



## **UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR**

**Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente**

**Carrera de Agronomía**

**TEMA:**

**“EVALUACIÓN DE EXPLANTES DE DOS ESPECIES DE YAGUAL (*Polylepis reticulata*) y (*Polylepis incana* Kunth), MEDIANTE PROPAGACIÓN IN VITRO UTILIZANDO TRES DIFERENTES CITOQUININAS EN CUATRO DOSIS, EN LAGUACOTO II, CANTÓN GUARANDA, PROVINCIA BOLÍVAR”**

**Proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniera Agrónoma, otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, carrera de Agronomía.**

**AUTORAS:**

Sheyla Jackeline Chicaiza Pilacuan

Fabiana Kamila Realpe Bustillos

**DIRECTORA:**

Ing. Sonia Fierro Borja Mg.

**GUARANDA - ECUADOR**

**2023**

EVALUACIÓN DE EXPLANTES DE DOS ESPECIES DE YAGUAL (*Polylepis reticulata*) y (*Polylepis incana Kunth*), MEDIANTE PROPAGACIÓN IN VITRO UTILIZANDO TRES DIFERENTES CITOQUININAS EN CUATRO DOSIS, EN LAGUACOTO II, CANTÓN GUARANDA, PROVINCIA BOLÍVAR.

**REVISADO Y APROBADO POR:**



.....  
**ING. SONIA FIERRO BORJA Mg.**  
**DIRECTORA**



.....  
**ING. DAVID SILVA GARCÍA Mg.**  
**BIOMETRISTA**



.....  
**ING. HUGO VÁSQUEZ COLOMA PhD.**  
**REDACCIÓN TÉCNICA**



## CERTIFICADO DE AUTORÍA

Nosotras Sheyla Jackeline Chicaiza Pilacuan con cédula de identidad número 1004590004 y Fabiana Kamila Realpe Bustillos, con cédula de identidad número 0250020559 declaramos que el trabajo y los resultados reportados en este informe, no han sido previamente presentados para ningún grado o calificación profesional; y, que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultados y citados con su respectivo autor (es).

La Universidad Estatal de Bolívar, puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, su Reglamentación y la Normativa Institucional vigente.

.....  
**SHEYLA JACKELINE CHICAIZA PILACUAN**  
**AUTORA**  
**CI: 1004590004**

.....  
**FABIANA KAMILA REALPE BUSTILLOS**  
**AUTORA**  
**CI: 0250020559**

.....  
**ING. SONIA FIERRO BORJA Mg.**  
**DIRECTORA**  
**CI: 0201084712**

.....  
**ING. DAVID SILVA GARCÍA Mg.**  
**ÁREA DE BIOMETRÍA**  
**CI: 0201600327**

.....  
**ING. HUGO VÁSQUEZ COLOMA PhD.**  
**ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA**  
**CI: 0200852523**

  
rio  
N° ESCRITURA 20230201003P00912

**Notaría Tercera del Cantón Guaranda**  
**Msc. Ab. Henry Rojas Narvaez**  
**Notario**



**DECLARACION JURAMENTADA**

**OTORGADA POR:**

FABIANA KAMILA REALPE BUSTILLOS y  
SHEYLA JACKELINE CHICAIZA PILACUAN

**DI: 2 COPIAS L.L.**

Factura: 001-001-000012991

En la ciudad de Guaranda, capital de la provincia Bolívar, República del Ecuador, hoy día veintiséis de abril del dos mil veintitrés, ante mí Abogado HENRY ROJAS NARVAEZ, Notario Público Tercero del Cantón Guaranda, comparecen las señoritas FABIANA KAMILA REALPE BUSTILLOS soltera, domiciliada en esta ciudad de Guaranda, celular número 0985981193; y, SHEYLA JACKELINE CHICAIZA PILACUAN soltera, domiciliada en el Cantón Ibarra y de paso por esta ciudad de Guaranda, celular número 0986211190, por sus propios derechos, obligarse a quienes de conocerlos doy fe en virtud de haberme exhibido sus documentos de identificación y con su autorización se ha procedido a verificar la información en el Sistema Nacional de Identificación Ciudadana; bien instruidos por mí el Notario con el objeto y resultado de esta escritura pública a la que procede libre y voluntariamente, advertidos de la gravedad del juramento y las penas de perjurio, me presenta su declaración Bajo Juramento declaran lo siguientes "Previo a la obtención de Ingenieras Agrónomas, manifestamos que los criterios e ideas emitidas en el presente trabajo de investigación titulado "EVALUACIÓN DE EXPLANTES DE DOS ESPECIES DE YAGUAL (*Polylepis reticulada*); y, (*Polylepis incana* Kunth)," MEDIANTE PROPAGACIÓN IN VITRO UTILIZADO TRES DIFERENTES CITOQUININAS EN CUATRO DOSIS, EN LAGUACOTO II, CANTÓN GUARANDA, PROVINCIA BOLÍVAR, es de nuestra exclusiva responsabilidad en calidad de autores". Es todo cuanto podemos declarar en honor a la verdad, la misma que la hacemos para los fines legales pertinentes. HASTA AQUÍ LA DECLARACIÓN JURADA. La misma que elevada a escritura pública con todo su valor legal. Para el otorgamiento de la presente escritura pública se observaron todos los preceptos legales del caso, leída que les fue a los comparecientes por mí el Notario en unidad de acto, aquellos se ratifican y firman conmigo se incorpora al protocolo de esta Notaría la presente escritura, de todo lo cual doy fe.-

  
FABIANA KAMILA REALPE BUSTILLOS  
C.C. 0250020558

  
SHEYLA JACKELINE CHICAIZA PILACUAN  
C.C. 1004590004

  
AB. HENRY ROJAS NARVAEZ  
NOTARIO PUBLICO TERCERO DEL CANTON GUARANDA



### Document Information

---

Analyzed document	TESIS URKUND - CHICAIZA SHEYLA; REALPE FABIANA.pdf (D164569861)
Submitted	4/20/2023 5:59:00 PM
Submitted by	.
Submitter email	schicaiza@mailles.ueb.edu.ec
Similarity	8%
Analysis address	nmonar.ueb@analysis.orkund.com

### Sources included in the report

---

### Entire Document

---

### Hit and source - focused comparison, Side by Side

---

Submitted text	As student entered the text in the submitted document.
Matching text	As the text appears in the source.

  
**ING. SONIA FIERRO BORJA Mg.**  
DIRECTORA

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo de investigación dedico principalmente a Dios quien ha guiado mi vida con sabiduría, salud y fuerzas, ya que gracias a él he logrado concluir con una de mis metas profesionales.

A mis padres Yalyla y Danilo a quienes amo mucho, ya que ellos estuvieron a mi lado brindándome su apoyo integral y sus consejos para hacer de mí una mejor persona, a mis hermanos Ivana y Matheo por sus palabras, a mis sobrinos Tadeo y Aitana quienes me llenan de alegría.

**Fabiana**

## **DEDICATORIA**

Este trabajo de investigación dedico principalmente a Dios por haberme dado la valentía y la fuerza para cada acción realizada en todo mi trayecto de vida personal y profesional, siendo mi guía para seguir adelante superando las adversidades.

A mi madre con todo mi corazón Lucía Pilacuan por su apoyo incondicional y el sacrificio en proporcionarme durante todos estos años con los recursos económicos necesarios para seguir adelante con mis estudios. En definitiva, me ha dado todo lo que soy con principios y valores para nunca rendirme y triunfar en la vida.

A mi abuelito Pedro, a mis hermanos Jefferson Chicaiza y Larry Chicaiza por estar presentes con su apoyo integral en todo momento, a mi sobrina querida Francys Chicaiza, porque también forma parte de mi superación e inspiración para continuar.

A mi novio, Bryan López que a pesar de la distancia y los obstáculos siempre ha estado apoyándome con palabras de aliento y apoyo constante en todo el trayecto de mi carrera universitaria para seguir adelante y culminar con éxito mis estudios y realizarme como profesional.

**Sheyla**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecemos a Dios por su amor y bondad que no tiene fin; por darnos salud y vida, bendecirnos, guiarnos por el buen camino y que gracias a su eterno amor tenemos la oportunidad de encontrarnos en este lugar, de corazón agradecemos a nuestras familias principalmente a nuestros padres, por apoyarnos en cada decisión y proyecto; gracias por creer en nosotras y gracias a Dios por permitirnos vivir y disfrutar cada día; gracias a la vida porque cada día nos demuestra lo hermosa que es y lo justa que puede llegar a ser.

Agradecemos de manera especial a la Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Agronomía, por habernos acogido en sus aulas el tiempo que ha transcurrido desde que iniciamos nuestros estudios y hasta que culminamos; a todos los Docentes quienes supieron compartir su conocimiento, siendo la base fundamental para formarnos como profesionales.

Agradecemos profundamente al Tribunal de proyecto de investigación liderados por la Ing. Sonia Fierro Borja Mg. (Directora), Ing. David Silva García Mg. (Biometrista) e Ing. Hugo Vásquez Coloma PhD. (Redacción Técnica), por el conocimiento compartido, apoyo y orientación durante la carrera y en la realización de esta investigación como modalidad de titulación.

Finalmente, a nuestros compañeros de los cuales no nos vamos a olvidar nunca con quienes hemos tenido momentos de alegrías, tristezas, estrés, pero siempre los llevaremos en nuestros corazones.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	PÁG.
CAPÍTULO I.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 PROBLEMA .....	3
CAPÍTULO II .....	4
2. MARCO TEÓRICO .....	4
2.1 Origen <i>Polylepis</i> .....	4
2.2. Clasificación taxonómica.....	5
2.3. Importancia ambiental de <i>Polylepis</i> .....	5
2.4. Características vegetativas de <i>Polylepis reticulata</i> .....	5
2.4.1. Planta .....	5
2.4.2. Tallo .....	6
2.4.3. Hojas .....	6
2.4.4. Inflorescencia.....	6
2.5. Características vegetativas de <i>Polylepis incana Kunth</i> .....	6
2.5.1. Planta .....	6
2.5.2. Tallo .....	6
2.5.3. Hojas .....	7
2.5.4. Flores .....	7
2.5.5. Fruto.....	7
2.6. Distribución y datos ecológicos.....	7
2.6.1. <i>Polylepis reticulata</i> .....	7
2.6.2. <i>Polylepis incana Kunth</i> .....	8
2.7. Distribución de <i>Polylepis</i> en el Ecuador .....	9
2.8. Manejo .....	10
2.9. Usos .....	10
2.9.1. Uso medicinal .....	10
2.10. Propagación .....	11
2.10.1. Propagación sexual .....	11

2.10.2. Propagación asexual .....	11
2.10.3. Esquejes .....	11
2.10.4. Estacas .....	12
2.10.5. Acodos .....	12
2.11. Plagas .....	12
2.12. Enfermedades.....	12
2.13. Control químico .....	12
2.14. Micropropagación in vitro .....	13
2.14.1. Ventajas de la propagación in vitro .....	13
2.14.2. Desventajas de la propagación in vitro .....	14
2.14.3. Técnicas de micropropagación .....	14
2.15. Etapas de la micropropagación .....	15
2.15.1. Etapa 0: Preparación del material vegetal.....	15
2.15.2. Etapa 1: Establecimiento del cultivo .....	15
2.15.3. Etapa 2: Multiplicación.....	16
2.15.4. Etapa 3: Enraizamiento y aclimatación .....	16
2.16. Explante .....	17
2.17. Medios de cultivo.....	17
2.17.1. Medios simples .....	17
2.17.2. Medios enriquecidos .....	17
2.17.3. Medios selectivos.....	18
2.17.4. Medios diferenciales .....	18
2.17.5. Componentes del medio de cultivo.....	18
2.18. Citoquininas .....	18
2.19. Kinetina (K) .....	19
2.20. Bencil Amino Purina (BAP).....	19
2.21. Soluciones nutritivas.....	20
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>21</b>
<b>3. MARCO METODOLÓGICO .....</b>	<b>21</b>
3.1. Materiales.....	21
3.1.1. Localización de la investigación.....	21

3.1.2. Situación geográfica y climática .....	21
3.2. Zona de vida .....	21
3.3. Material experimental.....	21
3.4. Material de campo (laboratorio).....	21
3.5. Materiales de oficina .....	22
3.6. Métodos .....	23
3.6.2. Factores en estudio.....	23
3.6.2. Tratamientos .....	24
3.6.3. Tipo de diseño experimental o estadístico.....	24
3.6.4. Procedimiento.....	25
3.6.5. Tipos de análisis .....	25
3.7. Métodos de evaluación y datos tomados .....	26
3.7.1. Porcentaje de explantes contaminados (PEC) .....	26
3.7.2. Días a la brotación (DB) .....	26
3.7.3. Número de brotes por explante (NBE) .....	26
3.7.4. Número de hojas por explante (NHE) .....	26
3.7.5. Longitud del brote (LB).....	26
3.7.6. Días a la emisión de raíces (DER).....	26
3.7.7. Número de raíces (NR).....	27
3.7.8. Longitud de raíz (LR) .....	27
3.8. Manejo del experimento .....	27
3.8.1. Selección de las plantas .....	27
3.8.2. Preparación del medio de cultivo.....	27
3.8.3. Recolección y selección de los brotes en el invernadero.....	27
3.8.4. Desinfección de los brotes .....	27
3.8.5. Introducción de los explantes en el medio de cultivo.....	28
3.8.6. Preparación del medio de cultivo con las diferentes dosis .....	29
CAPÍTULO IV.....	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30

4.1. Factor A: Especies de <i>Polylepis</i> .....	31
4.2. Factor B: Tipos de citoquininas.....	36
4.3. Factor C: Dosis de citoquininas.....	41
4.4. Interacción de especies de <i>Polylepis</i> por tipos de hormonas (AxB) .....	46
4.5. Interacción de especies de <i>Polylepis</i> por dosis de hormonas (AxC).....	52
4.6. Interacción de factores Tipos de citoquininas por dosis (BxC).....	58
4.7. Interacción de factores especies de <i>Polylepis</i> por tipos de citoquininas y por dosis (AxBxC).....	65
4.8. Coeficiente de Variación (CV).....	70
4.9. Correlación y regresión lineal .....	70
4.9.1 Correlación (r).....	70
4.9.2 Regresión (b).....	70
4.9.3 Coeficiente de determinación (R <sup>2</sup> ).....	71
4.10. Comprobación de hipótesis .....	73
4.11. Conclusiones y recomendaciones.....	74
4.11.1 Conclusiones.....	74
4.11.2 Recomendaciones .....	76
BIBLIOGRAFÍA .....	77
ANEXOS	

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁG
N.-1	Preparación de los medios de cultivos	29
N.-2	Resultados promedios de la prueba de Tukey y efecto principal del factor A: Tipos de <i>Polylepis</i>	31
N.-3	Resultados promedios de la prueba de Tukey para el factor B: Tipos de citoquininas	36
N.-4	Resultados promedios de la prueba de Tendencias polinomiales para el factor C: Dosis de citoquininas	41
N.-5	Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% en la interacción de factores especies de <i>Polylepis</i> por tipos de hormonas	46
N.-6	Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% en la interacción de factores especies de <i>Polylepis</i> por dosis de hormonas	52
N.-7	Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% en la interacción de factores tipos de citoquininas por dosis de hormonas	58
N.-8	Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% en la interacción de factores especies de <i>Polylepis</i> por tipos de citoquininas y por dosis de hormonas	65
N.-9	Resultados del análisis de correlación y regresión lineal	70

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO		PÁG
N.-1	Resultados promedios del factor A: tipos de <i>Polylepis</i> en las variables días a la brotación y días a la emisión de la raíz	33
N.-2	Resultados promedios del factor A: tipos de <i>Polylepis</i> en las variables número de brotes por explante y número de hojas por explante	34
N.-3	Resultados promedios del factor A: tipos de <i>Polylepis</i> en las variables longitud del brote y de la raíz	35
N.-4	Resultados promedios del factor B: tipos de citoquininas en la variable número de brotes por explante a los 90 días	38
N.-5	Resultados promedios del factor B: tipos de citoquininas en las variables longitud del brote y de la raíz a los 90 días	39
N.-6	Resultados promedios del factor B: tipos de citoquininas en la variable días a la emisión de la raíz	40
N.-7	Tendencias polinomiales del factor C: dosis de citoquininas en la variable número de brotes por explante a los 90 días	43
N.-8	Tendencias polinomiales del factor C: dosis de citoquininas en la variable longitud del brote (cm) a los 90 días	44
N.-9	Tendencias polinomiales del factor C: dosis de citoquininas en la variable longitud de la raíz (cm) a los 90 día	45
N.-10	Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos de la interacción de factores especies de <i>Polylepis</i> por tipos de Citoquininas (AxB) en la variable número de brotes por explante a los 90 días	48

N.-11	Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos en la interacción de factores especies de <i>Polylepis</i> por tipos de citoquininas (Ax $\times$ B) en la variable longitud del brote (cm) a los 90 días	49
N.-12	Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos en la interacción de factores especies de <i>Polylepis</i> por tipos de citoquininas (Ax $\times$ B) en la variable número de raíces a los 90 días	50
N.-13	Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos de la interacción de factores especies de <i>Polylepis</i> por tipos de citoquininas (Ax $\times$ B) en la variable longitud de la raíz a los 90 días	51
N.-14	Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos de la interacción de factores especies de <i>Polylepis</i> por dosis de citoquininas (Ax $\times$ C) en la variable longitud del brote a los 90 días	55
N.-15	Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos de la interacción de factores especies de <i>Polylepis</i> por dosis de citoquininas (Ax $\times$ C) en la variable número de raíces a los 90 días	56
N.-16	Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos de la interacción de factores especies de <i>Polylepis</i> por dosis de citoquininas (Ax $\times$ C) en la variable longitud de la raíz a los 90 días	57
N.-17	Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos de la interacción de factores tipos de hormonas por dosis de citoquininas (B $\times$ C) en la variable número de brotes por explante a los 90 días	61

N.-18	Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos de la interacción de factores tipos de hormonas por dosis de citoquininas (BxC) en la variable longitud del brote en cm a los 90 días	62
N.-19	Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos en la interacción de factores tipos de hormonas por dosis de citoquininas (BxC) en la variable número de raíces a los 90 días	63
N.-20	Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos en la interacción de factores tipos de hormonas por dosis de citoquininas (BxC) en la variable longitud de raíces en cm a los 90 días	64
N.-21	Regresión lineal entre la variable días a emisión de la raíz versus la longitud del brote (cm) a los 90 días	71
N.-22	Regresión lineal entre la variable longitud de la raíz a los 90 días versus la longitud del brote (cm) a los 90 días	72
N.-23	Regresión lineal entre la variable número de raíces a los 90 días versus la longitud del brote (cm) a los 90 días	72



## ÍNDICE DE ANEXOS

### ANEXO

- N.-1 Ubicación del ensayo
- N.-2 Base de datos
- N.-3 Fotografías de la instalación, seguimiento y evaluación del ensayo
- N.-4 Glosario de términos técnicos

## RESUMEN Y SUMMARY

### RESUMEN

El género *Polylepis* representa gran diversidad en Sudamérica, y contribuyen a reducir la erosión, sirven de refugio y alimentación de muchas especies, son fuente de recarga hídrica y captura de carbono, están presentes en áreas restringidas, tienen una reproducción sexual reducida y están en peligro de extinción. Es importante realizar procesos de investigación a través del cultivo in vitro. Esta investigación, se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Campus Lagunacoto. Los objetivos fueron medir el efecto principal de dos especies de *Polylepis* (*P. reticulata* e *incana*), tres tipos de hormonas (Bencil Adenina, Bencil Amino Purina y Kinetina) con cuatro dosis (1; 3; 5 y 7 mg/l) e interacciones. Se aplicó el Diseño Completamente Aleatorizado con 24 tratamientos y tres repeticiones. Se evaluaron las principales variables del explante a los 90 días. Se realizaron análisis de varianza, prueba de Tukey, tendencias polinomiales, correlación y regresión. El efecto más importante fue el varietal, presentando mayor sanidad y promedios más altos en *Polylepis reticulata*. El efecto de los tipos de hormonas y dosis incidieron parcialmente en algunas variables, pero no fueron consistentes. Se midieron dependencia significativa de factores. El componente que redujo la longitud del brote (variable dependiente), fue días a la emisión de la raíz y los que contribuyeron positivamente fueron el número y longitud de la raíz. Finalmente, esta investigación, permitió seleccionar alternativas tecnológicas promisorias para la propagación asexual de *Polylepis* in vitro como fue la especie *Polylepis reticulata* con la hormona Kinetina en dosis de 1 y 3 mg/l, lo que contribuyó a obtener plántulas de mayor calidad en cuanto a sanidad y longitud del brote, a nivel experimental del laboratorio.

**Palabras clave:** Conservación, Explante, Hormona, Micropropagación y *Polylepis*.

## SUMMARY

The genus of plants *Polylepis* represents great diversity in South America, and contributes to reducing erosion, serves as shelter and feeding for many species, is a source of water recharge and carbon captures. Being in restricted areas, it has reduced sexual reproduction, consequently, it is in danger of extinction. Due to this reduction of sexual reproduction, is important to carry out research processes through in vitro culture. This research was carried out in the Laboratory of Biotechnology of the Laguacoto Campus. The objectives were to measure the main effect of two species of *Polylepis* (*P. reticulata* and *incana*), three types of hormones (Benzyl Adenine, Benzyl Amino Purine and Kinetin) with four doses (1; 3; 5 and 7 mg/l) and interactions. The Completely Randomized Design was applied with 24 treatments and three repetitions. The main explant variables were evaluated at 90 days. Analysis of variance, Tukey's test, polynomial trends, correlation and regression were performed. The most important effect was the varietal, presenting greater health and higher averages the *Polylepis reticulata*. The effect of hormone types and doses partially affected some variables, but were not consistent. Significant factor dependence was measured. The component that reduced the length of the shoot (dependent variable), was days to the emission of the root and those that contributed positively were the number and length of the root. Finally, this research allowed to select promising technological alternatives for the asexual reproduction of *Polylepis* in vitro such as the species *Polylepis reticulata* with the hormone Kinetina in doses of 1 and 3 mg/l, which contributed to obtain seedlings of higher quality in terms of health and length of the outshoot.

**Key words:** Conservation, Explant, Hormone, Micropropagation and *Polylepis*.

# CAPÍTULO I

## 1.1 INTRODUCCIÓN

Los bosques de *Polylepis* representan la vegetación natural de una gran parte de los Andes Centrales a altitudes entre 3500 y 4400 m. Las aproximadamente 28 especies del género ocupan una gran variedad de hábitats, desde el límite superior de los bosques de neblina hasta los volcanes áridos del Altiplano. Sin embargo, durante milenios las actividades humanas en los Andes han destruido a más del 95% de estos bosques, restringiéndolos a hábitats marginales y modificando su composición florística y faunística. Las extremas condiciones ambientales (temperaturas bajas, periodos secos) en el ámbito de los bosques de *Polylepis*, han favorecido en la evolución de especies de plantas con propiedades útiles para el hombre. (Kessler, M. 2006)

En el Ecuador se encuentra una gran variedad de *Polylepis* (Yagual), como es el *Polylepis incana* Kunth ya que al igual que *Polylepis reticulata* que se encuentran en la cordillera (3000 a 4500 m), tiene una gran importancia ornamental, agroforestal, cercas vivas, parques, proyectos de forestación, protección de vertientes. Estos bosques contienen una fauna y flora única caracterizada por especialistas de hábitat y con altos niveles de endemismo. Desdichadamente, representan uno de los hábitats más vulnerables de los altos Andes por la fuerte presión antropogénica existente, siendo además el único recurso maderable en esas alturas. (Gualavisi, L. 2008)

En la provincia de Bolívar existen alrededor de 5 especies de *Polylepis*, que ocupan un área aproximada de 42 hectáreas y éstas se encuentran distribuidas en los sectores de Salinas, Tundapamba, San Lorenzo y Vía al arenal. (Naranjo, A. 2014)

En zonas donde se encuentran bosques de *Polylepis*, las familias aprovechan la madera debido a que tiene gran resistencia y dureza, además la corteza interna de la especie es utilizada como medicina natural debido a sus propiedades curativas. (Ruiz, D. 2013)

La propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo in vitro; allí se tratan los explantes al igual que las plantas madres, se colocan en

medios de cultivo desinfectados, se realiza la multiplicación o proliferación de explantes, a continuación, sigue el enraizamiento, luego el endurecimiento y la aclimatación de las plantas. (Ramos, J. 2012)

Las citoquininas o citocininas, son un grupo de hormonas vegetales (fitohormonas) que promueven la división y la diferenciación celular y además regulan el crecimiento y el desarrollo de las plantas. (Antama, F. 2017)

La kinetina es una fitohormona de citoquinina de tipo adenina utilizada en medios de cultivo de plantas como los medios Murashige y Skoog (MS), mismos que constituyen los medios de cultivo vegetal más utilizados y están disponibles como mezclas salinas basales o medios que contienen compuestos orgánicos. (Quimicompany, 2020)

Bencil Amino Purina, es de la familia de las citoquininas, por lo tanto, estimulan la división celular, promueven la formación de capullos laterales, induce los cambios metabólicos, la floración y la fructificación e inhibe el envejecimiento de las plantas. (Agroactivo , 2021)

En esta investigación, se plantearon los siguientes objetivos:

- Estudiar el efecto de las citoquininas en la propagación in vitro de dos especies de Yagual: *Polylepis reticulata* y *Polylepis incana* Kunth.
- Validar el efecto de tres tipos de citoquininas en la propagación in vitro de *Polylepis*.
- Medir la respuesta de cuatro dosis de citoquininas en la propagación in vitro de *Polylepis*.
- Determinar la dependencia o interacción de factores en estudio: especies de *Polylepis* por tipos de citoquininas y dosis en la propagación in vitro.

