edirisinghage 2015).

#### **2.6.1.3. Fase de enraizamiento y aclimatación.**

La formación de raíces adventicias en las especies herbáceas, es relativamente fácil mientras que en las especies leñosas, resulta más complicada por su limitada capacidad

rizogénica. El enraizamiento se realiza tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso puede 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, logrando una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz. El estrés asociado a la transpiración acelerada de las plantas durante las etapas iniciales del trasplante puede reducir considerablemente la tasa de sobrevivencia. 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. Organogénesis.**

Litz y Jarret (1991), citado por Ventura (2016), definen organogénesis como el desarrollo de yemas o de meristemos radicales a partir de los explantas directamente o de callos. Es el proceso donde células y tejidos son forzados a sufrir una serie de cambios, dando como resultado final una estructura unipolar, ya sea primordio de brote o de raíz cuyo sistema vascular está a menudo conectado con el tejido madre (Castillo 2004).

La organogénesis *in vitro* se clasifica en proceso directo o indirecto (Hicks 1994). En el tipo directo, los explantas responden al estímulo con reguladores del crecimiento, y no requieren la formación previa de callo antes de inducir la respuesta. En el tipo indirecto, la regeneración de órganos ocurre previa formación de callo en el explanta (Vargas 2012). El proceso de organogénesis, comprende la diferenciación, interacción celular y la reacción a señales específicas (Thorpe 1980).

Skoog y Miller (1957), descubrieron que el desarrollo organizado ocurre como resultado de la interacción cuantitativa entre auxinas, citocininas y otros factores. Se ha demostrado en muchos cultivos la importancia de los reguladores de crecimiento en la iniciación y la regulación del desarrollo organizado. Por tanto, un balance apropiado entre auxinas y citocininas permite la formación de plantas a partir de meristemos, ápices y yemas, dependiendo de la especie y tipo de explanta.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y METODO

#### 3.1. Ubicación.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca (UNC), ubicado en el Distrito, Provincia y Región de Cajamarca, a una altitud de 2703 msnm, entre las coordenadas 07°10' 06.35" S. y 78° 29' 42.70" W. Durante el periodo experimental, dentro del laboratorio, se registró una temperatura promedio 23.4°C, con una máxima de 27.7° C y mínima de 19.1°C. La humedad relativa promedio fue de 33.5%, y el fotoperiodo fue regulado por un timer a 12/12 horas de iluminación y oscuridad, respectivamente.

#### 3.2. Materiales.

##### 3.2.1. Material biológico.

Explantas (yemas apicales vegetativas de tres clones de *Alstroemeria*).

##### 3.2.2. Reactivos.

- Constituyentes del medio basal: Murashige y Skoog (1962) (Tabla 10 del anexo 1).
- Reguladores del crecimiento: 6-benzil amino purina (BAP) y ácido 3-indol butírico (AIB).
- Agar (AGAR AGAR ING).
- Alcohol Etilico al 70 %.
- Sacarosa.
- Solución de Jabón a 8000 ppm.
- Hipoclorito de sodio al 2 %.

##### 3.2.3. Material de vidrio.

- Beakers de 50 y 100 ml.
- Embudo.
- Frascos de vidrio (6 Vinsa R.1.8777).
- Frascos para reactivos de 100 ml de capacidad.
- Matraces de 125, 250, 500, 1000 y 2000 ml.
- Mechero de alcohol.

- Placas Petri de 9.5 cm de diámetro.
- Probeta de 250 ml.
- Tubos de ensayo de 7 x 2cm.

#### **3.2.4. Equipos.**

- Autoclave (HW KESSEL)
- Agitador magnético (NUOVA II).
- Balanza analítica (OHAUS).
- Cámara de flujo laminar (ENVIRCO).
- Cocina eléctrica con resistencia espiral (INSEGESA).
- Destilador de agua (WD 3 RK).
- Estufa (CAUTION).
- PH-metro (SCHOTT / HANDILAB 1).
- Refrigerador (COLDEX).

#### **3.2.5. Otros.**

- Algodón 0.5 Kg.
- Fósforos.
- Gradillas.
- Hojas de bisturí N° 11.
- Jeringas hipodérmicas de 1, 5, 10 y 20 ml.
- Mangos de bisturí N° 7.
- Magentas.
- Parafilm.
- Papel aluminio.
- Papel absorbente.
- Pinzas de disección de 20 cm.
- Plumones marcadores Faber Castell.
- Ron de quemar.

### **3.3. Metodología.**

#### **Fase de establecimiento.**

##### **3.3.1. Obtención y traslado de explantas, del campo de producción de *Alstroemeria* spp. al Laboratorio de Biotecnología Vegetal.**

Las plantas madres de *Alstroemeria* spp, representadas por clones productores de flores amarillas, blancas y rosadas con blanco, seleccionadas para el presente estudio, formaron parte de una plantación comercial establecida en camas de propagación dentro de un cobertor ubicado en el Caserío Miraflores del Distrito de Baños del Inca, a una altitud de 2837 msnm, entre las coordenadas Este 780140.68 E y Norte 9212946.16 S, a 10 km al norte de la ciudad de Cajamarca-Perú.

A partir de éstas plantas madres, y haciendo uso de un bisturí, se aislaron las puntas de los brotes vegetativos (2 a 3 cm de largo y con 3 a 4 hojas) diferenciados a partir de los rizomas de los tres clones de *Alstroemeria* (amarillo, blanco y rosado con blanco). Estos brotes mostraron buenas características fitosanitarias.

Luego de su aislamiento, las puntas de brotes vegetativos, fueron empacadas con papel absorbente estéril y húmedo y finalmente trasladadas al Laboratorio de Biotecnología Vegetal (LBV) –UNC.

##### **3.3.2. Desinfección superficial de explantas.**

Dentro del LBV, las puntas de los brotes vegetativos de cada clon de *Alstroemeria*, fueron desempacadas y colocadas en frascos de vidrio (6 Vinsa R.1.8777), de boca ancha, de 226 mL de capacidad, previamente esterilizados y debidamente identificados.

En cada frasco se depositó 45 explantas y 100 mL de solución desinfectante compuesto de Jabón Bolívar bebe (8 000 ppm w/v) la cual fue manualmente agitada por 2 horas. Cumplido este tiempo, los explantas fueron enjuagados cuatro veces con ADE y luego, tratados durante diez minutos, con solución de hipoclorito de sodio al 2.0% (v/v), más dos a tres gotas de Tween-20 (Figura 4). Al término de este tiempo, los explantas fueron nuevamente enjuagados cuatro veces, con ADE.

Finalmente, los explantas desinfectados fueron mantenidos sumergidos en aproximadamente 100 mL de ADE, hasta el momento de su siembra in vitro, bajo condiciones de estricta asepsia y dentro de una cámara de flujo laminar.



Figura 1. Desinfección superficial de los explantas (A) explantas con solución de jabón Bolívar Bebé 8 000 ppm (w/v), (B) explantas con solución de hipoclorito de sodio al 2.0% (v/v) y dos a tres gotas de Tween-20

### 3.3.3. Fases de establecimiento y multiplicación

#### 3.3.3.1. Preparación de medios de cultivo

Previo al aislamiento de puntas de tallo, se preparó el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) (Tabla 10), el que, con fines experimentales, fue repartido en tres envases (matraces) de un litro de capacidad: el primero para el tratamiento control (0 ppm de BAP), el segundo, fue enriquecido con 5 ppm de BAP; y el tercero, con 10 ppm BAP (Tabla 1).

Luego se procedió a ajustar el pH de los medios de cultivo a un valor de 5.7, utilizando alícuotas de NaOH 0.1 N y/o HCl 0.1 N (Figura 2).

Posteriormente, cada uno de estos medios de cultivo fue depositado en tubos de ensayo estériles (diámetro: 2cm, altura: 7cm). Cada tubo de ensayo contuvo 4 mL de medio de cultivo. Finalmente, los tubos de ensayo, conteniendo al medio de cultivo, fueron tapados con papel aluminio, identificados y esterilizados en autoclave a 121 °C, por 20 minutos, enfriados a temperatura ambiente y conservados a 7°C (refrigerador) hasta su uso.

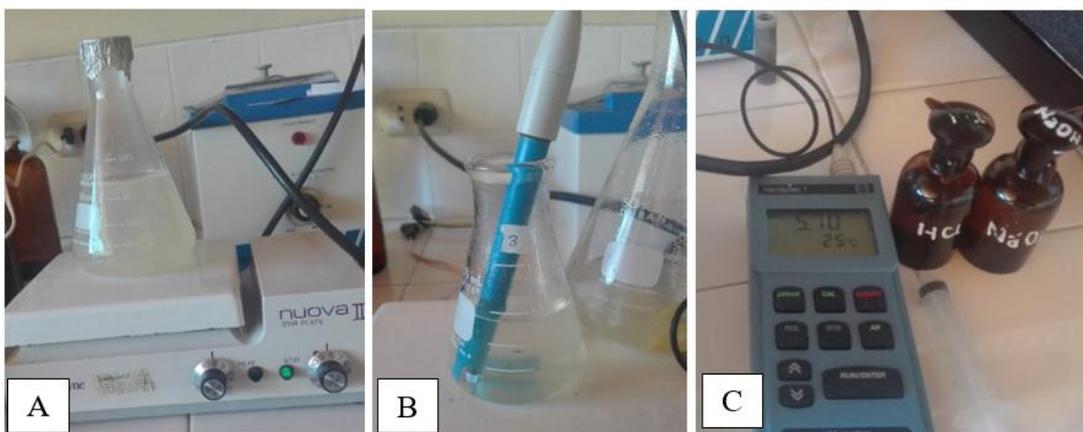


Figura 2. Preparación del medio de cultivo: (A) Mezcla de los componentes del medio de cultivo, (B) Y (C) medición y ajuste del pH del medio de cultivo a un valor de 5.7.

### 3.3.3.2. Factores, niveles y tratamientos en estudio

Factor A: Dosis de 6-benzil amino purina (BAP)

Niveles:

- a<sub>0</sub> = 0 ppm
- a<sub>1</sub> = 5 ppm
- a<sub>2</sub> = 10 ppm

Factor B: Clones de *Alstroemeria* spp.

- b<sub>0</sub> = Amarillo
- b<sub>1</sub> = Blanco
- b<sub>2</sub> = Rosado con blanco

**Tabla 1.** Tratamientos ensayados en la fase de establecimiento *in vitro* de explantas de *Alstroemeria* spp.

Tratamiento		Descripción
Número	Clave	
t <sub>1</sub>	a <sub>0</sub> b <sub>0</sub>	BAP(0 ppm) + clon amarillo
t <sub>2</sub>	a <sub>0</sub> b <sub>1</sub>	BAP(0 ppm) + clon blanco
t <sub>3</sub>	a <sub>0</sub> b <sub>2</sub>	BAP(0 ppm) +clon rosado con blanco
t <sub>4</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>0</sub>	BAP(5 ppm) + clon amarillo
t <sub>5</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>	BAP(5 ppm) + clon blanco
t <sub>6</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>2</sub>	BAP(5 ppm) + clon rosado con blanco
t <sub>7</sub>	a <sub>2</sub> b <sub>0</sub>	BAP(10 ppm) +clon amarillo
t <sub>8</sub>	a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	BAP(10 ppm) + clon blanco
t <sub>9</sub>	a <sub>2</sub> b <sub>2</sub>	BAP(10 ppm) +clon rosado con blanco

**Diseño experimental:** Diseño Completamente Randomizado (DCR), bajo arreglo factorial 3 X 3, con nueve tratamientos y tres repeticiones. Cada tratamiento involucró a diez unidades experimentales (explantas).

### 3.3.3.3. Siembras *in vitro*.

Luego de desinfectar el área de trabajo (cámara de flujo laminar), con algodón empapado en una solución de alcohol etílico al 70 %, se colocó dentro de la cámara de flujo laminar todos los materiales estériles necesarios para realizar la siembra *in vitro*: pinza, bisturí, frascos conteniendo ADE y explantas (puntas de brotes vegetativos), tubos de ensayo con medios de cultivo y placas Petri conteniendo papel estéril, entre otros.

Posteriormente, haciendo uso de una pinza estéril, se extrajeron una a una, las puntas de brotes vegetativos contenidas en sus respectivos frascos de vidrio, las cuales fueron puestas dentro de una placa Petri conteniendo láminas de papel absorbente estéril. Acto seguido, con la ayuda de un bisturí, se aislaron las brácteas que protegen a la yema vegetativa, hasta que ésta alcanzó una longitud promedio de 3 mm.

Finalmente, la yema vegetativa, fue separada del eje caulinar a través de un corte basal liso e inmediatamente sembrada en la superficie del correspondiente medio de cultivo (Tabla 1, Fig. 3).

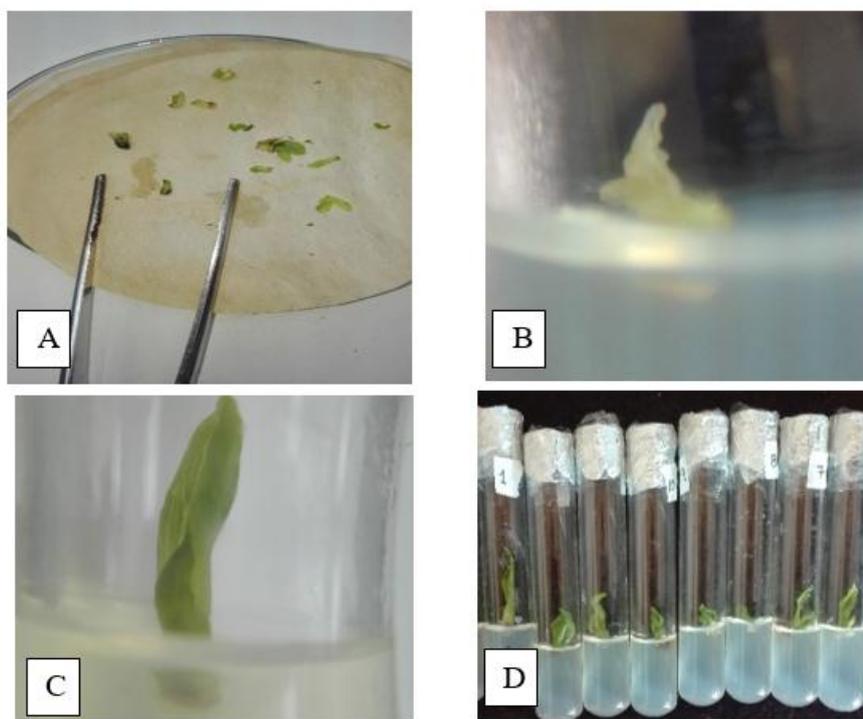


Figura 3. Proceso del establecimiento de plántulas de *Alstroemeria* : (A) Aislamiento aséptico de explantas, (B) Explantas aislado y recién sembrado, (C) Brote regenerado, de 15 días de edad, (D) Brotes regenerados, de 23 días de edad.

