UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE AGRONOMIA
CARRERA INGENIERIA AGRONOMICA

TESIS DE GRADO

EFECTO DEL ÁCIDO INDOL ACETICO Y BENCIL AMINO PURINA EN EL DESARROLLO DE YEMAS DE YÁCON (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl) EN CODICIONES *in vitro*

SONIA SAIRE APAZA

LA PAZ – BOLIVIA
2012

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE AGRONOMIA
CARRERA INGENIERIA AGRONOMICA

EFECTO DEL ÁCIDO INDOL ACETICO Y BENCIL AMINO PURINA EN EL DESARROLLO DE YEMAS DE YÁCON (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl) EN CODICIONES *in vitro*

Tesis de Grado presentado como requisito
Parcial para optar al Grado de
Ingeniero Agrónomo

SONIA SAIRE APAZA

Asesor:
Ph.D. Ing. Agr. Abul Kalam Kurban ……

Asesor:
Ph.D. Ing. Agr. Félix Marza Mamani ……

Tribunal:

Ing. Agr. M.Sc. Félix Rojas Ponce ……

Ing. Agr. David Callizaya Gutiérrez ……

Ing. Agr. M.Sc. Rafael Murillo ……

Aprobado

Presidente Tribunal Examinador ……..

LA PAZ – BOLIVIA
2012

Dedicado a las razones de mi vida:
Mi esposo, las personas que me cobijaron
y me dieron la oportunidad de crecer

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios mío por darme la oportunidad de crecer en tu amor y poder elegir el camino a seguir, por darme siempre la fuerza necesaria para terminar lo que he emprendido, en este caso, finalizar mi carrera. Te pido que siempre acompañes a mi familia y a todos los que me rodean a quienes les agradezco con mucho cariño su ayuda, apoyo, compañía y paciencia; a mi abuela, mi madre y hermano que hoy están en tu compañía, a mi madrina Nancy Malle y a sus hijos, a mis hermanos espirituales Karina Espinosa, Carla Quispe, Marisol Cori, Mary Claudia Poma, Serjio Plasencio y a su familia, a los señores Lic. Vitalio Maldonado y su esposa Rosa Escalante, al Ing. Frida Maldonado, a mis amigos y a todos los compañeros, docentes, y personal administrativo de mi Facultad de Agronomía, a los señores miembros del Tribunal Revisor Ing. Agr. M.Sc. Félix Rojas Ponce, Ing. Agr. David Callizaya Gutiérrez, Ing. Agr. M.Sc. Rafael Murillo y Asesores Ph.D. Ing. Agr. Abul Kalam Kurban, Ph.D. Ing. Agr. Félix Marza Mamani; quienes con sus aportes y recomendaciones enriquecieron este trabajo, a la familia que nos recibió para realizar la recolección de material en Toriri, a mi esposo que me brindo todo su apoyo… a todos…

…..MUCHAS GRACIAS.

RESUMEN

En la presente investigación sobre el cultivo de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), se planteo la introducción de este a condiciones *in vitro* a partir de yemas laterales y apicales; previa selección del material adecuado, el proceso de desinfección y se logró establecer la mejor metodología para el proceso de introducción *in vitro* de yacón morfotipo morado.

Paralelamente se realizo la evaluación del efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de ácido indolacético y bencil aminopurina, en el desarrollo de vitro plantas teniendo como base la solución stok de Murashige y Skoog durante el experimento se evaluó características morfológicas propias del cultivo en toda su etapa de crecimiento, lo que nos permitió identificar un protocolo apropiado para la propagación de este cultivo.

La aplicación de BAP con AIA en una concentración de 0,5 mg/l para cada uno de estos; logra los mejores promedios para prendimiento con 88.28 %; 9.71 días para la formación de brotes; 5.27 brotes, un largo de hoja de 48.18 mm, 60.82 días en la formación de raíz; 7.94 raíces por planta y un largo promedio de 79.52 mm. Solo con el tratamiento de BAP 0.5 mg/l y AIA 1.0 mg/l logra el mayor valor en número de hojas.

ÍNDICE

Página

1. INTRODUCCION ……. 1
2. OBJETIVOS …… 3
2.1 Objetivo general …….. 3
2.2 Objetivo específicos …….. 3
3. REVISION BIBLIOGRAFICA …….. 4
3.1. Generalidades del cultivo de yacón …….. 4
3.1.1. Clasificación taxonómica de yacón …… 4
3.1.2. Descripción morfológica …….. 4
3.1.3. Requerimientos edafoclimáticos ……. 8
3.1.4. Propagación vegetativa ……... 9
3.1.5. Variación del Cultivo …….. 9
3.1.6. Enfermedades de yacón ……. 10
3.2. Composición nutricional del yacón …… 11
3.3. Biotecnología vegetal …….. 11
3.3.1. Cultivo *in Vitro* …… 12
3.3.3. Métodos de regeneración ……. 13
3.3.4. Organogénesis …… 14
3.4. Micropropagación ……. 14
3.5. Medios de Cultivo ……. 15
3.6. Cultivo *in vitro* del yacón …….. 16
3.7. Hormonas vegetales ……. 16
3.7.1. Efecto de reguladores de crecimiento en el desarrollo de vitro plantas 17
4. MATERIALES Y MÉTODOS …… 20
4.1. Ubicación del área de estudio …… 20
4.2. Materiales ……... 20
4.2.1. Material biológico …….. 20
4.2.2. Materiales e equipos del laboratorio …….. 20
4.2.3. Compuestos químicos y material vegetal ……. 21

4.3. Metodología …… 21
4.4. Diseño experimental ……. 24
4.4.1. Modelo lineal aditivo ……. 25
4.4.2. Variables de respuesta ……. 25
5. RESULTADOS Y DISCUCIONES …….. 27
5.1. Análisis de variables de respuesta …… 27
5.1.1. Promedio de prendimiento (PP) ……. 27
5.1.2. Días a la formación del brote (DFB) …….. 33
5.1.3. Número de brotes por explante (NBE) …….. 39
5.1.4. Número de hojas (NH) …… 44
5.1.5. Largo de hoja (LDH) …….. 51
5.1.6. Inicio de la formación de raíz (IFR) ……. 58
5.1.7. Número de raíces (NR) …….. 65
5.1.8. Largo de raíz (LR) …… 73
5.1.9. Porcentaje de contaminación ……. 80
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES ……. 85
6.1. Conclusiones …….. 85
6.2. Recomendaciones ……. 86
BIBLIOGRAFIA
ANEXOS

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Composición nutricional del yacón …… …..... 11

Cuadro 2. Factores y niveles del estudio …… 25

Cuadro 3. Variables de respuesta ……. 26

Cuadro 4. Resultados alcanzados con el análisis ANVA, para las variables de respuesta …… 28

Cuadro 5. Comparación de promedios variable promedio de prendimiento, para bencil aminopurina, según la prueba de Duncan al 5% …… 29

Cuadro 6. Comparación de promedios variable promedio de prendimiento, para ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5% …… 30

Cuadro 7. Comparación de promedios variable días a la formación del brote, para bencil aminopurina, según la prueba de Duncan al 5% ……... 34

Cuadro 8. Comparación de promedios variable días a la formación del brote, para ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5% …… 35

Cuadro 9. Comparación de promedios para número de brotes por explante, para bencil aminopurina, según la prueba de Duncan al 5% …… 40

Cuadro 10. Comparación de promedios variable número de brotes por explante ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5% .. 41

Cuadro 11. Comparación de promedios para número de hojas para bencil aminopurina, según la prueba de Duncan al 5% ……. 46

Cuadro 12. Comparación de promedios variable número de hojas para ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5% …… 47

Cuadro 13. Comparación de promedios para largo de hoja (mm), para bencil aminopurina, según la prueba de Duncan al 5% …….. 52

Cuadro 14. Comparación de promedios variable largo de hoja (mm), para ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5% …… 54

Cuadro 15. Comparación de promedios para inicio de la formación de raíz, para bencil aminopurina, según la prueba de Duncan al 5% ……. 59

Cuadro 16. Comparación de promedios variable inicio de la formación de raíz,

para ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5% …… 61
Cuadro 17. Comparación de promedios para el número de raíces (días), para bencil aminopurina, según la prueba de Duncan al 5% …… 66
Cuadro 18. Comparación de promedios variable número de raíces, para ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5% ……. 68
Cuadro 19. Comparación de promedios para longitud de raíz (días), para bencil aminopurina, según la prueba de Duncan al 5% …….. 74
Cuadro 20. Comparación de promedios variable longitud de raíz (mm), para ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5% …….. 75
Cuadro 21. Descripción de los hongos detectados e identificados durante el cultivo *in vitro* del yacón (*Smallanthus sonchifolius*) ……. 82
Cuadro 22. Desarrollo de las yemas de yacón en los diferentes tratamientos 90 días después de la siembra expresado en porcentajes ……. 84

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Flor del yacón (*S. sonchifolius)*, presente al momento de realizar la recolección en Toriri ……. 5

Figura 2. Detalle de los rizóforos en yacón (*S. sonchifolius)*, durante el proceso de recolección del material vegetal en la comunidad de Toriri ……. 5

Figura 3. Planta de yacón (*S. sonchifolius)*, en sus fases iníciales de crecimiento en el período de aclimatación Vivero Sol Limanipata … 7

Figura 4. Planta de yacón (*S. sonchifolius)*, de 5 meses durante la fase de aclimatación Vivero Sol Limanipata ……. 7

Figura 5. Comparación promedio de prendimiento, para la interacción Bencil aminopurina por Acido indolacético, según la prueba de Duncan al 5% …… 31

Figura 6. Comparación de promedios variable días a la formación del brote, para la interacción bencil aminopurina*ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5% …….. 37

Figura 7. Comparación de promedios variable número de brotes por explante, para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5% …….. 43

Figura 8. Comparación de promedios variable número de hojas, para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5% …….. 49

Figura 9. Comparación de promedios variable largo de hoja (mm), para la interacción bencil aminopurina*ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5% ……. 56

Figura 10. Comparación de promedios variable días a la formación de raíz, para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético según la prueba de Duncan al 5% …….. 63

Figura 11. Comparación de promedios variable número de raíces, para la interacción bencil aminopurina*ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5% …….. 70

Figura 12. Comparación de promedios variable longitud de raíz (mm), para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5% ……..... 77

Figura 13. Número de plantas que presentaron crecimiento anormal en el cultivo de yacón en condiciones *in vitro* …….. 81

ÍNDICE DE FIGURAS

ANEXO 1. Fotos del estudio

ANEXO 2. Vista de las diferentes partes del yacón

ANEXO 3. Estructuras moleculares de diversas auxinas y citoquininas empleadas para la preparación de medios de cultivo in vitro.

ANEXO 4. Concentración de sales minerales de la disolución nutritiva diseñada por Murashige-Skoog

1. INTRODUCCION

El yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), es una planta milenaria que fue utilizado por los antepasados como un alimento y fruta refrescante. El yacón es de gran importancia alimentaria, medicinal y económico en el vecino país Perú al industrializar este cultivo es altamente comercializable ya que su rendimiento alcanza de 95 Ton./hectarea; y el rendimiento de la raíz alcanza de 1.5–9.5Kg por planta, (Zagarra y Granado, 1999). En Bolivia este cultivo todavía es reducido su rendimiento solo alcanza 30Ton./hectarea, si bien el rendimiento de la raíz es algo similar 1.3-8.1Kg por planta PROIMPA, 2000 a un así en el mercado se encuentra en poca cantidad y es de carácter estacional solo se lo consumen en forma natural, sus propiedades terapéuticos son muy poco difundidos, así como su uso para forraje (Grau, 2001).

Esta especie se adapta mejor en regiones como valles pero también se adecua a zonas tropicales y altiplano. Se considera que es una especie difícil de propagar por vía sexual debido a su bajo poder germinativo, que puede corresponder a alto índice de esterilidad producto de una falta de sincronización en el desarrollo de los órganos reproductivos y por dificultades en la maduración de sus semillas debido a que existe el aborto prematuro de embriones y por el mal desarrollo del endospermo. (Flores, 2000b).

Flores (1998a), menciona que la propagación se lleva a cavo por vía asexual por medio de rizóforos o estacas de la planta; no obstante, este sistema de propagación clonal a demostrado ser lento y la tasa de multiplicación es relativamente baja, a la vez que ocasiona la diseminación de enfermedades y plagas a los nuevos cultivos.

El yacón, podría constituir una magnifica alternativa para los diabéticos y personas que siguen dietas para bajar de peso, por ser un alimento bajo en calorías además coadyuva a problemas digestivos, circulatorios y cáncer de colon. A un son escasos los trabajos realizados con esta especie probablemente por falta de información; aunque se percibe incursiones dirigidas a la generación de nuevas técnicas principalmente de cultivos *in vitro*.

De acuerdo con Rea, (2002), la propagación del yacón se puede dar por medio de semillas con bajos resultados (propagación sexuala), como por rizóforos (propagación vegetativa); en este sentido las técnicas de micropropagación se tornan posibles por la facilidad que permite intensificar la multiplicación de esta especies, viabilizando igualmente la posibilidad de acortar el ciclo vegetativo debido a la acción de reguladores vegetales empleados en los medios de cultivo.

La necesidad de rescatar especies en extinción o simplemente no tomados en cuenta, entonces esto implica entregar especies de excelente calidad, ello origina la necesidad de optimizar procesos de producción con tecnologías de alto nivel que permitan resolver problemas concretos de propagación y saneamientos de plantas

Por tanto se planteó la presente investigación para contribuir a la expansión y conservación de este cultivo (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a través de un método distinto al tradicional (siembra de rizoforos y esquejes), como es el cultivo de tejidos vegetales en condiciones *in vitro* y con un control riguroso de las características deseadas en este cultivo.

En el presente estudio se planteo la introducción de morfotipo morado de yacón a condiciones *in vitro* a partir de yemas laterales y apicales teniendo como base la solución stok de Murashige y Skoog, (1969), adicionando reguladores de crecimiento en concentraciones diferentes, que son estimulantes del proceso de desarrollo de las v*itro* plantas.

Durante el experimento se evaluó características morfológicas propias del cultivo en toda su etapa de crecimiento del explante, lo que nos permitió identificar un protocolo apropiado para la propagación de estos cultivares, basados en los siguientes objetivos:

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto del ácido indolacético y bencil aminopurina, en el desarrollo de vitro plantas a partir de yemas de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl).

2.2 Objetivo específicos

- Determinar el efecto de tres niveles de ácido indolacético y bencil aminopurina en el comportamiento morfológico y el desarrollo de yacón en condiciones de *in vitro*

- Obtener un protocolo de establecimiento en condiciones *in vitro* a partir de yemas de yacón.