## 1.2 PROBLEMA

En Ecuador se presentan severos problemas de deforestación y destrucción de especies forestales con el propósito de extender la frontera agrícola y ganadera del país, siendo una amenaza para los bosques de Yagual. Estos daños llevan consigo consecuencias desastrosas para el medio ambiente tales como la pérdida de fuentes hídricas, degradación de los suelos y la desaparición de la flora y fauna silvestre, así como de microorganismos benéficos para el suelo; existen también limitados conocimientos sobre la propagación sexual con un bajo porcentaje de germinación.

En la propagación asexual de plantas de Yagual, no forman raíces fácilmente por ello estos deben ser llevados a un medio que favorezca la emisión de raíces y que contengan porcentajes de nutrientes químicos necesarios como son las fitohormonas. En los últimos años la propagación vegetativa de esta especie ha presentado un alto porcentaje de mortalidad en la etapa de vivero superior al 50%, afectando económicamente al productor.

Además, la producción de esta especie se restringe debido al gran vacío de información biológica y datos insuficientes sobre el manejo y reproducción asexual.

La presente investigación tuvo como finalidad la propagación in vitro con la aplicación de cuatro dosis de tres citoquininas (Bencil Adenina, Bencil Amino Purina y Kinetina), en dos especies nativas de Yagual (*Polylepis reticulata*) y (*Polylepis incana Kunth*) incrementando la cantidad y calidad de plantas, siendo esta especie nativa un elemento fundamental en las estrategias de conservación y restauración de los ecosistemas naturales como parte de un cambio general de los métodos de uso de tierras de los Andes que son imprescindibles para mantener la viabilidad ecosistémica de esta región además son sumideros de carbono atmosférico, protectores de la función hidrológica y conservadores de biodiversidad, etc, por ello nace la necesidad de propagar esta especie nativa bajo la tecnología de cultivo in vitro, en consideración que esta especie presenta dificultad por los métodos tradicionales.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Origen *Polylepis*

El género *Polylepis* es típico de los Andes con especies definidas en Perú, Venezuela, Colombia, Ecuador, Bolivia, norte de Chile y en el noroeste de Argentina. Estos crecen en altitudes de 4000 a 5000 metros sobre el nivel del mar, pero hay de ellos en altitudes por debajo de los 1800 metros sobre el nivel del mar.

Se adaptan a diversos tipos de suelos, formando matorrales en barrancos y pendientes húmedas. La regeneración natural no es habitual, pero si procede de semilla vegetativa. (Simpson, B. 1979)

Los árboles de papel, como se les conoce comúnmente otros nombres populares incluyen: Queñoa, Yagual; pertenecen al género botánico de *Polylepis* el cual ha sido estudiado taxonómicamente desde 1911, cuando Bitter describió 33 especies, 9 subespecies y 18 variedades. *Polylepis* pertenece a la familia de las Rosáceas, Sanguisorbeae, incluye especies de árboles medianos y pequeños, con algunos arbustos, que habitan las alturas de los Andes.

Los árboles de *Polylepis* han sido relegados hoy a una distribución muy diferente; su hábitat, alterado y reducido a fragmentos de bosque discontinuo. Esta amenaza ha crecido y existen numerosos trabajos y esfuerzos para mitigar la pérdida de esta especie. Por otro lado, en la ecología los parches restantes de *Polylepis* no son bosques de una sola especie, son sistemas ecológicos más complejos y otras especies vegetales conviven con especies animales que deben jugar un papel clave en el mantenimiento de la dinámica ecológica y la diversidad en el bosque de *Polylepis*. (Nava, G. 2018)

## 2.2. Clasificación taxonómica

Reino:	Plantae
División:	Embriofitas
Clase:	Dicotiledonea
Familia:	Rosácea
Género:	<i>Polylepis</i>
Especie	incana - reticulata
Nombre científico:	<i>Polylepis reticulata</i> , <i>Polylepis incana</i> <b>Kunth</b>
Nombres comunes:	Árbol de papel, Palo colorado, Yagual, Pantza, Queñual, Siete cortezas

**Fuente:** <https://dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/1146/1/128.pdf> (Meléndez, J. 2014)

## 2.3. Importancia ambiental de *Polylepis*

Los bosques de *Polylepis* proveen de servicios ambientales y socioeconómicos de gran valor, como la protección de fuentes de agua, el control de la erosión de los suelos y la regulación del microclima y del hábitat para numerosas especies. Los árboles de *Polylepis* además de eso poseen importancia económica para las comunidades campesinas. (Renison, D., Cuyckens, G. 2018)

## 2.4. Características vegetativas de *Polylepis reticulata*

### 2.4.1. Planta

*Polylepis reticulata* más conocida como quinua, quinar o yagual, es una especie de árboles, caracterizada por presentar un tronco retorcido con varias ramificaciones, que en algunos de los casos se originan desde la base. (Calderón, M. 2010)



#### **2.4.2. Tallo**

Se caracterizan por ser árboles que miden hasta 12 metros de alto; los troncos son retorcidos y tienen la corteza de color café anaranjado, que se desprende en láminas bastante delgadas como papel. (Caranqui, J. 2010)

#### **2.4.3. Hojas**

Las hojas son alternas y crecen amontonadas en las puntas de las ramas, conformadas por 3 hojuelas que miden hasta 2,5 cm de largo. (Ulloa, C. 2004)

#### **2.4.4. Inflorescencia**

Las inflorescencias son racimos colgantes poco llamativos, de hasta 8 cm de largo. Las flores miden alrededor de 5 mm y son de color verdoso. (Ulloa, C. 2004)

#### **2.4.5. Fruto**

El fruto es seco drupáceo, compuesto por espinas allanadas y desiguales, con un ancho 0.2 - 0.8 cm abarcando las espinas y un largo entre 0.3 - 0.9 cm. (Calderón, M. 2010)

### **2.5. Características vegetativas de *Polylepis incana* Kunth**

#### **2.5.1. Planta**

Árboles o arbustos con corteza exfoliante en láminas papiráceas, rojizas. (Lojan, L. 1992)

#### **2.5.2. Tallo**

Es una especie que incluye arbustos de 1 a 5 m, de altura, hasta árboles de 22 m. El fuste normalmente es torcido y puede ser único o con varios tallos. El árbol tiene abundante ramificación que muchas veces nace desde la base del tronco. La copa generalmente es difusa e irregular. La corteza es de color rojiza o marrón - amarillento brillante, que se desprende en forma continua en capas delgadas translúcidas, en las ramas jóvenes la corteza externa aumenta considerablemente su

diámetro aparente. En el caso de *Polylepis incana* Kunth el espesor de la corteza varía entre 2 y 2.4 mm, su consistencia es papirácea. (Chiclote, J. 1985)

### **2.5.3. Hojas**

Las hojas son compuestas, imparipinadas con un número variable de folíolos de acuerdo a la especie (3 en el caso de *Polylepis incana* Kunth de 15 a 23 mm, de largo). Por lo general los folíolos son de color verde claro a verde oscuro, brillante en el haz, glabros y con el envés blanquecino - grisáceo y pubescente. Sus nervaduras son bien marcadas. En cualquiera de las especies del género el tamaño de la hoja puede variar según las condiciones donde crece, siendo más grande en terrenos húmedos. (Chiclote, J. 1985)

### **2.5.4. Flores**

Sus flores de Yagual son incompletas; sin corola ni nectario, se agrupan en racimos con 5 - 10 flores cada uno, son racimos simples de 2 a 8 cm de longitud con 4 a 7 flores que miden de 5 a 6 mm de longitud, las semillas de 2 a 3 mm de longitud. (Limaico, R. 2011)

### **2.5.5. Fruto**

El fruto es seco drupáceo, con 2 a 5 proyecciones planas de forma irregular con varias puntas. (Limaico, R. 2011)

## **2.6. Distribución y datos ecológicos**

### **2.6.1. *Polylepis reticulata***

*Polylepis reticulata*, especie endémica del Ecuador, se desarrolla en la Sierra Andina *Polylepis reticulata* se encuentra en el Bosque andino alto y páramo húmedo, desde los 2500 hasta los 4500 msnm. Se localiza en las provincias de Azuay, Cañar, Chimborazo, Imbabura, Pichincha y Tungurahua. (Peter, M. 1999)

### **2.6.2. *Polylepis incana* Kunth**

La especie se encuentra en los Andes del Ecuador donde su rango altitudinal va desde 2800 a 4900 msnm en zonas de temperatura de 3 a 12 grados centígrados. De acuerdo a la clasificación de Holdridge esta especie se distribuye entre los pisos montanos y páramo Sub Alpino; soporta precipitaciones que varían entre los 250 a los 2000 mm anuales distribuidos en 6 - 7 meses. Se desarrolla en suelos ligeramente ácidos y de textura media. (Limaico, R. 2011)

Crece en forma natural en una amplia gama de suelos, desde los suelos superficiales con afloramientos de roca, en laderas pedregosas protegidas, hasta en el fondo de los valles y quebradas con suelos profundos. Se desarrolla en suelos residuales a partir de areniscas, de topografía quebrada; su rusticidad es tal que puede llegar a crecer hasta en grietas de roca. Prefieren suelos ligeramente ácidos y de textura media. Por la importancia del género para las zonas altas de los andes, tanto como protector de las cuencas hidrográficas y refugio para la vida silvestre, como productos de madera y leña, el género está protegido por la ley siendo prohibida su tala. (Chiclote, J. 1985)

## 2.7. Distribución de *Polylepis* en el Ecuador

<b>Especie</b>	<b>Distribución en Ecuador</b>	<b>Altitud</b>	<b>Cordilleras</b>	<b>Distribución por país</b>
<i>P. incana</i>	Azuay, Bolívar, Carchi, Napo, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Pichincha	2700 - 4300	Occidental y Oriental	Ecuador y Perú
<i>P. lanuginosa</i>	Azuay, Bolívar, Cañar, Chimborazo	2800 - 3250	Occidental	Endémica de Ecuador
<i>P. microphylla</i>	Chimborazo	3500 - 4100	Occidental	Ecuador y Perú
<i>P. pauta</i>	Carchi, Cotopaxi, Imbabura, Napo, Pichincha	3800 - 4200	Oriental	Ecuador y Perú
<i>P. reticulata</i>	Azuay, Cañar, Carchi, Loja, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Pichincha, Tungurahua	2750 - 4300	Occidental y Oriental	Ecuador y Perú
<i>P. seríceea</i>	Azuay, Cañar, Carchi, Loja, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, El Oro, Napo, Pichincha	3500 - 4140	Occidental y Oriental	Venezuela hasta Perú
<i>P. weberbaueri</i>	Azuay, Cañar	3500 - 4100	Occidental	Ecuador y Perú

Fuente: Romoleroux. K, 1996 Flora en Ecuador. New York.

## **2.8. Manejo**

El manejo que se realiza al bosque dependerá del uso que se le quiere dar a esta especie. Al estado natural el manejo se limita a proteger la tala ilegal y de las quemadas ocasionadas por acción humana.

En caso de asociaciones agroforestales, esta especie cumple la labor de proteger a los cultivos de los vientos, las heladas y los cambios bruscos de temperatura, creando un microclima especial que mejora la productividad de la parcela. En este caso el manejo que se realiza son las podas y raleos periódicos.

## **2.9. Usos**

Los campesinos lo utilizan como cerco vivo, cerco de huertos, para bosques de leña y bosques para cosecha de agua. También se utiliza para el mejoramiento del suelo por su gran cantidad de hoja y corteza, que se desprenden y son de fácil descomposición. La madera del *Polylepis* es dura, pesada y resistente a la humedad, utilizando como postes para la construcción y cercos. Debido a su alta densidad, el *Polylepis* es muy apreciado para leña por su alto valor calorífico es bueno para la elaboración de carbón de calidad. La práctica de establecimiento de cercos vivos alrededor del predio agrícola representa también un manejo de enorme eficiencia para protección de los suelos ante la erosión. (Espinel, W., Chavez, J. 2008)

Las hojas y ramitas trituradas y hervidas, proporcionan un tinte de color marrón claro que se emplea en el teñido de prendas de lana y algodón. (Añazco, M., Sánchez, D., Castro, E., Mosquera, R. 2014)

### **2.9.1. Uso medicinal**

Se recomienda su uso medicinal, tomándose la corteza interna como paliativo de las amigdalitis, inflamación de la garganta, resfríos y todo tipo de afecciones respiratorias. (Espinel, W., Chavez, J. 2008)

## **2.10. Propagación**

### **2.10.1. Propagación sexual**

El tiempo desde la floración hasta la maduración del fruto es de unos dos meses y cuando está maduro el fruto se cae muy rápidamente. Entonces es necesario monitorear de cerca los desarrollos para asegurar que la cosecha se lleve a cabo de manera oportuna. Cada inflorescencia tiene un número limitado de frutos y, debido a la falta de germinación, se debe cosechar una gran cantidad. (Branbyge, J. 1987)

### **2.10.2. Propagación asexual**

La forma más común de propagar el Yagual es a través de esta ruta. Se practican tres métodos: por esquejes o ramillas, por estacas convencionales o por acodos. Esto se hace en el vivero usando “esquejes preformados” que son ramas con “chichones”, es decir las raíces se forman primero. Este procedimiento ha sido probado con éxito en *Polylepis* con rápido crecimiento y desarrollo de plántulas. (Pretell, J. 1985)

### **2.10.3. Esquejes**

De los tres métodos, el método más confiable y recomendado para propagar el género *Polylepis* es a través de ramillas o esquejes que algunas son conocidas también como estacas apicales. El prendimiento es alto cuando se aplica la técnica correcta y porque no afecta a los árboles semilleros cuando se toman las ramillas.

También hay una ventaja de menor riesgo de entrada de patógenos a través de pequeñas heridas. Las plantas crecen más rápido, los esquejes se pueden encontrar fácilmente en árboles viejos, aislados en ramas con humedad en la corteza durante los primeros meses de lluvia. Apto para plantar el mismo día de recolección; de lo contrario los esquejes deben dejarse en musgo o suelo húmedo. Para plantar cada esqueje se corta un centímetro por debajo de las raíces bien establecidas y se podan las hojas dejando una sola. (Ocaña, D. 1991)

#### **2.10.4. Estacas**

Se debe considerar que estas estén lignificadas, de 20 a 25 cm de longitud, se entierran hasta un tercio de su longitud manteniéndolas bajo semi sombra hasta que se constate que han enraizado. (Gualavisí, L. 2008)

#### **2.10.5. Acodos**

Es la propagación para la formación de raíces adventicias del tallo que está adherido a la planta madre. Prontamente, el tallo enraizado, acodado se separa para convertirlo en una nueva planta que crece sobre sus propias raíces. (Agrosíntesis, 2019)

#### **2.11. Plagas**

La plaga más común que se ha observado es la Oruga defoliadora (Coleóptera, género *Agelastica*) del Yagual. (Mondoñedo, J. 1986)

#### **2.12. Enfermedades**

Hoy en día se ve comúnmente en viveros donde se produce *Polylepis spp* (Yagual) dejar un color amarillento en las hojas, luego se secan después de eso y, finalmente, la planta muere. Enfermedades fúngicas causadas por hongos del género *Peronospora spp*: todo esto puede deberse a un riego deficiente y una mala ventilación del vivero, el origen del material genético (semillas o esquejes), cambios climáticos repentinos, mucha sombra en verano; para controlar esta enfermedad se puede utilizar diferentes tratamientos. (Guaimalama, J. 1999)

#### **2.13. Control químico**

Incluye el uso de pesticidas suministrados por casas comerciales, pero por ser caro y dañino para el ecosistema, se recomienda el control agronómico, que consiste en la selección de plántulas según el tamaño y la gravedad de la enfermedad (sanas, medianamente atacadas y atacando), cuando se lo hace ocasionalmente. (Guaimalama, J. 1999)

## **2.14. Micropropagación in vitro**

La micropropagación de plantas in vitro es una técnica que consiste en propagar plantas de forma asexual. Con este método replicamos plantas a partir de un explante, a partir de hojas, tallos, raíces, semillas o cualquier otro órgano, para cultivarlo en un laboratorio. De esta forma podemos crear un ambiente artificial y controlarlo, por ejemplo, la temperatura, la humedad, nutrientes esenciales, entre otros que nos permiten asegurar un crecimiento exitoso. (BioplanInVitro, 2019)

El resultado de este proceso son plantas idénticas a la planta madre de la que se tomó el explante. Sus frutos y demás características tendrán el mismo sabor, tamaño, color, resistencia a enfermedades, al medio ambiente, entre otros. Esta técnica se utiliza para multiplicar plantas mejoradas genéticamente, especímenes únicos que cuentan con características ideales o para acelerar el mejoramiento u obtener abundante material para investigaciones. (BioplanInVitro, 2019)

El cultivo se incuba bajo condiciones de luz, temperatura y humedad controladas, que junto con las fisicoquímicas y nutricionales conducen el desarrollo del explante hacia la formación de una masa celular amorfa denominada callo, o hacia la diferenciación en un tejido organizado que producirá órganos o embriones. Los callos obtenidos mediante este procedimiento pueden subcultivarse para su mantenimiento y propagación o inducir su diferenciación para formar órganos (organogénesis), embriones (embriogénesis) o pasarse a un medio de cultivo líquido para obtener células y pequeños agregados en suspensión. Los factores que se deben tener presentes para obtener una respuesta adecuada del explante incluyen: Posición de la planta donadora, edad ontogenética (juvenilidad/madurez) de la planta y el estado fisiológico de la misma. (Bonilla, A. 2016)

### **2.14.1. Ventajas de la propagación in vitro**

1.- Durante el proceso productivo se pueden regular y controlar las condiciones de cultivo, lo cual permite corregirlas en caso de necesidad, aumentando la productividad, seguridad y calidad en todo el proceso.



2.- Los procesos de iniciación y colecta son mucho más fáciles lo que ahorra tiempo.

3.- Cabe destacar el cultivo celular en suspensión que, al facilitar el intercambio nutritivo entre las células y el medio, aumenta la tasa de replicación y con ello la síntesis de proteínas.

4.- También permite escalar la producción de cultivos celulares de una forma controlada a partir de unos parámetros establecidos para favorecer la síntesis de compuestos bioactivos. (Chimborazo, M. 2020)

#### **2.14.2. Desventajas de la propagación in vitro**

- La posibilidad de contaminación de la muestra, debido por ejemplo a una muerte celular descontrolada. Esto va afectar la calidad y seguridad del lote volviéndolo inservible para su comercialización. Es un riesgo bastante frecuente que puede aumentar mucho los costos de producción.
- La necesidad de elegir birreactores especializados para el tipo de explante propagado, lo cual puede aumentar los costos de producción y disminuir su productividad.
- Esta técnica es muy adecuada para la producción de metabolitos secundarios, puesto que muchos de ellos pueden encontrarse directamente en el medio de producción, facilitando enormemente su extracción. Sin embargo, para la organogénesis (formación de órganos a partir del cultivo de callos) y embriogénesis (vía de desarrollo celular donde células somáticas dan lugar a organizaciones similares a embriones) la rentabilidad disminuye, al complicarse la correcta nutrición de toda la planta. (Chimborazo, M. 2020)

#### **2.14.3. Técnicas de micropropagación**

Sostienen que el cultivo de tejidos in vitro comprende un amplio y heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante se cultiva asépticamente, en un

medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas.

Las técnicas de micropropagación, no sólo permiten mantener la homogeneidad o constancia del genotipo (salvo excepciones), sino que también perpetúan la condición fisiológica de los explantes. Por ejemplo, expresar y mantener la condición de juvenilidad o madurez existente en los explantes maternos, o de poder mantener o de capturar rasgos poco comunes en una población. Igualmente, por ejemplo, perpetuar hábitos arbustivos o de tronco en poblaciones de ambas características. De igual manera, material en floración o con yemas florales, generará material con expresión inmediata de características adultas. La micropropagación es, además, la herramienta central en la amplificación de material genético de alta calidad, permitiendo, además, el establecimiento y perpetuación de germoplasma o genotipos modificados a través de la ingeniería genética. (Jordan, M. 2005)

## **2.15. Etapas de la micropropagación**

### **2.15.1. Etapa 0: Preparación del material vegetal**

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

### **2.15.2. Etapa 1: Establecimiento del cultivo**

El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y axénicos. El éxito está determinado por la calidad del explante a utilizar. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes. Los materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son

los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, ya sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas en plantas herbáceas y aquellos tejidos meristemáticos que determinan el crecimiento en grosor, como el cambium en las plantas leñosas. (Olmos, S. 2010)

### **2.15.3. Etapa 2: Multiplicación**

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

### **2.15.4. Etapa 3: Enraizamiento y aclimatación**

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

## **2.16. Explante**

Parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, célula, tejido u órgano, que al ser cultivado en medio adecuado puede permitir la regeneración de plantas completas.

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento exitoso del cultivo de tejidos; dicha elección estará en función del objetivo perseguido y de la especie vegetal utilizada.

El tamaño del explante es otro factor a considerar y que también va a depender del objetivo y de la especie vegetal. Un explante más grande puede favorecer la proliferación callosa o el pegue en el medio, pero también se puede producir mayor heterogeneidad y contaminación por patógenos. Existe también un tamaño mínimo debajo del cual no se obtiene la respuesta deseada. Hay que considerar además otros factores que inciden en la respuesta del explante cultivado, con son: la época del año, pre tratamientos a los explantes y las condiciones de crecimiento de las plantas donantes de los mismos. (Hernán, P. 2007)

## **2.17. Medios de cultivo**

### **2.17.1. Medios simples**

Poseen los requisitos nutricionales para permitir el desarrollo bacteriano general, ejemplos: agar nutritivo, caldo nutritivo, entre otros. (Eduabc, 2019)

### **2.17.2. Medios enriquecidos**

Son medios simples o comunes, a los que se le añaden ciertos elementos como sangre, suero, líquido ascítico, huevo, glucosa, vitaminas, etc. lo que permite el aporte de factores de crecimiento o sustancias que neutralizan agentes inhibidores del crecimiento en bacterias exigentes nutricionalmente, entre algunos ejemplos: agar sangre, medio de Löwenstein-Jensen, enriquecido con huevo para facilitar el crecimiento de *Mycobacterium*; agar desoxicolato-lactosa (DLA), enriquecido con lactosa y desoxicolato. (Eduabc, 2019)

### **2.17.3 Medios selectivos**

Son aquellos que permiten el crecimiento de un tipo de microorganismos determinado, inhibiendo el desarrollo de los demás. (UGR, 2009)

### **2.17.4 Medios diferenciales**

Son aquellos en los que se pone de manifiesto propiedades que un determinado tipo de microorganismos posee. (UGR, 2009)

### **2.17.5 Componentes del medio de cultivo**

Los medios de cultivo vegetales contienen todos los nutrientes requeridos para el crecimiento normal y el desarrollo de las plantas. Estos están compuestos principalmente de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, otros compuestos orgánicos, reguladores del crecimiento, fuente de carbono y algunos agentes solidificantes, en el caso de los medios de cultivo sólidos. (Dagla, H. 2012)

El pH del medio de cultivo es muy importante, ya que éste afecta tanto al crecimiento de las plantas como a la actividad de los reguladores del crecimiento, este se debe de ajustar a valores entre 5.4 y 5.8. Para el cultivo del material vegetal se pueden emplear tanto medios líquidos como sólidos. Los componentes del medio de cultivo que tienen un mayor efecto en la respuesta inicial del material vegetal son la fuente de nitrógeno y los reguladores del crecimiento. (Hussain, A. 2012)

## **2.18. Citoquininas**

Las citoquininas son un tipo de fitohormonas capaces de estimular la división celular, (de ahí su nombre). Trabajan de forma conjunta con las auxinas y fueron descubiertas tras la búsqueda de una serie de moléculas capaces de estimular la proliferación de células en cultivos de tejidos vegetales. Entre sus funciones, las citoquininas estimulan la división celular, proliferación de yemas axilares (ruptura de la dominancia apical, tienen acción morfogénica al inducir la formación de órganos. En este aspecto están muy relacionadas con las auxinas, de forma que, en cultivos de tejidos vegetales, el balance entre auxina y citoquinina hace que se

estimule la caulogénesis (balance auxina/citoquinina favorable a citoquinina), o la rizogénesis (balance auxina/citoquinina favorable a auxina). De esta forma, las citoquininas tienen un papel coordinando el desarrollo de raíces y tallos. Se absorben fácilmente por las raíces llevando información a los tallos sobre el estado nutritivo de las mismas. (Agrocode, 2012)

### **2.19. Kinetina (K)**

- Estimulan la división celular y el crecimiento.
- Inhiben el desarrollo de las raíces laterales.
- Rompen la latencia de las yemas axilares.
- Promueven la organogénesis en los callos celulares (La organogénesis es un proceso bifásico, según los estudios de inducción de la formación de órganos a partir del cultivo de callos. Sus dos fases son la cito diferenciación, que da lugar a un primordio, y la organogénica, que determinará el tipo de órgano que se formará a partir del primordio).
- Retrasan la senescencia o envejecimiento de los órganos vegetales.
- Promueven la expansión celular en cotiledones y hojas.
- Promueven el desarrollo de los cloroplastos. (Almanzar, J. 2016)

### **2.20. Bencil Amino Purina (BAP)**

Es la citoquinina más común empleada en la propagación de diferentes especies leñosas y se utiliza en todos los medios de cultivo descritos para la propagación in vitro. (Quiala, E. 2012)

## 2.21. Soluciones nutritivas

Constituyente	Concentración de la solución madre	Volumen de la solución madre	Constituyente	Concentración de la solución madre	Volumen de la solución madre
<b>Stock 1</b>	<b>(g)</b>	1000 cc	<b>Stock 3</b>	<b>(mg)</b>	200 cc
Nitrato de potasio	19.0		Sulfato ferroso	756	
Nitrato de amonio	16.5		Na EDTA	744	
Cloruro de calcio	4.5		<b>Vitaminas</b>	<b>(mg)</b>	100 cc
Sulfato de magnesio	3.7		Myo inositol	10	
Fosfato de potasio	1.7		Ácido nicotínico	50	
<b>Stock 2</b>	<b>(mg)</b>	Piridoxina	50		
Sulfato de magnesio	84.5	500 cc	Tiamina	4	
Sulfato de zinc	43.0				
Ácido bórico	31.0				
Yoduro de potasio	4.15				
Molibdato de sodio	1.5				

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1. Materiales

##### 3.1.1. Localización de la investigación

<b>Provincia:</b>	Bolívar
<b>Cantón:</b>	Guaranda
<b>Parroquia</b>	Veintimilla
<b>Sector:</b>	Laguacoto II - Laboratorio de Biotecnología Vegetal
<b>Dirección:</b>	km 1.5 Vía Guaranda a San Simón

##### 3.1.2. Situación geográfica y climática

El proyecto de investigación se desarrolló en laboratorio por lo tanto no se presentan las características climáticas y geográficas.