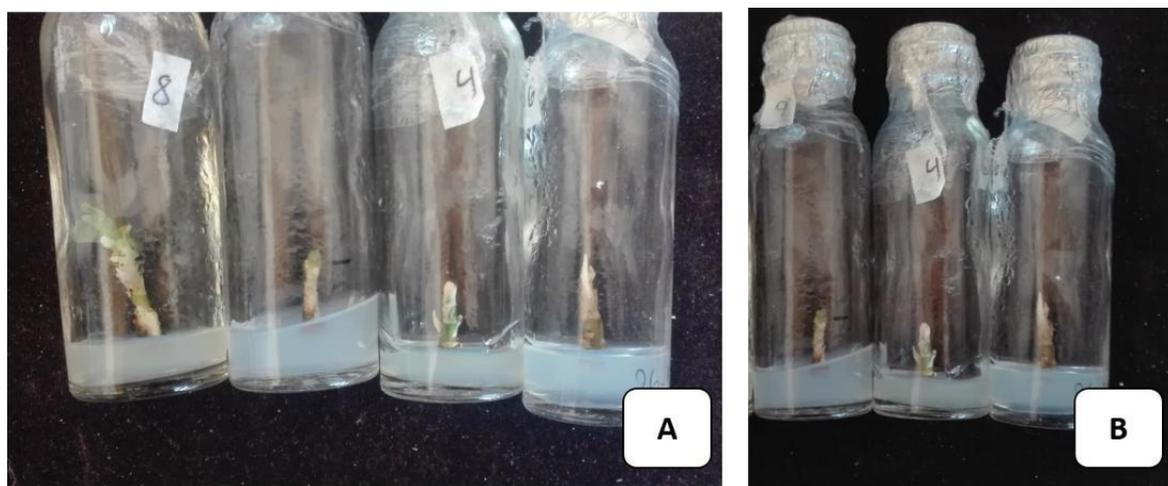
#### 3.3.3.4. Incubación de cultivos *in vitro*.

Luego de la siembra *in vitro*, los tubos de ensayo de 100 x 13 mm, conteniendo al medio de cultivo y explanta fueron tapados, apropiadamente, identificados y distribuidos según el diseño experimental dentro de una cámara oscura con una temperatura de 16 a 20 °C y humedad relativa promedio de 50 %.

Bajo estas condiciones, los cultivos fueron mantenidos por espacio de 8 días y luego fueron trasladados a la cámara de crecimiento (9 500 lux de Intensidad lumínica, 12 hora luz, 16 a 20 °C y 70 a 80% de humedad relativa) hasta la regeneración de los brotes foliados de cada clon de *Alstroemeria* (Amarillo, Blanco y Rosado con blanco), con lo cual terminó la fase de establecimiento. Posteriormente, los brotes foliados de cada clon de *Alstroemeria*, fueron micro propagados (Fase de multiplicación *in vitro*).

Para este propósito, sus tallos fueron divididos en yemas terminales sostenidas por un segmento de tallo de 7 a 12 mm de longitud y segmentos de tallo compuestos de un nudo acompañado con dos porciones de entrenudo, inferior y superior, cuya longitud promedio también osciló entre 7 y 12 mm.

Estos dos tipos de explanta, fueron subcultivados en el mejor medio de cultivo de la fase de establecimiento. Esto fue, MS + 5 ppm BAP para el clon amarillo, MS + 0 ppm BAP para el clon blanco y, MS + 10 ppm BAP para el clon rosado con blanco.



**Figura 4.** Tipos de explanta utilizados en la Fase de multiplicación de plántulas de *Alstroemeria* : (A) yemas terminales (B) entrenudo más nudo.

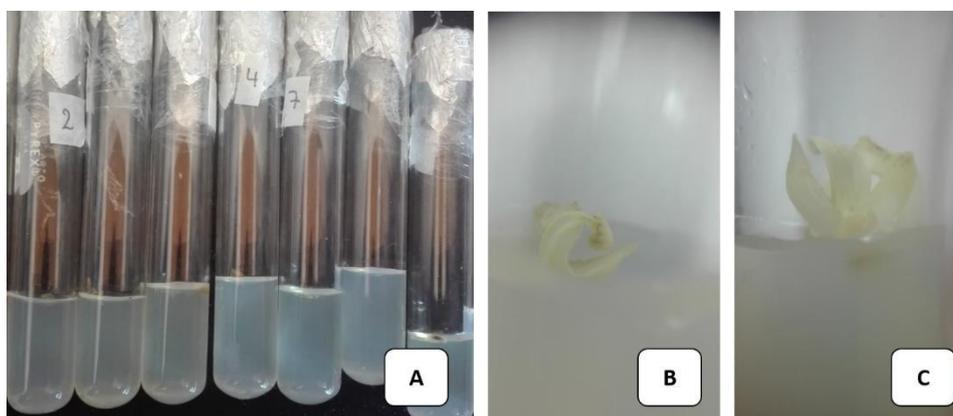
### 3.3.4. Organogénesis directa a partir de hojas de *Alstroemeria* spp.

Tomando en consideración que la *Alstroemeria* es una monocotiledónea herbácea, carente de cambium vascular, la regeneración de raíces adventicias es un proceso bastante complicado.

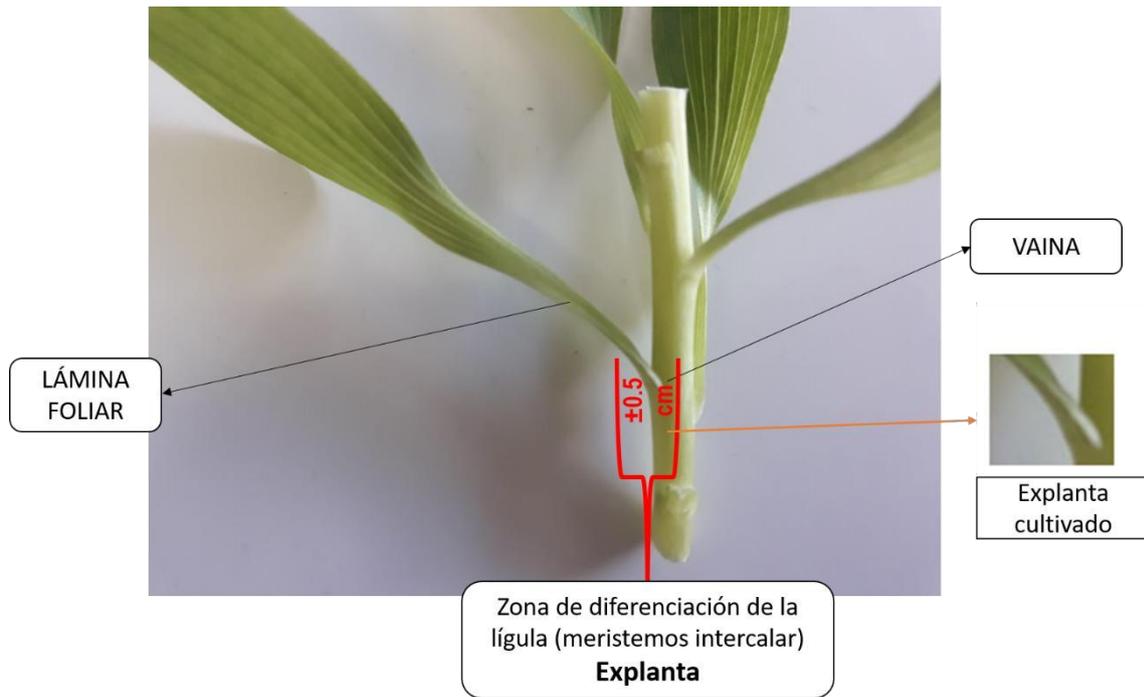
En consecuencia, el logro de este propósito demandó del establecimiento de un proceso organogénico, a partir de explantas que lleven consigo un tejido meristemático de tipo intercalar, razón por la cual no se emplearon los brotes ni sus segmentos (entrenudos o nudos), sino más bien las hojas aisladas de los brotes regenerados en la Fase I (Fase de establecimiento).

Bajo condiciones asépticas, se extrajeron hojas completas (vainas y lámina), se eliminaron las vainas y luego se aisló la porción basal de la lámina foliar, con una longitud promedio de 5 mm (explanta) la misma que quedó conformada por la base de la lámina acompañada de la zona de diferenciación de la lígula (Figura 7) próximo a la cual se sitúa el meristema intercalar.

Posteriormente, estas explantas fueron cultivados en medios de cultivo Murashige & Skoog (1962), enriquecidos con 6-Benzil Amino Purina (BAP) y ácido indol-3-butírico (AIB), cuyas dosis variaron según el tratamiento detallado en la Tabla 2.



**Figura 5.** Proceso de organogénesis de *Alstroemeria* spp., a partir de segmentos basales de lámina foliar: (A) Explantas recién sembrados, (B) Explanta *in vitro* después de 15 días de sembrado, (C) Explanta *in vitro* después de 30 días de sembrado.



**Figura 6.** Explantas compuestas por la base de la lámina acompañada de la zona de diferenciación de la lígula.

### 3.3.4.1. Factores, niveles y tratamientos en estudio

Factor A: Dosis de 6-Benzil Amino Purina (BAP)

Niveles:

$a_0 = 0$  ppm

$a_1 = 1$  ppm

$a_2 = 2$  ppm

Factor B: dosis de ácido indol butírico (AIB)

$b_0 = 0.1$  ppm

$b_1 = 0.2$  ppm

**Tabla 2.** Tratamientos en estudio de la fase de enraizamiento vía organogénesis de explantas (segmentos basales de las láminas foliares) de *Alstroemeria* spp.

Tratamiento		Descripción
Número	Clave	
t <sub>1</sub>	a <sub>0</sub> b <sub>0</sub>	BAP(0 ppm) + AIB (0.1 ppm)
t <sub>2</sub>	a <sub>0</sub> b <sub>1</sub>	BAP(0 ppm) + AIB (0.2 ppm)
t <sub>3</sub>	a <sub>0</sub> b <sub>2</sub>	BAP(0 ppm) + AIB (0.3 ppm)
t <sub>4</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>0</sub>	BAP(5 ppm) + AIB (0.1 ppm)
t <sub>5</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>	BAP(5 ppm) + AIB (0.2 ppm)
t <sub>6</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>2</sub>	BAP(5 ppm) + AIB (0.3 ppm)
t <sub>7</sub>	a <sub>2</sub> b <sub>0</sub>	BAP(10 ppm) + AIB (0.1 ppm)
t <sub>8</sub>	a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	BAP(10 ppm) + AIB (0.2 ppm)
t <sub>9</sub>	a <sub>2</sub> b <sub>2</sub>	BAP(10 ppm) + AIB (0.3 ppm)

**Diseño Experimental:** Diseño Completamente Randomizado (DCR), bajo arreglo factorial 3 X 3, con nueve tratamientos y tres repeticiones. Cada tratamiento involucró a diez unidades experimentales (explantas: segmentos basales de las láminas foliares).

### 3.3.5. Evaluaciones realizadas.

Las evaluaciones se realizaron mediante la observación directa en cada una de las tres fases de estudio:

#### 3.3.5.1. Fase de establecimiento.

**Contaminación:** Ocho días después de la siembra in vitro, cada unidad experimental fue minuciosamente observada para detectar contaminaciones por hongos o bacterias, y/o muerte de explantas (yemas apicales) por efecto del desinfectante. Se contabilizó y registró el número y porcentaje de explantas contaminados (identificando al contaminante), muertos y sobrevivientes a la desinfección de superficie.

**Longitud de brotes y número de hojas:** Se evaluó la longitud de brote (milímetros) y el número de hojas por brote con intervalos de 8 días a partir de la siembra in vitro, hasta 23 días después de la siembra.

#### 3.3.5.2. Fase de multiplicación.

Con intervalos de 15 días después de la siembra in vitro, se determinó tanto la altura del brote (milímetro), así como el número de hojas y nudos de cada uno de ellos.

### **3.3.5.3. Organogénesis directa a partir de hojas de *Alstroemeria* spp.**

Cada 15 días se evaluaron los cambios morfológicos de los explantas tendientes a la diferenciación de yemas adventicias y posteriormente, de brotes y/o raíces adventicias.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. ETAPA EXPERIMENTAL

##### 4.1.1. Fase I. Establecimiento *in vitro*

##### 4.1.1.1. Contaminación (%) de explantas

Ocho días después de la desinfección superficial de explantas de *Alstroemeria* (yemas apicales) y su correspondiente siembra *in vitro* en medios de cultivo MS, 1962, debidamente esterilizados, se confirmó que el tratamiento con la mejor acción desinfectante (95% de explantas libres de contaminación), resultó de la inmersión de explantas en una solución de jabón Bolívar bebe 8000 ppm (w/v) por 120 minutos, seguido de enjuagues sucesivos con agua destilada estéril y nueva inmersión de los explantas en una solución de hipoclorito de sodio al 2% (v/v) más 2 gotas de Tween 20, por 10 minutos (Tabla 3).

Se determinó además, que en el 5% de explantas restantes, los agentes causantes de la contaminación fueron los hongos *Fusarium* spp. y *Alternaria* spp., *Phytophthora* spp. y una bacteria taxonomicamente no identificada.

**Tabla 3.** Porcentaje promedio de explantas no contaminados por tratamiento. Evaluación registrada a los 8 días de la siembra *in vitro*.

N°	Tratamientos Descripción	N° explantas sembrados	Explantas no contaminadas	
			N°	(%)
t <sub>1</sub>	BAP(0 ppm) + clon amarillo	30	30	100
t <sub>2</sub>	BAP(0 ppm) + clon blanco	30	27	90
t <sub>3</sub>	BAP(0 ppm) + clon rosado con blanco	30	29	96.66
t <sub>4</sub>	BAP(5 ppm) + clon amarillo	30	30	100
t <sub>5</sub>	BAP(5 ppm) + clon blanco	30	27	90
t <sub>6</sub>	BAP(5 ppm) + clon rosado con blanco	30	28	93.33
t <sub>7</sub>	BAP(10 ppm) + clon amarillo	30	29	96.66
t <sub>8</sub>	BAP(10 ppm) + clon blanco	30	30	100
t <sub>9</sub>	BAP(10 ppm) + clon rosado con blanco	30	27	90

Nuestros resultados muestran una mayor eficiencia comparados con los obtenidos por otros investigadores. Por ejemplo, Letelier et al. (2012), realizó un prueba de desinfección en rizomas de *Alstroemeria* utilizando dos fungicidas (Bentale-Captan, 2g

l-1); su desinfección se inició con un lavado y un cepillado para remover los catafilos, los cuales fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2,5% por 30 minutos, obteniéndose tan solo el 46,9% de explantas vivos y sin presencia de patógenos.

Coincidentemente, Hamidoghli (2010), afirma que la contaminación de los explantas obtenidos de rizomas de las especies del género *Alstroemeria*, es el principal problema a superar en su cultivo *in vitro*.