- Evaluar el protocolo de establecimiento en condiciones *in vitro,* a partir de yacón morfotipo morado.

4. REVISION BIBLIOGRAFICA

3.1. Generalidades del cultivo de yacón

3.1.1. Clasificación taxonómica de yacón.

Según Rojas (2006), el yacón presenta la siguiente clasificación: Clase, *Magnoliopsida*, subclase: *Rosidae*, Orden: *Asterales*, Familia: *Asteraceae*, Genero: *Smallanthus sonchifolius*, Especie: *S. sonchifolius* y es conocido como yacón o aricoma.

3.1.2. Descripción morfológica

Según Valderrama y Manrique (2003), el yacón (*S. sonchifolius)*, es una hierba perenne de 1,5 a 2m de altura, presenta tallo cilíndrico a angular, surcado, hueco en la madurez y densamente pubescente en la parte superior, con un diámetro de hasta 2,5 cm en el segmento de la base, todo el tallo es exuberantemente pubescente. Son de color verde o pigmentado de púrpura; los tallos de la planta puede presentar ramas desde la base del tallo o sólo en la parte superior.

Taveira (2009), señala que las hojas son enteras y con peciolo, su borde es por lo general dentado; la lámina tiene forma triangular con la base hastada, truncada o acorazonada del mismo modo indica que presentan pilosidad en su superficie, cada tallo produce de 13 a 16 pares de hojas antes de la floración y, conforme la planta se acerca a la cosecha, las hojas reducen su número y tamaño. El mismo contiene compuestos con propiedades benéficas a la salud humana. Dostert, *et al.* (2009), indica que las hojas son un órgano laminar simple palmatinerva cordiforme de color verde con abundante pubecencia en el haz y en el envés con pilosidad de 1 a 1,5mm, el borde de la lamina es acerrado; las mismas llegan a tener una longitud de 22cm y un ancho de 15cm, por su suavidad, amplitud de las hojas son muy suceptiples a heladas y granizadas.

Figura 1. Flor del yacón (*S. sonchifolius)*, presente al momento de realizar la recolección en Toriri.

Figura 2. Detalle de los rizóforos en yacón (*S. sonchifolius)*, durante el proceso de recolección del material vegetal en la comunidad de Toriri

Vietmeyer (1994), menciona que las raíces reservantes se forma a partir de un sistema ramificado de ejes subterráneos; son mayormente napiformes, pueden alcanzar hasta 25 cm de largo y 10 cm de grosor y pesan entre 0,2 - 2 kg, el color de la corteza de las raíces y del tejido de almacenaje varía, dependiendo de la variedad, entre blanco, crema, rosado (estriado), lila, y hasta marrón.

La raíz del yacón se extiende de 80cm alrededor de la planta y a 60cm de profundidad, con inserción directa a la cepa madre la cual produce hasta 23 raíces tuberosas; la abundancia y el tamaño de las raíces dependen del tipo de suelo y la resistencia de la planta a factores climáticos. (FAO, 2008a).

Según Ciza (1999), indica que las flores del yacón presenta una inflorescencia que se llama capítulo, el cual está compuesto por dos tipos de flores: Las femeninas o liguladas que se ubican alrededor del capítulo, son de color amarillo intenso o anaranjado pálido y están en número de 12 a 16 y las masculinas o tubulares que están muy juntas, en mayor número y ocupan el centro del capítulo. Cada flor masculina está formada por un manojo de estambres. Producen semillas (tipo aquenio) en poca cantidad y con bajo poder germinativo (15 – 25 %).

Por su parte Valderrama y Manrique (2003), aseveran que las inflorescencias son terminales que fluctúa de 1-5 ejes cada uno con tres capítulos y pedúnculos densamente pubescentes, las brácteas involucrales son uniseriadas y aovadas, mide 15 mm de largo y 10 mm de ancho; con cerca de 15 flores liguladas, las flores liguladas son femeninas de 2 -3 dentadas, que mide aproximadamente 12 mm de largo y 7 mm de ancho, las flores tubulares son masculinas, con cerca de 7 mm de largo.

En condiciones favorables de cultivo, la floración comienza después de 6 - 7 meses y alcanza su punto máximo después de 8 - 9 meses. Se asume que el yacón presenta polinización cruzada, el indicador de ello es la morfología del polen, el desarrollo temprano de las flores femeninas (protoginia), y la producción de néctar, sobre todo en las flores tubulares (Valderrama y Manrique, 2003).

Figura 3. Planta de yacón (*S. sonchifolius)*, en sus fases iníciales de crecimiento en el período de aclimatación Vivero Sol Limanipata

Figura 4. Planta de yacón (*S. sonchifolius)*, de 5 meses durante la fase de aclimatación Vivero Sol Limanipata.

Por su parte Rea (2002), indica que el fruto es una cipsela, de 3,7 mm de largo y 2,2 mm de grosor en promedio; tienen forma elipsoidal, color café oscuro, con epidermis lisa, endocarpio sólido caracterizado por el libre desprendimiento del pericarpio con un ligero frotamiento; algunos ecotipos no producen frutos y si los producen no son viables. El mismo autor señala que el porcentaje de germinación es bastante baja de 1-30% de 100 semillas en la mayoría de los casos, la esterilidad del polen puede ser uno de los posibles factores, aunque los estudios disponibles hasta ahora son contradictorios.

Por su parte Dostert, *et al.* (2009), señala que un desequilibrio en el metabolismo de la planta puede ser asumido como un factor adicional ya que la planta debe suministrar recursos energéticos a muchas flores y, al mismo tiempo para el desarrollo de las raíces de almacenaje. Evidencia de ello es el mayor número de semillas formadas en las flores que se desarrollan primero; además las tasas de germinación de las semillas maduras son muy bajas, alcanzando 0–22 %. Nina, (1999), indican que una de las posibles razones para esto podría deberse a la latencia física de las semillas debido a la dureza de la testa, la que es conocida para una de las especies silvestres de *Smallanthus*.

3.1.3. Requerimientos edafoclimáticos

Vietmeyer (1994), señala que el crecimiento óptimo se produce con temperaturas entre 18 y 25°C, las hojas toleran temperaturas de hasta 40°C sin daño evidente; temperaturas nocturnas de 10-5°C ocasiona daños serios en la estructura de la planta. Valentová y Ulrichová. (2003), menciona que el yacón es una planta cultivada, hacia el comienzo del período de lluvias entre septiembre y octubre, la preparación del terreno depende de las condiciones locales, la plantación de esquejes o rizoforos, se realiza en hileras con una distancia de 60cm a 100cm entre plantas y 80cm a 100cm entre hileras, con una densidad de 24.000 plantas/ha. Graefe, *et al* (2004), menciona que el yacón es considerado neutral al fotoperíodo, al menos en lo que respecta al desarrollo del tallo y de la raíz recervante, ya que dichos procesos comienzan más tarde a mayores latitudes.

Valderrama y Manrique (2003), señala que el control de malezas se aplica con mas frecuencia cuando el cultivo es pequeño subsecuentemente suprime las malezas, se logra

rendimientos más altos mediante fertilización con 140 kg N/ha y 100 kg K/ha. El yacón se desarrolla en distintos tipos de suelo, los más apropiados son suelos livianos, profundos, con buen drenaje y ricos en nutrientes que favorece el desarrollo uniforme de las raíces o tubérculos, los suelos pesados no son aptos para este cultivo, el pH del suelo debe ser neutro a levemente ácido (Graefe *et al* 2004).

3.1.4. Propagación vegetativa

Pérez (1998), expresa que la propagación vegetativa se realiza usualmente por rizoforos o esquejes enraizados: el propagulo (porciones caulinares subterráneas), deben ser dividido en fragmentos que tenga entre 3 a 5 brotes; de esta manera es posible obtener 15 a 35 esquejes en una planta de un año, la plantación de propágulos que presenten mayo tamaño, el rendimiento por planta es incrementado a más del doble. Al respecto Muñoz (2006), menciona que la raíz recervante no puede ser propagada, en cambio el rizóforo, puede ser mantenido bajo tierra de 25 a 40 días posterior a la cosecha, a continuación los vástagos o rebrotes pueden ser cuidadosamente separados y plantados.

Por su parte Pisano y Castillo (2002), indican que para la propagación mediante esquejes (con al menos dos brotes) se debe emplear plantas antes de la floración, es decir con 5 a 6 meses de edad. Torres y Caldas (1998), señalan que la propagación mediante brotes individuales y puestos en sustrato enraizante bajo condiciones estériles, después de 60 días ya esta enraizado entre 43 y 97%. De un kilo de cepa, se obtienen aproximadamente 20 propágulos, se tiene que dejadas bajo la sombra por 1 a 3 días para favorecer la cicatrización de la herida, la misma herida puede ser tratada con benlate o cenizas que pueden favorecer la protección de los patógenos (Valderrama y Manrique, 2003).

3.1.5. Variación del Cultivo

Debido a que existe poca variación en la parte aérea de las plantas, los cultivos de yacón se diferencian por el color de la cáscara y la pulpa de la raíz, la pulpa puede ser de color cremoso, anaranjado, rojizo, morado o con jaspeados morados, pero más comunes son

los cultivos de pulpa anaranjada y cremosa. No se conoce el número de especies pero se estima que podrían ser entre 20 y 30 (Rea, 2002).

3.1.6. Enfermedades de yacón

Ames de Icochea (1997), señala que dentro de las enfermedades que atacan al cultivo de yacón se tiene al tizón marginal (*Alternaria sp*.), enfermedad observada en material de germoplasma, su presencia e intensidad están influenciadas por la alta humedad del aire o por lluvias frecuentes.

Así mismo; señala que las hojas de todas las edades son afectadas, pero especialmente el tercio medio e inferior de plantas jóvenes, la necrosis empieza por el borde y partes apicales dela hoja, la misma que se va extendiendo hacia la parte del limbo, esta necrosis se seca rápidamente, se vuelve frágil y se desprende poco a poco, antes de desprenderse toma un color marrón oscuro. Del mismo modo indica que esta enfermedad se puede controlar con aplicaciones preventivas de fungicidas en base a ditiocarbamatos, durante la época lluviosa, que es cuando se presenta una mayor incidencia (Ames de Icochea, 1997).

Manrique (2004), señala que entre otros patógenos que afectan al cultivo de yacon se tiene al bipolariosis (*Bipolaris* sp.), que se caracteriza porque este especie produce un tipo de mancha necrótica en las hojas, de poca frecuencia anual: está limitada a condiciones de alta humedad (75-82 %) y temperatura media-alta (22-26 °C). La enfermedad se detecta mediante cultivo en medio Papa-dextrosa-agar (PDA), el cual se desarrolla después de 10-13 días de incubación, un micelio oscuro que forma conidias típicas de *Bipolaris.* (Manrique, 2004).

La marchitez vascular (*Fusarium* sp.), ataca a las raíces reservantes las partes afectadas muestran necrosis externa de color marrón, que alcanza los tejidos internos; el proceso es irreversible y progresivo, el mismo causa pérdidas en la cosecha (Valderrama y Manrique, 2003).

3.7. Composición nutricional del yacón

Cambara (1998), señala que a diferencia de otras raíces reservantes comestibles, el 85 al 90% del peso fresco de este tubérculo es agua. Los carbohidratos representan el 90% del peso seco de las raíces recién cosechadas, de los cuales ente el 50 al 70% son Fructoligosacáridos (FOS), el resto de los carbohidratos lo conforman la sacarosa, Fructuosa y glucosa así mismo cconsidera que las hojas también poseen un gran valor medicinal para las personas diabéticas y como forraje.

Cuadro 1. Composición nutricional del yacón (100 g de raíz fresca sin cáscara)

Fuente, (BOHM, 2000)

Compuesto	**Rango**
Agua	85-90%
Oligo fructuosa (FOS)	6 - 12gr
Azucares simples	15- 4 gr
proteínas	0,1 - 0,5gr
potasio	185 -295mg
calcio	6 - 13mg
calorías	14 - 22 Kcal

Según Fernández, (2005), menciona que las propiedades beneficios para la salud se deben a la baja digestibilidad de FOS que permite ser consumida por diabéticos porque no elevan el nivel de glucosa en la sangre y su consumo está asociado a otras propiedades, reduce el colesterol y los triglicéridos, mejora la absorción de Calcio, fortalece el sistema inmunológico, Previene y reduce el riesgo de cáncer al colon previniendo el estreñimiento, restaura la flora intestinal.

3.8. Biotecnología vegetal

Marza (2009), sostiene que la biotecnología vegetal tiene una tremenda importancia para el desarrollo tecnológico del país, especialmente en la investigación de nuevos productos a partir de las especies con potencial y de los recursos genéticos, es una técnica empleada sobre vegetales como ser los organismos vivos o sobre alguna de sus partes (células, tallos, orgánulos, meristemos, hojas) para la obtención de un producto nuevo o

genotipos, que abarca desde la micropropagación hasta el cultivo de células y protoplastos.

Por su parte Brack, (2008), indica que la biotecnología vegetal está incursionando agresivamente en los campos de la agricultura, la ganadería, la salud y el saneamiento ambiental, con tendencias muy definidas, el cultivo de tejidos vegetales y la biotecnología moderna, normalmente se utilizan en cultivos de tejidos, seguido de la regeneración de plantas completas.

La biotecnología vegetal a diferencia de las técnicas tradicionales de cultivo, permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo; así como el manejo de las mismas en espacios reducidos, esta técnica es de gran utilidad en la obtención de plantas libres de patógenos (Roca y Mrogins, 1999).

3.8.1. Cultivo *in Vitro*

La propagación de plantas *in vitro* es una técnica utilizada en cultivos de importancia económica. Permite cultivar células, tejidos, órganos, semillas, embriones y obtener individuos selectos en forma rápida. Una vez ajustados los protocolos para la especie o cultivo de interés, es posible automatizar el proceso de modo de llevarlo a mayor escala de producción (Norma Cubana de experimentación, 2001). El cultivo *in vitro* es un método de propagación de plantas a aplicación profesional, en condiciones estériles y con instalaciones especiales, a demás ofrece nuevas alternativas para el mejoramiento de la producción del material genético que reúnen las condiciones deseadas y que cumpla con las exigencias del productor, principalmente para especies que requieren renovaciones anuales o bianuales.(Marza, 2009).

Severn y Ellis (1998), señalan que no existen dudas que en todo intento de propagación vegetal, ya sea *in vitro* o *in vivo*, el carácter del proceso de diferenciación depende del genoma de la especie, y que está regulado por el balance hormonal propio y por el estado fisiológico del órgano, tejido o célula puesta en cultivo. Los explantes más usados para los procesos de la propagación in vitro son las yemas vegetativas de las plantas. Los frascos

que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23°C, además de controlar la cantidad de horas luz (Castillo, 2004).