#### 3.2. Zona de vida

El proyecto de investigación se desarrolló en laboratorio por lo tanto no se presentan los datos de zona de vida.

#### 3.3. Material experimental

En esta investigación los materiales experimentales correspondieron a explantes de Yagual, tipos y dosis de citoquininas.

#### 3.4. Material de campo (laboratorio)

- Cámara de flujo laminar
- Balanza analítica
- Autoclave vertical
- pH metro
- Horno de microondas
- Agitador magnético



- Destilador de agua
- Refrigerador
- Reactivos
- Vasos de precipitación de 1000; 500; 250 y 100 ml
- Erlenmeyer de 1000; 500; 250 y 100 ml
- Probetas aforadas de 500; 250; 200 y 25 ml
- Cajas Petri de vidrio
- Tubos de ensayo
- Frascos de vidrio
- Pissetas
- Mecheros de alcohol
- Espátulas
- Pinzas de disección
- Bisturí
- Mangos para bisturí No. 4
- Papel aluminio
- Mandil
- Guantes de manejo
- Cofia
- Cubre zapatos
- Mascarilla

### **3.5. Materiales de oficina**

- Computadora
- Calculadora
- Cámara fotográfica
- Flash memory
- Papel bond
- Programas estadísticos: Excel 2020 y Statistixs 9.0
- Lápices
- Regla

- Teléfono celular
- Tablero de datos

### 3.6. Métodos

#### 3.6.2. Factores en estudio

FA: *Polylepis* con dos especies:

- A1: *Polylepis reticulata*
- A2: *Polylepis incana* Kunth

FB: Citoquininas con tres tipos:

- B1: Bencil Adenina (BA)
- B2: Bencil Amino Purina (BAP)
- B3: Kinetina (K)

FC: Niveles de reguladores de crecimiento con cuatro dosis:

- C1: 1mg/l
- C2: 3mg/l
- C3: 5mg/l
- C4: 7mg/l

### 3.6.2. Tratamientos

Combinación de factores A x B x C (2 x 3 x 4), según el siguiente detalle:

TRATAMIENTO	CÓDIGO	DETALLE
T1	A1B1C1	<i>Polylepis reticulata</i> + Bencil adenina + 1mg/l
T2	A1B1C2	<i>Polylepis reticulata</i> + Bencil adenina + 3mg/l
T3	A1B1C3	<i>Polylepis reticulata</i> + Bencil adenina + 5mg/l
T4	A1B1C4	<i>Polylepis reticulata</i> + Bencil adenina + 7mg/l
T5	A1B2C1	<i>Polylepis reticulata</i> + Bencil amino purina + 1mg/l
T6	A1B2C2	<i>Polylepis reticulata</i> + Bencil amino purina + 3mg/l
T7	A1B2C3	<i>Polylepis reticulata</i> + Bencil amino purina + 5mg/l
T8	A1B2C4	<i>Polylepis reticulata</i> + Bencil amino purina + 7mg/l
T9	A1B3C1	<i>Polylepis reticulata</i> + Kinetina + 1mg/l
T10	A1B3C2	<i>Polylepis reticulata</i> + Kinetina + 3mg/l
T11	A1B3C3	<i>Polylepis reticulata</i> + Kinetina + 5mg/l
T12	A1B3C4	<i>Polylepis reticulata</i> + Kinetina + 7mg/l
T13	A2B1C1	<i>Polylepis incana</i> Kunth + Bencil adenina + 1mg/l
T14	A2B1C2	<i>Polylepis incana</i> Kunth + Bencil adenina + 3mg/l
T15	A2B1C3	<i>Polylepis incana</i> Kunth + Bencil adenina + 5mg/l
T16	A2B1C4	<i>Polylepis incana</i> Kunth + Bencil adenina + 7mg/l
T17	A2B2C1	<i>Polylepis incana</i> Kunth + Bencil amino purina + 1mg/l
T18	A2B2C2	<i>Polylepis incana</i> Kunth + Bencil amino purina + 3mg/l
T19	A2B2C3	<i>Polylepis incana</i> Kunth + Bencil amino purina + 5mg/l
T20	A2B2C4	<i>Polylepis incana</i> Kunth + Bencil amino purina + 7mg/l
T21	A2B3C1	<i>Polylepis incana</i> Kunth + Kinetina + 1mg/l
T22	A2B3C2	<i>Polylepis incana</i> Kunth + Kinetina + 3mg/l
T23	A2B3C3	<i>Polylepis incana</i> Kunth + Kinetina + 5mg/l
T24	A2B3C4	<i>Polylepis incana</i> Kunth + Kinetina + 7mg/l

### 3.6.3. Tipo de diseño experimental o estadístico

Se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA) en arreglo factorial 2x3x4, con tres repeticiones.

### 3.6.4. Procedimiento

Número de localidades	1
Número de tratamientos	24
Número de repeticiones	3
Número de unidades experimentales	72

### 3.6.5. Tipos de análisis

- Análisis de varianza (ADEVA), según el siguiente detalle:

Fuentes de variación (FV)	Grados de Libertad (GL)	CME
<b>Factor A: Especies (a - 1)</b>	1	$f2 e + 36 \Theta^2 A$
<b>Factor B: Citoquininas (b - 1)</b>	2	$f2 e + 24 \Theta^2 B$
<b>Factor C: Dosis (c - 1)</b>	3	$f2 e + 18 \Theta^2 C$
<b>Factores AxB (a-1) (b-1)</b>	2	$f2 e + 12 \Theta^2 AxB$
<b>Factores AxC (a-1) (c-1)</b>	3	$f2 e + 9 \Theta^2 AxC$
<b>Factores BxC (b-1) (c-1)</b>	6	$f2 e + 6 \Theta^2 BxC$
<b>Factores AxBxC (a-1) (b-1) (c-1)</b>	6	$f2 e + 3 \Theta^2 AxBxC$
<b>Error Experimental t (r - 1)</b>	48	$f2 e$
<b>Total (t x r) - 1</b>	71	

- Prueba de Tukey al 5% para comparar promedios de los factores A, B e interacciones.
- Análisis de efecto principal para el factor A.
- Tendencias polinomiales para el factor C (respuesta lineal, cuadrática y cúbica).
- Análisis de correlación y regresión lineal simple.

### **3.7. Métodos de evaluación y datos tomados**

#### **3.7.1. Porcentaje de explantes contaminados (PEC)**

Esta variable se registró a los 90 días por observación directa de los explantes y se expresaron los resultados en porcentaje en función del número total de explantes por cada tratamiento.

#### **3.7.2. Días a la brotación (DB)**

Por observación directa y continua, cuando más del 50% de los explantes presentaron la aparición del primer brote, se registró el número de días a la brotación.

#### **3.7.3. Número de brotes por explante (NBE)**

Se determinó por conteo directo del número de brotes por cada explante a los 90 días en todos los tratamientos.

#### **3.7.4. Número de hojas por explante (NHE)**

Se registró por conteo directo del número de hojas por cada explante a los 90 días en todos los tratamientos.

#### **3.7.5. Longitud del brote (LB)**

Se evaluó con un flexómetro en cm a los 90 días en los 3 frascos de cada uno de los tratamientos, y se midieron desde la base del tallo hasta el ápice de los brotes, y por la parte exterior de cada frasco.

#### **3.7.6. Días a la emisión de raíces (DER)**

Se registró por observación directa cuando más del 50% de los explantes presentaron la primera raicilla en todos los tratamientos.

### **3.7.7. Número de raíces (NR)**

Se determinó en cada tratamiento por conteo directo de todas las raíces de cada explante a los 90 días.

### **3.7.8. Longitud de raíz (LR)**

Se midió en todos los tratamientos con una regla en cm a los 90 días desde el cuello de la raíz hasta la parte terminal o cofia.

## **3.8. Manejo del experimento**

### **3.8.1. Selección de las plantas**

Para la extracción de los explantes de los dos tipos de Yagual (*Polylepis reticulata*) y (*Polylepis incana Kunth*), se seleccionó la planta madre genéticamente óptima con buenas características como vigor, tamaño y libre de plagas y enfermedades.

### **3.8.2. Preparación del medio de cultivo**

Se utilizó el medio de cultivo según Murashige y Skoog (MS) en el que se añadió azúcar, macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, reguladores de crecimiento Bencil Adenina, Bencil Amino Purina y Kinetina, en cuatro concentraciones 1mg/l, 3 mg/l, 5mg/l y 7 mg/l respectivamente, y agar que sirvió para dar solidificación al medio de cultivo, con un pH de 5.6 - 5.7 (Cuadro 1).

### **3.8.3. Recolección y selección de los brotes en el invernadero**

Cuando los brotes tuvieron entre 6 a 10 cm de longitud en el invernadero, se procedió a cortar con la ayuda de un bisturí los brotes, mismos que fueron trasladados al laboratorio con todas las medidas de seguridad.

### **3.8.4. Desinfección de los brotes**

Se procedió a lavar los brotes con una solución de jabón líquido al 1% más agua destilada durante 20 minutos, posteriormente en la cámara de flujo laminar se realizó la desinfección con cloro al 60% durante diez minutos, luego se realizaron

tres lavados consecutivos con agua destilada esterilizada con un intervalo de tres minutos entre cada lavado.

### **3.8.5. Introducción de los explantes en el medio de cultivo**

Los explantes fueron colocados en los frascos que contenían los medios de cultivos previamente preparados con sus respectivos tratamientos y repeticiones.

### 3.8.6. Preparación del medio de cultivo con las diferentes dosis

**Cuadro N° 1.** Preparación de los medios de cultivos.

<b>Muestra 1: Bencil Adenina Volumen 1000 ml</b>		<b>Muestra 2: Bencil Amino Purina Volumen 1000 ml</b>		<b>Muestra 3 Kinetina Volumen 1000 ml</b>	
Azúcar	30 g	Azúcar	30 g	Azúcar	30 g
Stook 1	100 ml	Stook 1	100 ml	Stook 1	100 ml
Stook 2	10 ml	Stook 2	10 ml	Stook 2	10 ml
Stook 3	10 ml	Stook 3	10 ml	Stook 3	10 ml
Vitaminas	10 ml	Vitaminas	10 ml	Vitaminas	10 ml
BA	10, 30, 50 y 70 ml	BAP	10, 30, 50 y 70 ml	K	10, 30, 50 y 70 ml
pH	5.6- 5.7	pH	5.6- 5.7	pH	5.6- 5.7
Agar	9 g	Agar	9 g	Agar	9 g



## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis estadísticos se realizaron aplicando el Diseño Completamente Aleatorizado en arreglo factorial (2x3x4) y con tres repeticiones. Se efectuaron los análisis de varianza (ADEVAS) de las diferentes variables cuantitativas discretas y continuas evaluadas a nivel de laboratorio como fueron el porcentaje de explantes contaminados a los 90 días, días a la brotación, número de brotes por explante a los 90 días, longitud del brote a los 90 días; número de hojas por explante a los 90 días, días a la emisión de la raíz, número de raíces a los 90 días y la longitud de las raíces a los 90 días. Para comparar los promedios de los tratamientos, se aplicó la prueba de Tukey al 5% para los Factores A: Especies de *Polylepis*, Factor B: Tipos de hormonas e interacciones. Para el Factor C: Dosis de hormonas, se realizó la prueba de Tendencias Polinomiales (para determinar si se presentó una respuesta Lineal, Cuadrática o Cúbica). Para realizar los análisis de correlación y regresión lineal, se consideró como variable dependiente a la longitud del brote a los 90 días.

#### 4.1. Factor A: Especies de *Polylepis*

**Cuadro N° 2.** Resultados promedios de la prueba de Tukey y Efecto Principal del factor A (tipos de *Polylepis*) para las variables: porcentaje de explantes contaminados a los 90 días (PEC), días a la brotación (DB), número de brotes por explante a los 90 días (NBE), longitud del brote a los 90 días (LB), numero de hojas por explante a los 90 días (NHE), días a la emisión de la raíz (DER), numero de raíces a los 90 días (NR) y la longitud de la raíz a los 90 días (LR).

Variable	Factor A: Tipos de <i>Polylepis</i>		Efecto Principal (EP)	Media General	CV (%)
	A1: <i>P. reticulata</i>	A2: <i>P. incana</i>			
PEC (*)	2.78 B	25.00 A	22.22%	13.89%	268.30
DB (**)	38.00 B	41.00 A	3 días	40 días	3.00
NBE (**)	4.00 A	3.00 B	1 brote	4 brotes	13.60
LB (**)	1.56 A	1.16 B	0.4 cm	1.36 cm	14.90
NHE (**)	4.00 A	3.00 B	1 hoja	4 hojas	23.00
DER (**)	82.00 B	90.00 A	8 días	86 días	0.81
NR (ns)	2.00 A	1.00 A	1 raíz	2 raíces	31.40
LR (**)	0.39 A	0.20 B	0.19 cm	0.29 cm	18.50

NS: No significativo. \*Significativo al 5%. \*\*Altamente significativo al 1%. Promedios con distinta letra, son estadísticamente diferentes al 5%

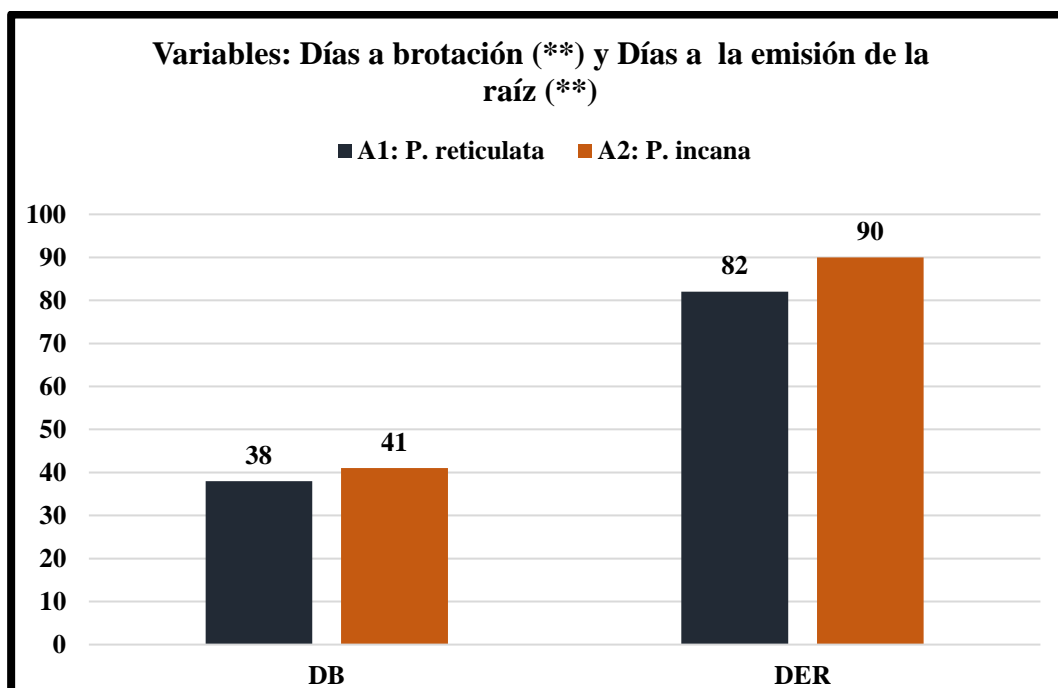
La respuesta de los dos tipos de *Polylepis* (factor A) en relación a la variable Porcentaje de explantes contaminados a los 90 días, fue muy diferente (Cuadro 2).

Con la prueba de Tukey al 5%, el mayor porcentaje de contaminación, se presentó en A2: *Polylepis incana* con un valor promedio de 25%, lo que significó como efecto principal un 22.22% más en comparación al A1: *Polylepis reticulata* que tuvo un valor promedio de 2.78% (Cuadro 2). La contaminación que se presentó en los explantes posiblemente fue causada por hongos de los géneros *Fusarium sp* y *Penicillium sp*. En esta investigación, claramente y en función de los resultados, se demuestra que el *Polylepis incana*, fue más susceptible, y esto es además una característica varietal (fenotípica y genotípica) y su interacción con el medio de cultivo in vitro y las condiciones ambientales del laboratorio.

Para las variables días a brotación de los explantes y días a la emisión de la raíz, se determinó un efecto altamente significativo del factor A: Tipos de *Polylepis* (Cuadro N° 2).

Con la prueba de Tukey al 5% el A2: *Polylepis incana*, fue más tardío con 41 días a brotación y 90 días a la emisión de la raíz. Los promedios inferiores o ligeramente más precoces correspondieron al A1: *Polylepis reticulata* con 38 días a la brotación y 82 días a la emisión de la raíz (Cuadro N° 2 y Gráfico N° 1).

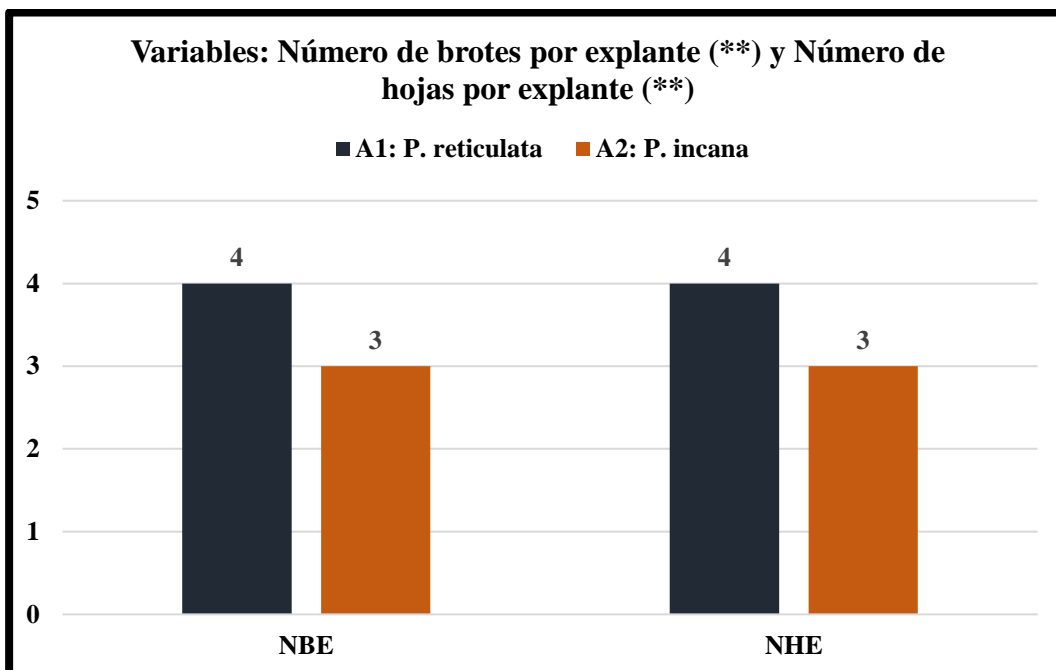
Como efecto principal, *Polylepis incana* registró 3 días más tardío a la brotación y 8 días a la emisión de la raíz (Cuadro N° 2). Esta respuesta diferente para estas variables, posiblemente se dio por las características varietales de las dos especies de *Polylepis* y la interacción con las condiciones bioclimáticas del laboratorio.



**Gráfico N° 1.** Resultados promedios del factor A: tipos de *Polylepis* en las variables días a la brotación y días a la emisión de la raíz.

La respuesta agronómica de las especies de *Polylepis* en cuanto a las variables número de brotes y número de hojas por explante, fueron muy diferentes (Cuadro N° 2). Aplicando la prueba de Tukey al 5%, los promedios más altos se registraron en el A1: *Polylepis reticulata* con 4 brotes y hojas respectivamente. El promedio inferior se determinó en A2: *Polylepis incana* con 3 brotes y hojas (Cuadro N° 2 y Gráfico N° 2). Como efecto principal A1: *P. reticulata* tuvo un brote y una hoja más en comparación al *P. incana* (Cuadro N° 2).

Las variables número de brotes y hojas por explante, son atributos varietales y además inciden las características climatizadas del laboratorio.

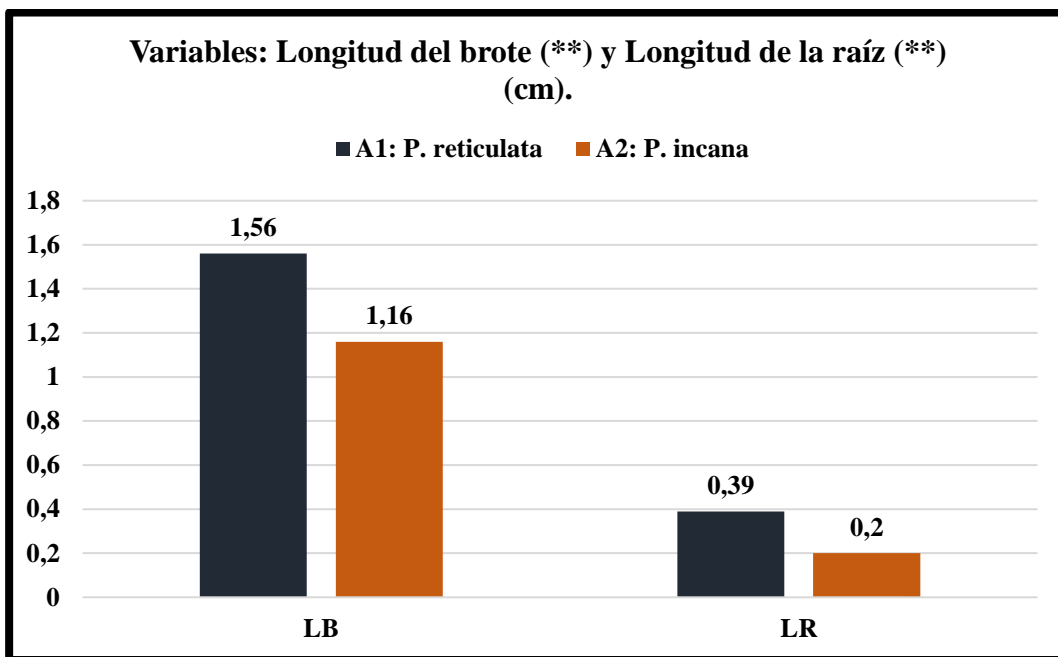


**Gráfico N° 2.** Resultados promedios del factor A: tipos de *Polylepis* en las variables número de brotes por explante y número de hojas por explante.