#### **4.1.1.2. Longitud promedio de brotes.**

A los 23 días de la siembra *in vitro*, la longitud promedio de brotes (mm) de *Alstroemeria* spp., no fue estadísticamente influenciada por las dosis probadas de BAP (0, 5 y 10 ppm) ni por la interacción de esta fuente de variabilidad con el Clon (amarillo, blanco o rosado con blanco) utilizado como fuente de explantas (yemas apicales).

Nuestros resultados son contrarios a los reportados por Letelier et al. (2012), quienes determinaron que 20 días después de la siembra *in vitro* de yemas aisladas de rizomas de *Alstroemeria spathulata* (color rosado), la mayor longitud de brotes (5 cm) los registraron los explantas cultivados en medio MS más 6 mg/l de BAP. Estas diferencias en la respuesta probablemente estén asociadas a los distintos tipos de explantas empleados, yemas apicales en nuestro caso y yemas de rizomas en el caso descrito.

Contrariamente, la longitud de brotes resultó ser estadísticamente dependiente (con el 1% de probabilidad de error) del tipo de clon utilizado en la presente investigación. En efecto, la prueba de rango múltiple de Tukey, al 5% de probabilidad de error señaló que, el clon blanco es el que generó plántulas *in vitro* con la mayor longitud promedio de brotes (12.29 mm).

Este fue seguido de los clones Amarillo y rosado con blanco, cuyas longitudes promedio de brote fueron de 9.49 y 7.48 mm, respectivamente. Lo descrito indica que la longitud de brotes de las plántulas *in vitro* de *Alstroemeria* spp., es un carácter genético que podría ser influenciado por las condiciones de manejo, dentro de las cuales destaca el efecto del medio de cultivo y sus constituyentes, principalmente reguladores del crecimiento (BAP).

Al respecto, Salisbury y Ross (2000) sostienen que, a medida que los organismos crecen, aumentan su volumen, peso, número de células, cantidad de protoplasmas y su complejidad, procesos bioquímicos que, en conjunto, determinan la forma y función

(fenotipo) de las plantas, como resultado de la interacción del genoma y el medio ambiente.

Se sabe que los genes controlan la síntesis de las enzimas, las que a su vez controlan los procesos químicos de las células y que todo esto conduce al crecimiento y desarrollo de la planta. Sin embargo, no se conoce con exactitud qué es lo que determina cuales son los genes que se transcriben en un momento dado y que células deben hacerlo (Salisbury y Ross 2000).

**Tabla 4.** Análisis de varianza (ANVA) para la variable altura promedio mayor del explanta (mm).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tabular	
					0.05	0.01
Repeticiones	2	47.24	23.62	5.86*	3.63	6.23
Tratamientos	8	99.78	12.47	3.10*	2.89	3.85
Bap (A)	2	1.35	0.68	0.17	3.63	6.23
Clon (B)	2	72.22	36.11	8.97**	3.63	6.23
AxB	4	26.20	6.55	1.63	3.01	4.77
Error	16	64.45	4.03			
Total	26	211.47				

CV = 26.18 %, \*\*alta significación estadística al 99 %, \* significación estadística al 95%

**Tabla 5.** Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5 % de probabilidad para la variable altura promedio mayor del explanta (mm) en el factor Clon. Evaluación realizada a los 23 días después de la siembra *in vitro*

Ord. De mérito	Clon	Longitud promedio de planta (mm)	Significación
			0.05
1	b1	12.29	A
2	b0	9.49	A B
3	b2	7.48	B

#### 4.1.1.3. Número promedio de hojas

El número promedio de hojas por plántula *in vitro*, es estadísticamente influenciado por el factor Clon, más no por la dosis de BAP ni por la interacción BAP x Clon (Tabla 6).

La Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5% de probabilidad (Tabla 7), permite distinguir una diferencia estadística en el número promedio de hojas de los tres clones, siendo el blanco, el que mejor respuesta numérica ha registrado (1.98 hojas por plántula), superando a los clones amarillo (1.7 hojas por plántula) y rosado con blanco (1.53 hojas por plántula). De lo expuesto se deduce que el número de hojas por plántula de *Alstroemeria* spp, es un carácter genéticamente controlado.

Jordán y Casaretto (2006) establece que las citocininas son hormonas esenciales en el accionar de varios procesos vinculados al crecimiento y desarrollo de las plantas y relacionados a la acción de varios genes.

**Tabla 6.** Análisis de varianza (ANVA) para la variable número promedio de hojas (datos transformados con  $Y = \sqrt{X + 0.5}$ ).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tabular	
					0.05	0.01
<b>Bloques</b>	2	0.603	0.301	5.173*	3.63	6.23
<b>Tratamientos</b>	8	1.445	0.181	3.099	2.89	3.85
<b>Bap (A)</b>	2	0.144	0.072	1.232	3.63	6.23
<b>Clon (B)</b>	2	0.886	0.443	7.606**	3.63	6.23
<b>AxB</b>	4	0.415	0.104	1.780	3.01	4.77
<b>Error</b>	16	0.932	0.058			
<b>Total</b>	26	2.980				

CV = 13.893 %, \*\*alta significación estadística al 99 %, \* significación estadística al 95%

**Tabla 7.** Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5 % de probabilidad para la variable número promedio de hojas (datos transformados con  $Y = \sqrt{X + 0.5}$ ). Evaluación realizada a los 23 días después de la siembra *in vitro*

Ord. de merito	Clon	N° promedio de hoja /explanta	Significación 0.05
1	b1	1.98	A
2	b0	1.10	A B
3	b2	1.53	B

#### 4.1.2. Fase de multiplicación.

En la Fase de Establecimiento de los cultivos *in vitro* (Acapite 2.2.1) se determinó que los mejores medios de cultivo fueron el MS más 5 ppm de BAP para el Clon amarillo, MS para el Clon blanco y MS más 10 ppm de BAP para el Clon rosado con blanco; sin embargo, la multiplicación de estos mismos clones en estos mejores medios de cultivo,

utilizando dos tipos de explantas (YT= yema terminal y N= nudo) fue un fracaso, en la medida que a ocho días de iniciada la Fase de multiplicación, los explantas se tornaron cloróticos, luego se pardearon y finalmente, se necrosaron.

Esta secuencia de eventos, fijó una tasa de multiplicación de 1:0. Por lo tanto, nuestros resultados señalan que, los clones probados de esta monocotiledónea, *Alstroemeria* spp., no son multiplicados en el sistema *in vitro*, a través de yemas terminales ni nudos acompañados de dos porciones de entrenudo, superior e inferior, lo que probablemente sea el reflejo de la ausencia de tejido meristemático secundario (cambium vascular y/o felógeno) en ambos tipos de explantas, a partir de los cuales, las dicotiledóneas normalmente diferencian los nuevos brotes, cada uno de los cuales forma un sistema radicular adventicio.

A diferencia de nuestros resultados, Letelier et al. (2012), tras cultivar ápices de rizomas de *Alstroemeria spathulata* en medio MS con la adición de 6 ppm de BAP, luego de 25 días de cultivo, obtuvo una tasa promedio de multiplicación de 2.3; sin embargo, cuando estos brotes fueron verticalmente seccionados y cada mitad, con sus respectiva base de rizoma, utilizada en un segundo ciclo de multiplicación, no se formaron raíces adventicias, hecho que igualmente limita la propagación *in vitro* de esta especie al uso continuado de rizomas.

Lo antes descrito indica que después de introducir *Alstroemeria* spp. al sistema *in vitro* es necesario estimular la formación de rizomas, como etapa previa a la multiplicación de la especie, pues estos serán la fuente de explantas (ápices o segmentos) para su micro propagación masiva.

**Tabla 8.** Efecto del tipo de explanta, medio de cultivo, y clon en la tasa de multiplicación de *Alstroemeria* spp.

<b>Clon</b>	<b>Tipo de explanta</b> *	<b>Tipo de medio de cultivo</b>	<b>Tasa de multiplicación</b>
<b>Amarillo</b>	YT N	MS + BAP(5 ppm)	1:0
<b>Blanco</b>	YT N	MS + BAP(0 ppm)	1:0
<b>Rosado con blanco</b>	YT N	MS + BAP(10 ppm)	1:0

\*explantas cultivados:

YT=yema terminas sostenida por un segmento de tallo de 7 a 12 mm de largo, N= nudo acompañado de dos porciones de entrenudo, inferior y superior de 7 a 12 mm de largo

#### 4.2. Organogénesis directa a partir de hojas de *Alstroemeria* spp.

Dado el fracaso en la fase de multiplicación utilizando yemas terminales y nudos, se ensayó un nuevo sistema de propagación *in vitro*, utilizando las porciones basales de las láminas foliares acompañadas de sus respectivas zonas de diferenciación de la lígula. Estos explantas fueron asépticamente cultivados en la superficie del medio MS complementado con BAP y AIB, en las concentraciones señaladas en la Tabla 14 e incubados en oscuridad.

**Tabla 9.** Efecto del BAP y AIB en el proceso organogénico directo de porciones basales de láminas foliares, acompañadas de sus respectivas zonas de diferenciación de la lígula. Evaluación registrada a los 15 y 30 días de la siembra *in vitro*.

Tratamientos		Explantas sobrevivientes (%)	
Nº	Descripción	15 días después de su siembra	30 días después de su siembra
t <sub>1</sub>	BAP(0 ppm) + AIB (0.1 ppm)	53.3	50
t <sub>2</sub>	BAP(0 ppm) + AIB (0.2 ppm)	70	63.3
t <sub>3</sub>	BAP(0 ppm) + AIB (0.3 ppm)	66.7	63.3
t <sub>4</sub>	BAP(5 ppm) + AIB (0.1 ppm)	46.7	40
t <sub>5</sub>	BAP(5 ppm) + AIB (0.2 ppm)	53.3	46.7
t <sub>6</sub>	BAP(5 ppm) + AIB (0.3 ppm)	70	63.3
t <sub>7</sub>	BAP(10 ppm) + AIB (0.1 ppm)	83.3	83.3
t <sub>8</sub>	BAP(10 ppm) + AIB (0.2 ppm)	76.7	73.3
t <sub>9</sub>	BAP(10 ppm) + AIB (0.3 ppm)	73.3	70

\*cada tratamiento se compuso de 30 explantas

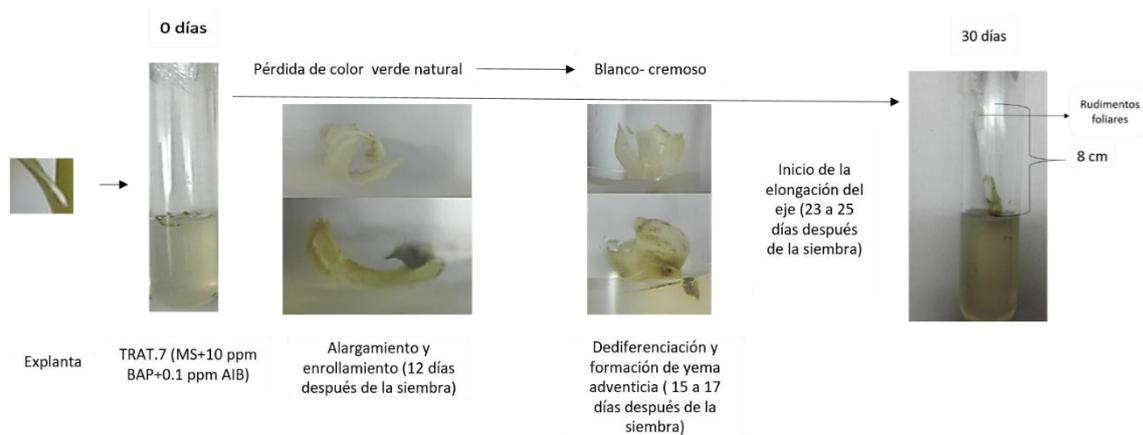
Quince días después de la siembra *in vitro* y posterior incubación de explantas bajo oscuridad, se observó que el mayor porcentaje de sobrevivencia de explantas (83.3%) se presentó en el tratamiento 7 (MS + 10 ppm BAP + 0.1 ppm AIB) seguido de otros tratamientos con elevados niveles de citocininas (10 ppm BAP). Esta tendencia se mantuvo hasta el final de las evaluaciones (30 días después de la siembra *in vitro*, Tabla 9).

Se deduce entonces que la citocinina beneficia la sobrevivencia de explantas, probablemente debido a que actúa convirtiendo al explanta en un sumidero de sustancias orgánicas e inorgánicas que contribuyen a mantener su aspecto juvenil y postergar el inicio de su senescencia y muerte. Al respecto, Jordan y Casaretto (2006), sostienen que

las citocininas, además de retrasar la senescencia, intensifican la expresión de demanda en el transporte de sabia elaborada a nivel del floema.

Entre los días 0 (siembra *in vitro*) y 30 (fin del experimento), los explantas cultivados en el tratamiento 7 (MS+ porque ppm BAP + 0.1 ppm AIB), bajo condiciones de oscuridad, mostraron una pérdida gradual del color verde normal hasta lucir de un color blanco cremoso. En paralelo, atravesaron por una secuencia de eventos característicos de un proceso de de-diferenciación celular.

Estos fueron: (1) alargamiento y enrollamiento de explantas, hasta el día 12 después de la siembra *in vitro*, (2) deformación del explanta y agrupamiento de células, entre los días 12 y 17 después de la siembra; (3) formación de yemas adventicias, entre los días 15 y 20 de la siembra; y, (4) inicio de la elongación del eje caulinar, entre los días 23 y 25 de la siembra. En el día 30 después de la siembra *in vitro*, este eje caulinar registró una longitud de 8 cm, ausencia de raíces adventicias y, en lugar de hojas diferenciadas presentó un conjunto de tres rudimentos foliares en su parte apical (Fig. 7 y 8)



**Figura 7.** Proceso de Organogénesis directa a partir de hojas de *Alstroemeria* spp.

De lo expuesto se deduce que, un balance hormonal compuesto de elevados niveles de citocinina (10 ppm de BAP) y reducidos niveles de auxina (0.1 ppm de AIB), bajo condiciones de oscuridad, propician la organogénesis directa de los explantas de *Alstroemeria* spp, proceso que se inicia con la de-diferenciación de explantas y concluye con la regeneración de tallos.

Para tal efecto, conforme lo mencionan Jordan y Casaretto (2006), se requiere de la participación de las citocininas a fin de promover la división celular e iniciación de

brotos, como etapas clave de un proceso organogénico. Sin embargo, también es importante la presencia de las auxinas, pues según Raven, Evert y Eicchorn (1992), la interacción entre auxinas y citocininas, han ayudado a los fisiólogos vegetales a comprender como actúa las hormonas vegetales para producir el crecimiento integral de la planta. Según parece, la célula vegetal puede seguir dos caminos, puede crecer y dividirse, crecer y dividirse de nuevo, o pueda alargarse sin dividirse.