El cultivo de tejidos vegetativos o cultivo *in vitro* del mismo, es una técnica de reproducción en condiciones totalmente asépticas, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido es posible regenerar en poco tiempo miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre, esto se logra mediante la aplicación a un tejido vegetal de estímulos físicos y químicos controlados en un medio de cultivo (Pierik, 2001a).

Las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos, basadas en la organogénesis directa como método de propagación, surgen como una posible alternativa a los problemas de calidad fitosanitaria, ya que permite la eliminación de patógenos y rejuvenecer el material vegetal, haciéndolo más rendidor en campo. Esta capacidad se denomina *totipotencialidad celular,* y es característico del grupo de celulas vegetales conocidas como células meristemáticas, presentes en distintos órganos de la planta De la Cruz (2007).

3.3.3. Métodos de regeneración

FAO (1994b), este sistema es utilizado para obtener clones libres de agentes patógenos, consiste en cortar el meristemo apical y las dos primeras insinuaciones de hojas, de los brotes y ubicarlos en un medio estéril de tal forma que le permita formar raíces. El meristemo no es capaz de formar raíces, a menos que exista una o dos formaciones inferiores que luego serian las hojas, para extirpar el meristemo deben quitarse las hojas que lo cubren.

Del mismo modo (Gómez, 2007), indica que en las yemas apicales se encuentran un grupo de células que conforman el meristemo apical, es un tejido embrionario que tiene la capacidad de formar todos los tejidos de la planta y regenerar plantas completas. El cultivo de meristemo tiene numerosas aplicaciones; una de las más importantes, es la obtención de plantas libres de virus, ya que esta pequeña zona de tejido generalmente no está afectada por estos patógenos vegetales.

3.3.4. Organogénesis

Barthelemy y Dawso (1997), indican que es una ruta que conduce a la diferenciación de meristemos que originarán tallos o raíces adventicias, respectivamente. Es un proceso rápido, muy útil para plantas de mucho valor (sólo obtener tantas plantas como yemas); esta yema es un medio adecuado para obtener plantas libres de patógenos.

Por su parte Castillo, *et al* (2000), menciona que también podemos promover la formación de tallos adventicios (tallos que no había). Esto se hace cogiendo un explanto que se somete a una condición adecuada, inicialmente a partir de un callo (masa de células indiferenciadas) en los bordes o lesiones del explanto, tras un tiempo se formarán internamente. El ejemplo importante que ha servido de pauta para muchas investigaciones son los trabajos desarrollados para obtener la organogénesis o sea la producción de brotes y raíces, utilizando el tabaco como modelo biológico. (Perdomo. *et al*. 1989).

3.9. Micropropagación

Saralequi, R. 2006, menciona que la micropropagación (propagación clonal por cultivo *in vitro*) constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura, ya que se usa en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, así mismola (Bohm. 2000.) señala que la micropropagación mediante segmentos nodales (Multiplicación meristemética de clones) es un instrumento para la multiplicación de nuevos clones obtenidos con nuevas y valiosas cualidades, y para mantener la estabilidad de las mismas.

Según Gómez (2007), señalan que las fases de multiplicación resultan de la suspensión del meristemo terminales para la estimulación de yemas axilares a sí que crezcan y se alarguen. La división respectiva y la transferencia de propágulos a un nuevo medio de cultivo conducen a un considerado incremento, pero la cantidad está limitada por el número de yemas axilares presentes en el explante.

3.10. Medios de Cultivo

Pospisilova *et al*., (1999), infieren que el medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y del agua, usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina Medio Basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento, los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta.

Así mismo Seelve *et al*. (2003), menciona que sin agua, nutrientes y minerales una planta no puede vivir ni in vivo ni in Vitro. También se debe añadir sacarosa al medio de cultivo, ya que las plantas no son completamente autotrófas cuando se desarrollan en estas condiciones. Por su parte Araya (2006), indica que los requerimientos nutritivos para un crecimiento *in vitro* óptimo varían con la especie, e incluso son específicos de acuerdo a la parte de la planta que se esté cultivando y a la respuesta que se desea obtener.

Castillo (2004), expone que las cantidades a ocupar de macro, micronutrientes, hierro y vitaminas son bastante pequeñas, sería bastante lento e impreciso tener que pesarlas cada vez que se prepara un medio; por tanto es una práctica habitual en todos los laboratorios preparar soluciones stock concentradas de los distintos componentes, agrupados de forma que no se produzcan fenómenos de precipitación. De esta manera, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar.

Abdelnour y Escalant (1999), sugiere que una vez elaborado el medio de cultivo se tiene que ajustar el pH a valores prefijados mediante la adición de NaOH y/o HCl 0.1-1 N. Dependiendo de que se vaya a preparar un medio sólido o líquido, se añadirá en el primer caso el agente solidificante (agar), se fundirá por calentamiento breve para, finalmente, ser dosificado en los contenedores adecuados. En el caso de tratarse de un medio líquido se procederá a dosificar directamente en los contenedores escogidos.

Chang (2000), manifiesta que conviene tener en cuenta que algunos de los componentes del medio de cultivo pueden ser termolábiles (algunas vitaminas, algunos reguladores). En

este caso, la esterilización de la solución que contienen substancia termolábil debe hacerse por filtración y añadir una vez esterilizada el medio de cultivo previamente esterilizado y parcialmente enfriado (en medios sólidos) o totalmente (en medios líquidos).

3.11. Cultivo *in vitro* del yacón

La tecnología de la micropropagación *in vitro* del yacón es valiosa para la propagación de genotipos de interés, teniendo en vista que los protocolos utilizados permiten una alta frecuencia de multiplicación de plantas; la "limpieza" del material es fundamental para obtener buenos resultados, volviendo esa técnica viable para la producción de plantas de alta calidad (Graefe, *et al*, 2004).

Según Soria, *et al* (2000), afirman que el en laboratorio bajo condiciones controladas, el mejor enraizamiento de yacón se produce mediante tratamiento con auxinas con periodos de 30 a 35 días; así mismo señala que en el campo, en ensayos con almácigos plantados en sustratos preparados con arena de río lavada y desinfectada con formalina (10%), y que se mantienen en condiciones húmedas al menos hasta que aparezcan los primeros brotes; enraízan después de 45 días.

Castillo *et al* (2000), señalan que la propagación *in vitro* es posible y comercialmente interesante en el cultivo de yacón, si bien en la actualidad los protocolos que se han desarrollados para ello están destinados principalmente a la producción de ejemplares vegetales libres de virus y enfermedades; teniendo en perspectiva el lograr encontrar cultivares que presenten mayores rendimientos.

3.7. Hormonas vegetales

Saavedra (2008), indica que las fitohormonas o también llamadas hormonas vegetales son sustancias químicas producidas por ciertas células vegetales en sitios estratégicos de la planta; diferentes hormonas vegetales son capaces de regular de manera predominante los fenómenos fisiológicos de las plantas, así mismo menciona que los hombres de la ciencia han logrado producir sistemáticamente hormonas o reguladores químico, con los

cuales han logrado aumentar o disminuir el crecimiento de las plantas, las cuales realizan fotosíntesis.

Por su parte Zhao (2008), menciona que las características compartidas de este grupo de reguladores del desarrollo consisten en que son sintetizados por la planta, se encuentran en muy bajas concentraciones en el interior de los tejidos, y pueden actuar en el lugar que fueron sintetizados o en otros lugares. Una fitohormona interviene en varios procesos, que constituyen fenómenos de antagonismo y balance hormonal que llevan a una regulación precisa de las funciones vegetales, lo que permite solucionar el problema de la ausencia de sistema nervioso Altuna y Acosta (2000)

Las hormonas vegetales controlan un gran número de sucesos, entre ellos el crecimiento de las plantas, la caída de las hojas, la floración, la formación del fruto y la germinación, las fitohormonas ejercen sus efectos mediante elementos moleculares, que desembocan en cambios de la expresión génica, en intercambios del citoesqueleto, la regulación de las vías metabólicas y cambios de flujos iónicos (Bidwell, 1993).

El desarrollo de las plantas, tanto en el aspecto del crecimiento como en la diferenciación se encuentran controlados por la acción de sustancias reguladoras del crecimiento, las cuales juegan un papel muy importante en el cultivo *in vitro*, se puede decir que el mismo es prácticamente imposible sin dichos reguladores (Zhao, 2008).

Azcon y Tallo (1993)**,** sugiere que la planta a nivel de sus tejidos produce sustancias que disminuyen o inhiben el crecimiento vegetal; estas sustancias controlan la germinación de las semillas y la evolución de las plantas, además regulan procesos de correlación es decir que toma el estímulo de un órgano, lo que amplifica, traduce y genera una respuesta en otra parte de la planta, interactuando entre ellos por distintos mecanismos.

3.7.1. Efecto de reguladores de crecimiento en el desarrollo de vitro plantas

Srivastava, (2002), indica que el efecto de las auxinas son un grupo de fitohormonas que funciona como regulador de crecimiento vegetal, básicamente provoca la elongación de

las células son sintetizados en las regiones meristemáticas del ápice. En relación a la síntesis de auxinas señala que se ha identificado en diversos organismos como plantas superiores, hongos, bacterias y algas, casi siempre están relacionadas con etapas de intenso crecimiento: la giberelina y las citocininas, junto a las auxinas regulan múltiples procesos fisiológicos en las plantas.

Saavedra (2008), mencioa que los reguladores de crecimiento, en particular las auxinas y la citocina, tienen funciones y resultados definitivos en el éxito de la micropropagación, asimismo las auxina naturales más importante son el ácido indolacético (AIA) aunque existen otros compuestos denominados auxinas sintéticos que producen efectos similares, algunas auxinas como el propio AIA son sintetizados por microorganismos como el *Azospirillum, Azotobacter, Pseudomonas, Rhyzobium.*

Por su parte Zagarra y Granado, (1999), indica que el principal uso de la auxina ha sido en la multiplicación asexual de plantas, sea por estacas, esquejes y otros, el AIB (Acido Indol Butirico) es la auxina más utilizada para estos efectos por su estabilidad y poca movilidad; la otra utilizada es el Ácido Naftalenacético, aunque es más móvil y por tanto menos consistente, en la micropropagación por cultivos de tejidos, las auxinas ANA, AIA y 2,4-D se utilizan para inducir la formación de raíces en los callos no diferenciados, así como para estimular la división de células.

Srivastava, (2002), señala que el Ácido indolacético actúa a nivel de los ápices en el tejido meristemático, el cual es indiferenciado, así mismo indica las auxinas también promueven la formación de raíces adventicias en hojas, tallos y la dominancia apical, y favorecen la floración e inducen la diferenciación vascular (Perrot-Rechenmann y Napier, 2005).

Orellana (1998), indica que la cantidad de citocinina endógena en los meristemos y ápices es baja, debido que el principal sitio de síntesis es en las raíces, por tanto en estos casos la adición exógena de citoquinina en los medios de cultivo es una práctica generalizada. La citoquinina más efectiva y empleada para la inducción de yemas axilares fue bencil aminopurina (6-BAP) con una frecuencia de 75% de los casos, seguida por la kinetina con 20% y zeatina con 3%.

La suplementación con citocininas (CK) permite a las plantas superar esta dificultades referentes a procesos oxidativos, ya que favorece a todos los procesos asociados al crecimiento y desarrollo, disminuyendo la pérdida de pigmentos fotosintéticos y proteínas, modificando positivamente las actividades de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo y como consecuencia se retrasa la senescencia (Divo de Sesar, 2005).

Las citocininas favorecen la diferenciación de cloroplastos, como consecuencia de ello, se observa un aumento en la concentración de clorofilas y la fotosíntesis por lo tanto se obtendría un balance positivo de carbono que permite un mayor crecimiento de hojas y brotes. Castillo (2004), así mismo señala que en diferentes ensayos realizados con raíces de diferentes cultivos y otros concentraciones de citoquininas BAP (Bencil Aminopurina) no lograron el crecimiento "*in vitro*" de ápices caulinares, evidenciándose solamente la formación de raíces.

Por su parte Altuna y Acosta (2005), mencionan que esto se pudo deber a la proporción de la auxina si bien las citocininas promueven la división celular también las auxinas que ejercen una cierta actividad sobre la división y diferenciación celular.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del área de estudio

El presente trabajo de investigación se llevo adelante en el Laboratorios de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía dependiente de la Universidad Mayor de San Andrés de La Paz.

4.2. Materiales

4.2.1. Material biológico

Para el desarrollo del presente estudio se utilizaron rizoforosde yacon, recolectadas de la comunidad Toriri; ubicada a los 16º 47´ 5´´ de latitud sur, a 60º 7´75´´ de longitud oeste, a una altura promedio de 2.550 msnm, la comunidad pertenece al cantón Licoma, al municipio de Villa Libertad Licoma, provincia Inquisivi del departamento de La Paz.

La selección se realizó tomando en cuenta las características propias del cultivo, plantas que no presentaron enfermedades o plagas. Una vez elegida las plantas madres y antes de extraer los rizoforos se realizó el lavado con agua para eliminar fragmentos de suelo y la desinfección se hizo con etanol al 70% para eliminar los contaminantes externos, como ser los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente, posteriormente fueron guardados en el conservador de plastoformo. A continuación se realizó el traslado a la ciudad de La Paz para su respectiva ambientación en campo, después de 5 meses se traslado los esquejes al laboratorio donde fueron cultivados en el medio y se aplicaron los tratamientos propuestos.

4.2.2. Materiales e equipos del laboratorio

El material y equipos que se usaron en el laboratorio fueron: probeta, erlenmeyer, vasos de precipitados, pipetas, pizetas, varillas, envases de vidrio para guardar la solución, cajas petri, magentas, contenedores de vidrio, estuche botánico, papel aluminio, plastiflix,

mechero y aspersor. Autoclave, balanza analítica, pHmetro, Cámara de flujo laminar Microondas, Refrigerador y Camara fotográfica.

4.2.3. Compuestos químicos y material vegetal

Hipoclorito de sodio al 3%, etanol al 7%, base de Murashige y Skoog (1962), fitohormonas BAP 0,5; 1; y 2 mg (Bencil Aminopurina y Acido Indol Acetico) AIA 0,5; 1; y 2 mg. Algodón y meristemos del Ecotipo Morado de yacón.