Dentro del proceso de propagación asexual de plantas in vitro, las variables más importantes son la longitud del brote y la longitud de la raíz. En esta investigación se determinaron diferencias significativas (Cuadro N° 2).

Con la prueba de Tukey al 5% los promedios superiores se evaluaron en el A2: *Polylepis reticulata* con 1.56 cm y 0.39 cm para la longitud de la raíz. Promedios inferiores registró el *Polylepis incana* con 1.16 cm de longitud de brote y 0.20 cm para la longitud de la raíz (Cuadro N° 2 y Gráfico N° 3). Como efecto principal de las dos especies, A1: *P. reticulata* tuvo 0.4 cm más de longitud del brote y 0.19 cm más de la longitud de raíz (Cuadro N° 2).

Las variables longitud del brote y de raíz son determinantes para obtener plantas de mejor calidad y en menor tiempo dentro del laboratorio, lo que tiene una relación directa con los beneficios económicos.



**Gráfico N° 3.** Resultados promedios del factor A: tipos de *Polylepis* en las variables longitud del brote y de la raíz.

Para la variable número de raíces por explante, no se determinaron diferencias estadísticas significativas (Cuadro N° 2). Para esta variable, se tuvo una media general de dos raíces por planta. Numéricamente en A2: *Polylepis reticulata*, presentó como efecto principal una raíz más por explante a los 90 días en comparación a *Polylepis incana*.

#### 4.2. Factor B: Tipos de citoquininas

**Cuadro N° 3.** Resultados promedios de la prueba de Tukey para el factor B: tipos de citoquininas en las variables: porcentaje de explantes contaminados a los 90 días (PEC), días a la brotación (DB), número de brotes por explante a los 90 días (NBE), longitud del brote a los 90 días (LB), número de hojas por explante a los 90 días (NHE), días a la emisión de la raíz (DER), número de raíces a los 90 Días (NR) y la longitud de la raíz a los 90 días (LR).

Variable	Factor B: Tipos de citoquininas			Media General	CV (%)
	B1: Bencil Adenina (BA)	B2: Bencil Amino Purina (BAP)	B3: Kinetina (K)		
PEC (NS)	16.67 A	12.50 A	12.50 A	13.89%	268.3
DB (NS)	40.10 A	39.30 A	39.30 A	40 días	3.0
NBE (**)	3.25 B	3.90 A	3.71 A	4 brotes	13.6
LB (**)	1.26 B	1.34 AB	1.47 A	1.36 cm	14.9
NH (NS)	3.31 A	3.90 A	3.71 A	4 hojas	23.0
DER (**)	85.40 B	85.30 B	86.30 A	86 días	0.8
NR (NS)	1.44 A	1.38 A	1.71 A	2 raíces	31.4
LR (**)	0.30 AB	0.34 A	0.25 B	0.29 cm	18.5

NS: No significativo. \*\*Altamente significativo al 1%. Promedios con distinta letra, son estadísticamente diferentes al 5%.

De acuerdo con los resultados estadísticos obtenidos para las variables porcentaje de explantes contaminados a los 90 días, días a la brotación, número de hojas por explante a los 90 días y el número de raíces por explante a los 90 días, no se determinaron diferencias estadísticas significativas como efecto de los tres tipos de citoquininas; es decir los resultados compartieron un mismo rango (Cuadro N° 3).

Para el porcentaje de explantes contaminados a los 90 días, se evaluó una media general de 13.89% y un valor del coeficiente de variación alto de 268.3%, lo cual se explica porque esta variable, no está bajo el control del investigador (Cuadro N° 3).

En la variable días a la brotación, se registró una media general de 40 días y un valor del coeficiente de variación de 3% (Cuadro N° 3).

Para el número de hojas por explante a los 90 días, se determinó una media general de 4 hojas y un valor del coeficiente de variación de 23% (Cuadro N° 3).

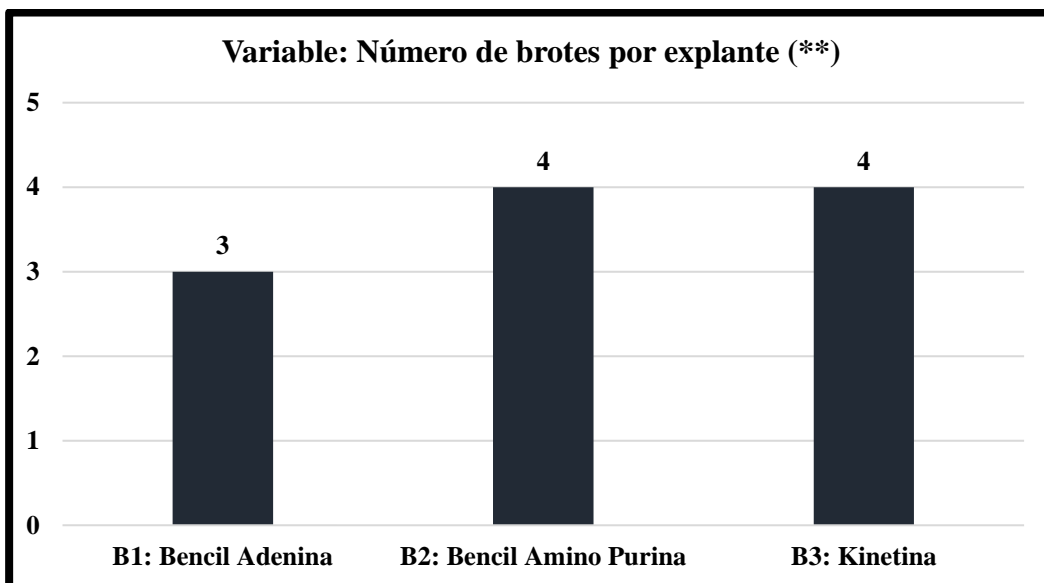
Para el componente número de raíces por explante a los 90 días, se calculó una media general de dos raíces y un valor del coeficiente de variación de 31.4%, ligeramente alto, pero es válido porque esta variable no está bajo la dependencia del investigador (Cuadro N° 3).

Para estas variables, el efecto de los tres tipos de citoquininas evaluadas, fue similar, y se demuestra que posiblemente son características varietales y dependieron de las condiciones bioclimáticas del laboratorio.

La respuesta de los tres tipos de citoquininas en relación a la variable Número de brotes por explante a los 90 días, fue muy diferente, con una media general de 4 brotes y un valor del coeficiente de variación de 13.6% (Cuadro N° 3).

Con la prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios de los tipos de citoquininas, los promedios superiores se determinaron en B2: Bencil Amino Purina y en B3: Kinetina con 4 brotes por explante respectivamente. El promedio inferior se registró en B1: Bencil Adenina con 3 brotes (Cuadro N° 3 y Gráfico 4).



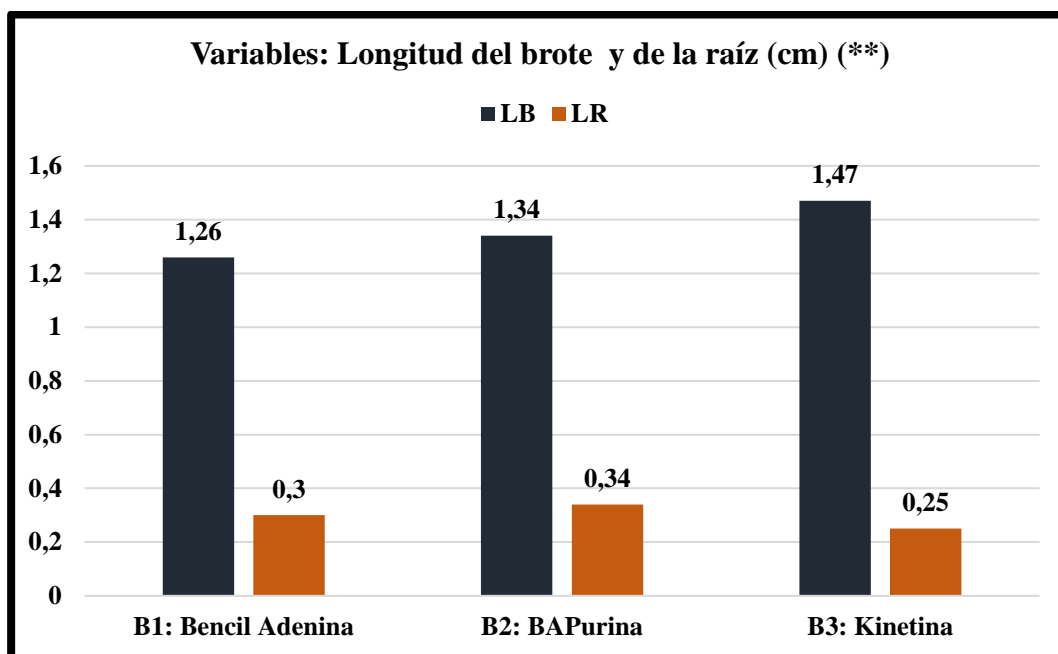


**Gráfico N° 4.** Resultados promedios del factor B: tipos de citoquininas en la variable número de brotes por explante a los 90 días.

La respuesta de los tipos de citoquininas para las variables longitud del brote y de la raíz, fue muy diferente con valores de la media general de 1.36 cm y un valor del coeficiente de variación de 14.9% para la longitud del brote y para la raíz con una media general de 0.29 cm y un valor del CV de 18.5% (Cuadro N° 3).

Aplicando la prueba de Tukey al 5% para comparar las medias de los tipos de citoquininas, el promedio más elevado de la longitud del brote se evaluó en B3: Kinetina con 1.47 cm, y el menor en B1: Bencil Adenina con 1.26 cm. Una respuesta intermedia presentó el B2: Bencil Amino Purina con 1.34 cm (Cuadro N° 3 y Gráfico N° 5).

Para la variable longitud de la raíz se presentó una respuesta diferente de los tipos de citoquininas, presentando el promedio más alto el B2: Bencil Amino Purina con 0.34 cm, seguido de B1: Bencil Adenina con 0.30 cm y el valor menor en B3: Kinetina con 0.25 cm (Cuadro N° 3 y Gráfico N° 5). De acuerdo a estos resultados, se infiere que, a mayor longitud del brote, menor tamaño de la raíz; sin embargo, es fundamental que haya un equilibrio entre el sistema aéreo y el radicular, cuyos procesos son controlados por las citoquininas (parte aérea de la planta) y auxinas (sistema radicular).

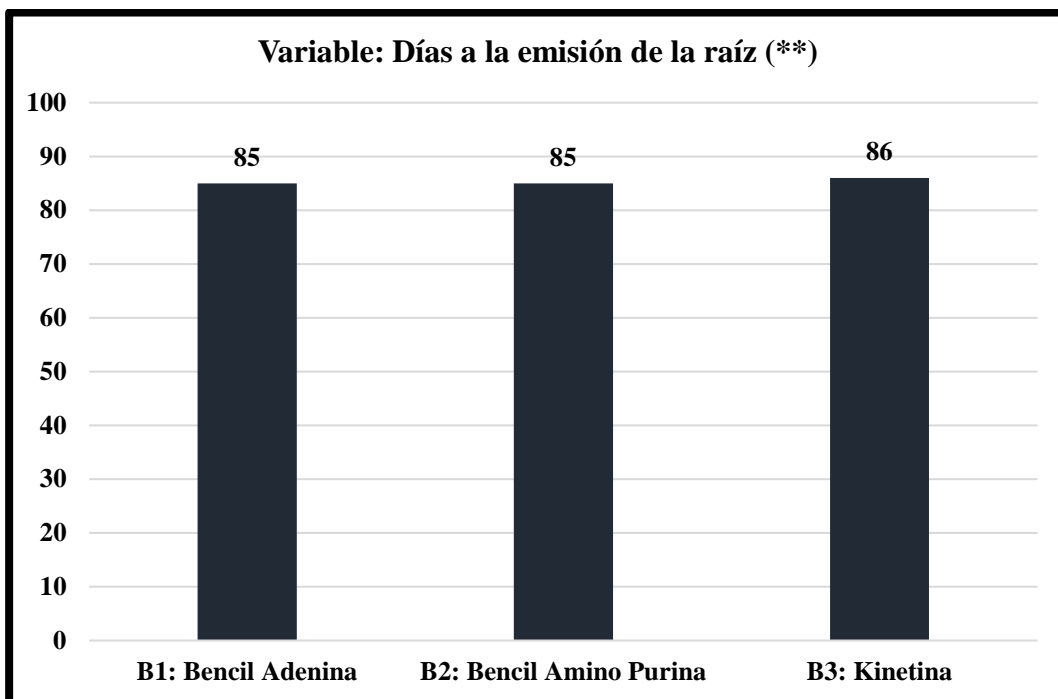


**Gráfico N° 5.** Resultados promedios del factor B: tipos de citoquininas en las variables longitud del brote y de la raíz a los 90 días.

Se determinó un efecto altamente significativo de los tipos de citoquininas para la variable días a la emisión de la raíz con una media general de 86 días y un valor del CV de 0.81% (Cuadro N° 3).

Con la prueba de Tukey al 5% para comparar los valores promedios, el tratamiento más tardío fue B3: Kinetina con 86.3 días. La respuesta de B1: Bencil Adenina y B2: Bencil Amino Purina fueron similares con 85.4 y 85.3 días a la emisión de la raíz respectivamente (Cuadro N° 3 y Gráfico N° 6).

Las citoquininas, regulan una serie de procesos de la planta, incluyendo la división celular, crecimiento de los brotes y raíces y en los cultivos comerciales hay una relación directa y positiva con el rendimiento de grano. (F. Antama, 2017).



**Gráfico N° 6.** Resultados promedios del factor B: tipos de citoquininas en la variable días a la emisión de la raíz.

### 4.3. Factor C: Dosis de citoquininas

**Cuadro N° 4.** Resultados promedios de la prueba de Tendencias polinomiales para el factor C: dosis de citoquininas en las variables: porcentaje de explantes contaminados a los 90 días (PEC), días a la brotación (DB), número de brotes por explante a los 90 días (NBE), longitud del brote a los 90 días (LB), número de hojas por explante a los 90 días (NHE), días a la emisión de la raíz (DER), número de raíces a los 90 Días (NR) y la longitud de la raíz a los 90 días (LR).

Variable	Factor C: Dosis de citoquininas (mg/l)				Tipo de respuesta		
	1	3	5	7	Lineal	Cuadrática	Cúbica
PEC (NS)	16.7A	16.70A	11.10A	11.10A	NS	NS	NS
DB (NS)	39.1A	40.10A	39.60A	39.40A	NS	NS	NS
NBE (**)	3.6A	3.10B	3.80A	3.90A	**	**	**
LB (**)	1.6A	1.24B	1.17B	1.46A	NS	**	NS
NH (NS)	3.6A	3.10A	3.80A	3.90A	NS	NS	NS
DER (**)	85.2B	85.30B	86.40A	85.70B	**	*	**
NR (NS)	1.5A	1.60A	1.30A	1.60A	NS	NS	NS
LR (**)	0.3A	0.34A	0.23B	0.30A	NS	NS	**

NS: No significativo. \*Significativo al 5%. \*\*Altamente significativo al 1%. Promedios con distinta letra, son estadísticamente diferentes al 5%.

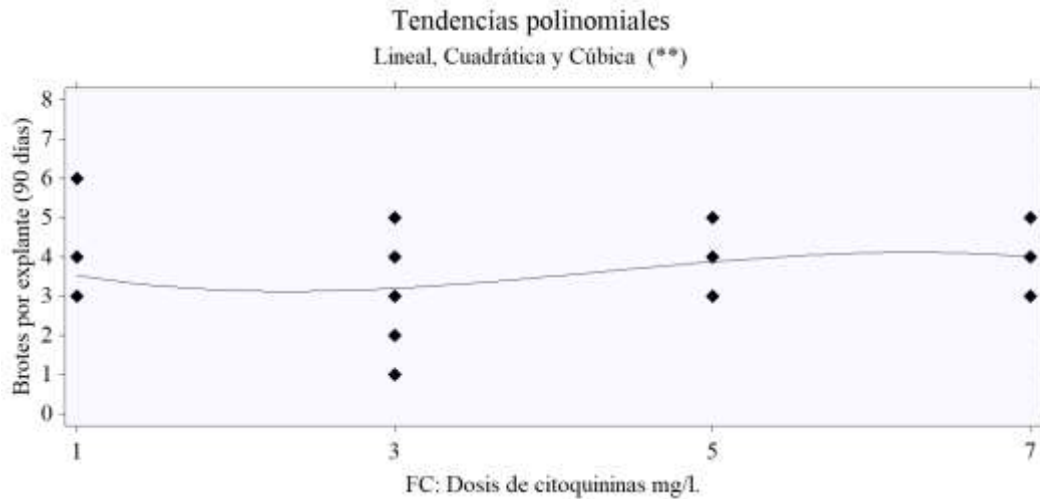
Considerando que el Factor C correspondió a un tratamiento cuantitativo con cuatro dosis de citoquininas, estadísticamente lo más apropiado es medir qué tipo de respuesta se presentó al incrementar la concentración de hormonas. En este caso al tener en estudio cuatro dosis ( $c - 1 = 3$ ), permite evaluar una respuesta lineal, cuadrática y cúbica.

Las dosis de hormonas que necesitan las plantas para la división celular y la formación de los diferentes órganos, son de vital importancia y es necesario cuantificar las concentraciones apropiadas para no causar antagonismos o toxicidad en las plantas.

En este estudio de propagación asexual de *P. incana* y *P. reticulata* in vitro, no incidieron significativamente las dosis de citoquininas en las variables: porcentaje de explantes contaminados, días a la brotación, número de hojas por explante y raíces a los 90 días; y por tanto tampoco se presentó una respuesta lineal, cuadrática y cúbica significativa (Cuadro N° 4).

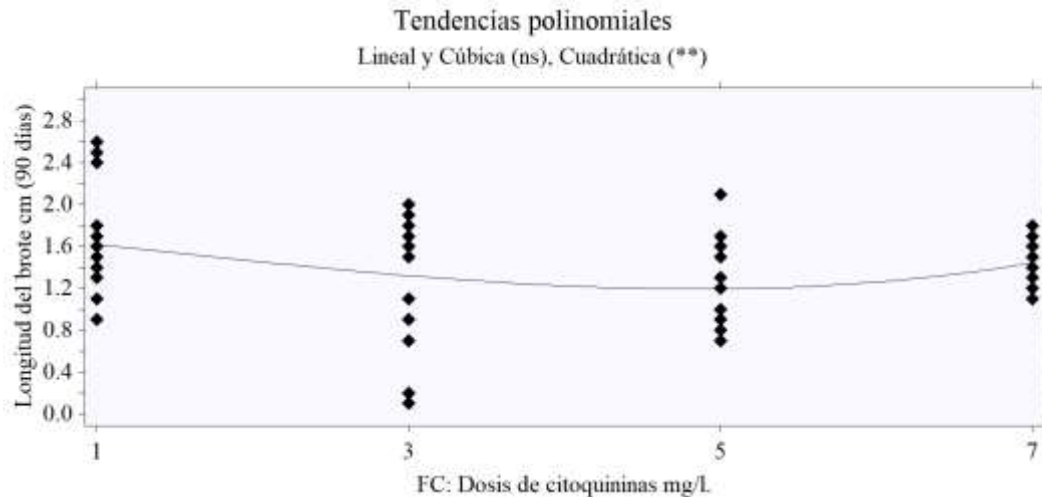
La respuesta de las dosis de citoquininas en relación a la variable número de brotes por explante a los 90 días, fue muy diferente, con una respuesta lineal, cuadrática y cúbica altamente significativa (Cuadro N° 4 y Gráfico N° 7). Estas tendencias significan que a mayor dosis de citoquininas mayor número de brotes por explante, pero se presentó un punto de inflexión (reducción) al pasar de 1 mg/l a 3 mg/l; sin embargo, de 3 a 5 y de 5 a 7 mg/l, se incrementó el número de brotes por explante (Figura N° 8).

El promedio más elevado del número de brotes por explante, se presentó con una concentración de 7 mg/l con un valor de 3.9 (4) brotes por explante. El promedio inferior se determinó en la dosis de 3 mg/l con 3 brotes por explante (Cuadro N° 4). Quizá los valores menores del número de brotes por explante, en las dosis de 1 mg/l y 3 mg/l, fueron debido a que existió un valor promedio más elevado de contaminación de los explantes (Cuadro N° 4).



**Gráfico N° 7.** Tendencias Polinomiales del factor C: Dosis de citoquininas en la variable número de brotes por explante a los 90 días.

Para la variable longitud del brote en cm a los 90 días, existieron diferencias altamente significativas de las dosis de citoquininas, con una respuesta cuadrática muy diferente (Cuadro N° 4 y Gráfico N° 8). La respuesta cuadrática significa que hay un punto de inflexión o cambio de la tendencia. El promedio superior de la longitud del brote a los 90 días, se evaluó con la concentración C1: 1 mg/l con 1.57 cm y el menor en C3: 5 mg/l con 1.17 cm (Cuadro N° 4). Estos resultados muestran claramente que la respuesta o efecto de los niveles de citoquininas, estuvieron afectados por otros factores como quizá la incidencia de contaminación y las condiciones climatizadas del laboratorio.



**Gráfico N° 8.** Tendencias Polinomiales del factor C: Dosis de citoquininas en la variable longitud del brote (cm) a los 90 días.

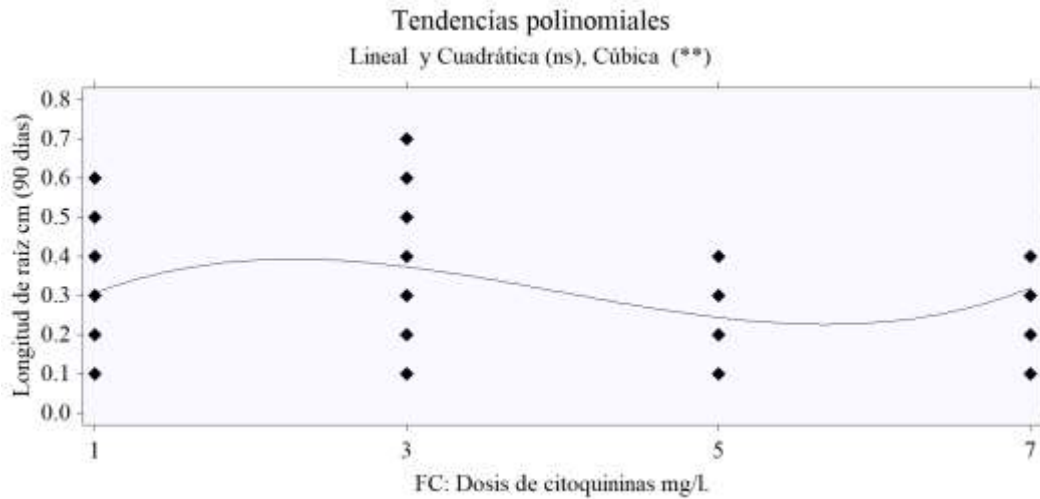
Para la variable días a la emisión de la raíz se presentaron resultados muy diferentes por efecto de la concentración de citoquininas. Con el análisis de tendencias polinomiales, se presentaron respuestas lineal, cuadrática y cúbica diferentes, pero quizá la tendencia más importante fue la lineal; es decir a mayor dosis de citoquininas, más tiempo para la emisión de la raíz (Cuadro N° 4). El promedio más tardío se registró en las dosis de 5 y 7 mg/l con 86.4 y 85.7 días respectivamente. Mayor precocidad se determinó con la menor dosis de citoquininas (Cuadro N° 4); es decir a mayores dosis, mayor tiempo para la emisión de las raíces. Las dosis de fitohormonas están asociadas con la división celular y por lo tanto con el crecimiento de los órganos de la planta, tanto vegetativos como reproductivos.

Para la variable longitud de la raíz a los 90 días, se calcularon diferencias muy diferentes por efecto de las dosis de citoquininas. Se calculó una respuesta cúbica, es decir con dos puntos de inflexión en la tendencia (Cuadro N° 4 y Gráfico N° 9).

El promedio más alto de la longitud de la raíz se determinó en la dosis C2: 3 mg/l con 0.34 cm y el menor con la dosis C3: 5 mg/l con 0.23 cm (Cuadro N° 4).