De otro lado se conoce que los tratamientos de incubación en oscuridad son benéficos para la inducción de brotes masivos en diferentes especies y tipos de explantas, entre los que se incluyen: segmentos de hojas de Maracuyá (*Passiflora edulis* Sims) (Apezzato et al. 1999), dos variedades de la especie Diospyros kaki (Choi et al, 2001), *Alstroemeria* cv. 'Yellow King' (Pedraza et al, 2006), Violeta Africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) (Al- Hussein et al, 2006); y, Durazno (*Prunus domestica* L.) (Petri y Scorza 2010). Aunque no se conoce el mecanismo de cómo la incubación en la oscuridad estimula la respuesta organogénica, se cree que puede preservar y facilitar el movimiento de reguladores de crecimiento a sitios de regeneración (Suárez et al. 2011).

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. La longitud promedio de brotes (mm) de *Alstroemeria* spp., no fue estadísticamente influenciada por las dosis probadas de BAP ni por la interacción de esta fuente de variabilidad con el clon utilizado como fuente de explantas. la longitud de brotes es estadísticamente dependiente al tipo de clon utilizado en la presente investigación. En efecto, la prueba de rango múltiple de Tukey, al 5% de probabilidad de error señaló que, el clon Blanco es el que generó plántulas *in vitro* con la mayor longitud promedio de brotes (12.29 mm). Este fue seguido de los clones amarillo y rosado con blanco, cuyas longitudes promedio de brote fueron de 9.49 y 7.48 mm, respectivamente
2. EL número promedio de hojas por plántula *in vitro*, es estadísticamente influenciado por el factor Clon, más no por la dosis de BAP ni por la interacción BAP x Clon. La Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5% de probabilidad, permite distinguir una diferencia estadística en el número promedio de hojas de los tres clones, siendo el blanco, el que mejor respuesta numérica ha registrado (1.98 hojas por plántula), superando a los clones amarillo (1.7 hojas por plántula) y rosado con blanco (1.53 hojas por plántula).
3. En la fase de la multiplicación se utilizó los mejores medios de cultivo, determinados por la Fase de Establecimiento (MS más 5 ppm de BAP para el Clon Amarillo, MS para el Clon Blanco y MS más 10 ppm de BAP para el Clon Rosado con Blanco), utilizando dos tipos de explantas (YT= yema terminal y N= nudo), la que fue un fracaso, en la medida que a ocho días de iniciada la fase de multiplicación, los explantas se tornaron cloróticos, luego se pardearon y finalmente, se necrosaron. Esta secuencia de eventos, fijó una tasa de multiplicación de 1:0.
4. El balance hormonal compuesto de elevados niveles de citocinina (10 ppm de BAP) y reducidos niveles de auxina (0.1 ppm de AIB), bajo condiciones de oscuridad, propician la organogénesis directa de los explantas de *Alstroemeria* spp, proceso que se inicia con la de-diferenciación de explantas y concluye con la regeneración de tallos.

## CAPÍTULO VI

### LITERATURA CITADA

- Abdelnour, A; Vicent, J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales (en línea). Costa Rica. 12-15p. consultado 22 mzo. 2019. Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A6525e/A6525e.pdf>
- Adama, 2017. Ficha técnica del Vitavax (en línea). Colombia. Consultado 4 my.2019. Disponible en: <http://www.adama.com/Colombia/es/crop-protection/fungicidas/vitavax.html>
- Aguirre,V; Baudoin ; Leigue, A. 2016. Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos (en línea). Tesis Ing. Agr. Cochabamba, Bolivia. Consultado 22 mzo. 2019. Disponible en: <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/212904/1/Aguirre%2C%20Baudoin%2C%20Leigue%20UMSS%202016.pdf>
- Aker, S; Healy,W. 1990. The phylogeography of the genus *Alstroemeria* (en línea). Argentina. Consultado 15 mzo. 2019 Disponible en: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta\\_-\\_bases\\_para\\_un\\_programa\\_de\\_mejoramiento\\_gentico.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_-_bases_para_un_programa_de_mejoramiento_gentico.pdf)
- Allcaco Cuya, JA. 2016. Estandarización de un medio de cultivo para la propagación clonal *in vitro* de *Rubus idaeus* var. Heritage “frambuesa roja” de importancia comercial (en línea). Tesis Lic. Biol. Lima. Perú. URP. Consultado 15 mzo. 2019. Disponible en: [http://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/urp/1009/Allcaco\\_jj.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/urp/1009/Allcaco_jj.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Arrué, C. 1986. Algunos aspectos sobre las orquídeas (en línea). Tesis Lic. Agr. Guatemala. USC. Consultado 23 mzo. 2019. Disponible en: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/10601/1/TESIS.pdf>
- Becerra, V. 2003. Efecto del origen del material vegetativo y la edad sobre la capacidad morfogénica de dos especies de *Passiflora* cultivadas *in vitro* (en línea). Tesis Biol.. Bogotá, Colombia. Consultado 28 mzo. 2019. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis48.pdf>

- Bengoa, M. 1990. Micro propagación del babaco (en línea). Tesis Ing. Agr. UCV. Quillota, Chile. Consultado 23 mzo. 2019. Disponible en: <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/212904/1/Aguirre%2C%20Baudoin%2C%20Leigu%20UMSS%202016.pdf>
- Boeri, P. 2015. Medios de cultivo y Reguladores de crecimiento en: plantas de probeta, Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro* (en línea). Buenos Aires, Argentina. 46p. consultado 22 mzo. 2019. Disponible en: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento\\_completo\\_\\_\\_.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento_completo___.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Bridgen, M. 1999. Cultivo de *Alstroemeria* (en línea). Tesis Ing. Agr. Valdivia, Chile. UAC. Consultado 15 mzo. 2019. Disponible en: [http://repositorio.unjbg.edu.pe/bitstream/handle/UNJBG/1735/437\\_2014\\_mamani\\_huarcaya\\_cv\\_fcag\\_agronomia.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unjbg.edu.pe/bitstream/handle/UNJBG/1735/437_2014_mamani_huarcaya_cv_fcag_agronomia.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Castillo, B. 2004. Determinación de la capacidad embriogénica de 22 clones de cacao tipo nacional multiplicados *in vitro* vía embriogénesis somática (en línea). Tesis Biol. Guayaquil, Ecuador.UG. Consultado 27 mzo. 2019. Disponible <https://books.google.com.pe/books?id=I7IzAQAAMAAJ&pg=PA82&lpg=PA82&dq=Pliego,+F+y+Barcel%C3%B3,+A.+2001.+Morfog%C3%A9nesis+in+vitro.+En:+Introducci%C3%B3n+a+la+biotecnolog%C3%ADa+vegetal+.+M%C3%A9todos+y+aplicaciones.+C%C3%B3rdoba.+Espa%C3%B1a.&source=bl&ots=pGnDGbCFAb&sig=ACfU3U2kmYUZ5nKuSf7iVUPk56y7V-u7UA&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwj15qqWlrHIAhUFw1kKHROyAToQ6AEwAHoECAkQAQ#v=onepage&q=Pliego%2C%20F%20y%20Barcel%C3%B3%2C%20A.%202001.%20Morfog%C3%A9nesis%20in%20vitro.%20En%3A%20Introducci%C3%B3n%20a%20la%20biotecnolog%C3%ADa%20vegetal%20.%20M%C3%A9todos%20y%20aplicaciones.%20C%C3%B3rdoba.%20Espa%C3%B1a.&f=false>
- CEFAF (centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal). 2000. Introducción a la Biotecnología Vegetal (en línea). Roca, W; Ramírez, H. 2000. Santo

Domingo, República Dominicana. Consultado 22 mzo.2019. Disponible en:  
[https://www.academia.edu/11710955/Introducci%C3%B3n\\_a\\_la\\_Biotecnolog%C3%ADa\\_Vegetal](https://www.academia.edu/11710955/Introducci%C3%B3n_a_la_Biotecnolog%C3%ADa_Vegetal)

Culqui, F. 2012. Evaluación de dos tipos de rizomas para la producción de plántulas de astromelia (*Lagerstroernia indica*) con la aplicación de dos fitohormonas en cuatro variedades (aman, amor, ibory, sacha) bajo invernadero en el sector de San Buenaventura provincia de Cotopaxi (en línea). Tesis Ing. Agr. Ecuador, UTC. Consultado 28 mzo.2019. Disponible en:  
<http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/1639/1/T-UTC-1513.pdf>

De Fossard. 1984. Cultivo de tejidos para propagadores de plantas (en línea) Inglaterra, Australia. Consultado 23 mzo. 2019. Disponible en:  
<https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/212904/1/Aguirre%20Baudoin%20Leigues%20UMSS%202016.pdf>

Del Cid, I. 2009. Trabajo de graduación realizado en el laboratorio de cultivos de tejidos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala (en línea). Tesis Ing. Agr. Guatemala, USC. Consultado 21 mzo. 2019. Disponible en: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01\\_2468.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2468.pdf)

Edirisinghage. 2015. Respuesta *in vitro* y en casa de cultivo de variedades cubanas durante la obtención de semilla original de papa (*Solanum tuberosum* L.)(en línea). Tesis de diplomado. Santa Clara, Cuba, UMAV. Consultado 21 de mzo. 2019. Disponible en:  
<http://dspace.uclv.edu.cu/bitstream/handle/123456789/2076/Kasunibiologia.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Escalante, B. 1989. Cultivo *in vitro* de papa principios y metodología. Cajamarca, Perú. 89 p.

Eyzaguirre, T. 2008. Validación de *Alstroemeria citrina* Phil (Alstromeriaceae) (en línea). Revista Gayana Bot. 65(2): 241-244. Consultado 15 mzo. 2019. Disponible en:  
[http://www.gayanabotanica.cl/pdfs/2008/2/12\\_Eyzaguirre\\_2008.pdf](http://www.gayanabotanica.cl/pdfs/2008/2/12_Eyzaguirre_2008.pdf).

- Fonturbel, F. 2001. Los vitropatógenos: consideraciones generales, detención y eliminación (en línea). Revista Biología.org, Vol.6. Consultado 23 mzo.2019. Disponible en: [http://www.biologia.org/revista/ numero6/vitropatogenos.html](http://www.biologia.org/revista/numero6/vitropatogenos.html).
- Fossard, R. 1999. Notas sobre el cultivo de tejidos (en línea). XARMA PTY, Queensland, Australia. Consultado 23 mzo.2019. Disponible en: <http://www.xarma.com.au/culture.html>.
- Freire, M. 2012. Evaluación en fertilización de NPK-Ca en el cultivo de *Alstroemeria (Alstroemeria hybrida)* (en línea). Tesis Ing. Agr. Ambato, Ecuador, UTA. Consultado 15 mzo. 2019. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/2225/1/Tesis-27agr.pdf>
- Garay E. 2015. Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "Orégano" sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, *in vitro*. Tesis de pos grado. Cajamarca, UNC. 40p
- George, E; Sherington, P. 1984. Propagación de plantas por Cultivo de tejidos de prensa oriental (en línea). Gran Bretaña. Consultado 23 mzo. 2019. Disponible en: <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/212904/1/Aguirre%2C%20Baudoin%2C%20Leigues%20UMSS%202016.pdf>
- Hamidoghli, Bohloli, S; Hatamzadeh, A. 2010. *In vitro* propagation of *Alstroemeria using* rhizome explants derived *in vitro* and in pot plants (en línea). African Journal of Biotechnology Vol. 6 (18), pp. 2147-2149. consultado 28 mzo. 2019. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/5115/29c1155ced0cbbb1eb401188169e3c1afa11.pdf>
- Hicks, G. 1994. Shoot Induction and Organogenesis *in vitro*: A Developmental Perspective (en línea). Revista Biología Celular y del Desarrollo *In vitro - Planta*. Consultado 27 mzo. 2019. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02632113>

Hurtado, M; Merino M. 1991. Cultivo De Tejidos Vegetales (en línea). México. 82p. consultado 23 mzo. 2019. Disponibles en: <https://books.google.com.pe/books?id=jy75O2ftHvMC&pg=PA108&dq=Hurtado+M.+y+Merino+M.+1991.+Cultivo+De+Tejidos+Vegetales.+Trillas.+edit.+M%C3%A9xico&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiVrIrSufzkAhWnmOAKHTEADXEQ6AEIJzAA#v=onepage&q=Hurtado%20M.%20y%20Merino%20M.%201991.%20Cultivo%20De%20Tejidos%20Vegetales.%20Trillas.%20edit.%20M%C3%A9xico&f=false>

INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay). 2004. Castillo, A. Propagación de plantas por Cultivo In vitro: Una Biotecnología que nos Acompaña Hace Mucho Tiempo. Uruguay. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas. 1-2p. consultado 25 mzo. 2019. Disponible en: [http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad\\_382.pdf](http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf)

INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, España). 2002. Laboratorio de cultivo de tejidos. 4p. consultado 20 mzo. 2019. Disponible en: <http://www.inia.org.uy/investigacion/biotecnologia/cultivos.htm>,

INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). 2017. Cultivo de Alstroemeria (en línea). Piovano, MV; y Pisi G. Argentina. Agencia de Extensión Rural Luján de Cuyo. 1-2p. consultado el 16 mzo. 2019. Disponible en: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_cartilla\\_Alstroemeria\\_s\\_2017.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_cartilla_Alstroemeria_s_2017.pdf)

Jordán, M; Cassareto, J. 2006. Fisiología Vegetal (en línea). Ediciones Universidad de la Sirena 15: xx-xx. La Sirena, Chile. Consultado 20 mzo. 2019. Disponible en: <http://www.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>

- Kyte, L; Kleyn, J. 1996 Plants from test tube: an Introduction to micropropagation (en línea). New York. 32p. consultado 23 mzo. 2019. Disponible en: <https://lib.ugent.be/en/catalog/rug01:000428677>
- Medina. G. 2006. Efecto del alcohol etílico sobre la actividad específica de aminopeptidasas reguladoras de neuropeptidos en neuronas y astroglia en cultivo (en línea). Jaén, España, UG. Consultado 30 mzo. 2019. Disponible en: [http://www.ujaen.es/investiga/cvi296/TercerCiclo/Memoria\\_GMC.pdf](http://www.ujaen.es/investiga/cvi296/TercerCiclo/Memoria_GMC.pdf)
- Mejia, R; Vittorelli, C. 1988. Cultivo in vitro de plantas de papa. Manual del laboratorio. Trujillo, Perú. 57p.
- Mroginski, L; Sansberro, P; Flaschland, E. 2010. Establecimiento de Cultivo de Tejidos Vegetales (en línea). Argentina.17p. consultado 25 mzo.2019. Disponible en: [https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/escuelagro/\\_archivos/000011\\_INTA%20Biotecnologia/000000\\_Inta%20-%20B%20C%20ADotecnolog%20C%20ADa.pdf](https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/escuelagro/_archivos/000011_INTA%20Biotecnologia/000000_Inta%20-%20B%20C%20ADotecnolog%20C%20ADa.pdf)
- Letelier; Suazo; Green; Cabello.2012. Propagación in vitro de *Alstroemeria spathulata* K. y nuevo límite sur de la especie (en línea). Revista chilena de flora y vegetación. Consultado 28 mzo. 2019. Disponible en: <http://www.chlorischile.cl/alstroemeria%20spathulata%20in%20vitro/Alstroemeria%20spathulata.htm>
- Olmos, S; Luciani, G; Galdeano, E. 2010. Métodos de propagación y conservación de germoplasma en: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II (en línea). Argentina. 351p. consultado 26 mzo. 2019. Disponible en: [http://intainforma.inta.gov.ar/wp-content/uploads/2010/09/bio\\_WEB.pdf](http://intainforma.inta.gov.ar/wp-content/uploads/2010/09/bio_WEB.pdf)
- Osorio, C. 2009. Cultivo y manejo de *Alstroemeria* (en línea). Chile. Universidad de Chile. Informe de la Facultad de Ciencias Agronómicas. Consultado 15 mzo. 2019. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/266256027/EL-CULTIVO-DE-LA-ALSTROEMERIA-pdf>