4.3. Metodología

Durante el trabajo de investigación se usó como base, la metodología empleada por Murashige y Skoog (1962), que fue adecuada a las condiciones requeridas, a esta se añadió las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, planteados durante el desarrollo de la investigación, con el fin de cumplir con los objetivos del trabajo este se dividió en tres fases las cuales se describen a continuación.

a. Primera fase: preparación del terreno y obtención de las plantas madres

Para aclimatar los brotes se preparo el terreno de 12 m^2**.** Como el yacón se desarrolla bien en distintos tipos de suelo, para la presente investigación se preparo un sustrato franco arenoso ya que el propósito fue obtener plantines de 20 a 30 cm; este suelo permitió el desarrollo uniforme de las plantas, a si se obtuvo las plantas madres que se utilizo para la introducción *in vitro.*

b. Segunda fase: lavado de materiales y Preparación del Medio de Cultivo

Se realizo la limpieza, esterilización de todos ambientes con hipoclorito de sodio al 80% y los mesones con etanol 90 %; esta operación se hizo cada vez que se usó los ambientes y equipos. El desinfectado de la cámara de flujo laminar se hizo solo con etanol al 90% para evitar la formación de escamas (capa blanquecina que se forma en el vidrio, al aplicar detergente o hipoclorito).

El lavado de los cristales como ser: probetas, vasos de precipitados, erlenmeyers, los frascos, cajas preterí, gotero, varilla, las espátulas y los recipientes de cristal: se realizo el lavado con detergente, se enjuago de cuatro aguas el ultimo enjuague se realizo con agua destilada, luego se volteo sobre el mesón desinfectado (no se debe secar con ningún tipo de paño ya que esto deja pelusas y esto puede ocasionar la contaminación del medio de cultivo). Para ejecutar la preparación del medio de cultivo se tuvo que hacer los cálculos y las respectivas conversiones. La base de Murashige y Skoog (1962), viene preparado con todos sus requerimientos para el cultivo *in Vitro* de esto se utilizo 4 gr/lt, sacarosa 3 % (p/v), agar 0,55 % (p/v) Bencil aminopurina y Ácido Indol Acético.

Para evitar los contaminantes naturales del ambiente: se utilizo guardapolvo, gorro quirúrgico, barbijo y guantes; entonces se procedió a pesar los reactivos, para esto se taro la balanza analítica a cero con los recipientes donde se peso la solución y los reactivos, de MS 6.16gr/ del preparado comercial, 46.2 gr de sacarosa, 8.47gr de agar, de BAP 0.5. 1 y 2mg/tl y de AIA 0.5. 1y 2 mg/tl.

Para el preparado del medio de cultivo se siguió los siguientes pasos: en un vaso de precipitado de 500ml se disolvió el MS con agua destilada, agitándolo con la varilla luego se vació en la probeta aforándolo con H_2Od hasta 1000 ml; enseguida se dividió en dos recipientes de 500 ml en erlenmeyer. En seguida se colocó la sacarosa ambas soluciones, se procedió a agitar hasta homogeneizar la mezcla seguidamente se ajusto el pH a 5.6 a 5.7**.** En seis vasos precipitados se diluyo por separado cada concentración de (BAP y AIA) las hormonas aforando a 1000ml con agua destilada cada una de ellas.

Por otro lado se dividió la solución MS homogenizada con sacarosa en los nueve tratamientos y el testigo que se hiso en 10 vasos precipitados: de las seis soluciones a cada tratamiento se aplico 10ml de BAP (FA) citocininas y 10ml de AIA (FB) auxinas. Se distribuyo las distintas concentraciones (a1b1= 0.5/0.5; a1b2= 0.5/1; a1b3= 0.5/2, etc.) luego se combino hasta lograr homogenizar el medio de cultivo. Por último se puso el agar a cada uno de los tratamientos y se llevo al microondas por 3minutos aproximadamente hasta que se disolvió el agar (el agar se coloca cuando ya se nivelo el pH, solo con la

sacarosa), en seguida se distribuyó el medio de cultivo en los vasitos e inmediatamente se sello con el papel aluminio, se procedió de la misma manera con todos los tratamientos.

Para la esterilización de los medios de cultivo se coloco los vasitos dentro del autoclave, así mismo; se ubico las cajas petri envueltos en papel sabana cada par y otros materiales como los algodones en un frasco sellado con papel aluminio (se los tiene que hacer bollitos para cuando se use en la cámara de flujo laminar no despida pelusas lo cual ocasiona contaminación), el agua destilada (para enjuagar los explantes), las pinzas y los mangos de bisturí luego se aseguró muy bien el autoclave. El proceso de esterilización se hizo a 15 libras de presión y a 20 grados centígrados de temperatura por un periodo aproximado de 25 a 30 minutos; luego se apago, cuando la presión y la temperatura descendió totalmente, se llevo el autoclave a la cámara de flojo laminar para abrirlo y obtener el material desinfectado.

c. Tercera fase: recolección, desinfección e introducción a condiciones in vitro y evaluación.

Se recolectó los mejores esquejes de yacón (libres de patógenos); en horas de la mañana se cortaron los esquejes de 15cm de longitud aproximadamente que fueron transportados al laboratorio en un conservador. En el laboratorio se coloco bajo el chorro de agua para evitar el estrés del esqueje, con la ayuda de una tijera, se cortaron las hojas, dejando el esqueje libre de estas, pero con parte de la nervadura que envuelve a la yema; en un cedazo se dejo los esquejes sin hojas a chorro continuo por espacio de 5 minutos; después se preparo una solución de etanol al 70 % (364.58 ml de etanol a forra a 500 ml con agua destilada) paralelamente se preparo hipoclorito de sodio al 3 % (15,68 ml de hipoclorito taré a 500 ml con agua destilada).

Se expuso a los rayos ultravioleta el MC medio de cultivo, las soluciones de etanol, lavandina, los bisturís, pinzas, el algodón, el agua destilada, las cajas petri, los frascos para enjuagar, plastiflix, marcador indeleble, guardapolvo, guantes, barbijo, gorra y los mecheros por espacio de 30minutos, después se procedió a apagar el UV y dejo reposar por unos 15 minutos; recién se introdujo el material vegetal a la cámara flujo laminar y se

procedió de la siguiente manera: Se sumergió en etanol por espacio de 10 segundos los explantes, luego se hizo un enjuague en agua destilada. A continuación se introdujo al hipoclorito de sodio por espacio de 20 minutos y se hicieron tres lavados con agua destilada.

Para la siembra inicial se procedió a limpiar el tablero (de la cámara flujo laminar) este procedimiento se realizó cada vez que se uso, empleando alcohol antiséptico y algodón estéril; paralelamente se realizo el encendido del mechero de alcohol, se flamearon los instrumentos (tapa de cajas petri, el bisturí, y las pinzas). Con la ayuda de una pinza se procedió a sujetar el esqueje para realizar el corte del tallito en la caja petri con el bisturí; una vez cortado el explante de 5 a 10 mm aproximadamente, se destapo el medio de cultivo e inmediatamente se realizo la introducción del explante.

Una vez realizada la siembra se flameo rápidamente y en seguida se sello con el plastiflix, luego se llevo a la sala de crecimiento (área estéril y ambiente controlado). La evaluación se hizo con respecto a las variables de respuestas, se utilizo muestreo destructivo para algunas variables (largo de hojas, numero de hojas, numero de raíces y longitud de raíces) al no existir la planta para sus posteriores mediciones se tomo en cuenta a la siguiente muestra hasta obtener todos los datos deseados. Unas ves concluidas la recolección de datos y al considerarse que no existían nuevos eventos entonces se procedió a realizar el análisis de los datos obtenidos.

4.5. Diseño experimental

El diseño experimental empleado en el presente estudio fue el de muestreo completamente al azar con arreglo bifactorial; el primer factor fue la hormona bencil aminopurina (BAP) y un segundo factor la hormona ácido indolacético (AIA), ambos distribuidos en tres concentraciones, para realizar comparaciones se empleo un grupo control formado por 100 unidades experimentales a los cuales no se aplico ningún tipo de hormonas; la aplicación de las tres concentraciones y sus combinaciones constituyeron nueve tratamientos que estuvieron formados por diez tubos, empleándose diez

repeticiones, totalizando 900 unidades experimentales, los niveles empleados se muestran a continuación.

Cuadro 2. Factores y niveles del estudio

Factor A (BAP)	Factor B (AIA)
a_1 = 0.5 mg/l	b_1 = 0.5 mg/l
a_2 = 1.0 mg/l	b_2 = 1.0 mg/l
a_3 = 2.0 mg/l	b_3 = 2.0 mg/l

Testigo

4.5.1. Modelo lineal aditivo

Según Rodríguez, 2000, menciona que el modelo lineal aditivo corresponde a diseño completamente al azar con arreglo bifactorial, y el modelo es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha i + \beta j + (\beta\alpha)ij + \varepsilon\varepsilon ijk$$

Donde:

Y_{ijk} : es una observación cualquiera

μ : es la media general

αi : Efecto del i - ésimo nivel del factor bencil aminopurina

βj : Efecto del j - ésimo nivel del factor acido indolacetico

(βα)ij: Efecto de la interacción bencil aminopurina y ácido indolacetico

Eεijk: Efecto aleatorio del error experimental

4.5.2. Variables de respuesta

El Cuadro 3, nos muestra las variables analizadas durante el desarrollo del presente estudio.

Cuadro 3. Variables de respuesta

Variable	Símbolo	Características	Operacionalización de la variable
Porcentaje de prendimiento	**PP**	Se realizara en conteo de vitro plantas que inician el proceso de formación de partes vegetativas.	ANVA, Prueba de promedios
Días a la formación de brotes	**DFB**	Se medirá en días y se considerará desde el momento de la siembra hasta la aparición del primer brote.	ANVA, Prueba de promedios
Número de brotes por explante	**NBE**	Se realizara en los que respondan a la producción de brotes.	Por conteo del número brotes y calculo de promedios. ANVA, Prueba de medias Duncan
Número de hojas	**NH**	Se realizara en los que respondan a la producción de hojas.	Conteo del número, calculo de porcentajes. ANVA, Prueba de promedios
Longitud de hoja	**LDH**	Se realizara en los que respondan a la producción de hojas y se medirá en mm, desde la base al ápice.	Se medirá de acuerdo al desarrollo de las hojas, calculo de porcentajes. ANVA, Prueba de promedios
Inicio de la formación de la raíz	**IFR**	Se medirá en días y se considerará desde el momento de la siembra hasta la aparición de la primera raíz.	ANVA, Prueba de promedios
Número de raíces	**NR**	Considerará a todas las raíces presentes en la cabellera radicular.	Conteo del número raices, calculo de porcentajes. ANVA, Prueba de promedios
Longitud de raíz	**LR**	Se medirá en mm y se considerara solo a la raíz mas larga de la cabellera radicular presente.	ANVA, Prueba de promedios
Porcentaje de contaminación	**PC**	Se considerara a las que presenten contaminación fúngica, bacteriana u oxidación.	Conteo del número de vitro plantas contaminadas, calculo de porcentajes, prueba de promedios. ANVA

5. RESULTADOS Y DISCUCIONES

5.1. Análisis de variables de respuesta

El cuadro 4 muestra los resultados alcanzados en el análisis ANVA, para cada una de las variables de respuesta del presente estudio.

5.1.1. Promedio de prendimiento (PP)

Para la operacionalización de la variable se realizó en conteo de las vitro plantas que inician el proceso de prendimiento de partes vegetativas y que no estén muertas y/o contaminadas, se tomaron datos para su posterior análisis, éste reporto un coeficiente de variación de 11.93 % que muestra un manejo homogéneo de las unidades experimentales, así mismo existen diferencias altamente significativas a un 1% de probabilidad, para los tratamientos aplicados con bencil aminopurina, ácido indolacético y para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético.

Esta diferencia podría atribuirse al manejo que se realizó previo a la siembra en campo y a los cuidados que se tuvo durante la recolección del material, su empacado y su traslado, que disminuye la contaminación, estimula su desarrollo y acelera el desarrollo celular, sin olvidar el comportamiento propio de la especie, determinada por sus características genéticas y su respuesta a las condiciones del medio en el que se desarrollan.

Por su parte Villalobos y Thorpe (1991), argumentan que la diferenciación *de novo* está ligada a la proliferación celular y la organización de las nuevas células sigue una "programación" influenciada por las condiciones de cultivo in vitro conjuntamente con la ganancia de peso. Bravo (1997), consideró que el método de desinfección da resultados eficientes cuando son aplicados en forma correcta previo a la recolección y transporte. Asi mismo; Okabe (1997), indica que el material proveniente del campo debe desinfectarse antes de introducirlo a condiciones asépticas. Por esta razón se recomienda introducir el material al invernadero y tratarlo en un período prudente con fungicidas para bajar la incidencia de patógenos endógenos.

Cuadro 4. Resultados alcanzados con el análisis ANVA, para las variables de respuesta.

VARIABLES DE RESPUESTA		PP		DFB		NBE		NH		LDH		IFR		NR		LR	
FV	**GL**	**CM**	**Prob > F**	**CM**	**Prob > F**	**CM**	**Prob > F**	**CM**	**Prob > F**	**CM**	**Prob > F**	**CM**	**Prob > F**	**CM**	**Prob > F**	**CM**	**Prob > F**
Bencil aminopurina	3	2127.5	0,01**	1391.9	0,01**	24.6	0,01**	78.8	0,01**	1500.2	0,01**	2516.6	0,01**	57.6	0,01**	3626.2	0,01**
Acido indolacético	3	1302.0	0,01**	1518.5	0,01**	49.3	0,01**	56.3	0,01**	1538.3	0,01**	2642.0	0,01**	53.7	0,01**	3384.5	0,01**
Bencil aminopurina * Ácido indolacético	9	340.5	0,01**	680.6	0,01**	6.9	0,01**	17.4	0,01**	355.8	0,01**	2517.2	0,01**	11.2	0,01**	1263.8	0,01**
Error	96	1.58		1.60		0.7		0.03		0.3		0.58		0.009		2.1	
Total	111																
		CV: 11.93		**CV: 13.91**		**CV: 12.10**		**CV: 11.04**		**CV: 11.83**		**CV: 12.13**		**CV: 12.57**		**CV: 13.01**	

CV = coeficiente de variación; ** = altamente significativo; * = significativo; ns = no significativo

En base a los resultados obtenidos se realizó la comparación de medias para el factor bencil aminopurina, ácido indolacético y la interacción y cuyos resultados se muestran en los siguientes cuadros.