En la micropropagación es muy importante establecer el balance hormonal para cada una de las fases del proceso. En esta investigación y en función de los resultados obtenidos, claramente se infiere que incidieron otros factores biológicos

como el nivel de contaminación de los explantes, el rango de temperatura en el laboratorio y en el frasco, la cantidad y calidad de luz solar y artificial y el contenido de humedad relativa del laboratorio. Posiblemente las condiciones del laboratorio no fueron suficientemente homogéneas lo que incidió en la respuesta de los factores en estudio. La concentración de cada tipo de hormona quizá varió en función del órgano y la fase fenológica del cultivo o explante.



**Gráfico N° 9.** Tendencias Polinomiales del factor C: Dosis de citoquininas en la variable longitud de la raíz (cm) a los 90 días.



#### 4.4. Interacción de factores especies de *Polylepis* por tipos de hormonas (AxB)

**Cuadro N° 5.** Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% en la interacción de factores especies de *Polylepis* por tipos de hormonas (AxB) en las variables: porcentaje de explantes contaminados a los 90 días (PEC), días a la brotación (DB), número de brotes por explante a los 90 días (NBE), longitud del brote a los 90 días (LB), número de hojas por explante a los 90 días (NHE), días a la emisión de la raíz (DER), número de raíces a los 90 días (NR) y la longitud de la raíz a los 90 días (LR).

Variable	Tratamientos: Especies de <i>Polylepis</i> por tipos de hormonas (AxB)					
	T1:A1B1	T2: A1B2	T3:A1B3	T4: A2B1	T5: A2B2	T6: A2B3
PEC (NS)	0.00 A	8.33 A	0.00 A	33.33 A	16.66 A	25.00 A
DB (**)	38.30 CD	37.60 D	38.80 CD	41.90 A	40.90 AB	39.80 BC
NBE (**)	3.75 BC	4.66 A	3.91 B	2.75 D	3.12 CD	3.50 BC
LB (**)	1.50 B	1.33 BC	1.84 A	1.02 D	1.35 BC	1.10 CD
NH (NS)	3.75 A	4.66 A	3.91 A	2.87 A	3.12 A	3.50 A
DER (*)	81.80 D	82.20 D	83.20 C	89.00 AB	88.30 B	89.50 A
NR (**)	1.50 B	1.25 B	2.08 A	1.37 B	1.50 B	1.33 B
LR (**)	0.43 A	0.39 AB	0.35 B	0.16 D	0.27 C	0.14 D

NS: No significativo. \*Significativo al 5%. \*\*Altamente significativo al 1%. Promedios con distinta letra, son estadísticamente diferentes al 5%.

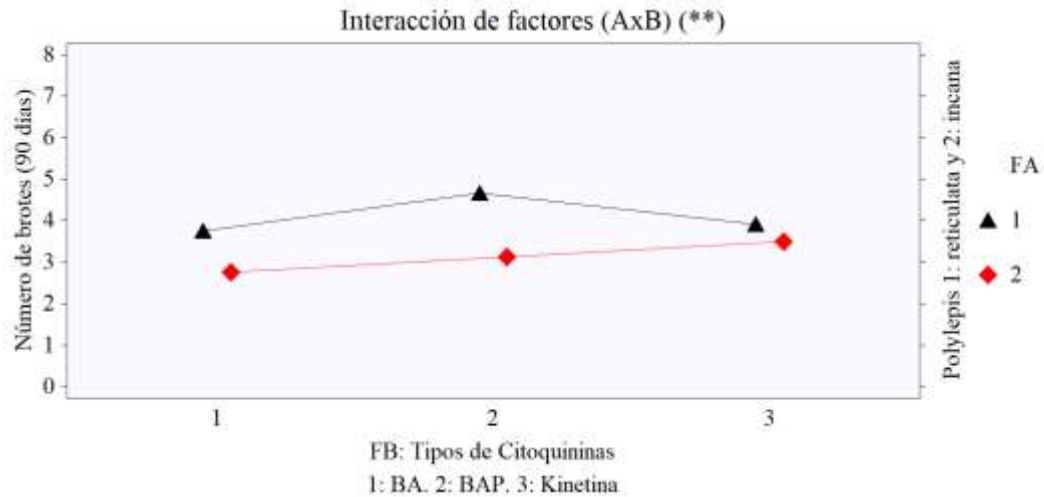
La respuesta de las especies de *Polylepis* en cuanto a las variables porcentaje de explantes contaminados y el número de hojas a los 90 días, no dependieron de los tipos de citoquinas; es decir fueron factores independientes para estos componentes de la multiplicación asexual in vitro (Cuadro N° 5).

Para el porcentaje de contaminación de explantes el promedio más elevado se registró en la interacción A2B1 (*Polylepis incana* con la hormona Bencil Adenina) con un promedio de 33.33%, seguido de la interacción A2B3 (*Polylepis incana* con la hormona Kinetina) con un 25%. En las interacciones A1B1 (*Polylepis reticulata* con la hormona Bencil Adenina) y en la A1B3 (*Polylepis reticulata* con la hormona Kinetina), no se presentaron contaminaciones de los explantes (Cuadro N° 5). El proceso de contaminación de explantes durante el cultivo de explantes in vitro, tiene un efecto directo sobre otros componentes como la longitud del brote y raíces, número de brotes y hojas. Como se infirió en la discusión del factor principal tipos de *Polylepis*, la especie *P. incana* fue más susceptible y esta contaminación posiblemente fue de hongos como *Fusariumm sp* y *Penicillium sp*.

Para el componente número de hojas numéricamente los promedios superiores, se cuantificaron en las interacciones A1B2 (*P. reticulata* con la hormona BAP) con 4.66 (5) hojas y en las interacciones A1B3 (*P. reticulata* con la hormona Kinetina) y en la A1B1 (*P. reticulata* y la hormona BA) con un promedio de 4 hojas por explante (Cuadro N° 5). El promedio inferior correspondió a la A2B1 (*P. incana* con la hormona BA) con un promedio de 2.87 (3) hojas (Cuadro N° 5).

En cuanto a la variable número de brotes por explante a los 90 días, existió una dependencia altamente significativa entre los factores especies de *Polylepis* y tipos de hormonas (Cuadro N° 5 y Gráfico N° 10).

Con la prueba de Tukey al 5%, el promedio superior se determinó en la interacción A1B2 (*P. reticulata* con la hormona BAP) con 4.66 (5) brotes y el menor promedio en la A2B1 (*P. incana* con la hormona BA) con 2.75 (3) brotes por explante (Cuadro N° 5 y Gráfico N° 10).



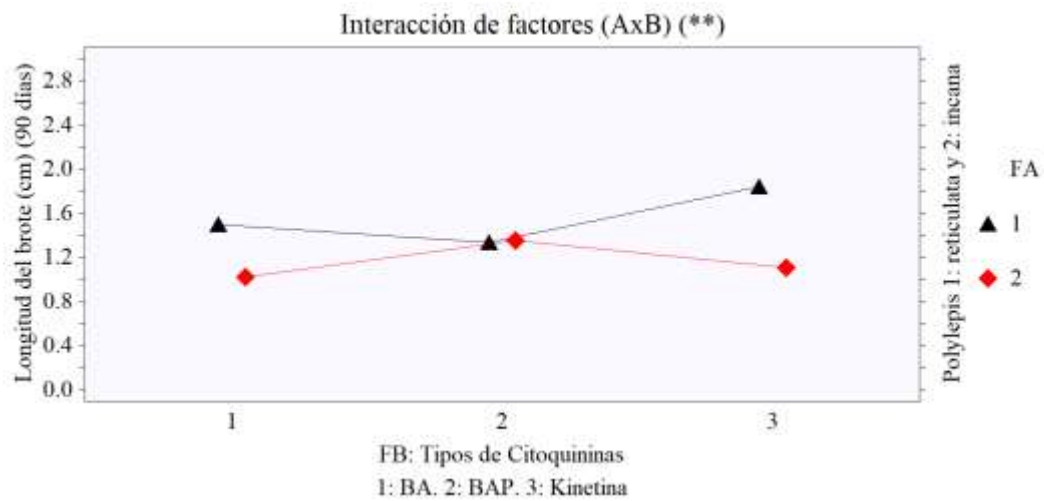
**Gráfico N° 10.** Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos de la interacción de factores especies de *Polylepis* por tipos de Citoquininas (AxB) en la variable número de brotes por explante a los 90 días.

Observando el gráfico N° 10, claramente la respuesta de las especies de *Polylepis* es diferente con los tipos de hormonas. *P. reticulata* respondió mejor con la hormona Bencil Amino Purina, sin embargo *P. incana* incrementó el número de brotes con la hormona B3: Kinetina. De este comportamiento se deduce que la respuesta de las especies de plantas y en este caso de *Polylepis* no es igual a un mismo tipo de hormona y esto responde a la carga genética de cada especie y variedad, siendo fundamental validar qué hormona y dosis responde mejor para cada variedad.

La respuesta de las especies de *Polylepis* en relación a la variable longitud del brote a los 90 días, dependió significativamente de los tipos de hormonas (Cuadro N° 5 y Gráfico N° 11).

Aplicando la prueba de Tukey al 5% los tratamientos que tuvieron los promedios más altos de la longitud del brote a los 90 días fue en la A1B3 (*P. reticulata* con la hormona Kinetina) con 1.84 cm, seguido de la interacción A1B1 (*P. reticulata* con la hormona BA) con 1.5 cm. El promedio menor se calculó en la interacción A2B1 (*P. incana* con la hormona BA) con 1.02 cm (Cuadro N°5 y Gráfico 11).

La longitud del brote o altura de plantas es una de las variables más importantes en la reproducción in vitro y en esta investigación claramente la respuesta de las especies de *Polylepis* fue diferente. *P. reticulata* respondió mejor con la hormona B3: Kinetina, no así el *P. incana* cuyo promedio más alto fue con la hormona B2: Bencil Amino Purina (Gráfico N° 11). Está claro que la longitud del brote, dependió de la especie de *Polylepis*, el tipo de hormona y con una relación o estrechas directa con el porcentaje de contaminación del explante.



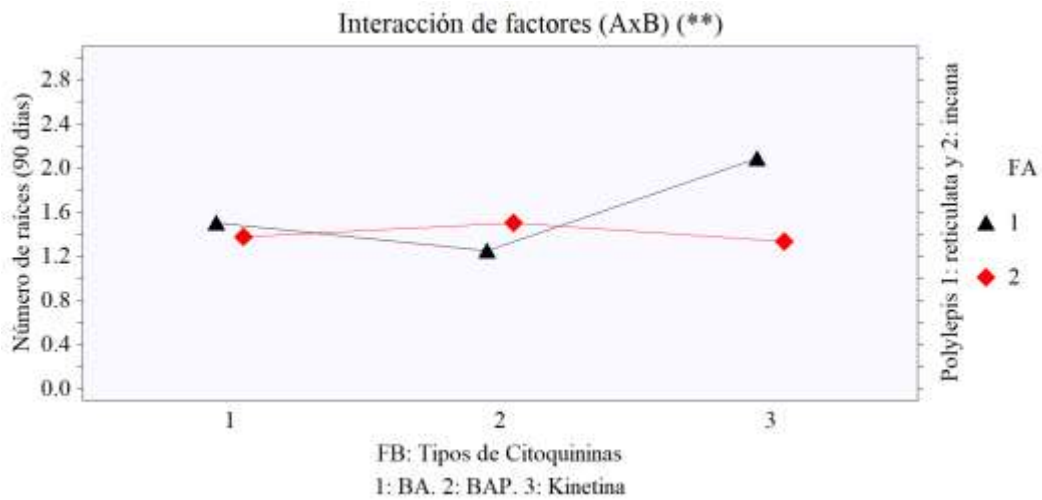
**Gráfico N° 11.** Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos en la interacción de factores especies de *Polylepis* por tipos de Citoquininas (AxB) en la variable longitud del brote (cm) a los 90 días.

Se tuvieron diferencias significativas para la variable días a la emisión de la raíz como efecto de la dependencia de factores especies de *Polylepis* por tipos de hormonas. La interacción más tardía fue A2B3 (*P. incana* con la hormona Kinetina) con 89.45 (90) días. Las interacciones más precoces fue la A1B1 (*P. incana* con BA) y la A1B2 (*P. incana* con BAP) con 82 días (Cuadro 5). Los días a la emisión de la raíz fueron afectados por la contaminación del explante y la especie de *polylepis* por sus características varietales.

Se evaluó un efecto altamente significativo para la variable número de raíces por explante a los 90 días por efecto de la dependencia de factores especies de *Polylepis* por tipos de hormonas (Cuadro N° 5 y Gráfico N° 12).

Con la prueba de Tukey al 5%, el promedio más alto se tuvo en la interacción A1B3 (*P. reticulata* con Kinetina) con 2.08 raíces y el menor promedio en la A1B2 (*P. reticulata* con la hormona BAP) con 1.25 raíces (Cuadro 5 y Gráfico 12).

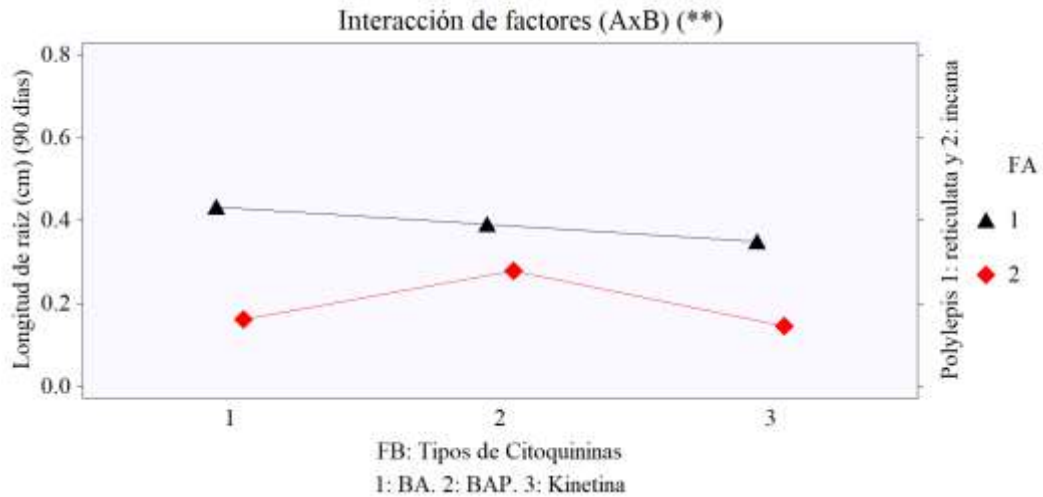
Observando el gráfico N° 12, claramente la respuesta de las especies de *Polylepis* son diferentes. *P. reticulata* respondió mejor con la hormona Kinetina y el *P. incana* fue ligeramente superior con B2: BAP. Conocer y validar estos resultados, son vitales para generar alternativas tecnológicas que permitan mejorar la productividad de plantas en menor tiempo y reducir los costos de producción.



**Gráfico N° 12.** Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos en la interacción de factores especies de *Polylepis* por tipos de Citoquininas (AxB) en la variable número de raíces a los 90 días.

Finalmente, la respuesta de las especies de *Polylepis* en cuanto a la variable longitud de la raíz, dependió significativamente de los tipos de hormonas (Cuadro N° 5 y Gráfico N° 13).

De acuerdo a la prueba de Tukey al 5%, el promedio superior se calculó en la interacción A1B1 (*P. reticulata* con la hormona BA) con 0.43 cm y la menor se presentó en A2B1 (*P. incana* con la hormona BA) y en la A2B3 (*P. incana* con Kinetina) con 0.16 y 0.14 cm respectivamente (Cuadro N° 5 y Gráfico N° 13).



**Gráfico N° 13.** Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos de la interacción de factores especies de *Polylepis* por tipos de Citoquininas (AxB) en la variable longitud de la raíz a los 90 días.

De acuerdo al gráfico N° 13, es evidente la respuesta diferente de las especies de *Polylepis* para la variable longitud de la raíz; *P. reticulata* respondió mejor con la hormona B1: Bencil Adenina, mientras que *P. incana* con la hormona B2: Bencil Adenina Purina. Es evidente que los componentes agronómicos de las plántulas propagadas in vitro, dependen de qué tipo de especie vamos a propagar y qué tipo de hormona responde favorablemente para permitir un equilibrio entre el sistema radicular de las plantas.

#### 4.5. Interacción de factores especies de *Polylepis* por dosis de hormonas (AxC)

**Cuadro N° 6.** Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% en la interacción de factores especies de *Polylepis* por dosis de hormonas (AxC) en las variables: porcentaje de explantes contaminados a los 90 días (PEC), días a la brotación (DB), número de brotes por explante a los 90 días (NBE), longitud del brote a los 90 días (LB), número de hojas por explante a los 90 días (NHE), días a la emisión de la raíz (DER), número de raíces a los 90 Días (NR) y la longitud de la raíz a los 90 días (LR).

Variable	Tratamientos: Tipos de especies de <i>Polylepis</i> por dosis de hormonas (AxC)							
	T1: A1C1	T2: A1C2	T3: A1C3	T4: A1C4	T5: A2C1	T6: A2C2	T7: A2C3	T8: A2C4
PEC (NS)	11.10 A	0.00 A	0.00 A	0.00 A	22.20 A	33.30 A	22.20 A	22.20 A
DB (NS)	37.90 A	38.40 A	38.00 A	38.40 A	40.20 A	41.80 A	41.10 A	41.40 A
NBE (NS)	4.10 A	3.80 A	4.03 A	4.20 A	3.20 A	2.3 0A	3.30 A	3.70 A
LB (**)	1.82 A	1.70 AB	1.36 B	1.41 B	1.34 B	0.82 C	0.98 C	1.50 AB
NH (NS)	4.10 A	3.80 A	4.30 A	4.20 A	3.20 A	2.50 A	3.30 A	3.70 A
DER (NS)	82.30 A	81.80 A	83.00 A	82.40 A	88.10 A	88.80 A	89.90 A	88.90 A
NR (**)	1.80 A	1.80 A	1.60 A	1.30 A	1.30 A	1.30 A	1.10 B	1.90 A
LR (**)	0.40 B	0.49 A	0.30 CD	0.40 BC	0.19 E	0.20 E	0.15 E	0.24 DE

NS: No significativo. \*\*Altamente significativo al 1%. Promedios con distinta letra, son estadísticamente diferentes al 5%.

La respuesta de las especies de *Polylepis* en cuanto a las variables porcentaje de explantes contaminados, días a brotación, número de brotes por explante, número de hojas y los días a la emisión de la raíz, no dependieron de las dosis de citoquininas; es decir fueron factores dependientes (Cuadro N° 6).

Para el porcentaje de contaminación de los explantes a los 90 días, numéricamente los valores promedios más elevados se presentaron en la especie A2: *Polylepis incana* y en la dosis de 3 mg/l (interacción A2C2) con un promedio de 33.3%. Los promedios menores se tuvieron en A1: *Polylepis reticulata* y en las dosis de 3; 5 y 7 mg/l con un 0% de contaminación (Cuadro N°6).

El porcentaje de contaminación, responde a las características varietales y el manejo del medio de cultivo in vitro.

Al respecto, Digonzelli (2007), citado por Gualavisi, L. (2008) menciona que las bacterias son los contaminantes más comunes y ocasionan serios problemas porque pueden ser sistémicas y son difíciles de detectar. Algunas son endógenas, o sea viven con el explante, y son muy difíciles de eliminar. A menudo no se observan en los primeros subcultivos, manifestándose en la fase de multiplicación. Estos microorganismos escapan a los efectos de desinfección superficial y pueden ser intracelulares y entre los que están géneros bacterianos como: *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium* y *Pseudomonas* (George & Sherrington, 1984).

Para el componente días a la brotación, las interacciones más tardías se presentaron en la especie A2: *Polylepis incana* y en las dosis de 7 mg/l con 41. 4 días. Las interacciones más precoces, se presentaron en A1: *Polylepis reticulata* y en la dosis de 1 mg/l con 37. 9 (38) días (Cuadro N° 6). De acuerdo a estos resultados, más importante en la respuesta fue el efecto varietal, las dosis evaluadas, no fueron consistentes y estadísticamente fueron similares, es decir comparten un mismo rango, aunque numéricamente sean diferentes.

Para la variable número de brotes por explante a los 90 días, numéricamente los promedios más elevados se determinaron en A1: *Polylepis reticulata* y en la dosis de 5 mg/l con un promedio de 4.3 brotes por explante. El promedio menor se evaluó



en la interacción A2C2 (*P. incana* con 3 mg/l) con 2.3 brotes por explante. Se confirma que el efecto más importante fue la especie de *Polylepis*, y la respuesta de las dosis no fue significativa compartiendo un mismo rango estadístico para todas las interacciones (Cuadro N° 6).

En la variable número de hojas por explante a los 90 días en respuesta consiste la especie A1: *Polylepis reticulata* presentó numéricamente valores promedios más altos en comparación al A2: *Polylepis incana*. Numéricamente la interacción con el promedio más elevado fue la A1B3 (*P. reticulata* con 5 mg/l) con 4.3 hojas y la menor promedio en la interacción A2C2 (*P. incana* con 3 mg/l) con 2.5 hojas (Cuadro N° 6). Estadísticamente todas las interacciones correspondieron a un mismo rango.

Para el componente días a la emisión de la raíz, en respuesta consistente la especie más tardía fue A2: *P. incana* con las dosis de 5 y 7 mg/l que correspondieron a los tratamientos T7 y T8 con un promedio de 89.9 (90) respectivamente (Cuadro N°6).

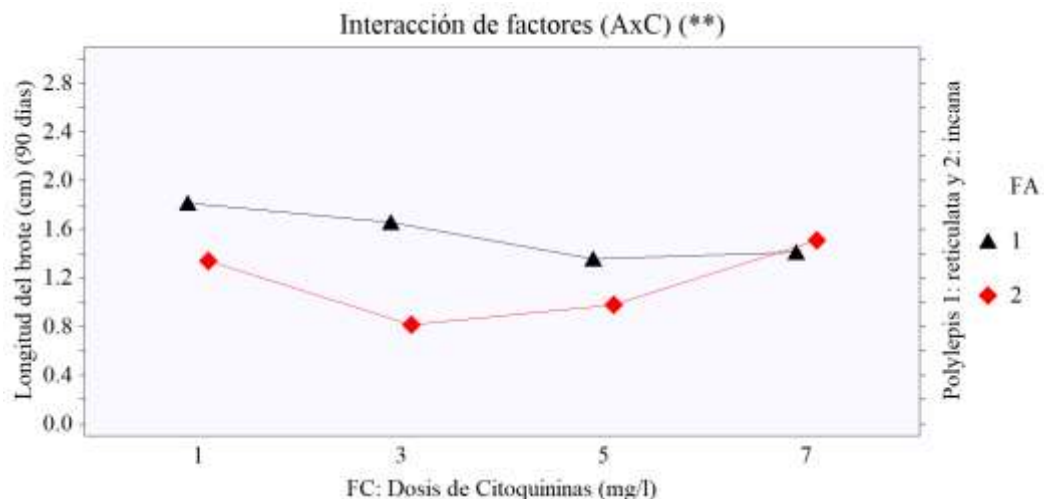
La respuesta agronómica de las dos especies de *Polylepis* en cuanto a la variable longitud del brote en cm a los 90 días, dependió de las dosis de citoquininas es decir estadísticamente fueron factores dependientes (Cuadro N° 6 y Gráfico N° 14).

Con la prueba de Tukey al 5%, los valores promedios más altos, se presentaron en las interacciones A1C1 (*P. reticulata* con 1 mg/l) y en la A1C2 (*P. reticulata* con 3 mg/l) con 1.82 y 1.66 cm respectivamente. Los promedios inferiores se cuantificaron en las interacciones A2C2 (*P. incana* con 3 mg/l) y en la A2C3 (*P. incana* con 5 mg/l) con 0.82 y 0.98 cm (Cuadro N° 6 y Gráfico N° 14).

Al observar el gráfico N° 14, claramente la respuesta de las especies de *Polylepis* a la aplicación de diferentes dosis de citoquininas, fue muy diferente. *P. reticulata* respondió mejor con la dosis más baja de citoquininas es decir con 1 mg/l y a mayores dosis se redujo la longitud del brote; sin embargo, para la especie *P. incana*, a mayores dosis, se incrementó la longitud del brote, pero con valores inferiores a *P. reticulata*. Estos resultados claramente demuestran que las

características varietales de cada especie influyeron significativamente en la respuesta a las dosis de citoquininas.

Mamani, B., et al. 2015, reportan en trabajos de investigación de propagación in vitro de *Polylepis sp* de 3.1 brotes por explante, 1.19 cm de longitud del brote y 7.8 hojas por brote a los 90 días.