- Pedersen, C; Hansen, CW; Brandt, K; Kristiansen, K. 1996. *Alstroemeria* plantlets can be induced to flowering by cold treatment during in vitro culture (en línea). *Revista Scientia Horticulturae* 66: 217-228. Consultado 28 mzo.2019. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030442389600917X>
- Peña,C. 2000. Adaptación de técnicas para la micro propagación a partir e meristemos de *Vitis vinífera* L. (en línea). Tesis Biol. Bogotá, Colombia UJ. Consultado 20 mzo. 2019. Disponible en: <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis68.pdf>
- Pérez, CJ; Müller, C; Pertuzé, R; Infante, R. 2007. Cruzamientos interespecíficos en *Alstroemeria* sp. y rescate de embriones in vitro como base del mejoramiento genético de la especie (en línea) . Chile. Consultado 28 mzo.2019. Disponible en: <http://repositoriodigital.corfo.cl/bitstream/handle/11373/1281/Directorio%20de%20Capacidades%20de%20investigacion%20en%20Chile.pdf?sequence=1>
- Ponce E.2018. Diseño de un tren de potabilización para una planta generadora de agua embotellada (en línea). Tesis Ing. Civil. Cholula, Puebla, México, UAP. Consultada 30 mzo. 2019. Disponible en: [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lic/ponce\\_o\\_e/capitulo5.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lic/ponce_o_e/capitulo5.pdf)
- Rangel, O. 2014. Establecimiento de Cultivos in vitro de albahaca (*Ocimum basilicum*) para la producción de aceite esencial (en línea). Tesis Quím. Alim. México, UAEM. Consultado 25 mzo. 2019. Disponible en: <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/14819/Tesis.417185.pdf?sequence=1>
- Raven, PH; Evert, RF; Eicchorn, SE. 1992. *Biología de las plantas* (en línea). Barcelona, España.486p. consultado 20 mzo. 2019. Disponible en:

<https://books.google.com.pe/books?id=xvNd3udrh1YC&pg=PA481&dq=citocinina&hl=&sa=X&ved=0ahUKEwjuhPmWtK7aAhUFtIMKHXINDUUQ6AEIJjAA#v=onepage&q=citocinina&f=false>

Roca, W; Mroginski, L. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura fundamentos y aplicaciones (en línea). Cali, Colombia. 64p. Consultado 23 mzo. 2019. Disponible en: [http://ciatlibrary.ciat.cgiar.org/Articulos\\_Ciat/biblioteca/Cultivo\\_de\\_tejidos\\_en\\_la\\_agricultura.pdf](http://ciatlibrary.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf)

Rojas, S; García J; Alarcón, M. 2004. Propagación asexual de plantas. Conceptos Básicos y Experiencias con Especies Amazónicas (en línea). Colombia. 10p. consultado 25 mzo. 2019. Disponible en: <https://ecojardines.files.wordpress.com/2013/12/propagacinasexualdeplantas.pdf>

Salisbury, F; Ross, C. 2000. Fisiología de las plantas (en línea). USA. Consultado 30 mzo. 2019. Disponible: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/fisiologiavegetalbidwell.pdf>

Skoog, F. y Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue culture in vitro (en línea). Revista CNPAT. Consultado 27 mzo. 2019. Disponible en: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=ACERVO.xis&method=post&formato=2&candidad=1&expresion=mfn=012310>

Suárez, OM; Naranjo, EJ; Garcés, LA; Trujillo, SB. 2011. Organogénesis directa in vitro a partir de hojas de la planta Antiplasmodial *Solanum nudum* Dunal (en línea). Revista Colombia Biotecnología. Vol. XIII No. 2. Consultado 15 my. 2019. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v13n2/v13n2a18.pdf>

- Thorpe, T.A. 1980. Organogénesis in vitro. Structural, physiological and biochemical aspects y embriogénesis (en línea). Revista de Morphogenesis in Plants. Consultado 27 mzo. 2019. Disponible en: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4899-1265-7\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4899-1265-7_2)
- Torres, G. 2007. Unidad de propagación in vitro de especies ornamentales (en línea). Boletín N° 1. Consultado 15 mzo. 2019. Disponible en: [https://www.opia.cl/static/website/601/articles-75605\\_archivo\\_01.pdf](https://www.opia.cl/static/website/601/articles-75605_archivo_01.pdf).
- Vallejo W., Díaz C., Navarro K., Valle R., Arboleda J., Eduard R. 2016. Estudio de la actividad antimicrobiana de películas delgadas de dióxido de titanio modificado con plata (en línea). Programa de Doctorado en Medicina Tropical, Cartagena, Colombia, UC. Consultado 23 mzo. 2019. Disponible: <http://www.scielo.org.co/pdf/racefn/v40n154/v40n154a08.pdf>
- Vásquez. RME. 2016. Micropropagación de *Alstroemeria pallida* Graham a través de rizomas in vitro (en línea). Tesis Ing. Agr. Santiago, Chile, UE. Consultado 28 mzo. 2019. Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/150800/Micropropagacion-de-Alstroemeria-Pallida-Graham-a-traves-de-rizomas-invitro.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Vargas, T. 2012. Establecimiento de un sistema de organogénesis in vitro en *Citrus reticulata* blanco a partir de segmentos de hojas y entrenudos (en línea). Tesis Ing. Agr. Caracas, Venezuela. Consultado 25 mzo. 2019. Disponible en: [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos\\_Ciat/biblioteca/Cultivo\\_de\\_tejidos\\_en\\_la\\_agricultura.pdf](http://ciat-library.ciar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf)
- Ventura, E. 2016. Influencia del Ácido Giberélico (AG3) Y Bencil Aminopurina (BAP) en la propagación clonal in vitro de *Phisalis peruviana*. Tesis Ing. Agr. Cajamarca, Perú. UNC. 21p.

## ANEXOS

**ANEXO 1. COMPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN “MADRE” UTILIZADA EN LA PREPARACIÓN DEL MEDIO MS (1962), 1X.**

**Tabla 10.** Componentes del medio de cultivo MS (1962)

<b>Constituyentes</b>		<b>Concentración mg/l</b>	
	Nitrato de potasio	KNO <sub>2</sub>	1900
	Nitrato de amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 650
	Cloruro de calcio	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
	Sulfato De Magnesio	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
	Fosfato acido de potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
	Sulfato de manganeso	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	22.3
	Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6
<b>SALES</b>	Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
	Yoduro de potasio	KI	0.83
	Molibdato de sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
	Cloruro de cobalto	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
	Sulfato de cobre	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
	Sulfato de fierro	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8
	Na <sub>2</sub> EDTA	Na <sub>2</sub> C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub> N <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	37.3
	Tiamina HCl	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> OS.HCl	1
	Mio Inositol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	100
<b>VITAMINAS</b>	Ácido nicotínico	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	0.5
	Piridoxina	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> .	0.5
	Glicina	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	2.0
<b>AZÚCAR</b>	Sucrosa		30000
<b>GELIFICANTE</b>	Agar		8000
<b>pH</b>			5.7

## APÉNDICE

## 1. Pruebas preliminares de la desinfección superficial de explantas.

Estas pruebas tuvieron el propósito de seleccionar el tipo de desinfectante, dosis y tiempo de exposición más apropiadas para el logro de los objetivos de la presente investigación.

Se realizaron 3 pruebas preliminares:

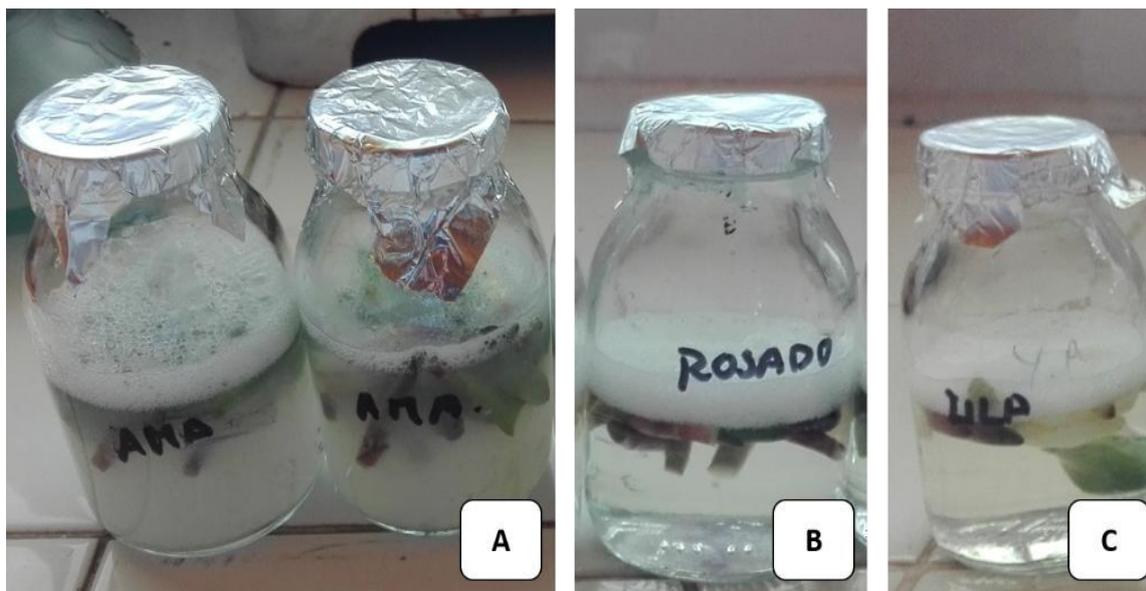
### 1.1. Primera prueba: Jabón, alcohol e hipoclorito de sodio.

Dentro del LBV, las puntas de los brotes vegetativos de cada clon, fueron desempacadas y colocadas en frascos de vidrio de boca ancha, de 75ml de capacidad, previamente esterilizados y debidamente identificados. En cada frasco se depositó 5 explantas y 20 ml de solución de cada tratamiento (Tabla 1). Seguidamente, los frascos conteniendo a las explantas y la solución desinfectante fueron manualmente agitados según el tiempo correspondiente a cada tratamiento.

Cumplidos estos tiempos, los explantas fueron enjuagados cuatro veces, con agua destilada estéril (ADE). Finalmente, se agregó a cada uno de los frascos conteniendo los explantas, aproximadamente 20 mL de ADE y bajo estas condiciones fueron mantenidas hasta el momento de siembra in vitro, bajo condiciones de estricta asepsia y dentro de una cámara de flujo laminar.

**Tabla 11.** Tratamientos de la primera prueba de desinfección superficial de explantas: jabón, alcohol etílico e hipoclorito de sodio.

Tratamiento	Descripción de la solución desinfectante	Tiempo de exposición (minutos)
t <sub>1</sub>	Jabón Bolívar bebe (4160ppm).	1440
t <sub>2</sub>	Alcohol etílico al 70%.	5
t <sub>3</sub>	Hipoclorito de sodio 2%.	5
t <sub>4</sub>	a) Jabón Bolívar bebe (4160ppm)	150
	b) alcohol etílico al 70%	10
	c) Hipoclorito de sodio 2%.	10



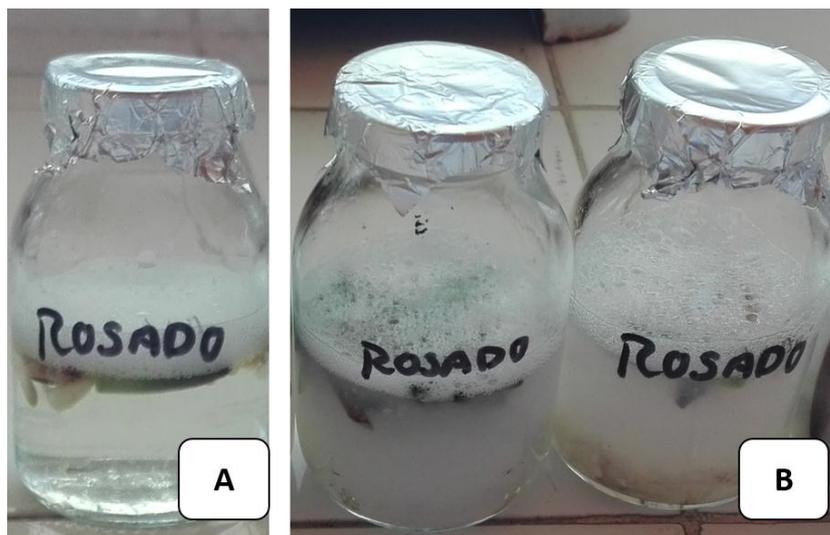
**Figura 8.** Primera prueba de desinfección superficial de explantas: (A) explantas con solución de jabón Bolívar bebe 4160 ppm (w/v), (B) explantas con solución de hipoclorito de sodio al 2.0% (v/v) (C) explantas en solución de alcohol etílico al 70%.

### 1.2. Segunda prueba de desinfección superficial de explantas: Jabón, tween 20, hipoclorito de sodio y agua oxigenada.

En el LBV, cinco puntas de los brotes vegetativos de cada clon, fueron colocadas dentro de frascos de vidrio de boca ancha, de 75ml de capacidad, conteniendo 20 mL de solución desinfectante. Seguidamente, se practicó una vigorosa agitación manual durante los tiempos indicados en la Tabla 2; y finalmente, los explantas de cada tratamiento fueron rápidamente enjuagados con ADE, manteniéndolos así hasta el momento de su siembra in vitro.

**Tabla 12.** Tratamientos de la segunda prueba de desinfección superficial de explantas: jabón, tween 20, hipoclorito de sodio y agua oxigenada de explantas de *Alstroemeria* spp.

Tratamiento	Descripción	Tiempo de exposición (minutos)
t <sub>1</sub>	Hipoclorito de sodio 2%+ dos gotas de tween 20	10
t <sub>2</sub>	a) Jabón Bolívar bebe (4160ppm)	120
	b) hipoclorito de sodio 2%+ dos gotas de tween 20	10
t <sub>3</sub>	Jabón Bolívar bebe (4160ppm)+ agua oxigenada al 3%	10



**Figura 9.** Segunda prueba preliminar de desinfección superficial de explantas: (A) explantas con solución de hipoclorito de sodio al 2.0% (v/v) y dos gotas de Tween-20 (B) explantas con solución de jabón Bolívar bebe 4160 ppm (w/v).