Cuadro 5. Comparación de promedios variable promedio de prendimiento, para bencil aminopurina, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Bencil aminopurina (mg/l)
A	75.10	0.5 mg/l
B	68.82	1 mg/l
C	61.64	2 mg/l
D	55.00	Testigo

Fuente: elaboración propia

El anterior cuadro nos muestra la comparación de promedios en prendimiento para la aplicación de bencil aminopurina; logra el mayor promedio de prendimiento la aplicación de 0.5 mg/l de la hormona con un promedio de 75.10 %, con valores intermedios se encuentran los tratamientos de 1 y 2 mg/l y en último lugar se tiene al grupo testigo que no recibió ningún tipo de hormona que solo logra el 55 %.

El efecto de las concentraciones de BAP en el proceso de prendimiento se observó en los tratamientos que incluyeron 2 mg/l BAP; al disminuir la concentración de esta hormona por debajo de 2 mg/l, el proceso de prendimiento tiende a aumentar progresivamente. Cuando se empleó este mismo regulador en cantidades de 1 mg/l y 0.5 mg/l esta cantidad logro superar las mismas cantidades que se lograron con la aplicación de 2 mg/l, la tendencia observada indica que a mayor nivel de este regulador del crecimiento en el medio de cultivo, la relación de prendimiento es menor.

Esto se debe a que la concentración de ciertas hormonas incita o estimulan la división celular y generan mayor número de estas provocando con ello la elongación y crecimiento de la yema. Lo anterior está relacionado con lo señalado por Orellana (1998), quien indicó que las citoquininas (bencil aminopurina), incorporadas a los medios de cultivo promueven

el desarrollo de las yemas, por lo que la eliminación de la dormancia que presentaron estas en algunas especies, estimula la expansión foliar por efecto del alargamiento celular.

Por su parte Zhao (2008) y Araya (2006), señala que éste comportamiento puede explicarse en que en cada especie existe un balance entre auxinas y citocininas para mantener el crecimiento y desarrollo de órganos; mientras las auxinas (como AIA) aumentan el tamaño de la célula, las citocininas (como el bencil aminopurina) incrementan el número de éstas.

Cuadro 6. Comparación de promedios variable promedio de prendimiento, para ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Ácido indolacético (mg/l)
A	69.75	2 mg/l
B	68.10	0.5 mg/l
B	67.71	1 mg/l
C	55.00	Testigo

Fuente: elaboración propia

El cuadro 6, nos muestra la comparación de promedios en prendimiento para la aplicación de ácido indolacético; logra el mayor promedio de prendimiento la aplicación de 2 mg/l de la hormona con un promedio de 69.75 %, son estadísticamente iguales los tratamientos de 1 y 0.5 mg/l y en último lugar se tiene al grupo testigo que no recibió ningún tipo de hormona que solo logra el 55 %.

Por los valores alcanzados el efecto de las concentraciones de AIA en el prendimiento del cultivo in vitro del yacon se observó en los tratamientos que incluyeron 2 mg/l AIA; al disminuir la concentración de AIA por debajo de 2 mg/l, el número de explantes que llegan a prender disminuye; esto a pesar de que se empleó este mismo regulador en cantidad inferior a 2 mg/l estas concentraciones no lograron mayor número de prendimientos ni en menor tiempo, la tendencia observada indica que a mayor nivel de este regulador del crecimiento en el medio de cultivo, el número de prendimientos aumenta.

Esto se puede atribuir a que la concentración de ciertas hormonas estimula y acelera la división celular y generan mayor número de estas, provocando con ello la elongación y crecimiento de la yema y su posterior diferenciación. Lo anterior está relacionado con lo señalado por Araya (2006), que afirma que éste comportamiento puede explicarse en que en cada especie existe un balance entre auxinas y citocininas para mantener el crecimiento y desarrollo de órganos; mientras las auxinas (como AIA) aumentan el tamaño de la célula, las citocininas (como el bencil aminopurina) incrementan el número de éstas.

Orellana (1998), quien indicó que las citoquininas (bencil aminopurina), incorporadas a los medios de cultivo promueven el desarrollo de las yemas, por lo que la eliminación de la dormancia que presentaron estas en algunas especies, estimula la expansión por efecto del alargamiento celular. Daquinta (1998), menciona que con la aplicación de auxina al medio de multiplicación se incide directamente en el número de brotes puesto que al haber un balance de citoquinina - auxina provoca que los brotes no se desarrollen en forma desordenada y se inhiban el enraizamiento.

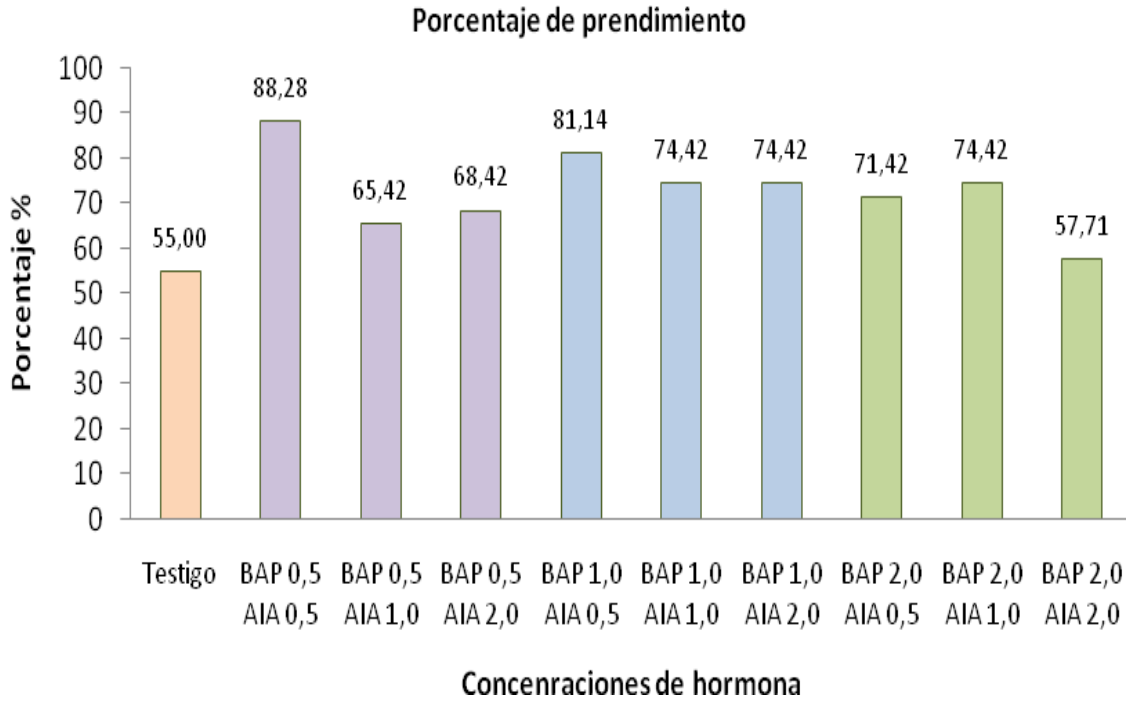


Figura 5. Comparación promedio de prendimiento, para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5%

La figura 5, nos muestra la comparación de promedios en prendimiento para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético; logra el mayor promedio de prendimiento el tratamiento realizado con 0.5 mg/l de la hormona bencil amino purina con 0.5 mg/l de ácido indolacético (a3*b1), con un promedio de 88.28 %, el resto de los tratamientos logran valores inferiores, destacando que el tratamiento realizado con 2 mg/l de bencil aminopurina y 2 mg/l de ácido indolacético resulta ser estadísticamente igual al testigo.

El efecto de las concentraciones de BAP y AIA en la cantidad de prendimientos logrados se observó en los tratamientos que incluyeron 0.5 mg/l de BAP y 0.5 mg/l AIA; al aumentar la concentración de AIA por arriba de 0.5 mg/l y variar la concentración de BAP hacia niveles superiores a está, el número de prendimientos tiende a disminuir.

Pese a que se empleó este mismo regulador en cantidad inferior a 0.5 mg/l para el BAP y aumentar la concentración del AIA, esto no logro incrementar el prendimiento de los explantes, la tendencia observada indica que al variar los niveles de los reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, el número de prendimientos disminuye.

Esto se puede atribuir a que la concentración de ciertos reguladores estimula y acelera la división celular y generan mayor número de estas, provocando con ello la elongación y crecimiento de la yema y su posterior diferenciación, estas concentraciones afectan de distinto modo a las especies vegetales.

Litz y Jarret (1991), afirman que la concentración de reguladores de crecimiento requeridos para la organogénesis puede variar de un tejido a otro dentro de la misma planta, o entre plantas de la misma especie, lo cual supone que la respuesta de un determinado explante puede variar de la respuesta de otro explante bajo las mismas concentraciones de hormonas.

Por su parte Villalobos y Thorpe (1991) argumentan que la diferenciación *de novo* está ligada a la proliferación celular y la organización de las nuevas células sigue una “programación” influenciada por las condiciones de cultivo in vitro conjuntamente con la ganancia de peso.

Por su parte Araya (2006), señala que éste comportamiento puede explicarse en que en cada especie existe un balance entre auxinas y citocininas para mantener el crecimiento y desarrollo de órganos; mientras las auxinas (como AIA) aumentan el tamaño de la célula, las citocininas (como el bencil aminopurina) incrementan el número de éstas.

Lo anterior está relacionado con lo señalado por Orellana (1998), quien indicó que las citoquininas (bencil aminopurina), incorporadas a los medios de cultivo promueven el desarrollo de las yemas, por lo que la eliminación de la dormancia que presentaron estas en algunas especies, estimula la expansión por efecto del alargamiento celular.

Daquinta (1998), menciona que con la aplicación de auxina al medio de multiplicación se incide directamente en el número de brotes puesto que al haber un balance de citoquinina-auxina provoca que los brotes no se elonguen en forma desordenada y se inhiban el enraizamiento.

5.1.2. Días a la formación del brote (DFB)

Para la operacionalización de la variable se realizó la toma de datos desde el momento de realizada la siembra hasta la aparición del primer brote, se midió en días y el conteo de las vitro plantas que inician con la formación de partes vegetativas y que no estén muertas, se tomaron datos para su posterior análisis cuyos resultados muestran (cuadro 4), lo siguiente el coeficiente de variación de 13.91 % lo que muestra un manejo homogéneo de las unidades experimentales, así mismo existen diferencias altamente significativas a un 1% de probabilidad, para los tratamientos aplicados con bencil aminopurina, ácido indolacético y para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético.

Esta diferencia podría atribuirse a que las diferentes concentraciones de las hormonas afectan e inciden en la formación de brotes, sumado a esto el manejo que se realizó previo a la siembra en campo y a los cuidados que se tuvo durante la recolección del material, su empacado y su traslado, estimula su desarrollo y acelera el desarrollo celular, sin olvidar el comportamiento propio de la especie, determinada por sus características genéticas y su respuesta a las condiciones del medio en el que se desarrollan.

Lo anterior está relacionado con lo señalado por Toro (2009) y Orellana (1998), quienes en ensayos con la misma concentracion (bencil aminopurina 1 mg/l), incorporadas a los medios de cultivo promueven el desarrollo de las yemas, por lo que la eliminación de la dormancia que presentaron estas en algunas especies, estimula la expansión foliar por efecto del alargamiento celular.

En base a los resultados obtenidos se realizó la comparación de promedios para el factor bencil aminopurina, ácido indolacético y la interacción y cuyos resultados se muestran en los siguientes cuadros.

Cuadro 7. Comparación de promedios variable días a la formación del brote, para bencil aminopurina, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Bencil aminopurina (mg/l)
A	25.39	0.5 mg/l
B	28.64	1 mg/l
C	33.75	2 mg/l
D	41.57	Testigo

Fuente: elaboración propia

El cuadro 7, nos muestra la comparación de promedios en días a la formación del brote para la aplicación de BAP; logra el menor periodo en días la aplicación de 0.5 mg/l de la hormona con un promedio de 25.39 días desde el momento de la siembra, con valores intermedios se encuentran los tratamientos de 1 y 2 mg/l y en último lugar se tiene al grupo testigo que no recibió ningún tipo de hormona y que demora aproximadamente 41.57 días en la formación del brote.

El efecto de las concentraciones de BAP en la cantidad de días a la formación del brote se observó en los tratamientos que incluyeron 1 mg/l; al modificar la concentración de AIA por arriba de 0.5 mg/l, el número de días a la formación del brote aumenta, la tendencia

observada indica que a menor o mayor nivel de este regulador del crecimiento en el medio de cultivo, el periodo de formación del brote se extiende.

Esto se debe a que la concentración de ciertas hormonas incita o estimulan la división celular y generan mayor número de estas provocando con ello la elongación, diferenciación y crecimiento de la yema.

Orellana (1998) y Toro (2009), indican que las citoquininas (BAP), incorporadas a los medios de cultivo promueven el desarrollo de las yemas, por lo que la eliminación de la dormancia que presentaron estas en algunas especies, estimula la expansión foliar por efecto del alargamiento celular, lo cual se halla relacionado con lo señalado anteriormente.

Venkatachalam *et al.* (2007), señalaron que las citoquininas son fitohormonas que intervienen principalmente en la promoción de la división celular, aunque el efecto pudiera variar según el estado de diferenciación de las células, induciendo la formación de órganos, el desarrollo de brotes, estimulando la movilización de nutrientes y la síntesis de clorofila.

Entonces la adición de BAP, en los medios de cultivo es determinante para la inducción de nuevos brotes durante la multiplicación *in vitro*. Se evidencio una consistente tendencia al incremento de los valores de las variables de crecimiento (longitud del brote, biomasa fresca total e índice de incremento de crecimiento).

Cuadro 8. Comparación de promedios variable días a la formación del brote, para ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Ácido indolacético (mg/l)
A	25.60	0.5 mg/l
B	27.10	1 mg/l
C	35.28	2 mg/l
D	41.35	Testigo

Fuente: elaboración propia

El cuadro 8, nos muestra la comparación de promedios en días a la formación del brote para la aplicación de ácido indolacético; logra el menor periodo en días la aplicación de 0.5 mg/l de la hormona con un promedio de 25.60 días desde el momento de realizada la siembra.

Con valores intermedios se encuentran los tratamientos de 1 y 2 mg/l de la misma hormona y en último lugar se tiene al grupo testigo que no recibió ningún tipo de hormona y que demora aproximadamente 41.35 días en la formación del brote.

El efecto de las concentraciones de AIA en la formación de raíz se observó en los tratamientos que incluyeron 1 mg/l; al variar las cantidades de esta en el medio de cultivo, el número de días a la formación del brote aumenta, entonces la tendencia observada indica que una menor o mayor concentración de este regulador del crecimiento en el medio de cultivo, el periodo de formación del brote se amplía.