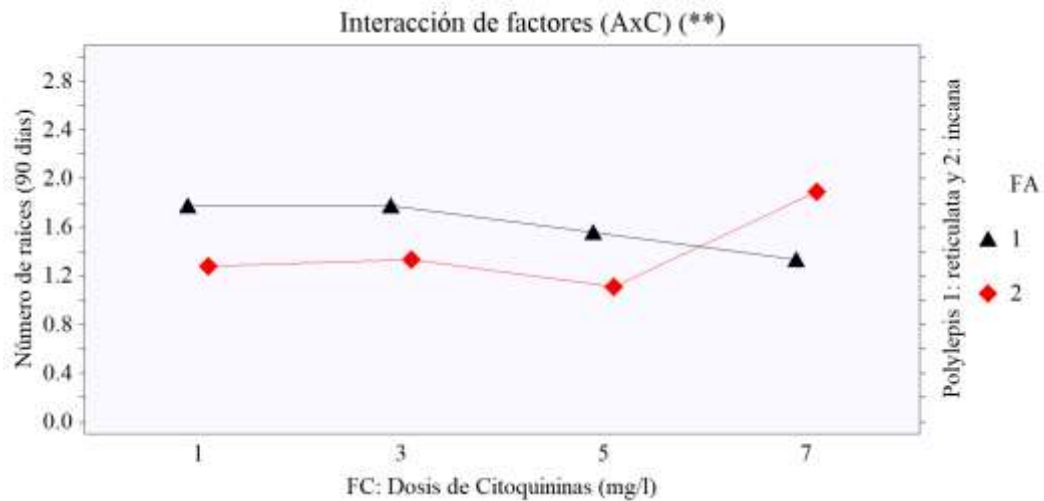


**Gráfico N° 14.** Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos de la interacción de factores especies de *Polylepis* por dosis de Citoquininas (AxC) en la variable longitud del brote a los 90 días.

Se calcularon diferencias estadísticas altamente significativas para la variable número de raíces a los 90 días como efecto de la interacción de factores especies de *Polylepis* por dosis de citoquininas; es decir fueron factores dependientes (Cuadro N° 6 y Gráfico N° 15).

Con la prueba de Tukey al 5%, los promedios más elevados, se registraron en las interacciones A2C4 (*P. incana* con 7 mg/l) con 1.9 (2 raíces), seguido por las interacciones A1C1 (*P. reticulata* con 1 mg/l) y en la A1C2 (*P. reticulata* con 3 mg/l) con valores promedios de 1.8 raíces respectivamente. El promedio inferior, se determinó en la A2C3 (*P. incana* con 5 mg/l) con 1.1 raíces (Cuadro N° 6 y Gráfico N° 15).

El gráfico N° 15, claramente muestra la respuesta muy diferente de las especies de *Polylepis* a la aplicación de dosis de citoquininas. *Polylepis reticulata* respondió mejor con dosis bajas de entre 1 y 3 mg/l, sin embargo *P. incana* en términos generales mostró con mayor fuerza una respuesta lineal para la variable número de raíces por explante a los 90 días.

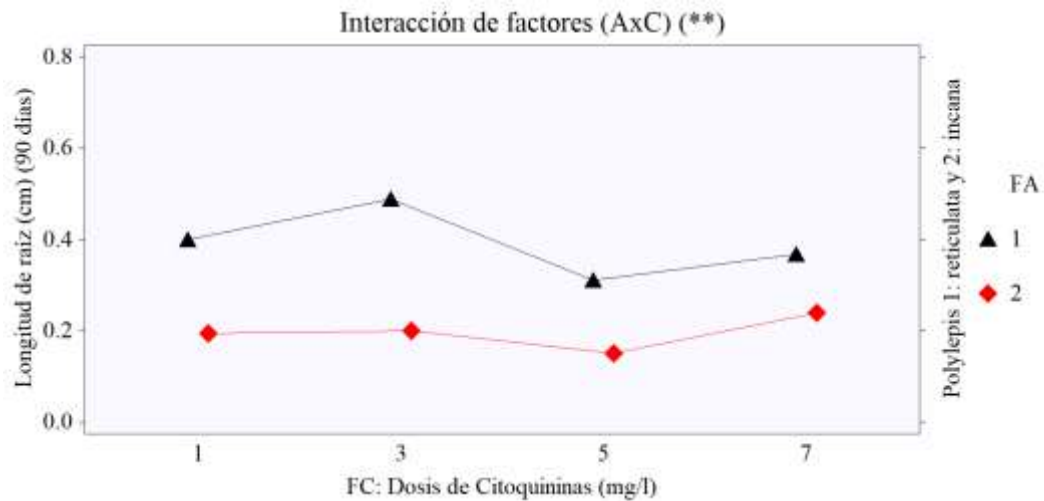


**Gráfico N° 15.** Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos de la interacción de factores especies de *Polylepis* por dosis de Citoquininas (AxC) en la variable número de raíces a los 90 días.

Se calcularon diferencias estadísticas altamente significativas para la variable longitud de la raíz a los 90 días por efecto de la dependencia de factores especies de *Polylepis* por dosis de citoquininas (Cuadro N° 6 y Gráfico N° 16).

Con la prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios de los tratamientos, el valor más elevado correspondió a la interacción A1C2 (*P. reticulata* con 3 mg/l) con 0.49 cm y con el mayor rango, seguido de la interacción A1C1 (*P. reticulata* con 1 mg/l) con 0.40 cm. Los promedios inferiores se tuvieron en las interacciones A2C3 (*P. incana* con 5 mg/l); A2C1 (*P. incana* con 1 mg/l) y A2C2 (*P. incana* con 3 mg/l) con 0.15; 0.19 y 0.20 cm respectivamente (Cuadro N° 6 y Gráfico N° 16).

En una respuesta consistente al igual que la variable número de raíces por explante a los 90 días, para la variable longitud de la raíz a los 90 días, la respuesta de las especies de *Polylepis* a las concentraciones de citoquininas, fueron muy diferentes. *P. reticulata* tuvo un mejor comportamiento a las dosis bajas de 1 y 3 mg/l; sin embargo *P. incana* respondió a las dosis más altas de 7 mg/l (Gráfico N° 16).



**Gráfico N° 16.** Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos de la interacción de factores especies de *Polylepis* por dosis de Citoquininas (AxC) en la variable longitud de la raíz a los 90 días.

Se confirma en esta investigación que las variables que presentaron diferencias altamente significativas en la interacción de especies de *Polylepis* por dosis de citoquininas como fueron la longitud del brote, el número y longitud de raíces a los 90 días, son atributos varietales y dependieron además de la interacción con las condiciones climatizadas donde se desarrolló la propagación in vitro. Son determinantes la sanidad del explante y el manejo del experimento especialmente en la toma de los datos para cuantificar la respuesta de los diferentes tratamientos.

Es evidente que en esta investigación el factor principal más determinante en los datos y por ende en los resultados correspondientes a dos especies de *Polylepis*. La respuesta de los tipos y dosis de citoquininas, fue relevante pero no consistente, siendo fundamental validar los resultados por varios períodos.

#### 4.6. Interacción de factores Tipos de citoquininas por dosis (BxC)

**Cuadro N° 7.** Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% en la interacción de factores Tipos de citoquininas por dosis de hormonas (BxC) en las variables: porcentaje de explantes contaminados a los 90 días (PEC), días a la brotación (DB), número de brotes por explante a los 90 días (NBE), longitud del brote a los 90 días (LB), número de hojas por explante a los 90 días (NHE), días a la emisión de la raíz (DER), número de raíces a los 90 Días (NR) y la longitud de la raíz a los 90 días (LR).

Tratamiento No.	Variables							
	PEC <sup>ns</sup>	DB**	NBE**	LB**	NH <sup>ns</sup>	DER**	NR*	LR**
<b>T1: B1C1</b>	16.6 A	39.6 ABC	3.4 ABCD	1.52 AB	3.4 A	84.1 E	1.6 A	0.33 ABCD
<b>T2: B1C2</b>	16.6 A	41.2 A	2.4 D	0.79 D	2.7 A	85.4 BCDE	1.2 B	0.38 AB
<b>T3: B1C3</b>	16.6 A	39.5 ABC	3.7 ABC	1.14 BCD	3.7 A	86.1 ABC	1.2 B	0.23 DE
<b>T4: B1C4</b>	16.6 A	40.0 ABC	3.5 ABCD	1.59 AB	3.5 A	85.9 ABCD	1.8 A	0.26 CDE
<b>T5: B2C1</b>	33.3 A	37.5 C	4.5 A	1.37 BC	4.5 A	85.5 ABCDE	1.0 B	0.25 CDE
<b>T6: B2C2</b>	16.6 A	40.0 ABC	3.4 ABCD	1.58 AB	3.4 A	84.9 CDE	1.8A	0.44 A
<b>T7: B2C3</b>	0.0 A	40.0ABC	3.7 ABC	0.98 CD	3.7 A	86.2 ABC	1.2 B	0.28 BCDE
<b>T8: B2C4</b>	0.0 A	39.7ABC	4.0 AB	1.43 AB	4.0 A	84.5 DE	1.5 A	0.37 ABC
<b>T9: B3C1</b>	0.0 A	40.2 AB	3.0 CD	1.83 A	3.0 A	86.0 ABC	2.0 A	0.32 BCD
<b>T10: B3C2</b>	16.6 A	39.3ABC	3.3 BCD	1.33 BC	3.3 A	85.6 ABCDE	1.7 A	0.21 DE
<b>T11: B3C3</b>	16.6 A	39.2ABC	4.1 AB	1.37 BC	4.0 A	87.1 A	1.7 A	0.18 E
<b>T12: B3C4</b>	16.6 A	38.5 BC	4.4 AB	1.35 BC	4.4 A	86.6 AB	1.5 A	0.28 BCDE

NS: No significativo. \*Significativo al 5%. \*\*Altamente significativo al 1%. Promedios con distinta letra, son estadísticamente diferentes al 5%.

La respuesta de los tipos de citoquininas en relación a las variables porcentaje de contaminación de los explantes acumulado a los 90 días, y para el número de hojas por explante a los 90 días, no dependieron de las dosis de las hormonas; es decir fueron factores independientes.

Numéricamente el porcentaje más elevado de contaminación de los explantes, se cuantificó en la interacción B2C1 (Bencil Amino Purina en la dosis de 1 mg/l) con el 33.3%. No se presentaron contaminación de los explantes en las interacciones B2C3 (Bencil Amino Purina con 5 mg/l); B2C4 (Bencil Amino Purina con 7 mg/l) y B3C1 (Kinetina con 1 mg/l). El resto de las interacciones presentaron promedios de contaminación de un 16.6% (Cuadro N° 7). El nivel de contaminación ya discutido anteriormente pudo darse por la oxidación del medio de cultivo, presencia de hongos y posiblemente también de bacterias.

Para la variable número de hojas por explante a los 90 días todos los tratamientos comparten el mismo rango por cuanto no se presentaron diferencias estadísticas significativas. Sin embargo, numéricamente los promedios más altos se dieron en las interacciones B2C1 (Bencil Amino Purina en la dosis de 1 mg/l) y en la B3C4 (Kinetina en la dosis de 7 mg/l) con un promedio de 4.5 y 4.4 hojas por explante. Las interacciones B2C4 (Bencil Amino Purina con 7 mg/l) y la B3C3 (Kinetina con 5 mg/l) con promedios de 4 hojas. Las interacciones con los promedios inferiores correspondieron a la B1C2 (Bencil Adenina con 1 mg/l) y en la B3C1 (Kinetina con 1 mg/l) con promedios de 2.7 y 3 hojas por explante respectivamente (Cuadro N° 7).

Para la variable días a la brotación, y días a la emisión de las raíces los tipos de citoquininas, dependieron significativamente de las dosis (Cuadro N° 7).

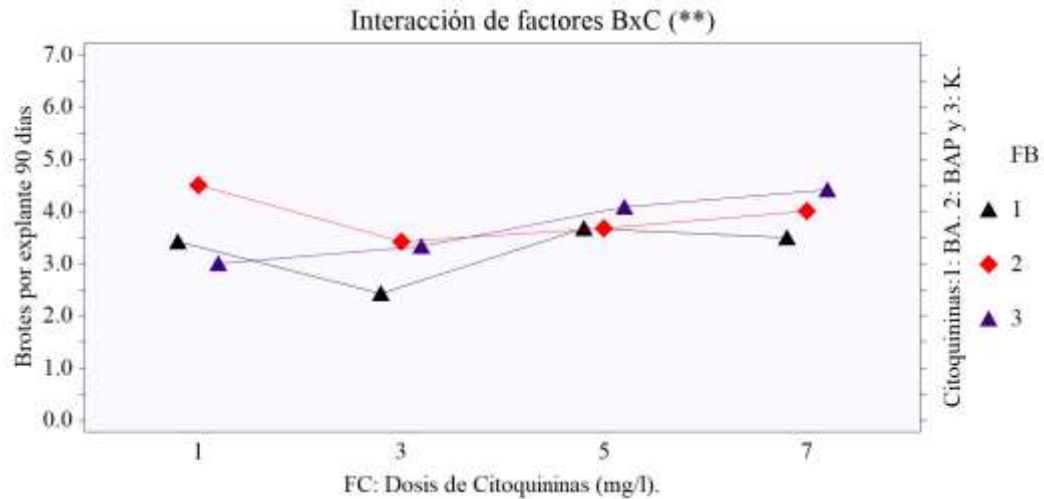
Con la prueba de Tukey al 5% los promedios más tardíos en la variable días a la brotación se tuvo en la B1C2 (Bencil Adenina con 3 mg/l) con 41.2 días y el promedio más precoz en la interacción B2C1 (Bencil Amino Purina con 1 mg/l) con 37.5 días. El resto de las interacciones compartieron valores promedios similares (Cuadro N° 7).

Para el componente días a la emisión de la raíz, el promedio superior se determinó en las interacciones B3C3 (Kinetina con 5 mg/l) y la B3C4 (Kinetina con 7 mg/l) con 87.1 y 86.6 días respectivamente. El promedio menor se tuvo en la interacción B1C1 (Bencil Adenina con 1 mg/l) con un promedio de 84.1 días (Cuadro N° 7).

La respuesta agronómica del tipo de citoquininas en cuanto a la variable número de brotes por explante a los 90 días, dependió de las dosis de hormonas (Cuadro N° 7 y Gráfico N° 17).

Con la prueba de Tukey al 5%, los promedios más altos se registraron en las interacciones B2C1 (Bencil Amino Purina con 1 mg/l) con 4.5 (5) brotes por explante, seguido de las interacciones B3C3 (Kinetina con 5 mg/l) y la B3C4 (Kinetina con 7 mg/l) con 4.1 y 4.4 brotes por explante. Los promedios inferiores correspondieron a las interacciones B1C2 (Bencil Adenina con 3 mg/l) y la B3C1 (Kinetina con 1 mg/l) con 2.4 y 3 brotes por explante a los 90 días (Cuadro N° 7 y Gráfico N° 17).

En el gráfico N° 17, claramente los tipos de Citoquininas, dependieron de las dosis de hormonas, por cuanto en la respuesta hay cambios en dirección y en magnitud por efecto de las dosis. Para Bencil Adenina respondió mejor con la dosis de 5 mg/l; Bencil Amino Purina tuvo su mejor respuesta en la dosis de 1 mg/l; sin embargo, para Kinetina, tuvo una respuesta lineal es decir a mayores dosis, más brotes por explante a los 90 días (Gráfico N° 17). Estos resultados infieren de manera consistente que las diferentes hormonas tienen una dosis específica para contribuir al desarrollo del sistema radicular de las plantas.



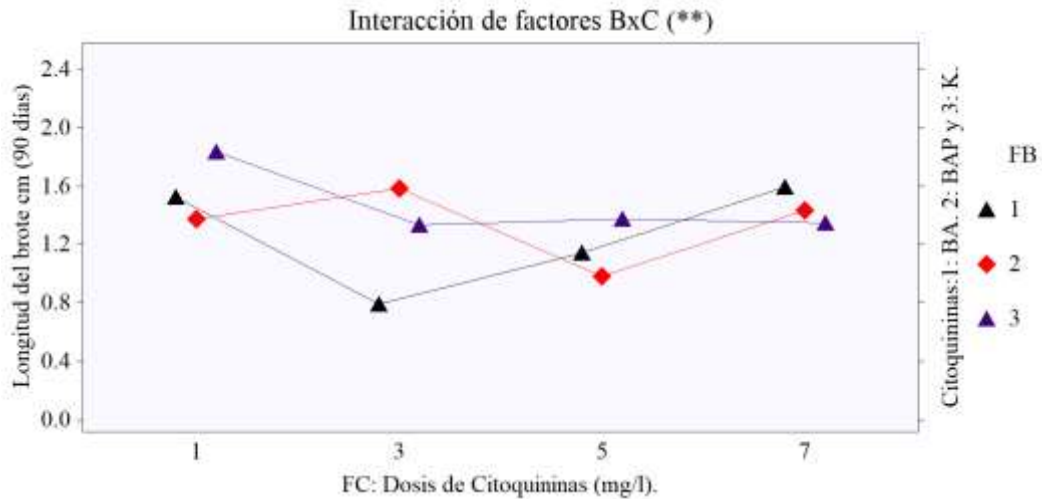
**Gráfico N° 17.** Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos de la interacción de factores tipos de hormonas por dosis de Citoquininas (BxC) en la variable número de brotes por explante a los 90 días.

Para la variable quizá más importante evaluada en esta investigación como fue la longitud del brote (cm) a los 90 días o lo que sería lo mismo la altura de las plántulas, el efecto de los tipos de citoquininas, dependió de las dosis (Cuadro N° 7 y Gráfico N° 18).

La prueba de Tukey al 5% para la variable longitud del brote determinó con los promedios mayores a las interacciones B3C1 (Kinetina con 1 mg/l); B1C4 (Bencil Adenina con 7 mg/l) y B2C2 (Bencil Amino Purina con 3 mg/l) con 1.83; 1.59 y 1.58 cm respectivamente. Los promedios menores se tuvieron en las interacciones B1C2 (Bencil Adenina con 3 mg/l) y en la B2C3 (Bencil Amino Purina con 5 mg/l) con 0.79 y 0.98 cm (Cuadro N° 7 y Gráfico N° 18).

De la misma manera en el gráfico N° 18, confirma la respuesta diferente de los tipos de citoquininas para la variable longitud del brote a medida que cambiaron las dosis de las hormonas. Bencil Adenina fue más eficiente en la dosis de 1 mg/l; Bencil Amino Purina su mejor respuesta correspondió con 3 mg/l y Kinetina con la dosis de 1 mg/l. Generalmente las dosis de hormonas para los cultivos in vitro que tienen corta duración (90 días), las dosis más bajas fueron más eficientes para la longitud del brote.



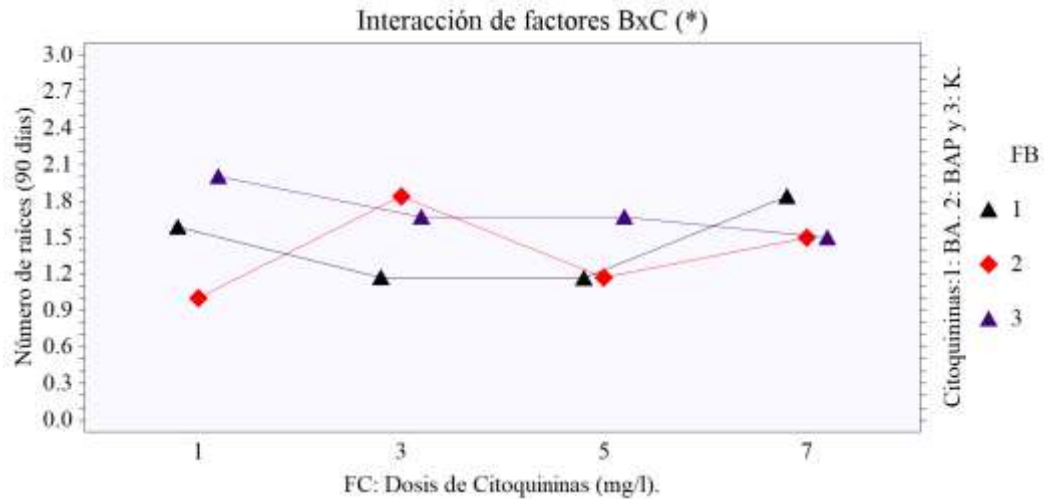


**Gráfico N° 18.** Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos de la interacción de factores tipos de hormonas por dosis de Citoquininas (BxC) en la variable longitud del brote en cm a los 90 días.

Se calcularon diferencias significativas o diferentes para la variable número de raíces a los 90 días como efecto de la dependencia de los tipos de citoquininas por dosis de hormonas (Cuadro N° 7 y Gráfico N° 19).

Los promedios del número de raíces más altos se registraron en las interacciones B3C1 (Kinetina con 1 mg/l); B2C2 (Bencil Amino Purina con 3 mg/l) y en la B1C4 (Bencil Adenina con 7 mg/l) con 2.0 y 1.8 respectivamente. El valor promedio inferior se tuvo en la interacción B2C1 (Bencil Amino Purina con 1 mg/l) con un promedio de apenas una raíz por explante a los 90 días (Cuadro N° 7 y Gráfico N° 19).

El gráfico N° 19, muestra la respuesta diferente de los tipos de citoquininas por dosis de hormonas. Bencil Amino funcionó mejor con 7 mg/l. Bencil Amino Purina en la dosis de 3 mg/l y Kinetina en la concentración de 1 mg/l para la variable número de raíces por explante a los 90 días.

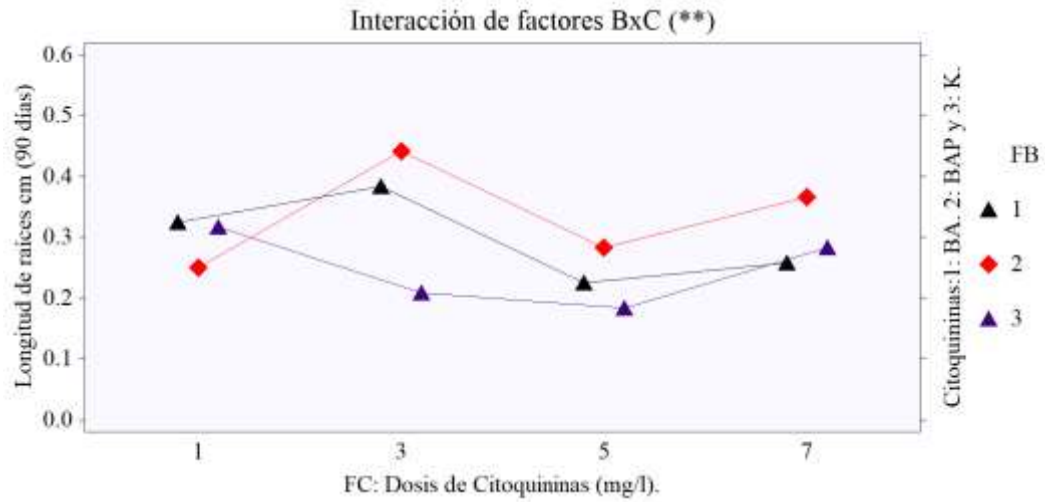


**Gráfico N° 19.** Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos en la interacción de factores tipos de hormonas por dosis de Citoquininas (BxC) en la variable número de raíces a los 90 días.

Finalmente, la respuesta de los tipos de citoquininas en relación a la variable longitud de la raíz a los 90 días, dependió significativamente de las dosis de hormonas (Cuadro N° 7 y Gráfico N° 20).

Con la prueba de Tukey al 5%, los promedios más altos de la longitud de la raíz a los 90 días, se calcularon en las interacciones B2C2 (Bencil Amino Purina con 3 mg/l) y en la B1C2 (Bencil Amino con 1 mg/l) con 0.44 y 0.38 cm respectivamente. Los promedios menores tuvieron las interacciones B3C3 (Kinetina con 5 mg/l) y en la B3C2 (Kinetina con 3 mg/l) con 0.18 y 0.21 cm (Cuadro N° 7 y Gráfico N° 20).

El propósito de plantear experimentos factoriales es para medir los efectos principales de cada factor y las interacciones que puedan presentarse por la dependencia entre dos o más factores. El gráfico N° 20, muestra la respuesta diferente de los tipos de citoquininas con las dosis de hormonas aplicadas en este experimento. Bencil Adenina y Bencil Amino Purina fueron más eficientes con la dosis de 3 mg/l, sin embargo, la Kinetina fue más efectiva con la dosis de 1 mg/l.



**Gráfico N° 20.** Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% para comparar los tratamientos en la interacción de factores tipos de hormonas por dosis de Citoquininas (BxC) en la variable longitud de raíces en cm a los 90 días.

#### 4.7. Interacción de factores especies de *Polylepis* por tipos de citoquininas y por dosis (AxBxC)

**Cuadro N° 8.** Resultados promedios de la prueba de Tukey al 5% en la interacción de factores especies de *Polylepis* por tipos de citoquininas y por dosis de hormonas (AxBxC) en las variables: días a la brotación (DB), número de brotes por explante a los 90 días (NBE), longitud del brote a los 90 días (LB), días a la emisión de la raíz (DER) y la longitud de la raíz a los 90 días (LR).