### 1.3. Tercera prueba de desinfección superficial de explantas: jabón, tween 20, hipoclorito de sodio y Vitavax.

Grupos compuestos de cinco puntas de brotes vegetativos, fueron depositados en sus respectivos frascos de vidrio conteniendo 20ml de solución desinfectante, manualmente agitados durante los tiempos indicados en la Tabla 3, y finalmente enjuagados repetidas veces con ADE.

**Tabla 12.** Tratamientos de la tercera prueba de desinfección superficial de explantas: jabón, tween 20, hipoclorito de sodio y Vitavax.

Tratamiento	Descripción	Tiempo de exposición (minutos)
$t_1$	a) Jabón Bolívar bebe (2000 ppm)	120
	b) Hipoclorito de sodio 2% + tween 20	10
$t_2$	a) Jabón Bolívar bebe (4000 ppm)	120
	b) hipoclorito de sodio 2% + tween 20	10
$t_3$	a) Jabón Bolívar bebe (8000 ppm)	120
	b)hipoclorito de sodio 2% + tween 20	10
$t_4$	Vitavax (2000 ppm)	10



**Figura 10.** Tercera prueba preliminar de desinfección superficial de explantas: (A) explantas con soluciones de jabón Bolívar bebe (2000 ppm, 4000 ppm y 8000 ppm w/v), (B) explantas con solución de hipoclorito de sodio al 2.0% (v/v) y dos gotas de Tween20, (C) explantas en solución de Vitavax 2000ppm.

Todos los explantas superficialmente desinfectados en cada una de las tres pruebas preliminares fueron aséptica e individualmente cultivados en la superficie de un medio semisólido, debidamente esterilizado y preparado en base a la formulación Murashige Skoog 1962 (Tabla 15).

Siete días después de la siembra *in vitro* se evaluó la eficiencia de los desinfectantes (tratamientos) utilizados. Para tal efecto, se contabilizó el número de explantas contaminados/libres de contaminación dentro de cada tratamiento, ello nos llevó a determinar que, de todas las pruebas preliminares realizadas, el mejor tratamiento para la desinfección superficial de explantas (puntas) de *Alstroemeria* comprendió su inmersión secuencial en una solución de Jabón Bolívar bebe 8 000 ppm w/v y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio al 2% v/v +dos gotas de Tween20.

Entre un tratamiento y otro se realizó un minucioso enjuague de los explantas con ADE. Por su elevada eficiencia, este tratamiento fue considerado para el inicio de la fase experimental de la presente investigación.

## **2. Resultados de la etapa pre experimental: protocolo de desinfección superficial de explantas**

### **2.1. Efectividad de las soluciones desinfectantes en el control de los contaminantes de superficie de los explantas de *Alstroemeria* spp.**

Ninguna de las soluciones desinfectantes probadas en el primer ensayo (Tabla 6, Fig. 10) fueron lo suficientemente eficaces para controlar el desarrollo de procesos infectivos por efecto de hongos y bacterias de acción superficial en los explantas de *Alstroemeria* spp. (yemas apicales) y sus correspondientes medios de cultivo (MS, 1962). Además de la presencia de contaminantes (*Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Phytophthora* spp.; y una bacteria no identificada), se observó que los explantas sometidos al efecto de los tratamientos que involucraron la presencia de alcohol etílico al 70% (t2 = alcohol etílico al 70%; t4 = jabón Bolívar bebe 4160 ppm + alcohol al 70% + hipoclorito de sodio al 2%), sufrieron una severa deshidratación.

Al respecto, Edmondson (1956) y Gaddum (1959), citados por Medina (2006), sostienen que el alcohol es un veneno citoplasmático que causa la muerte de un cierto número de células en cada expansión, ya que tiene la propiedad de deshidratar y precipitar a las proteínas del citoplasma, siendo capaz de lesionar las células con las que se pone en contacto.

En consecuencia, el 100% de las unidades experimentales (explantas) de cada tratamiento desinfectante fue perdido por acción de contaminantes no controlados y efecto deshidratante del alcohol etílico, resultado que justificó el inicio de un segundo ensayo (Tabla 7).

**Tabla 14.** Porcentaje de contaminación de la primera prueba preliminar: Jabón, alcohol e hipoclorito de sodio.

N°	Tratamiento descripción	Tiempo de exposición (minutos)	Total explantas sembrados	Explantas contaminados (%)
1	Jabón Bolivar bebe(4160 ppm)	1440	5	100
2	Alcohol al 70%	5	5	100
3	Hipoclorito de sodio al 2%	5	5	100
4	Jabón Bolivar bebe(4160 ppm)	150	5	100
	Alcohol al 70%	10		
	Hipoclorito de sodio al 2%	10		

Evidenciados los efectos negativos del alcohol etílico al 70%, el segundo ensayo comprendió la desinfección superficial de explantas de *Alstroemeria* spp. con hipoclorito de sodio, jabón Bolívar bebé y agua oxigenada en las combinaciones y concentraciones señaladas en la Tabla 14.

Ocho días de realizada la desinfección superficial de explantas, se determinó que el tratamiento 2, compuesto por jabón Bolívar bebe 4160 ppm, seguido del hipoclorito de sodio al 2% más 2 gotas de tween 20, con un tiempo de exposición secuencial de 120 y 10 minutos, respectivamente, fue el más efectivo, pues 40% de los explantas resultaron libres de contaminantes, sin mostrar síntomas visibles de deshidratación.

Las otras dos soluciones desinfectantes utilizadas no alcanzaron los resultados esperados en tanto que, el 100% de los explantas tratados murieron por efecto de hongos (*Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Phytophthora* spp.) y bacterias contaminantes, taxonómicamente no identificadas.

**Tabla 15.** Porcentaje de contaminación en la segunda prueba preliminar con jabón, tween 20, hipoclorito de sodio y agua oxigenada.

N°	Tratamiento descripción	Tiempo de exposición (minutos)	Total explantas sembradas	Explantas contaminados (%)
		N°	%	N°
1	Hipoclorito de sodio al 2% v/v+ Tween 20	10	5	100
2	Jabón Bolívar bebe (4160 ppm) + Hipoclorito de sodio al 2% v/v+ Tween 20	120	5	60
		10		
3	Jabón Bolívar bebe (4160 ppm)+ agua oxigenada al 3%	10	5	100

Los resultados antes descritos (40 % de efectividad desinfectante), señalaron que la solución de jabón Bolívar bebé, sola o en combinación con hipoclorito de sodio, previo reajuste de su dosis o tiempo de exposición de explantas podría ser de alta eficiencia para un proceso de desinfección de explantas de *Alstroemeria* spp.; por tal motivo, se diseñó el tercer ensayo (Tabla 8), utilizando como testigo una solución de Vitavax 300 wp, a 2 000 ppm, un fungicida de uso agrícola, ideal para el tratamiento de semillas y plántulas, de acción preventiva y curativa, altamente tóxico, cuyos ingredientes activos son el carboxin (fungicida preventivo, curativo, de acción sistémica que afecta la respiración de los hongos) y el captan (fungicida protectante que presenta una defensa contra los agentes causales de la pudrición de plántulas) (Adama 2017).

Los resultados mostraron que el tratamiento de mayor efectividad para eliminar hongos y bacterias contaminantes de superficie, fue el t3 (jabón Bolívar bebe 8000 ppm, por 120 minutos seguido del hipoclorito de sodio al 2% más 2 gotas de tween 20, por 10 minutos), lográndose obtener el 100 % de explantas sin contaminación, ni deshidratación, en comparación a los tratamientos 1 y 2, con los cuales se obtuvo 100% y 60% de explantas contaminados, respectivamente.

La Prueba del Chi-cuadrado de Pearson nos muestra que el valor 14,7252, es mayor al valor del margen de error 0.01 y 0.05, lo que significa que en esta prueba influyen los tratamientos, para la eliminación de microorganismos.

El tratamiento 4 (Vitavax 300 wp, a 2 000 ppm, por 10 minutos) registró el mayor porcentaje de contaminación de explantas (100%).

**Tabla 16.** Porcentaje de contaminación de la tercera prueba preliminar con jabón, tween 20, hipoclorito de sodio 2% y Vitavax.

N°	Tratamiento descripción	Tiempo de exposición (minutos)	Total explantas sembrados	Explantas contaminados (%)
1	Jabón Bolívar bebe (2000 ppm)	120	5	100
	Hipoclorito de sodio 2% + tween 20	10		
2	Jabón Bolívar bebe (4000 ppm)	120	5	60
	hipoclorito de sodio 2% + tween 20	10		
3	Jabón Bolívar bebe (8000 ppm)	120	5	0
	hipoclorito de sodio 2% + tween 20	10		
4	Vitavax (2000 ppm)	10	5	100

**Tabla 17.** Prueba del Chi-cuadrado de Pearson, en la tercera prueba preliminar con jabón, tween 20, hipoclorito de sodio 2% y Vitavax.

	GI	valor	0.01	0.05
Chi- cuadrado de Pearson	3	14,7252	11,3449	7,8147

La elevada efectividad del tratamiento antes descrito, probablemente derive de una adecuada inactivación, remoción o reducción de los microorganismos contaminantes tanto por parte de la solución de Jabón Bolívar Bebé, como por parte del hipoclorito de sodio, combinado con el agente tenso activo (tween 20).

En el primer caso, el fabricante (ALICORP PERÚ), reporta que el jabón Bolívar Bebé tiene como principales componentes al dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) y a los aceites vegetales. Vallejo et al. (2016), sostiene que el TiO<sub>2</sub> es un inactivador bacteriano, lo que sin duda ha contribuido a la eficiencia del tratamiento.

De otro lado, Garay (2015), afirma que los aceites vegetales son utilizados en la investigación en medicamentos, con el propósito de combatir infecciones, sin embargo, la erradicación definitiva sigue siendo un problema en la medida que, a cada paso que se dá con los nuevos fármacos, también las bacterias dan un paso creando resistencia a

ellos. El mismo autor aclara que el citral, un tipo de aceite vegetal, posee actividad anti microbiana frente a *Staphylococcus aureus*.

Por tanto, asumimos que la combinación del TiO<sub>2</sub> con el aceite vegetal en un solo producto (Jabón Bolivar Bebé) tiene propiedades antimicrobianas y resulta adecuado para el control de contaminantes de superficie en los explantas de *Alstroemeria* spp., más aún si los explantas son luego sometidos al efecto de una solución de hipoclorito de sodio, la cual alcanzará mayor penetración en la estructura de los explantas debido a que, tanto el jabón Bolivar bebé como el tween-20, por sus propiedades tensoactivas, rompen la tensión superficial del agua, favoreciendo la acción del principio activo del desinfectante empleado (ejemplo, hipoclorito de sodio).

Se conoce que el hipoclorito de sodio es una sal compuesta por la unión de ácido hipocloroso e hidróxido de sodio. Cuando el cloro se aplica en forma de alguna de sus sales, el proceso se denomina hipocloración. En este proceso, el cloro actúa como un poderoso oxidante y potente germicida; eliminando bacterias, hongos, virus, esporas y algas (Ponce 2005), liberando así a los explantas de *Alstroemeria* spp., de los contaminantes que tienden a reducir su viabilidad en condiciones *in vitro*.

### 3. Prueba pre eliminar en organogénesis directa

Hojas completas y vigorosas aproximadamente de 5 mm de largo por 2.5 mm de diámetro, fueron aisladas cuidadosamente y asépticamente en tres secciones (ápice, parte media y base de la hoja) y fueron sembrados en la superficie del medio de cultivo de MS (1962).

#### 3.1.Resultados de la Prueba pre eliminar en organogénesis directa

Quince días después de la siembra *in vitro*, se realizó la evolución de sobrevivencia de las explantas, donde podemos observar que la parte basal de la planta nos dio el 100% de explantas vivas, pueda ser que se deba a la presencia de la lígula en la hoja

**Tabla 18.** Prueba pre eliminar en organogénesis directa de *Alstroemeria* spp.

Tipo de explanta *	Tipo de medio de cultivo	% de sobrevivencia
Ápice	MS	0
Parte media	MS	0
Base	MS	100

#### 4. Datos obtenidos en la evaluación de los resultados

**Tabla 19.** Resultados (números promedios) para la variable longitud de plántula (mm). Evaluación realizada a los 15 días después de la siembra *in vitro*

##### DATOS ORIGINALES

Trat.	Repetición			Total	Promedio
	I	II	III		
t <sub>1</sub>	9.22	6.6	4.9	20.72	6.91
t <sub>2</sub>	8.63	11.56	13.4	33.59	11.2
t <sub>3</sub>	8	5.5	3.9	17.4	5.8
t <sub>4</sub>	8.6	9.1	9.7	27.4	9.13
t <sub>5</sub>	12.22	8.22	5.33	25.77	8.59
t <sub>6</sub>	6	5.25	4	15.25	5.08
t <sub>7</sub>	9.5	6	3.11	18.61	6.2
t <sub>8</sub>	13.4	9.3	6	28.7	9.57
t <sub>9</sub>	8.6	6.22	4.75	19.57	6.52
<b>Total</b>	<b>84.17</b>	<b>67.75</b>	<b>55.09</b>	<b>207.01</b>	<b>69</b>

**Tabla 20.** Resultados (números promedios) para la variable longitud de plántula (mm). Evaluación realizada a los 23 días después de la siembra *in vitro*

Trat.	Repetición			Total	Promedio
	I	II	III		
t <sub>1</sub>	12.1	8.1	5.1	25.3	8.43
t <sub>2</sub>	10.75	13.56	15.4	39.71	13.24
t <sub>3</sub>	10.33	7.3	5.2	22.83	7.61
t <sub>4</sub>	11.8	12.2	13.5	37.5	12.5
t <sub>5</sub>	16	11.22	7.22	34.44	11.48
t <sub>6</sub>	7.6	7.13	6.5	21.23	7.08
t <sub>7</sub>	11.2	7.6	3.78	22.58	7.53
t <sub>8</sub>	16.3	12.2	8	36.5	12.17
t <sub>9</sub>	10.4	7.33	5.5	23.23	7.74
<b>Total</b>	<b>106.48</b>	<b>86.64</b>	<b>70.2</b>	<b>263.32</b>	<b>87.77</b>

**Tabla 21.** Resultados (números promedios) de la fase de estación para la variable número promedio de hojas. Evaluación realizada a los 15 días después de la siembra *in vitro*