Con los resultados obtenidos se puede afirmar que concentraciones elevadas de ácido indolacético prolongan el periodo vegetativo de las plantas. Esto también se puede atribuir a que la concentración de ciertas hormonas estimula y acelera la división celular y generan mayor número de estas, provocando con ello la elongación y crecimiento de la yema y su posterior diferenciación o multiplicación indefinida.

Por su parte Zhao (2008), señala que éste tipo de comportamiento puede explicarse ya que en cada especie existe un balance particular entre las cantidades de auxinas y citocininas esto para poder mantener el crecimiento y desarrollo de órganos; pues mientras las auxinas aumentan el tamaño de la célula; las citocininas incrementan el número de celulas.

Daquinta (1998), menciona que con la aplicación de auxina al medio de multiplicación se incide directamente en el número de brotes puesto que al haber un balance de citoquinina-auxina provoca que los brotes no se elonguen en forma desordenada y se inhiban el enraizamiento.

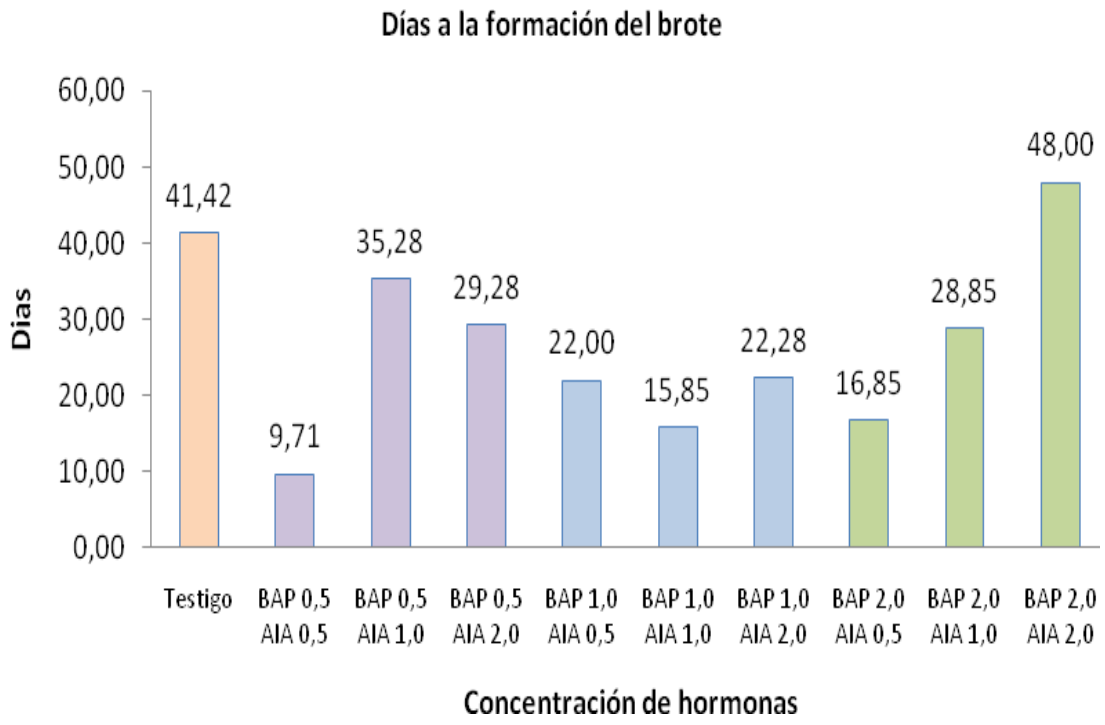


Figura 6. Comparación de promedios variable días a la formación del brote, para la interacción bencil aminopurina*ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5%

La figura 6, nos muestra la comparación de promedios en días a la formación del brote para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético; logra el menor periodo desde el momento de la siembra el tratamiento realizado con 0.5 mg/l de la hormona bencil aminopurina con 0.5 mg/l de ácido indolacético, con un promedio de días de 9.71.

El resto de los tratamientos logran valores inferiores, destacando que el tratamiento realizado con 2 mg/l de bencil aminopurina y 2 mg/l de ácido indolacético (a3*b3), logra el valor mas alto en cuanto a días a la formación del brote con 48 días y que resulta incluso ser mayor al periodo que logra el testigo (41.42); pero que estadísticamente resultan similares.

El efecto de las concentraciones de BAP y AIA en la formación del brote y el tiempo que demora este se observó en los tratamientos que incluyeron 0.5 mg/l BAP y 0.5 mg/l AIA; al aumentar la concentración de AIA por encima de 0.5 mg/l y disminuir la concentración de 2 mg/l BAP, el número de días a la formación del brote se extiende; la tendencia observada

indica que al variar los niveles de los reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, el periodo de formación del brote se amplia.

Esto se puede atribuir a que concentraciones elevadas de ciertos reguladores si bien estimulan y aceleran la división celular y generan mayor número de estas, provoca que el periodo de diferenciación se alargue, estas concentraciones afectan de distinto modo a las especies vegetales. Litz y Jarret (1991), afirman que la concentración de reguladores de crecimiento requeridos para la organogénesis puede variar de un tejido a otro dentro de la misma planta, o entre plantas de la misma especie, lo cual supone que la respuesta de un determinado explante puede variar de la respuesta de otro explante bajo las mismas concentraciones de hormonas o productos.

Por su parte Villalobos y Thorpe (1991) argumentan que la diferenciación *de novo* está ligada a la proliferación celular y la organización de las nuevas células sigue una "programación" influenciada por las condiciones de cultivo in vitro conjuntamente con la ganancia de peso por el aumento celular.

Por su parte Zhao (2008), y Araya (2006), señalan que éste comportamiento puede explicarse en que en cada especie existe un balance entre auxinas y citocininas para mantener el crecimiento y desarrollo de órganos; mientras las auxinas (como AIA) aumentan el tamaño de la célula, las citocininas (como el bencil aminopurina) incrementan el número de éstas.

Por su parte Toro (2009), señala que en pruebas preliminares de proliferación (brotación y crecimiento del brote) en explantes con el ápice cortado muestran que BAP1 mg/L presentan mayor brotación con más de tres brotes, además de presentar menor porcentaje de vitrificación y necrosis. Sin embargo, al hacer una comparación solo entre tipos de explantes presentan mayor problema de vitrificación en el medio con adición de giberelinas y auxinas durante el desarrollo de la etapa de proliferación (brotación y largo del brote). Las pruebas para crecimiento del brote mostraron que usando solo usando giberilinas, no se logra más que la elongación de las hojas.

5.1.3. Número de brotes por explante (NBE)

Para la operacionalización de la variable se realizó la toma de datos mediante conteo desde la aparición del primer brote hasta la conclusión del presente trabajo, se realizo el cálculo de promedio y un análisis ANVA cuyos resultados se muestran en el Cuadro 4, éste reporto un coeficiente de variación de 12.10 % lo que muestra un manejo homogéneo de las unidades experimentales, así mismo existen diferencias altamente significativas a un 1% de probabilidad, para los tratamientos aplicados con bencil aminopurina, ácido indolacético y para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético.

Esta diferencia podría atribuirse a que las diferentes concentraciones de las hormonas afectan e inciden en la formación de brotes, sumado a esto el manejo que se realizó previo a la siembra y durante la toma de muestras, sin olvidar que el tipo de corte empleado durante la toma de muestra, los cuidados que se tuvo durante el proceso de siembra; lo cual estimula su desarrollo y acelera el desarrollo celular, sin olvidar el comportamiento propio de la especie, determinada por sus características genéticas y su respuesta a las condiciones del medio en el que se desarrollan.

Lo anterior está relacionado con lo señalado por Orellana (1998), quien indicó que las citoquininas (bencil aminopurina), incorporadas a los medios de cultivo promueven el desarrollo de las yemas, por lo que la eliminación de la dormancia que presentaron estas en algunas especies, estimula la expansión foliar por efecto del alargamiento celular.
En base a los resultados obtenidos del cuadro 9, se realizó la comparación de medias con la prueba de Duncan para los factores BAP, AIA y la interacción y cuyos resultados se muestran en los siguientes cuadros.

El cuadro 9, nos muestra la comparación de medias en número de brotes por explante con la aplicación de bencil aminopurina; logra el mayor número de brotes la aplicación de 0.5 mg/l de la hormona con un promedio de 3.52 brotes por explante, con valores intermedios se encuentran los tratamientos de 1 mg/l y 2 mg/l y en último lugar se tiene al grupo testigo que no recibió ningún tipo de hormona y presenta 1.49 brotes por explante

Cuadro 9. Comparación de promedios para número de brotes por explante, para bencil aminopurina, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Bencil aminopurina (mg/l)
A	3.52	0.5 mg/l
B	3.42	1 mg/l
C	2.63	2 mg/l
D	1.49	Testigo

Fuente: elaboración propia

El efecto de las concentraciones de BAP en el número de brote por explante se observó en los tratamientos que incluyeron 0.5 mg/l BAP; al aumentar la concentración de BAP por arriba de 0.5 mg/l, el número de brotes decrece; a pesar de que se empleo éste mismo regulador en cantidad superior a 0.5 mg/l esto no logro generar mayor número de brotes por explante, entonces la tendencia observada indica que a mayor nivel de este regulador en el medio de cultivo, el número de brotes no aumenta.

Esto se debe a que la concentración de ciertas hormonas incita o estimulan la división celular y generan mayor número de estas provocando con ello la elongación, diferenciación y crecimiento de la yema. Venkatachalam *et al.* (2007), señalaron que las citoquininas son fitohormonas que intervienen principalmente en la promoción de la división celular, aunque el efecto pudiera variar según el estado de diferenciación de las células, induciendo la formación de órganos, el desarrollo de brotes, estimulando la movilización de nutrientes y la síntesis de clorofila.

La adición de bencil aminopurina en los medios de cultivo es determinante para la inducción de nuevos brotes durante la multiplicación *in vitro*. Se evidencio una consistente tendencia al incremento de los valores de las variables de crecimiento (longitud del brote, biomasa fresca total, biomasa del tejido descartado e índice de incremento de crecimiento), a excepción del número de brotes, el cual mostró un comportamiento similar en el tratamiento que tenía 1 mg/l de BAP. Así mismo; según los resultados encontrados

se puede apreciar que la presencia de citocininas en el medio de cultivo no garantiza la respuesta del callo hacia la formación del brote ni la organogénesis como ocurrió con el tratamiento que tenía 2 mg/l de BAP y 2 mg/l de AIA; donde la mayoría de las unidades experimentales formo callo.

Por su parte, Siddique *et al*. (2003), obtuvieron resultados semejantes al inducir callos en explantes caulinares de otras especies (Asclepiadaceae), encontrando que la combinación de 1.0 mg/l de AIA + 2.0 mg/l de ABA favoreció considerablemente el incremento de peso fresco. Lo cual presenta cierta concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo desde el punto de vista de la relación entre los reguladores de crecimiento, y el incremento de masa fresca de los callos proliferados.

Flick *et al*. (1983), reporto que algunas veces puede darse la ocurrencia de organogénesis directa en explantes cultivados en medios que contengan únicamente citocinina ya que esta depende de los niveles endógenos de reguladores de crecimiento vegetal en el momento de la organogénesis. Lo anterior está relacionado con lo señalado por Orellana (1998), quien indicó que las citoquininas (bencil aminopurina), incorporadas a los medios de cultivo promueven el desarrollo de las yemas, por lo que la eliminación de la dormancia que presentaron estas en algunas especies, estimula la expansión foliar por efecto del alargamiento celular.

Cuadro 10. Comparación de promedios variable número de brotes por explante ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Ácido indolacético (mg/l)
A	4.02	1 mg/l
B	3.79	0.5 mg/l
C	1.76	2 mg/l
D	1.47	Testigo

Fuente: elaboración propia

El cuadro 10, nos muestra la comparación de promedios para el número de brotes para la aplicación de ácido indolacético; logra el mayor número la aplicación de 1 mg de la hormona con un promedio de 4.02 brotes por explante. Con valores intermedios se encuentran los tratamientos de 0.5 mg/l y 2 mg/l con valores de 3.79 y 1.76 brotes por explante respectivamente de la misma hormona y en último lugar se tiene al grupo testigo que no recibió ningún tipo de hormona y solo presenta 1.47 brotes por explante.

La concentración de AIA que afecto en el número de brotes por explante se observó en los tratamientos que incluyeron 1 mg/l AIA; al disminuir o aumentar la concentración de AIA por arriba de 1 mg/l, el número de brotes tiende a disminuir, la tendencia observada nos indica que a menor o mayor nivel de este regulador del crecimiento en el medio de cultivo, el número de brotes por explante tiende a disminuir.

Litz y Jarret (1991), afirman que la concentración de reguladores de crecimiento requeridos para la organogénesis puede variar de un tejido a otro dentro de la misma planta, o entre plantas de la misma especie, lo cual supone que la respuesta de un determinado explante puede variar de la respuesta de otro explante bajo las mismas concentraciones de hormonas.

Por su parte Araya (2006), señala que éste comportamiento puede explicarse en que en cada especie existe un balance entre auxinas y citocininas para mantener el crecimiento y desarrollo de órganos; mientras las auxinas (como AIA) aumentan el tamaño de la célula, las citocininas (como el BAP) incrementan el número de éstas.

Daquinta (1998), menciona que con la aplicación de auxina al medio de multiplicación se incide directamente en el número de brotes puesto que al haber un balance de citoquinina-auxina provoca que los brotes no se elonguen en forma desordenada y se inhiban el enraizamiento.