Tratamiento No.	Variables				
	DB*	NBE**	LB**	DER**	LR**
T1:A1B1C1	38.7 BCD	3.3 EFG	1.70 BC	81.7 DEF	0.40 BC
T2:A1B1C2	39.3 ABCD	3.3 EFG	1.43 BCDEF	80.0 F	0.66 A
T3:A1B1C3	37.0 CD	4.3 BCD	1.33 BCDEF	82.7 DE	0.30 CDEF
T4:A1B1C4	38.0 BCD	4.0 BCDE	1.53 BCDE	82.3 DEF	0.36 BCD
T5:A1B2C1	35.5 D	6.0 A	1.25 BCDEF	82.5 DEF	0.30 CDEFG
T6:A1B2C2	37.0 CD	4.3 BCD	1.66 BCD	81.3 EF	0.53 AB
T7:A1B2C3	38.7 BCD	4.0 BCDE	0.93 EF	82.7 DE	0.36 BCD
T8:A1B2C4	39.3 ABCD	4.3 BCD	1.50 BCDEF	82.3 DEF	0.36 BCD
T9:A1B3C1	39.7 ABCD	3.0 FG	2.50 A	82.7 DE	0.5 AB
T10:A1B3C2	39.0 ABCD	3.7 CDEF	1.86 AB	83.7 D	0.26 CDEFG
T11:A1B3C3	38.3 BCD	4.7 B	1.80 BC	83.7 D	0.26 CDEFG
T12:A1B3C4	38.0 BCD	4.3 BCD	1.20 CDEF	82.7 DE	0.36 BCD

T13:A2B1C1	40.5 ABC	3.5 DEF	1.35 BCDEF	86.5 C	0.25 CDEFG
T14:A2B1C2	43.0 A	1.5 H	0.15 G	90.5 A	0.1 G
T15:A2B1C3	42.0 AB	3.0 FG	0.95 DEF	89.5 AB	0.15 EFG
T16:A2B1C4	42.0 AB	3.0 FG	1.65 BCDE	89.5 AB	0.15 EFG
T17:A2B2C1	39.5 ABCD	3.0 FG	1.50 BCDEF	88.5 ABC	0.20 DEFG
T18:A2B2C2	43.0 A	2.5 G	1.50 BCDEF	88.5 ABC	0.35 BCDE
T19:A2B2C3	41.3 AB	3.3 EFG	1.03 DEF	89.6 AB	0.20 DEFG
T20:A2B2C4	40.0 ABC	3.7 CDEF	1.36 BCDEF	86.7 C	0.36 BCD
T21:A2B3C1	40.7 ABC	3.0 FG	1.16 DEF	89.3 AB	0.13 FG
T22:A2B3C2	39.5 ABCD	3.0 FG	0.80 FG	87.5 BC	0.15 EFG
T23:A2B3C3	40.0 ABC	3.5 DEF	0.95 DEF	90.5 A	0.1 G
T24:A2B3C4	39.0 ABCD	4.5 BC	1.50 BCDEF	90.5 A	0.20 DEFG

NS: No significativo. \*Significativo al 5%. \*\*Altamente significativo al 1%. Promedios con distinta letra, son estadísticamente diferentes al 5%.

La respuesta de las especies de *Polylepis* en relación a las variables días a la brotación, número de brotes por explante a los 90 días, longitud del brote en cm a los 90 días, días a la emisión de las raíces y la longitud de la raíz a los 90 días, dependieron del tipo y las dosis de las hormonas; es decir fueron factores dependientes (Cuadro N° 8).

Para la variable días a la brotación, y con la aplicación de la prueba de Tukey al 5%, las interacciones más tardías fueron las A2B1C2 (*Polylepis incana* con la citoquinina Bencil Adenina y en la dosis de 3 mg/l) y la interacción A2B2C2 (*P. incana*, Bencil Amino Purina en la dosis de 3 mg/l) con 43 días a la brotación respectivamente. Las interacciones más precoces fueron las A1B2C1 (*P. reticulata* con la citoquinina Bencil Amino Purina en la dosis de 1 mg/l) con 35.5 (36) días a la brotación, seguido de las interacciones A1B1C3 (*P. reticulata* con Bencil Adenina y en la dosis de 5 mg/l) y la A1B2C2 (*P. reticulata* con Bencil Amino Purina y en la dosis de 3 mg/l) con 37 días a la brotación (Cuadro N° 8). Con una respuesta consistente la especie más tardía fue *P. incana* como efecto principal y la variable días a la brotación es una característica varietal y que puede estar afectada también por la sanidad, nivel de oxidación del medio de cultivo y las condiciones climatizadas.

La variable número de brotes por explante a los 90 días, también estuvo afectada por la dependencia altamente significativa de los factores especies de *Polylepis*, tipos y dosis de hormonas (Cuadro N° 8).

Con la prueba de Tukey al 5% los promedios más altos se registraron en las interacciones A1B2C1 (*P. reticulata* con la citoquinina Bencil Amino Purina en la dosis de 1 mg/l), con 6 brotes y en la interacción A1B3C3 (*P. reticulata* hormona Kinetina y en la dosis de 5 mg/l) con 4.7 (5) brotes por explante. Los promedios menores, se determinaron en las interacciones T14: A2B1C2 (*P. incana* con la hormona Bencil Adenina con 3 mg/l) con apenas 1.5 (2) brotes por explante y en el T18: A2B2C2 (*P. incana* hormona Bencil Amino Purina con 3 mg/l) con 2.5 (3) brotes por explante (Cuadro N° 8).

La respuesta de las especies de *Polylepis* en relación a la variable longitud del brote a los 90 días, dependieron significativamente de los factores tipos y dosis de hormonas (Cuadro N° 8).

Aplicando la prueba de Tukey al 5% para hacer las comparaciones de los promedios de las interacciones, los valores más elevados se calcularon en las interacciones A1B3C1 (*P. reticulata* hormona Kinetina en la dosis de 1 mg/l) y en la A1B3C2 (*P. reticulata*, Kinetina en la dosis de 3 mg/l) con 2.50 y 1.86 cm respectivamente. Promedios menores se determinaron en las interacciones A2B1C2 (*P. incana* con la hormona Bencil Adenina y en la dosis de 3 mg/l) y en la A2B3C2 (*P. incana*, Bencil Amino Purina en la dosis de 3 mg/l) con 0.15 y 0.8 cm (Cuadro N° 8).

La longitud del brote es una variable muy importante porque está directamente relacionada con la altura de la planta en el laboratorio. En resultados consistentes la respuesta de *Polylepis reticulata* fue mejor como efecto principal con la hormona Kinetina y en las dosis de 1 y 3 mg/l. Cada variedad responde a diferentes tipos de hormonas y concentraciones y lo más importante es cuantificar la dosis adecuada para contribuir al equilibrio del crecimiento y desarrollo del sistema radicular en donde actúan las auxinas y las citoquininas.

Para el componente días a la emisión de la raíz, se calcularon diferencias altamente significativas como efecto de la interacción de los factores especies de *Polylepis*, tipos y dosis de hormonas (Cuadro N° 8).

Con la prueba de Tukey al 5%, las interacciones más tardías fueron las A2B1C2 (*P. incana* con la hormona Bencil Adenina en dosis de 3 mg/l), la A2B3C3 (*P. incana* con la hormona Kinetina en dosis de 5 mg/l) y en la A2B3C4 (*P. incana* con la hormona Kinetina en la dosis de 7 mg/l) con un promedio de 90.5 (91) días respectivamente. Las interacciones más precoces fueron A1B1C2 (*P. reticulata* con la hormona Bencil Adenina en dosis de 3 mg/l) y la A1B2C2 (*P. reticulata* con la hormona Bencil Amino Purina en la dosis de 3 mg/l) con 80.0 y 81.3 (81) días a la emisión de la raíz. El resto de interacciones tuvieron valores intermedios y similares (Cuadro N° 8).

Finalmente, para la variable longitud de la raíz a los 90 días, los factores estudiados como fueron la especie de *Polylepis* por tipos y dosis de hormonas, tuvieron una dependencia altamente significativa (Cuadro N° 8).

Con la prueba de Tukey al 5% los promedios más elevados correspondieron a las interacciones A1B1C2 (*P. reticulata* con la hormona Bencil Adenina con una dosis de 3 mg/l), la A1B2C2 (*P. reticulata* con la hormona Bencil Amino Purina en dosis de 3 mg/l) y en la T9: A1B3C1 (*P. reticulata* con la hormona Kinetina en dosis de 1 mg/l), con valores de 0.66; 0.53 y 0.50 cm respectivamente, Los promedios menores se tuvieron en las interacciones A2B1C2 (*P. incana* con la hormona Bencil Adenina en la dosis de 3 mg/l) y en la A2B3C3 (*P. incana* con la hormona Kinetina en dosis de 5 mg/l) con un promedio de 0.10 cm respectivamente (Cuadro N° 8).

La respuesta de las especies de *Polylepis*, es claro que depende de sus características varietales, tipos de hormonas, dosis y además de la interacción con las condiciones climatizadas del laboratorio y del medio de cultivo in vitro.

Es conocido que la Bencil Adenina (citoquinina) se utiliza para promover la brotación lateral en numerosas especies ya que induce la división celular, incrementa el contenido de clorofila a través de la diferenciación de cloroplastos, aumenta la actividad fotosintética y participa tanto en los procesos de crecimiento y desarrollo vegetativo y reproductivo. Dentro de las citoquininas, la Bencil Amino Purina (BAP) activa la división celular en el embrión contribuyendo a su desarrollo y promoviendo la germinación en algunas especies.

Las fitohormonas son compuestos responsables de la expresión génica de diversos eventos de crecimiento y desarrollo y, además, participan en la regulación de múltiples procesos fisiológicos como la germinación, la semilla, el enraizamiento y los movimientos trópicos, entre otros; es decir, las fitohormonas se caracterizan por influenciar en variadas respuestas morfogénicas y de crecimiento. La citoquinina se sintetiza en cualquier tejido vegetal: tallos, raíces, hojas, frutos o semillas, aunque principalmente en las raíces. La aplicación de la kinetina provoca un mayor desarrollo del sistema radical, lo que



se traduce en poseer una mayor superficie de absorción de nutrientes, así como un mayor crecimiento y desarrollo en altura y, en general, en la parte aérea de las plantas. (Cevallos, G. et al. 2018)

#### 4.8. Coeficiente de Variación (CV)

Los valores calculados del CV en las variables que estuvieron bajo el control del investigador fueron menores del 20%, por tanto, las inferencias, conclusiones y recomendaciones son válidos para este experimento.

#### 4.9. Correlación y regresión lineal

**Cuadro N° 9.** Resultados del análisis de correlación y regresión lineal de los componentes agronómicos que presentaron una significación estadística altamente significativa negativa o positiva con la variable longitud del brote los 90 días.

<b>Variab independientes (Xs)</b>	<b>Coeficiente de correlación (r)</b>	<b>Coeficiente de regresión (b)</b>	<b>Coeficiente de determinación (R<sup>2</sup> %)</b>
DER (**)	- 0.4417	0.05871	20
LR (**)	0.4728	1.47308	22
NR (**)	0.7273	0.54474	53

\*\* Altamente significativo al 1%.

##### 4.9.1 Correlación (r)

En esta investigación se determinó una correlación negativa entre la variable días a la emisión de la raíz versus la longitud del brote (cm) a los 90 días. Además, se presentaron correlaciones altamente significativas y positivas entre las variables independientes Longitud de la raíz y el Número de raíces a los 90 días versus la Longitud del brote a los 90 días (Cuadro N° 9).

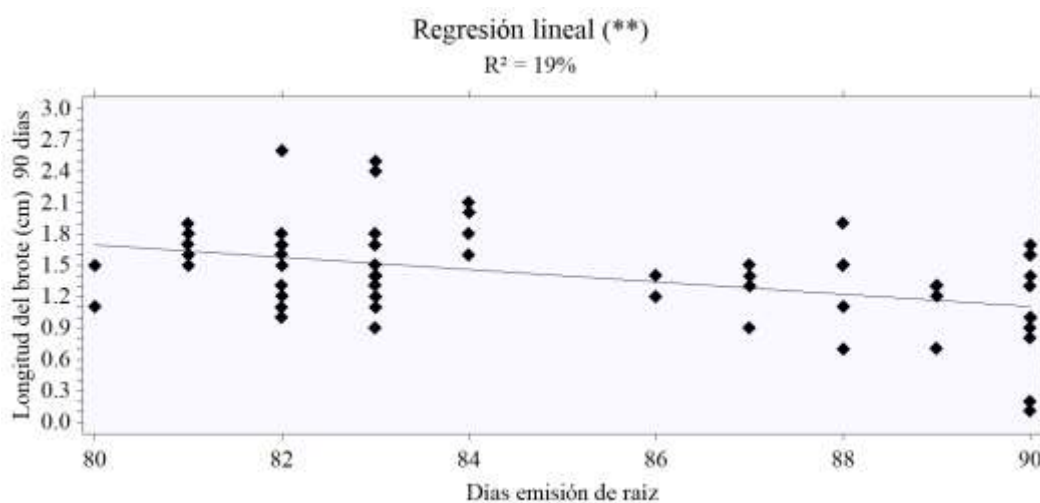
##### 4.9.2 Regresión (b)

En este experimento el componente agronómico que redujo la longitud del brote fue la variable número de días a la emisión de la raíz; es decir tratamientos más tardíos como fue principalmente la especie de *Polylepis incana*, significó una

menor longitud del brote. Las variables independientes que incrementaron la longitud del brote a los 90 días, fueron la longitud y el número de raíces a los 90 (Cuadro N° 9). Esto quiere decir valores promedios más altos de estos componentes agronómicos, mayor fue la longitud del brote.

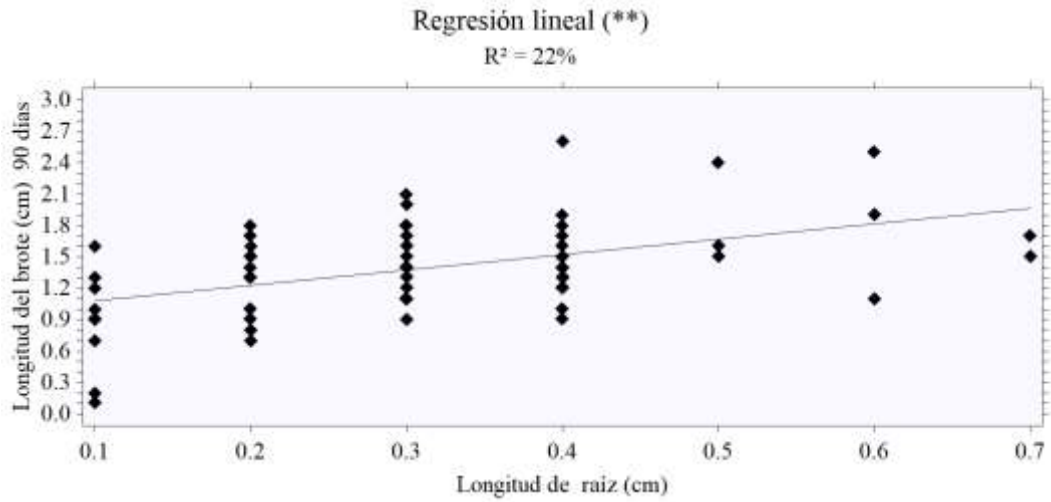
#### 4.9.3 Coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>)

El 19% de la reducción de la longitud del brote fue debido a valores promedios más altos de los días a la emisión de la raíz (Cuadro N° 9 y Gráfico N° 21); es decir tratamientos más tardíos, menor longitud del brote o altura de planta.



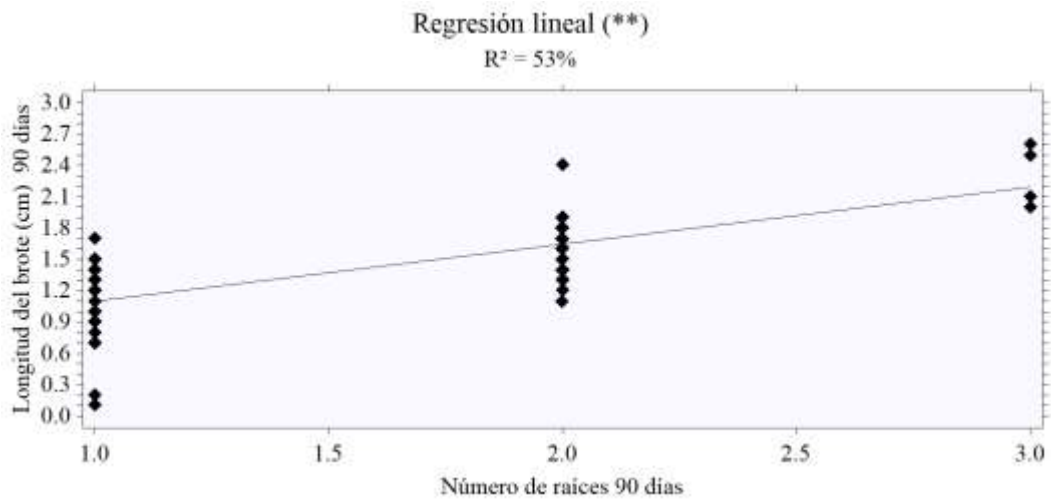
**Gráfico N° 21.** Regresión lineal entre la variable días a la emisión de la raíz versus la longitud del brote (cm) a los 90 días.

El 22% del incremento de la longitud del brote evaluado en cm, fue debido a valores promedios más altos de la longitud de la raíz a los 90 días (Cuadro N° 9 y Gráfico N° 22). Es fundamental que exista un equilibrio entre el sistema radicular de la planta para un mejor desarrollo.



**Gráfico N° 22.** Regresión lineal entre la variable longitud de la raíz a los 90 días versus la longitud del brote (cm) a los 90 días.

El 53% del incremento de la longitud del brote fue debido a valores promedios más altos del componente número de raíces por brote a los 90 días (Cuadro N° 9 y Gráfico N° 23).



**Gráfico N° 23.** Regresión lineal entre la variable número de raíces a los 90 días versus la longitud del brote (cm) a los 90 días.

#### **4.10. Comprobación de hipótesis**

Para la interacción de factores especies de *Polylepis* por tipos y dosis de hormonas, con un 99% de evidencia científica se determinaron diferencias significativas en las variables días a brotación, número de brotes por explante, longitud del brote, días a la emisión de la raíz y la longitud de la raíz, por tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

En síntesis, se infiere con suficiente evidencia científica que los factores en estudio incidieron en los resultados de la propagación asexual de plántulas in vitro de *Polylepis*.

## 4.11. Conclusiones y recomendaciones

### 4.11.1 Conclusiones

En función del análisis de los resultados estadísticos, se sintetizan las siguientes conclusiones:

- El efecto más importante y consistente que incidió significativamente en los valores promedios de las variables evaluadas en la propagación asexual in vitro fue determinado en el factor A: especies de *Polylepis*. Los valores promedios superiores en cuanto a la sanidad, precocidad, número de brotes, hojas, raíces y la longitud del brote a los 90 días, se obtuvieron en el *Polylepis reticulata*.
- Los tipos de hormonas incidieron significativamente sobre los componentes número de brotes, longitud del brote, días a la emisión y longitud de la raíz. Para longitud del brote el promedio más alto se tuvo en la hormona Kinetina con 1.47 cm.
- Las dosis de hormonas incidieron significativamente en los promedios superiores de los componentes número de brotes, longitud del brote, días a la emisión y longitud de la raíz. Para la variable número de brotes a los 90 días, se estableció una respuesta lineal; es decir a mayor dosis de citoquininas, más brotes por explante; sin embargo, para la longitud del brote, los promedios superiores y con una respuesta de tipo cuadrática se evaluaron con 1 y 7 mg/l.
- Para la relación de especies de *Polylepis* por tipos de hormonas (AxB), fueron interacciones dependientes en las variables días a la brotación, número de brotes, longitud del brote, días a la emisión de la raíz, número y longitud de la raíz. Para la longitud del brote, que se consideró como la variable más importante, el promedio superior tuvo la interacción A1B3: *Polylepis reticulata* con la hormona Kinetina con un valor promedio de 1.84 cm.

- En la interacción de factores especies de *Polylepis* por dosis de hormonas (AxC) se calcularon diferencias estadísticas diferentes para las variables longitud del brote, número y longitud de la raíz a los 90 días. Para la longitud del brote (altura de planta) los promedios más altos se calcularon en la especie *Polylepis reticulata* con 1 y 3 mg/l.
- La respuesta en la interacción de factores tipos de hormonas por dosis (BxC), se determinaron diferencias estadísticas significativas en las variables días a brotación, número de brotes por explante, longitud del brote, días a la emisión de la raíz, número y longitud de la raíz. El promedio más alto de la longitud del brote se tuvo en la hormona Kinetina y en dosis de 1 mg/l.
- En la interacción de especies de *Polylepis* por tipos de hormonas y por dosis, se tuvieron diferencias altamente significativas para las variables días a brotación, número de brotes por explante, longitud del brote, días a la emisión de la raíz y longitud de la raíz a los 90 días. Para la variable longitud del brote a los 90 días, el promedio más alto se tuvo en el tratamiento T2: A1B1C2 (*Polylepis reticulata* con la hormona Bencil Adenina con 3 mg/l), lo que confirma que la respuesta de las especies de *Polylepis* respondió en función al tipo de hormonas y dosis.
- Los componentes que incrementaron significativamente la longitud del brote, fueron en un 22% la longitud de la raíz y un 53% el número de raíces. La variable independiente que redujo en un 19% la longitud del brote fue los días a la emisión de la raíz.
- Esta investigación, permitió validar y seleccionar alternativas tecnológicas promisorias para la multiplicación asexual de plántulas de *Polylepis* in vitro.

#### 4.11.2 Recomendaciones

Sintetizado los principales resultados y conclusiones, se sugieren las siguientes recomendaciones:

- Para obtener plántulas con mayor sanidad y calidad en el menor tiempo, se recomienda la propagación asexual in vitro con la especie *Polylepis reticulata*.
- Validar los tipos y dosis de hormonas reduciendo al máximo el nivel de contaminación y oxidación del medio de cultivo. Se recomienda aumentar un tratamiento testigo absoluto con 0 mg/l para comparar la eficiencia y eficacia del tipo y dosis de hormonas.
- Con el apoyo de expertos en sanidad vegetal, identificar los tipos de patógenos contaminantes de los explantes en el medio de cultivo, ya que pueden ser diferentes especies de hongos y de bacterias.
- Validar explantes de diferentes edades de *Polylepis reticulata* ya que podrían estar relacionados con una mayor o menor incidencia de contaminación de los explantes, y la calidad en el desarrollo de sus tejidos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Agroactivo, 2021. Regulador fisiológico bencilaminopurina. Obtenido de Agroactivo:  
<https://agroactivocol.com/producto/sanidad-vegetal-alimentos-saludables/regulador-fisiologico-bencilaminopurina/>
- Agrocode, 2012. Citoquininas. Obtenido de Agrocode: [https://agrocode.com/glosario\\_terminos/citoquininas/](https://agrocode.com/glosario_terminos/citoquininas/)
- Agrosíntesis, 2019. Métodos de propagación vegetativa. Obtenido de Agrosíntesis:  
[https://www.agrosintesis.com/metodos-de-propagacion-vegetativa/#:~: text=El% 20acodo% 20es% 20un% 20m% C3% A9todo,crece% 20sobre% 20sus % 20propias% 20ra% C3% ADces.](https://www.agrosintesis.com/metodos-de-propagacion-vegetativa/#:~:text=El%20acodo%20es%20un%20m%C3%A9todo,crece%20sobre%20sus%20propias%20ra%C3%ADces.)
- Almanzar, J. 2016. Nutrición Vegetal. Obtenido de SlidePlayer: <https://slideplayer.es/slide/4044314/>
- Antama, F. 2017. La hormona vegetal - citoquinina regula el crecimiento y desarrollo de las plantas. Obtenido de Fundación Antama: <https://fundacion-antama.org/la-hormona-vegetal-citoquinina-regula-el-crecimiento-y-desarrollo-de-las-plantas/>
- Añazco, M., Sánchez, D., Castro, E., Mosquera, R. 2014. Conocimientos ancestrales para el manejo forestal sustentable. Quito - Ecuador.
- BioplanInVitro, 2019. Micropropagación de plantas. Obtenido de Bioplan In Vitro:  
<http://www.bioplaninvitro.com/micropropagacion-de-plantas/>
- Bonilla, A. 2016. Cultivo in vitro de células y tejidos vegetal. Obtenido de <https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/cultivo-in-vitro-de-celulas-y-tejidos-vegetal>
- Branbyge, J. 1987. Reforestación de los Andes Ecuatorianos con especies nativas.