**DATOS ORIGINALES**

Trat.	Repetición			Total	Promedio
	I	II	III		
t <sub>1</sub>	2.4	0.8	0.8	4	1.33
t <sub>2</sub>	2.038	3.667	4.1	9.81	3.27
t <sub>3</sub>	1.889	1.7	1.2	4.79	1.6
t <sub>4</sub>	2.5	2.6	2.7	7.8	2.6
t <sub>5</sub>	3.667	2.889	1.111	7.67	2.56
t <sub>6</sub>	1.2	1	0.7	2.9	0.97
t <sub>7</sub>	2.4	1.5	0.556	4.46	1.49
t <sub>8</sub>	2.8	2.3	1.7	6.8	2.27
t <sub>9</sub>	1.7	1.444	0.75	3.89	1.3
<b>Total</b>	<b>20.594</b>	<b>17.9</b>	<b>13.617</b>	<b>52.11</b>	<b>17.37</b>

**DATOS TRANSFORMADOS:  $Y = \sqrt{X + 0.5}$**

Trat.	Repetición			Total	Promedio
	I	II	III		
t <sub>1</sub>	1.7	1.14	1.14	3.98	1.33
t <sub>2</sub>	1.59	2.04	2.14	5.78	1.93
t <sub>3</sub>	1.55	1.48	1.3	4.33	1.44
t <sub>4</sub>	1.73	1.76	1.79	5.28	1.76
t <sub>5</sub>	2.04	1.84	1.27	5.15	1.72
t <sub>6</sub>	1.3	1.22	1.1	3.62	1.21
t <sub>7</sub>	1.7	1.41	1.03	4.14	1.38
t <sub>8</sub>	1.82	1.67	1.48	4.97	1.66
t <sub>9</sub>	1.48	1.39	1.12	4	1.33
<b>Total</b>	<b>14.92</b>	<b>13.97</b>	<b>12.37</b>	<b>41.27</b>	<b>13.76</b>

**Tabla 22.** Resultados de la fase de estación para la variable número promedio de hojas.  
Evaluación realizada a los 23 días después de la siembra *in vitro*

### DATOS ORIGINALES

Trat.	Repetición			Total	Promedio
	I	II	III		
<b>t<sub>1</sub></b>	3.5	2	1	6.5	2.17
<b>t<sub>2</sub></b>	2.875	4.222	5	12.1	4.03
<b>t<sub>3</sub></b>	2.222	2.2	1.4	5.82	1.94
<b>t<sub>4</sub></b>	3.1	3.5	4	10.6	3.53
<b>t<sub>5</sub></b>	5.111	3.778	1.556	10.45	3.48
<b>t<sub>6</sub></b>	2.2	1.5	1.4	5.1	1.7
<b>t<sub>7</sub></b>	2.9	1.8	0.778	5.48	1.83
<b>t<sub>8</sub></b>	3.9	3	2	8.9	2.97
<b>t<sub>9</sub></b>	2.7	2.222	1.125	6.05	2.02
<b>Total</b>	28.508	24.222	18.259	70.99	23.66

### DATOS TRANSFORMADOS: $Y = \sqrt{X + 0.5}$

Trat.	Repetición			Total	Promedio
	I	II	III		
<b>t<sub>1</sub></b>	2	1.58	1.22	4.81	1.6
<b>t<sub>2</sub></b>	1.84	2.17	2.35	6.36	2.12
<b>t<sub>3</sub></b>	1.65	1.64	1.38	4.67	1.56
<b>t<sub>4</sub></b>	1.9	2	2.12	6.02	2.01
<b>t<sub>5</sub></b>	2.37	2.07	1.43	5.87	1.96
<b>t<sub>6</sub></b>	1.64	1.41	1.38	4.44	1.48
<b>t<sub>7</sub></b>	1.84	1.52	1.13	4.49	1.5
<b>t<sub>8</sub></b>	2.1	1.87	1.58	5.55	1.85
<b>t<sub>9</sub></b>	1.79	1.65	1.27	4.71	1.57
<b>Total</b>	<b>17.13</b>	<b>15.92</b>	<b>13.87</b>	<b>46.91</b>	<b>15.64</b>

**Tabla 23.** Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 0.05 de probabilidad para la variable longitud de plántula (mm) en el factor Clon de planta. Evaluación realizada a los 15 días después de la siembra *in vitro*

Ord. de merito	Clon	Longitud promedio de planta (mm)	Significación 0.05
1	b1	9.78	A
2	b0	7.41	A B
3	b2	5.8	B

**Tabla 24.** Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5 % de probabilidad para la variable longitud de plántula (mm) en el factor Clon. Evaluación realizada a los 23 días después de la siembra *in vitro*

Ord. de merito	Clon	Longitud promedio de planta (mm)	Significación 0.05
1	b1	12.29	A
2	b0	9.49	A B
3	b2	7.48	B

**Tabla 25.** Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5 % de probabilidad para la variable número promedio de hojas (datos transformados con  $Y = \sqrt{X + 0.5}$ ). Evaluación realizada a los 15 días después de la siembra *in vitro*

Ord. de merito	N° promedio de hoja /explanta Clon	Significación 0.05
1	b1	A
2	b0	A B
3	b2	B

**Tabla 26.** Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5 % de probabilidad para la variable número

promedio de hojas (datos transformados con  $Y = \sqrt{X + 0.5}$ ). Evaluación realizada a los 23 días después de la siembra *in vitro*

Ord. de merito	Clon	N° promedio de hoja /explanta	Significación 0.05
1	b1	1.98	A
2	b0	1.10	A B
3	b2	1.53	B

**Tabla 27.** Registro de temperatura y humedad relativa durante la investigación

Fases de establecimiento			Organogénesis		
Fecha	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	Fecha	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)
17/07/17	22.0	29.0	15/09/17	21.4	35.0
18/07/17	27.7	28.0	18/09/17	20.3	37.0
25/07/17	19.3	31.0	19/09/17	19.9	34.0
26/07/17	21.8	32.0	20/09/17	22.4	32.0
31/07/17	20.4	30.0	21/09/17	21.3	35.0
01/08/17	20.6	31.0	22/09/17	20.1	28.0
02/08/17	20.3	32.0	25/09/17	19.8	34.0
04/08/17	21.5	30.0	26/09/17	21.6	36.0
08/08/17	19.1	33.0	27/09/17	20.7	33.0
09/08/17	20.7	29.0	28/09/17	20.2	35.0
10/08/17	20.7	32.0	02/10/17	21.6	38.0
11/08/17	21.3	33.0	03/10/17	21.0	39.0
14/08/17	21.8	32.0	04/10/17	20.5	35.0
15/08/17	20.2	35.0	05/10/17	20.2	35.0
16/08/17	21.4	34.0	06/10/17	21.8	28.0
17/08/17	21.8	33.0	09/10/17	19.5	36.0
18/08/17	22.4	36.0	10/10/17	20.5	29.0
21/08/17	22.1	37.0	11/10/17	21.0	39.0
22/08/17	21.6	36.0	12/10/17	21.8	32.0
23/08/17	19.9	39.0	16/10/17	22.0	33.0
24/08/17	21.8	38.0			
25/08/17	21.2	36.0			
28/08/17	21.1	38.0			

## GLOSARIO

### A

**Aceite.** Cada uno de los líquidos viscosos, de origen animal, vegetal, mineral o sintético, combustible e insoluble en el agua, pero solubles en ciertos disolventes orgánicos.

**Aceite vegetal.** Es un triglicérido extraído de una planta.

**Ácido.** Compuesto que, al disolverse en agua aumenta la concentración de iones hidrógenos, que es capaz de formar sales por reacción con algunos metales y con las bases, y que puede ceder protones.

**Ác. ascórbico.** Es un antioxidante que ayuda a prevenir el daño a los tejidos causado por los radicales libres, también llamado Vitamina C.

**Ác. cítrico.** Ácido 2-hidroxi-propan-1, 2,3-tricarboxílico, que se encuentran en los zumos de frutos cítricos y se utiliza generalmente en la fabricación de bebidas refrescantes y sales efervescentes.

**Ác. fenilacético.** El ácido fenilacético es una auxina activa

**Ác. fólico.** Ácido pteroilglutámico, vitamina fotolábil hidrosoluble cuya forma coenzimática es el 5, 6, 7,8-tetrahidrofólico (FH<sub>4</sub>). Pertenece al grupo de las vitaminas B y ayuda al organismo en el mantenimiento y en la creación de células nuevas. Esta función es imprescindible en los periodos de división y crecimiento celular rápido.

**Ácido giberélico.** Potente hormona cuya presencia natural en plantas controla su desarrollo.

**Ác. nicotínico.** Ácido b-piridin-carboxílico, componente del complejo vitamínico B. es una vitamina hidrosoluble. Actúa en el metabolismo celular formando parte de la coenzima NAD y NADP.

**Ác. pantoténico.** Vitamina del grupo B (pantoil-b-alanina).

**Adenina.** Base (6-aminopurina) componente esencial de los ácidos ribonucleicos y desoxirribonucleicos.

**Agar.** Sustancia mucilaginosa que se extrae de algunas algas, utilizada como medio de cultivo, en farmacia, en bacteriología y en ciertas industrias.

**Agitador magnético.** Es un dispositivo electrónico que utiliza un campo magnético para mezclar de manera automatizada un solvente y uno o más solutos.

**Alga.** Planta talofita autótrofa con clorofilas u otros pigmentos fotosintéticos

**Amida.** Cada uno de los compuestos orgánicos que formalmente se consideran derivados del amoniaco, o bien de las aminas primarias o secundarias, mediante por sustitución por grupos acilo de un átomo de hidrógeno unido al nitrógeno.

**Aminoácido.** Cada uno de los compuestos orgánicos caracterizados por la común presencia de, al menos, un grupo carboxilo y un grupo amino. Muchos participan en la estructura de las proteínas

**Análisis de Varianza.** Técnica descubierta por Fisher, es un proceso aritmético para descomponer una suma de cuadrados total y demás componentes asociados con reconocidas fuentes de variación.

**Ápice.** Extremo superior o punta de algo

**Asepsia.** Conjunto de procedimientos científicos destinados a eliminar gérmenes infecciosos o patógenos de un organismo u objeto

**Autoclave.** Es un recipiente metálico de paredes gruesas con cierre hermético que permite trabajar con vapor de agua a alta presión y alta temperatura, que sirve para esterilizar material médico o de laboratorio.

**Auxina.** Grupo de reguladores del desarrollo vegetal relacionado con la elongación celular, dominancia apical, iniciación de raíces, etc.

## **B**

**Bacteria.** Esquizofita desprovista de pigmentos fotosintéticos, sin núcleo diferenciado, que se multiplica por división simple o por esporas. Las bacterias son agentes de muchas enfermedades infecciosas.

**Beakers.** Recipiente de vidrio transparente con forma cilíndrica y boca ancha, sirve para medir volumen de líquidos y también para calentar y mezclar sustancias.

**Bioquímica.** Estudio de la estructura y función de los compuestos químicos constituyentes de los seres vivos.

**Biosíntesis.** Síntesis de un determinado compuesto en una célula u organismo vivo

**Biotechnología.** Toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos en usos específicos.

**Biotina.** Ácido carboxílico derivado del heretociclo resultante de la consideración de los ciclos del imidazol y del tiafeno.

**Brote.** Pimpollo o renuevo que empieza a desarrollarse.

## **C**

**Ca- calmodulina.** Es una pequeña proteína encontrada en el interior de las células eucariotas y que tiene como función detectar y enlazarse a los iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) presentes en el citoplasma y, a continuación, interactuar y regular la función en diversas proteínas objetivo de la célula.

**Cámara de flujo laminar.** Es un recinto que emplea un ventilador para forzar el paso de aire a través de un filtro HEPA o ULPA y proporcionar aire limpio a la zona de trabajo libre de partículas de hasta 0.1 micras.

**Cambium.** Es un tejido vegetal meristemático específico de las plantas leñosas, situado entre la corteza y el leño, compuesto normalmente por una capa única de células embrionarias y también de felógeno.

**Cambium vascular.** Es responsable del crecimiento secundario en grosor de los tallos, es un meristemo secundario, formado por células adultas que vuelven a recuperar su carácter meristemático.

**Callo.** Acúmulo celular en un cultivo de tejido en desarrollo.

**Catáfilo.** se denomina catáfilo o catáfila a cada una de las hojas modificadas y reducidas que generalmente protegen a las yemas de la planta que se hallan en reposo, particularmente en órganos subterráneos de reserva como bulbos y rizomas.

**Célula.** Unidad fundamental de los organismos vivos capaz de la reproducción independiente.

**Citocinesis.** Proceso de separación y segmentación del citoplasma que tiene lugar durante la última fase de la mitosis.

**Citocinina.** Grupo de reguladores del desarrollo vegetal que causan división celular, diferenciación celular, diferenciación de tallo, rotura de la dominancia apical, etc.

**Citoesqueleto.** Es un entramado tridimensional de proteínas que provee soporte interno en las células, organiza las estructuras internas e interviene en los fenómenos de transporte, tráfico y división celular.

**Citoplasma.** Parte del protoplasma que está afuera del núcleo y dentro de la pared celular.

**Clon.** Familia de las células genéticamente idénticas que proceden de una célula precursora por división binaria.// Grupos de organismo de idéntica constitución genética que proceden de un único individuo mediante multiplicación asexual , partenogénesis o apomixis.

**Clorosis.** Pérdida del color verde que presentan algunas plantas, motivadas por enfermedades generalmente causadas por virus o carencia de nutrientes.

**Coefficiente de Variación.** Es una medida de variabilidad relativa, que indica el porcentaje de la media correspondiente a la variabilidad de los datos.

**co-factores .** Es un componente no proteico, termoestable y de baja masa molecular, necesaria para la acción de una enzima.

**Coleóptilo.** Es una estructura característica del embrión de la familia de las gramíneas, el cual es, en realidad, una primera hoja modificada de tal modo que forma una caperuza cerrada sobre las hojas siguientes y el meristema apical.

**Contaminación.** Alteración nociva de las condiciones normales de cualquier medio por la presencia de agentes físicos, químicos o biológicos ajenos al mismo.

**Cultivo de tejidos.** Cultivo *in vitro* de células, tejidos u órganos en un medio con sustancias nutritivas bajo condiciones estériles.

## **D**

**Desinfección.** Consiste en un proceso químico que mata o erradica los microorganismos sin discriminación al igual como las bacterias, virus y protozoos impidiendo el crecimiento de microorganismos patógenos en fase vegetativa que se encuentren en objetos inertes.

**Deshidratación.** Ocurre cuando el cuerpo no tiene agua y líquidos como es necesario.

**Dicotiledónea.** Plantas angiosperma que presentan dos cotiledones en su embrión.

**Diferenciación.** Desarrollo en el explanta de nuevas características morfológicas o fisiológicas.

**Difusión.** Transporte molecular de uno o más componentes de una mezcla fluida.//fenómeno en que se entremezclan las moléculas de los fluidos o de los sólidos a causa de su agitación térmica.

**Dióxido de titanio.** Es un compuesto químico cuya fórmula es  $\text{TiO}_2$  .

**Diterpeno.** Son los terpenos de 20 carbonos. Se encuentran en las plantas superiores, hongos, insectos y organismos.

**Dominancia apical.** Se refiere a una marcada tendencia a mostrar un mayor crecimiento en la punta (ápice) de cada rama principal o bien en la punta del tallo principal, mientras que las ramas secundarias muestran nulo o muy escaso crecimiento.