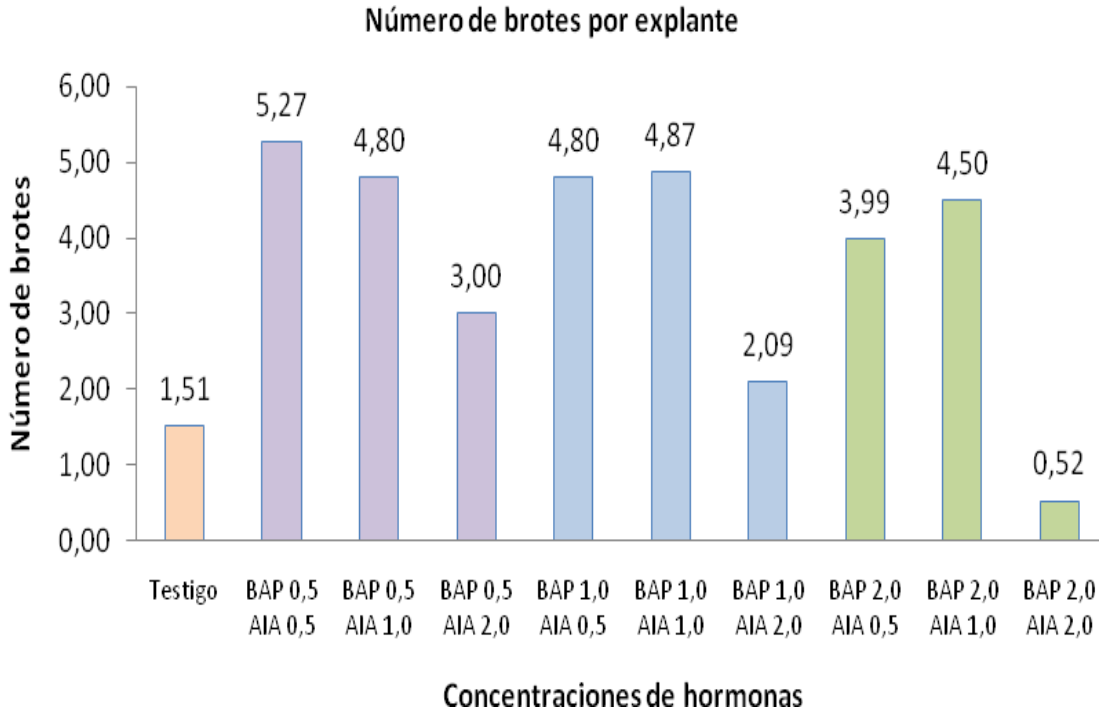


Figura 7. Comparación de promedios variable número de brotes por explante, para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5%

La figura 7, nos muestra la comparación de promedios en número de brotes por explante para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético; logra el mayor número de brotes por explante el tratamiento realizado con 0.5 mg/l de la hormona bencil amino purina con 0.5 mg/l de ácido indolacético, con un promedio de 5.27 brotes por explante.

El resto de los tratamientos logran valores inferiores, destacando que el tratamiento realizado con 2 mg/l de bencil aminopurina y 2 mg/l de ácido indolacético (a3*b3), logra el menor número de brotes con solo 0.52 y que resulta incluso ser menor al número que logra el testigo 1.51; debido a que este tratamiento presento mayor formación de callos con relación a los otros tratamientos.

Por consiguiente el efecto de las concentraciones de BAP y AIA en el número de brotes por explante se observó en los tratamientos que incluyeron 1 mg/l BAP y 1 mg/l AIA, se encuentra en un segundo lugar en lo que respecta a esta variable.

Esto se puede atribuir a que concentraciones elevadas de ciertos reguladores si bien estimulan y aceleran la división celular y generan mayor número células provoca la formación de callos. Litz y Jarret (1991), afirman que la concentración de reguladores de crecimiento requeridos para la organogénesis puede variar de un tejido a otro dentro de la misma planta, o entre plantas de la misma especie, lo cual supone que la respuesta de un determinado explante puede variar de la respuesta de otro explante bajo las mismas concentraciones de hormonas o productos.

Esto presenta cierta concordancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo desde el punto de vista de la relación entre los reguladores de crecimiento, y el incremento de masa fresca de los callos proliferados con el tratamiento con 2 mg/l de bencil aminopurina y 2 mg/l de ácido indolacético (a3*b3). Tisserat (1995), demostró que la producción de callos está íntimamente ligada a la adición de auxinas al medio de cultivo, y que este efecto podría verse potencializado por la adición conjunta de auxinas y citocininas en altas concentraciones en el mismo medio de cultivo.

Solange *et al* (2002), encontró que la ausencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo evitaba la formación de callos, comparado con medios suplementados con varias auxinas (2,4-D; IBA, AIA y ANA) en presencia de BAP, y observando que el mejor tratamiento para inducir callos en las diferentes especies es la combinación en igual proporción de AIA y BAP confirma que la combinación de auxinas y citocininas promueve la formación de tejido calloso.

5.1.4. Número de hojas (NH)

Para la operacionalización de la variable se realizó la toma de datos mediante, conteo desde la aparición del primer brote hasta la conclusión del presente trabajo, el muestreo fue de manera destructiva, se realizó el cálculo de promedio y un análisis ANVA cuyos resultados se muestran a continuación en el Cuadro 4, donde reporta un coeficiente de variación de 11.04 % lo que muestra un manejo homogéneo de las unidades experimentales, así mismo existen diferencias altamente significativas a un 1% de

probabilidad, para los tratamientos aplicados con bencil aminopurina, ácido indolacético y para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético.

Esta diferencia podría atribuirse a que las diferentes concentraciones de las hormonas afectan e inciden en la formación de brotes, sumado a esto el manejo que se realizó durante el desarrollo del brote al cambiar el tamaño de la planta también se cambio el tamaño del contenedor para facilitar el desarrollo, sin olvidar el comportamiento propio de la especie, determinada por sus características genéticas y su respuesta a las condiciones del medio en el que se desarrollan. Lo anterior está relacionado con lo señalado por Orellana (1998), quien indicó que las citoquininas (bencil aminopurina), incorporadas a los medios de cultivo promueven el desarrollo de las yemas, por lo que la eliminación de la dormancia que presentaron estas en algunas especies, estimula la expansión foliar por efecto del alargamiento celular.

Por su parte Zhao (2008) y Araya (2006), señala que éste comportamiento puede explicarse en que en cada especie existe un balance entre auxinas y citocininas para mantener el crecimiento y desarrollo de órganos; mientras las auxinas (como AIA) aumentan el tamaño de la célula, las citocininas (como el bencil aminopurina) incrementan el número de éstas. En base a los resultados obtenidos del cuadro 3, se realizó la comparación de medias con la prueba de Duncan para los factores bencil aminopurina, ácido indolacético y la interacción y cuyos resultados se muestran en los siguientes cuadros.

El cuadro 11, nos muestra la comparación de medias en número de hojas, con la aplicación de bencil aminopurina; logra el mayor número de hojas la aplicación de 0.5 mg/l de la hormona con un promedio de 4.65 hojas, con valores intermedios se encuentran los tratamientos de 1 mg/l y 2 mg/l, 3.65 y 1.74 respectivamente y en último lugar se tiene al grupo testigo que no recibió ningún tipo de hormona y presenta 1.05 hojas.

Cuadro 11. Comparación de promedios para número de hojas para Bencil aminopurina, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Bencil aminopurina (mg/l)
A	4.64	0.5 mg/l
B	3.65	1 mg/l
C	1.74	2 mg/l
D	1.05	Testigo

Fuente: elaboración propia

El efecto de las concentraciones de BAP en el número de hojas se observó en los tratamientos que incluyeron 0.5 mg/l BAP; al aumentar la concentración de BAP por encima de 0.5 mg/l, el número de hojas tiende a disminuir. Inversamente a que se empleó este mismo regulador en cantidades superiores a 0.5 mg/l, esto no logro formar mayor número de hojas, la tendencia observada indica que a mayor nivel de este regulador del crecimiento en el medio de cultivo, la cantidad de hojas disminuye.

Así mismo; según los resultados encontrados se puede apreciar que la presencia de citocininas en el medio de cultivo no garantiza la respuesta del callo hacia la formación del brote y por ende la formación de hojas como ocurrió con el tratamiento que tenía 2 mg/l de BAP y 2 mg/l de AIA; donde la mayoría de las unidades experimentales formo callo.

Venkatachalam *et al.* (2007), señalaron que las citoquininas (para este caso BAP), son fitohormonas que intervienen principalmente en la promoción de la división celular, aunque el efecto pudiera variar según el estado de diferenciación de las células, induciendo la formación de órganos, el desarrollo de brotes, estimulando la movilización de nutrientes y la síntesis de clorofila.

La adición de bencil aminopurina en los medios de cultivo es determinante para la inducción de nuevos brotes durante la multiplicación *in vitro*. Se evidencio una consistente tendencia al incremento de los valores de las variables de crecimiento (longitud del brote,

biomasa fresca total, biomasa del tejido descartado e índice de incremento de crecimiento).

Lo anterior está relacionado con lo señalado por Orellana (1998) y Toro (2009), quien indicó que las citoquininas (bencil aminopurina), incorporadas a los medios de cultivo promueven el desarrollo de las yemas, por lo que la eliminación de la dormancia que presentaron estas en algunas especies, estimula la expansión foliar por efecto del alargamiento celular.

Flick *et al*. (1983) reporto que algunas veces puede darse la ocurrencia de organogénesis directa en explantes cultivados en medios que contengan únicamente citocinina ya que esta depende de los niveles endógenos de reguladores de crecimiento vegetal en el momento de la organogénesis.

Lo cual presenta cierta concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo desde el punto de vista de la relación entre los reguladores de crecimiento, y el incremento de masa fresca, en el desarrollo de hojas en el tratamiento testigo.

Cuadro 12. Comparación de promedios variable número de hojas para ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Ácido indolacético (mg/l)
A	4.32	1 mg/l
B	3.46	0.5 mg/l
C	2.29	2 mg/l
D	1.06	Testigo

Fuente: elaboración propia

El cuadro 12, nos muestra la comparación de promedios para el número de hojas para la aplicación de ácido indolacético; logra el mayor número la aplicación de 1 mg/l de la hormona ácido indolacético con un promedio de 4.32 hojas. Con valores intermedios se

encuentran los tratamientos de 0.5 mg/l y 2 mg/l con valores de 3.46 y 2.29 hojas respectivamente de la misma hormona y en último lugar se tiene al grupo testigo que no recibió ningún tipo de hormona y solo presenta 1.06 hojas.

Por lo tanto el efecto de las concentraciones de AIA en la formación de raíz se observó en los tratamientos que incluyeron 1 mg/l AIA; al disminuir y o aumentar la concentración de AIA por arriba de 1 mg/l, el número de hojas disminuyo, la tendencia observada indica que en menores o mayores concentraciones de este regulador de crecimiento en el medio de cultivo, el número de hojas disminuye, sobre el tema Daquinta (1998), menciona que con la aplicación de auxina al medio de multiplicación se incide directamente en el número de brotes puesto que al haber un balance de citoquinina-auxina provoca que los brotes no se elonguen en forma desordenada.

Con los resultados obtenidos se puede afirmar que concentraciones elevadas de ácido indolacético prolongan el periodo vegetativo de las plantas produciendo un retraso en la formación de hojas, esto coincide con lo afirmado por Litz y Jarret (1991), afirman que la concentración de reguladores de crecimiento requeridos para la organogénesis puede variar de un tejido a otro dentro de la misma planta, o entre plantas de la misma especie, lo cual supone que la respuesta de un determinado explante puede variar de la respuesta de otro explante bajo las mismas concentraciones de hormonas.

Por su parte Villalobos y Thorpe (1991) argumentan que la diferenciación *de novo* está ligada a la proliferación celular y la organización de las nuevas células sigue una "programación" influenciada por las condiciones de cultivo in vitro conjuntamente con la ganancia de peso.

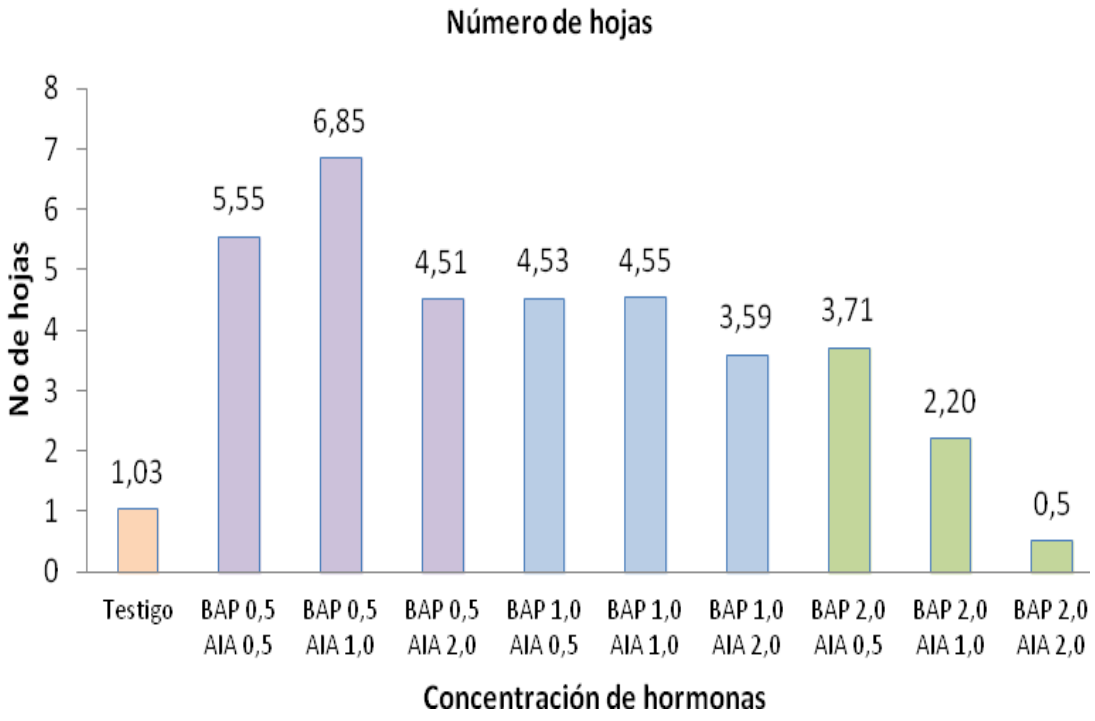


Figura 8. Comparación de promedios variable número de hojas, para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5%

La figura 8, nos muestra la comparación de promedios para número de hojas para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético; logra el mayor número de hojas el tratamiento realizado con 0.5 mg/l de la hormona bencil aminopurina con 1 mg/l de ácido indolacético (tratamiento a1b2), con un promedio de 8.59 hojas. El resto de los tratamientos logran valores menores, destacando que el tratamiento realizado con 2 mg/l de bencil aminopurina y 2 mg/l de ácido indolacético (a3*b3), logró producir escasas hojas debido a que este tratamiento presento mayor formación de callos con relación a los otros tratamientos; en comparación con el testigo, el cual sin la adición de hormonas produjo 1.03 hojas.

El efecto de las concentraciones de BAP y AIA en el número de hojas se observó en los tratamientos que incluyeron 0.5 mg/l BAP y 1 mg/l AIA; al aumentar la concentración de BAP por encima arriba de 0.5 mg/l, y variar la concentración de 1 mg/l AIA, el número de hojas tiende a disminuir, la tendencia observada indica que al variar las concentraciones

ya sea en menor o mayor nivel de ambos reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, el número de hojas tiende a disminuir.