- Calderón, M. 2010. Determinación de biomasa y contenido de carbono en plantaciones forestales de *Polylepis incana* y *Polylepis reticulata*. Obtenido de Escuela Politécnica Nacional: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/2060/1/CD-2872.pdf>
- Caranqui, J. 2010. Demografía de un Rodal de *Polylepis Reticulata* Hieron En La Reserva De Producción Faunística Chimborazo (Tesis de grado. Ingeniero Forestal). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Chimborazo, Ecuador. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/500>
- Chiclote, J. 1985. Apuntes sobre algunas especies forestales nativas de la sierra Peruana, Proyecto FAO/HOLANDA/INFOR. Centauro.
- Chimborazo, M. 2020. Tesis de grado Universidad Estatal de Bolívar. Guaranda.
- Cuestas, T. 2017. Tesis de grado Universidad Estatal de Bolívar. Guaranda.
- Dagla, H. 2012. Cultivo de tejidos vegetales. Obtenido de Springer Link: <http://doi.org/10.1007/s12045-012-0086-8>
- EduLabC. 2019. Medios de cultivo . Obtenido de EduLabC: <https://edulabc.com.mx/medios-de-cultivo/>
- Espinel, W., Chavez, J. 2008. Biblioteca Universidad Estatal de Bolívar. Quito.
- Guaimalama, J. 1999. Autotecnología de la especie *Polylepis spp.* INEFAN Cartilla N.- 6. Conocoto, Pichincha, Ecuador.
- Gualavisí, L. 2008. Comportamiento de *Polylepis racemosa* en vivero mediante propagación vegetativa utilizando cuatro longitudes de estacas en platabandas a nivel en tres diferentes pisos altitudinales Cayambe. Universidad Politécnica Salesiana sede Quito. Obtenido de dspace ups: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6750/1/UPS-YT00024.pdf>

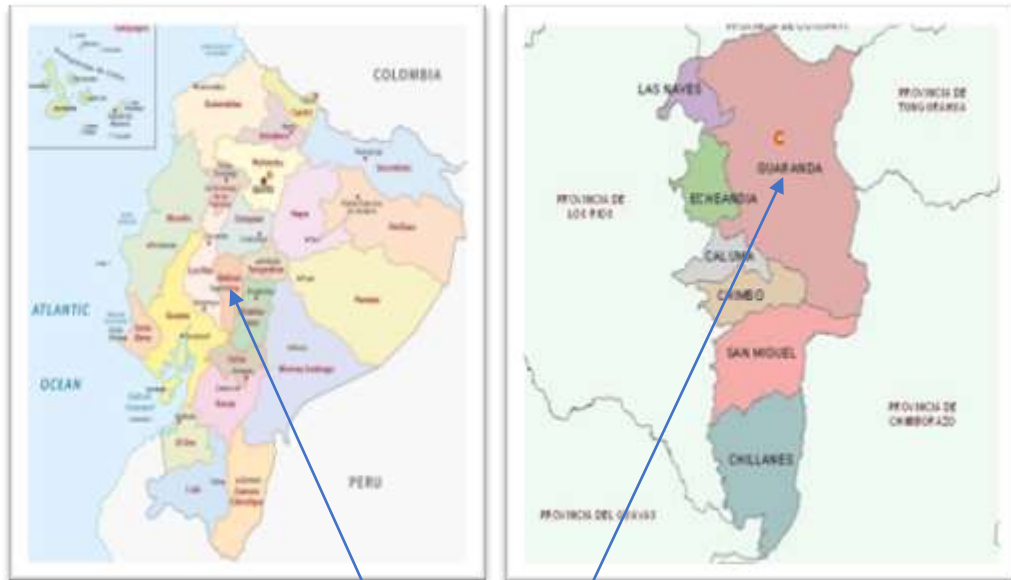
- Hernán, P. 2007. Evaluación de métodos de desinfección y tipos de explante de la especie vegetal *Piper oradendron* Trel y Standl., para el establecimiento de su cultiv in vitro. Obtenido de Biblioteca Universidad San Carlos de Guatemala: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2617.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2617.pdf)
- Holdridge, L. 1979. Determination of World Plant Formations from Simple Climatic Data. Life Zone Ecology. Costa Rica: Tropical Science Center.
- Hussain, A. 2012. Cultivo de tejidos vegetales: Estado actual y oportunidades. Obtenido de Intechopen: <http://dx.doi.org/10.5772/50568>
- Jordan, M. 2005. Repositorio UNC. Obtenido de <https://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/UNC/1782/INFLUENCIA%20DEL%20C3%81CIDO%20GIBERELICO%20%28AG3%29%20%20Y%20BENCIL%20AMINOPURINA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Kessler, M. 2006. Bosques de *Polylepis*. Obtenido de ResearchGate: [https://www.researchgate.net/publication/228644927\\_Bosques\\_de\\_Polylepis](https://www.researchgate.net/publication/228644927_Bosques_de_Polylepis)
- Limaico, R. 2011. Propagación vegetativa de *Polylepis Incana Kunth* aplicando la hormona (ANA), en cuatro niveles en el vivero de la granja Yuyucocha (Tesis de grado. Ingeniero Forestal ). Ibarra, Imbabura, Ecuador.
- Lojan, L. 1992. El Verdor de los Andes; Árboles y Arbustos Nativos Para el Desarrollo Forestal Alto Andino. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Meléndez, J. 2014. Tesis Universidad Estatal de Bolívar. Obtenido de <https://dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/1146/1/128.pdf>
- Mondoñedo, J. 1986. Producción forestal. México: Trillas.
- Naranjo, A. 2014. Evaluación de la calidad de plantas de Yagual (*Polylepis incana*) mediante la propagación asexual con dos enraizadores químicos y tres tipos de sustratos en la Moya, Cantón Guaranda, Provincia Bolívar. Obtenido de Repositorio Universidad Estatal de Bolívar: <https://www.dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/1146/1/128.pdf>

- Nava, G. 2018. Estudio de los árboles de *Polylepis* de termas, Papallacta con fines de manejo. Papallacta.
- Ocaña, D. 1991. Comunicación personal proyecto FAO/Holanda/Infor. Lima, Perú.
- Olmos, S. 2010. Influencia de citoquininas. Obtenido de Repositorio UNC: <https://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/UNC/1782/INFLUENCIA%20DEL%20C3%81CIDO%20GIBERELICO%20%28AG3%29%20%20Y%20BENCIL%20AMINOPURINA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Peter, M. 1999. Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. Missouri Botanical Garden. Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Herbario Nacional, Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales and Department of Systematic Botany, Aarhus University. Missouri. Ecuador.
- Pretell, J. 1985. Apuntes sobre algunas especies forestales nativas de la tierra peruana proyecto FAO/Holanda/Infor. Lima, Perú.
- Quijala, E. 2012. Efecto de citoquininas. Obtenido de Repositorio geotech: [http://repositorio.geotech.cu/jspui/bitstream/1234/3479/1/Efecto%20de%20la%206bencilaminopurina%20en%20morfoanatom%C3%ADa%20y%20la%20fisiolog%C3%ADa%20de%20Tectona%20grandis\\_p.1-46.pdf](http://repositorio.geotech.cu/jspui/bitstream/1234/3479/1/Efecto%20de%20la%206bencilaminopurina%20en%20morfoanatom%C3%ADa%20y%20la%20fisiolog%C3%ADa%20de%20Tectona%20grandis_p.1-46.pdf)
- Quimicompany. (2020). Hormonas y reguladores de crecimiento . Obtenido de Quimicompany:<https://quimicompany.com.co/productos-2/medios-para-cultivosvegetal/hormonasyreguladoresdecrecimiento2/citoquininas/kinetina-2/#:~:text=La%20kinetina%20es%20una%20fitohormona,plantas%20a%20partir%20de%20callos.>
- Ramos, J. 2012. Avances de la micropropagación in vitro de plantas leñosas. Obtenido de Universidad Nacional Abierta y a Distancia: <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/2515/17127974.pdf;jsessionid=59AF3028C7934CAEEC588E6FCFCB4235.jvm1?sequence=1>

- Renison, D., Cuyckens, G. 2018. Ecología y conservación de los bosques montanos de *Polylepis*. Obtenido de Asociación Argentina de Ecología: <https://core.ac.uk/download/pdf/237185434.pdf>
- Ruiz, D. 2013. Evaluación de cuatro métodos de propagación vegetativa en Yagual (*Polylepis incana*) Cayambe . Obtenido de Repositorio Universidad Politécnica Salesiana: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/4057/6/UPS-YT00189.pdf>
- Simpson, B. 1979. Origen del *Polylepis*. Obtenido de Repositorio UNC: <https://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/UNC/4076/TESIS%20LIDONIL%20CH%C3%81VEZ%20WALTER.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- UGR, 2009. Preparación de medios de cultivo. Obtenido de UGR: <https://www.ugr.es/~cjl/medios%20de%20cultivo.pdf>
- Ulloa, C. 2004. 100 plantas silvestres del páramo del Parque Nacional Cajas. Cuenca, Ecuador.

# **ANEXOS**

## Anexo 1. Mapa de ubicación del ensayo



**Provincia  
Bolívar**

**Cantón  
Guaranda**



## Anexo 2. Base de datos

### Codificación de variables agronómicas

Variable	Descripción
REP	Repeticiones: 3
FA	Factor A: Dos especies de <i>Polylepis</i> . A1: <i>P. reticulata</i> y A2: <i>P. incana</i>
FB	Factor B: Tres tipos de citoquininas: B1: Bencil Adenina; B2: Bencil Adenina Purina y B3: Kinetina
FC	Factor C: Cuatro dosis de hormonas (mg/l): C1:1; C2: 3; C3: 5 y C4: 7
PEC	Porcentaje de explantes contaminados a los 90 días
DB	Días a la brotación
NBE	Número de brotes por explante a los 90 días
NHE	Número de hojas por explante a los 90 días
LB	Longitud del brote en cm a los 90 días
DER	Días a la emisión de la raíz
NR	Número de raíces a los 90 días
LR	Longitud de la raíz cm a los 90 días

<b>REP</b>	<b>FA</b>	<b>FB</b>	<b>FC</b>	<b>PEC</b>	<b>DB</b>	<b>NBE</b>	<b>NHE</b>	<b>LB</b>	<b>DER</b>	<b>NR</b>	<b>LR</b>
1	1	1	1	0	38	4	4	1.8	82	2	0.4
1	1	1	3	0	38	4	4	1.1	80	1	0.6
1	1	1	5	0	35	5	5	1.2	83	1	0.3
1	1	1	7	0	38	4	4	1.7	83	1	0.3
1	1	2	1	0	36	6	5	1.4	83	1	0.3
1	1	2	3	0	35	5	5	1.5	81	1	0.5
1	1	2	5	0	37	4	5	0.9	83	1	0.4
1	1	2	7	0	39	5	5	1.3	83	1	0.4
1	1	3	1	0	39	3	2	2.5	83	3	0.6
1	1	3	3	0	39	3	3	2	84	3	0.3
1	1	3	5	0	38	5	6	1.6	84	2	0.3
1	1	3	7	0	38	5	5	1.3	83	1	0.4
1	2	1	1	0	40	4	4	1.3	87	1	0.2
1	2	1	3	0	43	2	2	0.2	90	1	0.1



1	2	1	5	0	42	3	2	0.7	89	1	0.2
1	2	1	7	0	42	3	3	1.7	90	2	0.2
1	2	2	1	0	40	3	4	1.5	88	1	0.2
1	2	2	3	0	42	3	3	1.9	88	2	0.4
1	2	2	5	0	43	3	3	1	90	1	0.2
1	2	2	7	0	39	4	4	1.4	87	1	0.3
1	2	3	1	0	40	3	4	0.9	90	1	0.1
1	2	3	3	0	40	3	4	0.7	88	1	0.1
1	2	3	5	0	40	4	4	0.9	90	1	0.1
1	2	3	7	0	39	5	5	1.4	90	2	0.2
2	1	1	1	0	38	3	3	1.6	81	2	0.4
2	1	1	3	0	40	3	3	1.5	80	1	0.7
2	1	1	5	0	38	4	4	1.3	82	1	0.3
2	1	1	7	0	36	4	5	1.4	83	2	0.4
2	1	2	1	0	35	6	7	1.1	82	1	0.3

2	1	2	3	0	38	4	4	1.9	81	2	0.6
2	1	2	5	0	39	4	4	1	82	1	0.4
2	1	2	7	0	39	4	4	1.4	83	1	0.4
2	1	3	1	0	40	3	3	2.6	82	3	0.4
2	1	3	3	0	38	4	4	1.8	83	2	0.3
2	1	3	5	0	38	5	4	2.1	84	3	0.3
2	1	3	7	0	38	4	4	1.2	82	1	0.4
2	2	1	1	0	41	3	3	1.4	86	2	0.3
2	2	1	3	0	43	1	2	0.1	90	1	0.1
2	2	1	5	0	42	3	4	1.2	89	1	0.1
2	2	1	7	0	42	3	3	1.6	90	2	0.1
2	2	2	1	0	39	3	2	1.5	88	1	0.2
2	2	2	3	0	43	2	2	1.1	88	2	0.3
2	2	2	5	0	43	3	3	1.3	89	2	0.2
2	2	2	7	0	42	3	3	1.2	86	2	0.4

2	2	3	1	0	42	3	3	1.3	89	1	0.1
2	2	3	3	0	39	3	2	0.9	87	1	0.2
2	2	3	5	0	40	3	3	1	90	1	0.1
2	2	3	7	0	39	4	4	1.6	90	2	0.2
3	1	1	1	0	40	3	3	1.7	82	1	0.4
3	1	1	3	0	40	3	3	1.7	81	2	0.7
3	1	1	5	0	38	4	4	1.5	83	2	0.3
3	1	1	7	0	40	4	3	1.5	82	1	0.4
3	1	2	1	100	-	-	-	-	-	-	-
3	1	2	3	0	38	4	4	1.6	82	2	0.5
3	1	2	5	0	40	4	3	0.9	83	1	0.3
3	1	2	7	0	40	4	4	1.8	81	2	0.3
3	1	3	1	0	40	3	4	2.4	83	2	0.5
3	1	3	3	0	40	4	4	1.8	84	2	0.2
3	1	3	5	0	39	4	4	1.7	83	2	0.2

3	1	3	7	0	38	4	4	1.1	83	1	0.3
3	2	1	1	100	-	-	-	-	-	-	-
3	2	1	3	100	-	-	-	-	-	-	-
3	2	1	5	100	-	-	-	-	-	-	-
3	2	1	7	100	-	-	-	-	-	-	-
3	2	2	1	100	-	-	-	-	-	-	-
3	2	2	3	100	-	-	-	-	-	-	-
3	2	2	5	0	39	4	4	0.8	90	1	0.2
3	2	2	7	0	39	4	4	1.5	87	2	0.4
3	2	3	1	0	40	3	2	1.3	90	2	0.2
3	2	3	3	100	-	-	-	-	-	-	-
3	2	3	5	100	-	-	-	-	-	-	-
3	2	3	7	100	-	-	-	-	-	-	-

-: Datos perdidos.

**El Modelo de Diseño Completamente Aleatorizado (DCA), dentro de sus ventajas, permite trabajar o realizar los análisis de varianzas (ADEVAS) con datos perdidos cuando los mismos no fueron evaluados o tienen extrema variabilidad; siempre y cuando se tengan datos al menos de dos repeticiones. (Beaver, J. 2002).**

### Anexo 3. Fotografías de la instalación, seguimiento y evaluación del ensayo



**Fotografía 1.** Adquisición del material vegetal



**Fotografía 2.** Selección y recolección del material vegetal



**Fotografía 3.** Preparación del medio de cultivo



**Fotografía 4.** Frascos con el medio de cultivo para introducir a la autoclave



**Fotografía 5.** Corte de los brotes de *Polylepis*



**Fotografía 6.** Lavado de explantes con jabón líquido



**Fotografía 7.** Desinfección de explantes de *Polylepis*



**Fotografía 8.** Traslado de explantes a la cámara de flujo laminar



**Fotografía 9.** Desinfección de explantes en una solución de cloro dentro de la cámara de flujo laminar



**Fotografía 10.** Corte de las partes oxidadas de los explantes después de las desinfecciones



**Fotografía 11.** Introducción de los explantes en el medio de cultivo



**Fotografía 12.** Sellado y etiquetado de los frascos que contienen los explantes con el medio de cultivo



**Fotografía 13.** Identificación de cada tratamiento y repetición



**Fotografía 14.** Visita del tribunal al Laboratorio de Biotecnología Vegetal



**Fotografía 15.** Monitoreo de los diferentes tratamientos y repeticiones



**Fotografía 16.** Eliminación de frascos con explantes contaminados.





**Fotografía 17.** Toma de datos de la variable número de brotes por explante en centímetros



**Fotografía 18.** Toma y registro de variables

#### **Anexo 4. Glosario de términos técnicos**

**Actividad fotosintética:** La fotosíntesis es un proceso fotoquímico por el cual las plantas, algas y bacterias fotosintéticas utilizan la radiación solar transformándola en energía química para utilizarla en la síntesis de compuestos orgánicos a través de sustancias inorgánicas como minerales, agua y  $CO^2$ .

**Agente solidificante:** Se añaden para preparar medios de cultivo sólidos y semisólidos. El agar-agar es el agente solidificante más común. El agar-agar es un polisacárido de galactosa y galactomanano que se obtiene de las algas rojas (Echema, Gelidium, Gracilaria). Contiene un 70% de agarosa y un 30% de agarpectina. El agar-agar es el agente solidificante más utilizado. Su composición química es indefinida y solidifica con mayor dificultad a medida que desciende el pH. Es insoluble en agua fría, pero se funde y solubiliza en agua hirviendo y solidifica a 45 C°. Forma geles transparentes muy estables y es degradado por muy pocas bacterias.

**Auxina:** Se trata de un tipo de hormona vegetal que ayuda al crecimiento y desarrollo de la planta. Entre sus beneficios también encontramos su contribución a la regulación de los tropismos o la abscisión de órganos, provocando una mayor tardía en la caída de flores, hojas y frutos jóvenes.

**Biotecnología:** Agrupa todo el conjunto de técnicas, procesos y métodos que utilizan organismos vivos, como las bacterias, hongos y virus, partes de ellos o sistemas biológicos derivados de los mismos. Esto con la finalidad de generar y/o mejorar bienes y/o procesos que sean de interés para el ser humano.

**Brote:** Nuevos crecimientos de las plantas, que pueden incluir tallos, yemas y hojas. El brote de germinación de la semilla que crece hacia arriba es un brote que desarrollará hojas.

**Caldo nutritivo:** Es un medio de cultivo universal para microorganismos poco exigentes en cuanto a sus necesidades nutritivas con su fórmula original o adicionada de indicadores, carbohidratos, sales, líquidos orgánicos, etc.

**Caulogénesis:** Crecimiento y desarrollo de tallos preformados o inducidos.

**Citoquininas:** Las citoquininas o citocininas son un grupo de hormonas vegetales que promueven la división y la diferenciación celular. Su nombre proviene del término «citocinesis» que se refiere al proceso de división celular.

**Correlación:** Medida estadística que expresa hasta qué punto dos variables están relacionadas linealmente (esto es, cambian conjuntamente a una tasa constante). Es una herramienta común para describir relaciones simples sin hacer afirmaciones sobre causa y efecto.

**Corteza exfoliante:** Describe el proceso natural y la condición del descascarado de la corteza de un tronco, típicamente en grandes piezas que pueden permanecer parcialmente fijadas al tronco hasta que tras un tiempo se desprenden completamente por los elementos de una exfoliación.

**Cotiledones:** Son la primera hoja que sale del embrión de la planta. Se pueden diferenciar de otras hojas debido a su tamaño. Su número sirve como método de clasificación de las plantas. El cotiledón es capaz de digerir el albumen (tejido que rodea al embrión) y que, tras la germinación, es usado como alimento.

**Cultivo axénico:** Un cultivo axénico o puro es aquel que contiene un sólo tipo de microorganismo y que procede generalmente de una sola célula; el crecimiento de ésta origina, en medio sólido, una masa de células fácilmente visible que recibe el nombre de colonia.

**Cultivo in vitro:** Cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, etc.), y el control de los factores que afectan el crecimiento.

**Edad ontogénica:** La edad de las plantas se expresa de dos formas: la edad ontogenética (juvenilidad/madurez) y la edad fisiológica. La juvenilidad es definida como la condición de una planta previa a la floración o gametogénesis.

**Especie endémica:** Cuando hablamos de endemismo, hacemos referencia a una especie cuyo ámbito geográfico es limitado. Los animales y plantas endémicos, cuya vulnerabilidad es enorme al contar con poblaciones más reducidas, son claves para sus ecosistemas y se convierten en un termómetro a la hora de medir el estado de salud de un territorio. Por esa razón, su protección frente a las amenazas de extinción es fundamental.

**Esquejes:** El esquejado o estaquillado es un método de multiplicación vegetal que consiste en tomar una porción de la planta, por ejemplo, un trozo de tallo, y conseguir que emita raíces para formar un nuevo individuo. Se le llama esqueje, estaca o estaquilla al trozo de tallo, de hoja o de raíz que se pone a enraizar.

**Esqueje preformado:** Es un fragmento de tallo, o también de hoja ya enraizado con la intención de disminuir el tiempo para reproducirla.

**Esterilización de plantas:** Cultivar in vitro tejidos vegetales deben eliminarse todas las fuentes de contaminación. El término esterilidad en este caso indicará que se han eliminado todas las formas de vida excepto el material vegetal.

**Explante:** Fragmento de un tejido extraído de un ser vivo para cultivarlo en un medio artificial.

**Fitohormonas:** Una hormona vegetal o fitohormona es un compuesto producido internamente por una planta, que ejerce su función en muy bajas concentraciones y cuyo principal efecto se produce a nivel celular, cambiando los patrones de crecimiento de los vegetales y permitiendo su control.

**Fruto drupáceo:** En botánica una drupa es un fruto monospermo de mesocarpio carnoso, coriáceo o fibroso que rodea un endocarpio leñoso con una sola semilla en su interior. Estos frutos se desarrollan de un único carpelo y en su mayoría de flores con ovarios súperos.

**Incubar:** Es aquel lugar en el que creamos las condiciones óptimas para que se desarrolle la vida vegetal.

**Micropropagación:** Si el cultivo de tejidos consiste en cultivar asépticamente diferentes explantes constituidos por fracciones de un tejido u órgano que se extrae de la planta, la micropropagación es prácticamente una multiplicación masiva in vitro.

**Nutrientes:** Los nutrientes son las sustancias necesarias para la síntesis de material celular y la obtención de energía. Estos nutrientes son orgánicos e inorgánicos (solo los organismos litótrofos pueden crecer en soluciones exentas de nutrientes orgánicos).

**Plaga:** Son plantas, animales, insectos, microbios u otros organismos no deseados que interfieren en otro ser vivo de interés para el humano. Estos pueden morder, destruir cultivos de alimentos, dañar propiedad, o hacer nuestras vidas más difíciles.

**Propagación:** La multiplicación o propagación vegetativa es la producción de una planta a partir de una célula, un tejido, un órgano o parte de una planta madre. Existe una gran variedad de métodos, desde los procedimientos más sencillos (estacas) hasta los biotecnológicamente más complejos (cultivo in vitro).

**Regresión:** Es un proceso estadístico para estimar las relaciones entre variables. Incluye muchas técnicas para el modelado y análisis de diversas variables, cuando la atención se centra en la relación entre una variable dependiente y una o más variables independientes

**Reproducción asexual:** Es la forma más sencilla para reproducirse; consiste en que a partir de un solo individuo se forman dos o más individuos nuevos que son todos iguales. Ejemplo: el plasmodio, un parásito que causa la enfermedad paludismo o malaria, plantas como musgos y helechos también se reproducen por esporas.

**Rusticación de plantas:** Prepararlas a condiciones posteriores de crecimiento en el campo. La rusticidad vegetal se define por su extensión nativa geográfica: longitud, latitud y elevación. Esos atributos se suelen simplificar definiendo la zona de rusticidad.

**Viabilidad:** Es un análisis que tiene por finalidad conocer la probabilidad que existe de poder llevar a cabo un proyecto con éxito. Por tanto, ofrece información sobre si se puede o no llevar a cabo. Así, si es viable, significa que tiene muchas posibilidades de salir adelante.

**Yema:** Es un órgano complejo de las plantas que se forma habitualmente en la axila de las hojas formado por un meristemo apical, (células con capacidad de división), a modo de botón escamoso (catáfilos) que darán lugar a hojas (folíferas) y flores (floríferas).

**Yemas axilares:** Son un conjunto de células que forman un meristemo y unas pequeñas hojas rudimentarias o primordios foliares protegiendo a dicho meristemo. Todo este conjunto se encuentra en los nudos, en la zona entre la inserción del peciolo de la hoja y el tallo, y dará lugar a las ramas laterales o las flores.