## E

**Equilibrio iónico.** Es un tipo especial de equilibrio químico, caracterizado por la presencia de especies químicas en solución acuosa, las cuales producen iones. Las especies que producen en solución cargas son denominadas electrolito

**Embriogénesis.** es el conjunto de procesos fisiológicos que conducen a la transformación de una sola célula, el cigoto, en un individuo multicelular más complejo, el embrión, contenido en la semilla madura

**Embrión.** Primera etapa en el desarrollo de los organismos pluricelulares. Sigue inmediatamente a la fusión de los pronúcleos en el óvulo fecundado.

**Embriones somáticos.** También denominada embriogénesis asexual, la cual consiste en el desarrollo de embriones a partir de células que no son el producto de una fusión de gametos durante la fecundación o, en otras palabras, es un proceso por el cual se produce una estructura bipolar (el embrión) a partir de una célula somática.

**Endoespermo.** Es el tejido nutricional formado en el saco embrionario de las plantas con semilla; es triploide y puede ser usado como fuente de nutrientes por el embrión durante la germinación.

**Entrenudo.** Es la parte del tallo comprendida entre dos nudos de donde sale otra rama.

**Enzimas.** Cada uno de las macromoléculas de naturaleza proteica que catalizan de forma específica reacciones bioquímicas muy variadas.

**Erradicación.** Eliminación o supresión completa y definitiva de una cosa, especialmente de algo inmaterial que es negativo o perjudicial.

**Espora.** Célula reproductora asexual capaz de experimentar una adaptación metabólica a condiciones desfavorables del medio.

**Estadística.** Es la rama de las matemáticas que estudia la variabilidad, así como el proceso aleatorio que la genera siguiendo leyes de probabilidad.

**Esterilización.** Se denomina esterilización al proceso por el cual se obtiene un producto libre de microorganismos viables.

**Etanol.** Conocido como alcohol etílico, es un alcohol que en condiciones normales de presión y temperatura se presenta como un líquido incoloro e inflamable con una temperatura de ebullición de 78,4 °C.

**Explantas.** Cualquier parte vegetal, puede ser un tejido (fragmentos de hojas, tallos, raíces, pétalos, etc.), un órgano (semillas, anteras, ovarios, botones florales, hojas y raíces completas, etc.), estructuras como las anteras y los ovarios, o bien células individuales (como en el caso de los protoplastos). Con excepción de los óvulos y el polen, las explantas están constituidos por tejidos y/o células somáticas.

**ex vitro.** Situación de cultivo al término de la etapa *in vitro* y su salida a la atmósfera

## **F**

**Fenotipo.** Expresión o manifestación externa de un genotipo en un ambiente determinado.

**Fisiología.** Ciencia que tiene por objeto el estudio de las funciones de los seres orgánicos.

**Fitosanitarias.** Relativo a la prevención y curación de las enfermedades de las plantas.

**Flor.** Órgano especializado en la reproducción, y en la que se pueden reconocer cuatro verticilos: cáliz, corola, androceo y gineceo, que se insertan en el receptáculo floral y se unen al tallo por medio del pedicelo.

**Fotoperiodo.** Alternancia de horas de luz y de oscuridad en un día.

**Fungicida.** Agente capaz de producir la muerte de un hongo.

## G

**Gelificar.** Transformar en gel.

**Genética.** Ciencia que estudia la variabilidad y la herencia biológica.

**Genoma.** Conjunto de genes que especifican todas las características potencialmente expresables de un organismo dado, sin connotación alguna de la naturaleza alelioca de los genes integrantes.

**Genotipo.** Constitución genética, de uno o más genes, de un organismo en relación a un rasgo hereditario específico o a un conjunto de ellos.

**Glaucas.** De color verde azulado.

## H

**Hexitol.** Es un edulcorante obtenido de la hidrogenación del azúcar manosa.

**Híbrido.** Individuo resultante del cruce genético entre dos especies biológicas distintas, normalmente estériles.//Individuo resultantes del cruzamiento entre parentales de la misma especie pero de diferente genotipo.

**Hipoclorito De Sodio.** Es un compuesto químico, fuertemente oxidante de fórmula NaClO. Contiene cloro en estado de oxidación +1, es un oxidante fuerte y económico.

**Hoja.** Órgano laminar especializado en realizar la fotosíntesis, que normalmente consta de limbo o lámina y peciolo; el peciolo puede ensancharse en su base, formando una vaina, y presentar estípulas.

**Hongos.** Vegetal carente de la clorofila, cuyas células se reúnen en hifas para formar el micelio. Se reproducen por esporas y pueden ser de vida parasita, saprofítica o simbiótica.

**Hormona.** Sustancia orgánica de origen natural de las plantas y que en bajas concentraciones influyen en los procesos fisiológicos; principalmente en los procesos de crecimiento, diferenciación y desarrollo de la planta.

**Humedad Relativa.** Razón entre la presión parcial del vapor de agua en una aire húmedo y la presión de un vapor de agua, a la misma temperatura. Indica el grado de saturación del aire.

## I

**Inactivar.** Hacer perder o anular la actividad.

**Infectividad.** Se denomina a la capacidad de un agente patógeno para invadir un organismo y provocar en él una infección.

**Intensidad lumínica.** Se define como la cantidad de flujo luminoso que emite una fuente por unidad de ángulo sólido.

**Investigación.** Es considerada una actividad orientada a la obtención de nuevos conocimientos y su aplicación para la solución a problemas o interrogantes de carácter científico.

**In Vitro.** Literalmente "en vidrio", se aplica a los cultivos (o procesos) que se desarrollan en recipientes estériles.

## L

**Lámina foliar.** Es la superficie más o menos plana de la hoja, cuyos lados se designan como haz y envés, o caras adaxial y abaxial respectivamente.

**Lígula.** Es un apéndice membranoso ubicado en la línea que une la lámina, o limbo foliar, con la vaina en la familia de las gramíneas.

## M

**Magenta.** Caja de policarbonato para cultivos vegetales.

**Matraz.** Es un frasco de vidrio con base circular o algo esférica y un cuello recto y estrecho, que se usa en laboratorios para medir líquidos o mezclar soluciones químicas.

**Meristemo.** Grupo localizado de células en continua división, a partir de las cuales se forman nuevos tejidos y órganos (raíces, tallos, etc.)

**Meristemo Apical.** Situado en el apico de las plantas, es un tipo de meristemo, ubicado en la zona de división y expansión celular dando origen a todos los tallos o ejes secundarios, hojas y flores.

**Meristemo Intercalar.** Tejido meristemático derivado del meristema apical y que continúa con su actividad meristemática a alguna distancia del meristema; puede estar intercalado entre tejidos que ya no son meristemáticos.

**Meristemas Radicales.** Es el tejido meristemático cuyas divisiones originan las células que, tras diferenciarse, forman los tejidos adultos de la raíz.

**Meristemático.** Que tiene las características del meristemo.

**Microorganismos.** Es un ser vivo, o un sistema biológico, que solo puede visualizarse con el microscopio.

**Micropropagación.** Propagación asexual (vegetativa) *in vitro* de plantas.

**Monocotiledónea.** Planta angiosperma con un solo cotiledón en el embrión, también denominada liliópsida.

**Morfogénesis.** Desarrollo de algún carácter morfológico o estructura del organismo.

**Mutación.** Cambio del material genético no debido a la segregación o la recombinación, que se transmite a las generaciones sucesivas, dando lugar a células mutantes.

**N**

**Necrosis.** Muerte de las células y los tejidos de una zona determinada de un organismo vivo.

**Nudo.** En el tallo puntos donde se insertan las hojas o las ramas.

**O**

**Organismos.** Conjunto de los órganos que constituyen un ser vivo

**Organogénesis.** En cultivos de tejidos vegetales, formación de órganos como raíces y tallos, a partir de callos o meristemos.

**P**

**Patente.** Es un conjunto de derechos exclusivos concedidos por un Estado al inventor de un nuevo producto o tecnología, susceptibles de ser explotados comercialmente por un período limitado de tiempo, a cambio de la divulgación de la invención.

**Patógenos.** Es un microorganismo capaz de producir enfermedad o daño a la biología de un huésped, sea animal o vegetal.

**Piridoxina.** Vitamina B6

**Pirimidina.** Derivado de la piridina de fórmula  $C_4H_4N_2$ , algunos de cuyos derivados son constituyentes de los ácidos nucleicos.

**Placas Petri.** Es un instrumento de laboratorio el cual puede ser de cristal o de plástico, que consta de una base circular, y las paredes son de una altura baja aproximadamente de 1 cm; y una cubierta de la misma forma pero algo más grande de diámetro para que encaje como una tapa.

**Plántula.** Se denomina al estadio de desarrollo del esporófito que comienza cuando la semilla rompe su dormancia y germina, y termina cuando el esporófito desarrolla sus primeras hojas no cotiledonares.

**Primordio.** Conjunto de células embrionarias que tiene la propiedad de dividirse a un ritmo considerable para formar los distintos órganos de la planta.

**Probeta.** Tubo de cristal alargado y graduado, cerrado por un extremo, el cual tiene como finalidad medir el volumen.

**Proteína.** Compuesto químico constituido por aminoácidos unidos covalentemente a través de uniones peptídicas.

**Protoplasto.** Son células vegetales que han sido separadas de su pared celular mediante un tratamiento enzimático o mecánico y adoptan forma esférica en el medio de cultivo

**Prueba De Rango Múltiple de Tukey.** Se utiliza en ANOVA para crear intervalos de confianza para todas las diferencias entre las medias de los niveles de los factores mientras controla la tasa de error en un nivel especificado.

**Purinas.** Es una base nitrogenada, un compuesto orgánico heterocíclico aromático.

## **R**

**Raíz.** Es la parte de la planta que crece el interior de la tierra, fija la planta al suelo. Absorbe del suelo la savia bruta y la conduce hasta el tallo. Almacena sustancias de reserva.

**Raíz adventicia.** Son aquellas que no provienen de la radícula del embrión, sino que se originan en cualquier otro lugar de la planta.

**Raíces Nutricias.** Raíces activamente ocupadas en la toma de agua y minerales

**Ramificación Sipondial.** Tanto las yemas apicales como axilares se desarrollan de la misma forma, sin que haya ningún tipo de dominancia alguna. Aunque el eje central central sigue siendo notorio, rápidamente las ramas alcanzan el mismo desarrollo. Este tipo de ramificación se presenta en casi todas las demás plantas.

**Reproducción Sexual.** También llamada gamética. En ella existen células especializadas en la reproducción. Esas células se llaman gametos (óvulo y espermatozoide). Los descendientes son parecidos a los parentales pero no son iguales.

**Reproducción Asexual.** También llamada vegetativa. En ella no existen células especializadas en la reproducción. Una célula o una porción del cuerpo de un organismo se desprenden y se desarrolla un nuevo individuo idéntico al anterior.

**Resupinadas.** Es el fenómeno por el cual un determinado órgano de la planta sufre una inversión o torsión respecto a su posición original.

**Riboflavina.** Vitamina B2

**Rizoma.** Tallos subterráneos alargados, más o menos engrosados, que dan lugar a tallos aéreos y raíces; suelen presentar escamas (catáfilos).

## S

**Senescencia.** Es el proceso iniciado como respuesta al estrés y daño ocurrido en una célula, y constituye una ruta alternativa de respuesta a la muerte celular programada.

**Síntoma.** Es la manifestación en la planta del proceso de la enfermedad. Por lo tanto su expresión depende de la planta.

**Sistema Radicular.** Se denomina al conjunto de raíces de una misma planta

**Sistema Vascular.** Es un tipo de tejido vegetal complejo, formado por varias clases de células y componentes, que se encuentra en las plantas vasculares. Los componentes primarios del tejido vascular son el xilema y el floema

**Solución.** Una disolución es una mezcla homogénea a nivel molecular o iónico de dos o más sustancias puras que no reaccionan entre sí, cuyos componentes se encuentran en proporciones variables.

**Soluciones Tampón.** Denominadas también soluciones buffer, son aquéllas que ante la adición de un ácido o base son capaces de reaccionar oponiendo la parte de componente básica o ácida para mantener fijo el pH.

## **T**

**Tallo.** Es el eje de la parte generalmente aérea de las cormófitas y es el órgano que sostiene a las hojas, flores y frutos.

**Tasa De Proliferación.** Se presenta por medio de un proceso llamado multiplicación celular.

**Taxonomía.** Es la ciencia de la clasificación. El término se emplea habitualmente para designar a la taxonomía biológica, la «teoría y práctica de clasificar organismos».

**Tensoactivo.** Son sustancias que influyen por medio de la tensión superficial en la superficie de contacto entre dos fases.

**Tetracíclicos.** Se deriva de la estructura molecular que consiste en cuatro estructuras en forma de anillo en forma de T.

**Tiamina.** La vitamina B1, es una vitamina hidrosoluble, insoluble en alcohol, que forma parte del complejo B.

**Totipotencia.** Célula que tiene la capacidad de dividirse y originar un individuo completo.

**Transpiración.** Consiste en la pérdida de agua en forma de vapor que se produce en las plantas.

**Tween 20.** es un tensoactivo tipo polisorbato cuya estabilidad y relativa ausencia de toxicidad permiten que sea usado como detergente y emulsionante en numerosas aplicaciones domésticas, científicas, alimentarias, industriales y farmacológicas

## U

**Unidad experimental.** Es la muestra de unidades que es necesario producir en una condición para obtener una medición o dato representativo. Unidad a la cual se le aplica un solo tratamiento (que puede ser una combinación de muchos factores).

## V

**Vainas.** Ensanchamiento en la base del peciolo; en algunas monocotiledóneas, como las gramíneas, parte basal de las hojas, que envuelve al tallo.

**Variabilidad Genética.** Se refiere a la variación en el material genético de una población o especie, e incluye los genomas.

**Variación somaclonal.** Es la variación observada en las plantas que han sido producidas por el cultivo de tejidos vegetales. Los reordenamientos cromosómicos son una fuente importante de esta variación.

**Vástago.** Renuevo o ramo tierno que brota del árbol o de otra planta.

**Viabilidad.** Es el estudio que dispone el éxito o fracaso de un proyecto a partir de una serie de datos base de naturaleza empírica.

**Vitavax.** Fungicida sistémico y protector de semillas, lo que asegura la represión de patógenos que atacan a la semilla, durante la germinación.

**Virus.** Es un agente infeccioso microscópico que solo puede multiplicarse dentro de las células de otros organismos.

## **Y**

**Yema.** Tejido meristemático cubierto por escamas protectoras, que son hojas rudimentarias o en formación, se localiza en el ápice de una rama o en las axilas de las hojas.

**Yema axilar.** Es un brote embrionario localizado en la axila de una hoja.

## **Z**

**Zeatina.** Fitohormona isoprenoídica del grupo de las citocininas, es la citocinina natural que se aísla de las plantas. .