Esto se puede atribuir a que concentraciones elevadas (para este caso 2 mg/l), en el medio de cultivo de las hormonas empleadas; si bien estimulan y aceleran la división celular y generan mayor número células provoca la formación de callos, los cuales posteriormente no forman hojas; sobre esto Litz y Jarret (1991), afirman que la concentración de reguladores de crecimiento requeridos para la organogénesis puede variar de un tejido a otro dentro de la misma planta, o entre plantas de la misma especie, lo cual supone que la respuesta de un determinado explante puede variar de la respuesta de otro explante bajo las mismas concentraciones de hormonas o productos.

Tisserat (1985), demostró que la producción de callos está íntimamente ligada a la adición de auxinas al medio de cultivo, y que este efecto podría verse potencializado por la adición conjunta de auxinas y citocininas en altas concentraciones en el mismo medio de cultivo; por su parte Solange *et al* (2002), encontró que la ausencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo evitaba la formación de callos, comparado con medios suplementados con varias auxinas (2,4-D; IBA, AIA y ANA) en presencia de BAP, y observando que el mejor tratamiento para inducir callos en las diferentes especies es la combinación en igual proporción de AIA y BAP confirma que la combinación de auxinas y citocininas promueve la formación de tejido calloso.

Krikorian (1991) reconoce que a pesar que en muchas especies vegetales puede inducirse la proliferación de tejido calloso y posteriormente la formación de brotes y raíces manipulando la relación auxina/citocinina aplicada exógenamente, no pueden universalizarse dichos acontecimientos, especialmente en cuanto a la respuesta morfogenética del callo como consecuencia de la adición exógena de citocininas.

Esto presenta cierta concordancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo desde el punto de vista de la relación entre los reguladores de crecimiento, y el incremento de masa fresca de los callos proliferados con el tratamiento con 2 mg/l de bencil aminopurina y 2 mg/l de ácido indolacético (a3*b3), esto confirma lo expuesto por Yaya *et*

al. (2005), quien afirma que la ausencia de organogénesis a partir de callo es frecuente en varias especies, especialmente en aquellas consideradas recalcitrantes para el cultivo in vitro.

Algunos estudios señalan un efecto inhibitorio del explante sobre la ocurrencia de organogénesis cuando el callo originado se mantiene adherido a este (Litz y Jarret, 1991); es así que durante el desarrollo del presente estudio la anterior premisa se reafirma puesto que la formación de los órganos regenerados en condiciones in vitro no ocurrió en los estados iniciales del proceso cuando el tejido de callo desarrollado y el explante se encontraban unidos en una misma estructura.

Adicionalmente, la separación del explante inicial del tejido calloso durante la etapa de multiplicación y posterior intento de regeneración por separado no contribuyeron con la formación de órganos aéreos (hojas), al aplicarles el mismo tratamiento (2 mg/l de bencil aminopurina y 2 mg/l de ácido indolacético) por separado tanto al callo logrado como al explante; este resultado se explica por lo citado por Sivaram y Mukundan (2003), quienes señalan que es posible que el tipo de explante utilizado tenga un efecto sobre los resultados obtenidos ya que existen reportes que sugieren la posibilidad de lograr organogénesis cuando se utiliza tejidos foliares como explante inicial.

5.1.5. Largo de hoja (LDH)

Para la operacionalización de la variable se realizó la toma de datos mediante, se procedió a medir con una regla y en milímetros todas y cada una de las hojas presentes en la planta desde la aparición de la primera hoja hasta la conclusión del presente trabajo, para esto se empleó las muestras tomadas del anterior análisis, se realizó el cálculo de promedio y un análisis ANVA (cuadro 4), éste reporto un coeficiente de variación de 11.83 % lo que muestra un manejo homogéneo de todas las unidades experimentales, así mismo nos muestra que existen diferencias altamente significativas a un 1% de probabilidad, para los tratamientos aplicados con bencil aminopurina, ácido indolacético y para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético.

Esta diferencia podría atribuirse a que las diferentes concentraciones de las hormonas afectan e inciden en la formación de hojas, sumado a esto el manejo que se realizo durante el desarrollo del brote al cambiar el tamaño de la planta; también se cambio el tamaño del contenedor para facilitar el desarrollo, sin olvidar el comportamiento propio de la especie, determinada por sus características genéticas y su respuesta a las condiciones del medio en el que se desarrollan.

Lo anterior está relacionado con lo señalado por Orellana (1998), quien indicó que las citoquininas (bencil aminopurina), incorporadas a los medios de cultivo promueven el desarrollo de las yemas, por lo que la eliminación de la dormancia que presentaron estas en algunas especies, estimula la expansión foliar por efecto del alargamiento celular. En base a los resultados obtenidos del cuadro 15, se realizó la comparación de medias con la prueba de Duncan para los factores bencil aminopurina, ácido indolacético y la interacción y cuyos resultados se muestran en los siguientes cuadros.

Cuadro 13. Comparación de promedios para largo de hoja (mm), para bencil aminopurina, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Bencil aminopurina (mg/l)
A	24.47	0.5 mg/l
B	19.23	1 mg/l
C	10.51	2 mg/l
D	9.03	Testigo

Fuente: elaboración propia

El cuadro 13, nos muestra la comparación de medias en número de hojas, con la aplicación de bencil aminopurina; logra el mayor largo de hoja la aplicación de 0.5 mg/l de la hormona con un promedio de 24.47 mm, con valores intermedios se encuentran los tratamientos de 1 mg/l y 2 mg/l con 19.23 mm y 10.51 mm respectivamente y en último lugar se tiene al grupo testigo que no recibió ningún tipo de hormona y logra un largo de hoja de 9.03 mm.

De los resultados alcanzados se deduce que el efecto de las concentraciones de BAP en el largo de hoja se observó en los tratamientos que incluyeron 0.5 mg/l BAP; al aumentar la concentración de BAP por arriba de 0.5 mg/l, el largo de hoja disminuye, a pesar de que se empleó éste mismo regulador en cantidades superiores a 0.5 mg/l, esto no logro incrementar el largo de hojas la tendencia observada indica que a mayor nivel del regulador del crecimiento en el medio de cultivo, el largo de hoja disminuye.

Esto se debe a que la concentración de ciertas cantidades de la hormona bencil aminopurina incita o estimulan la división celular y generan mayor número de estas provocando con ello la elongación, diferenciación y crecimiento de la yema con la consiguiente formación de hojas y un desarrollo acelerado que facilita el proceso fotosintético. Así mismo; según los resultados encontrados se puede apreciar que la presencia de citocininas en el medio de cultivo no garantiza la respuesta del callo hacia la formación del brote y por ende la formación de hojas como ocurrió con el tratamiento que tenia 2 mg/l de BAP y 2 mg/l de AIA; donde la mayoría de las unidades experimentales formo callo sin desarrollar hojas durante todo el proceso.

La adición de bencil aminopurina en los medios de cultivo es determinante para la inducción de nuevos brotes durante la multiplicación *in vitro*. Se evidencio una consistente tendencia al incremento de los valores de las variables de crecimiento (longitud del brote, biomasa fresca total, biomasa del tejido descartado e índice de incremento de crecimiento. Lo anterior se halla relacionado con lo mencionado por Venkatachalam *et al.* (2007), que indica que las citoquininas (bencil aminopurina), son fitohormonas que intervienen principalmente en la promoción de la división celular, aunque el efecto pudiera variar según el estado de diferenciación de las células, induciendo la formación de órganos, el desarrollo de brotes, estimulando la movilización de nutrientes y la síntesis de clorofila.

Orellana (1998), quien indicó que las citoquininas (bencil aminopurina), incorporadas a los medios de cultivo promueven el desarrollo de las yemas, por lo que la eliminación de la dormancia que presentaron estas en algunas especies, estimula la expansión foliar por efecto del alargamiento celular.

Flick *et al*. (1983) reporto que algunas veces puede darse la ocurrencia de organogénesis directa en explantes cultivados en medios que contengan únicamente citocinina ya que esta depende de los niveles endógenos de reguladores de crecimiento vegetal en el momento de la organogénesis. Lo cual presenta cierta concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo desde el punto de vista de la relación entre los reguladores de crecimiento, y el incremento de masa fresca, en el desarrollo de hojas en el tratamiento testigo.

El cuadro siguiente nos muestra los datos alcanzados durante la comparación de medias para la aplicación de ácido indolacético en tres niveles y la presencia de un tratamiento testigo.

Cuadro 14. Comparación de promedios variable largo de hoja (mm), para ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Ácido indolacético (mg/l)
A	25.06	0.5 mg/l
B	18.46	1 mg/l
C	10.68	Testigo
D	9.03	2 mg/l

Fuente: elaboración propia

El cuadro 14, nos muestra la comparación de promedios para el largo de hoja (mm), para la aplicación de ácido indolacético; en base al análisis realizado y las comparaciones Duncan logra el mayor largo de hoja la aplicación de 0.5 mg/l de ácido indolacético, con un promedio de 25.06 mm por hoja. Con valores intermedios se encuentran los tratamientos de 0.1 mg/l y el testigo con valores de 18.46 mm y 10.68 mm de largo de hoja respectivamente, con la aplicación de la misma hormona y en último lugar se tiene al grupo de 2 mg/l, que no recibió ningún tipo de hormona y que presenta un largo de hoja de 9.03 mm.

Se puede apreciar que el efecto de las concentraciones de AIA en la formación de raíz se observó en los tratamientos que incluyeron 1 mg/l AIA; al variar la concentración de AIA por arriba y debajo de 1 mg/l, el largo de las hojas no se incrementa, la tendencia observada indica que al variar las cantidades de este regulador del crecimiento en el medio de cultivo, el largo de hoja tiende a disminuir.

Con los resultados obtenidos se puede afirmar que concentraciones elevadas de ácido indolacético para este caso 2 mg/l, prolongan el periodo vegetativo de las plantas produciendo un retraso en la formación de hojas y afecta en el tamaño de las mismas, esta afirmación se halla respaldada con lo expuesto por Litz y Jarret (1983), quienes afirman que la concentración de reguladores de crecimiento requeridos para la organogénesis puede variar de un tejido a otro dentro de la misma planta, o entre plantas de la misma especie, lo cual supone que la respuesta de un determinado explante puede variar de la respuesta de otro explante bajo las mismas concentraciones de hormonas.

Daquinta (1998), menciona que con la aplicación de auxina al medio de multiplicación se incide directamente en el número de brotes puesto que al haber un balance de citoquinina-auxina provoca que los brotes no se elonguen en forma desordenada. Por su parte Villalobos y Thorpe (1991) argumentan que la diferenciación *de novo* está ligada a la proliferación celular y la organización de las nuevas células sigue una “programación” influenciada por las condiciones de cultivo in vitro conjuntamente con la ganancia de peso.

La figura 9, nos muestra la comparación de promedios realizado para el largo de hoja en la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético; donde se aprecia que logra el mayor largo de hoja el tratamiento realizado con 0.5 mg/l de la hormona bencil amino purina con 0.5 mg/l de ácido indolacético, con un promedio de 48.18 mm por hoja. El resto de los tratamientos logran valores menores, destacando que el tratamiento realizado con 2 mg/l de bencil aminopurina y 2 mg/l de ácido indolacético (a3*b3), que no logró producir muchas hojas y estas eran pequeñas debido a que este tratamiento presento formación de callos en todas sus unidades experimentales esto con relación a los otros tratamientos; en comparación el testigo, tratamiento al cual no se adiciono hormonas logro un largo de hoja de 8.67 mm.

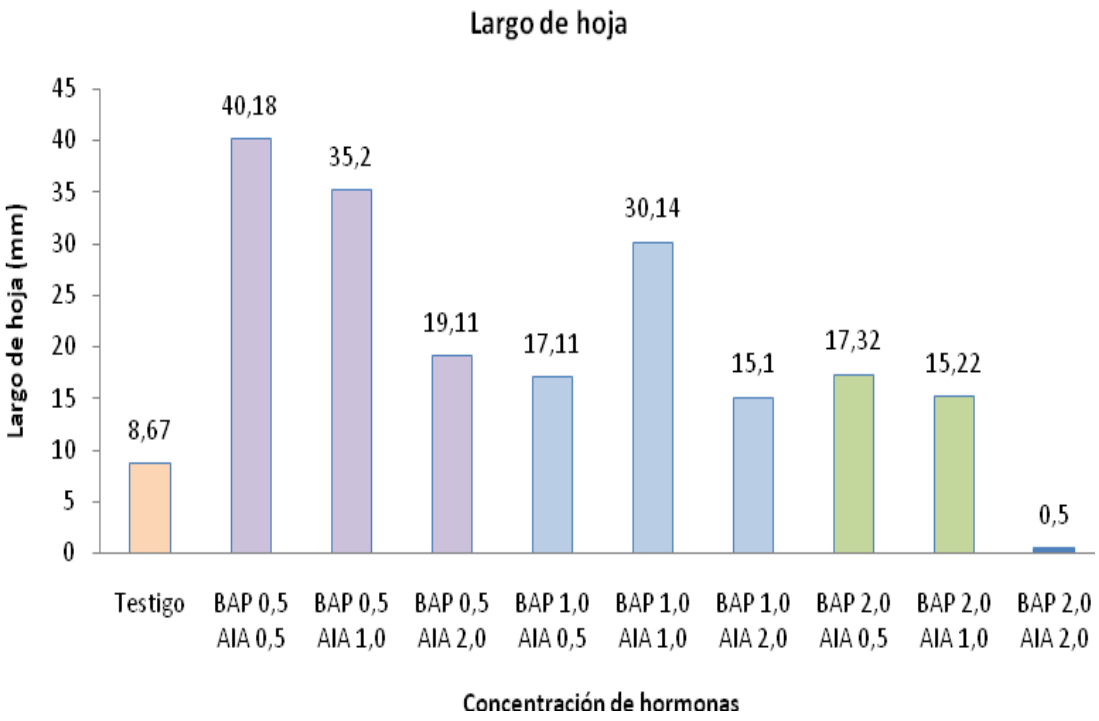


Figura 9. Comparación de promedios variable largo de hoja (mm), para la interacción bencil aminopurina*ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5%

Por los resultados logrados, el efecto de las concentraciones de BAP y AIA en el largo de hoja se observó en los tratamientos que incluyeron 0.5 mg/l BAP 0.5 mg/l AIA; al variar las concentraciones por arriba de 0.5 mg/l para el BAP y 0.5 mg/l para el AIA, el largo de las hojas disminuye, la tendencia observada indica que a mayor nivel del regulador BAP y variaciones del AIA, la longitud de hoja tiende a decrecer.

Esto se puede atribuir a que concentraciones elevadas, en el medio de cultivo de las hormonas empleadas (para el presente trabajo 2 mg/l); si bien estimulan y aceleran la división celular y generan mayor número células provoca la formación de callos, los cuales posteriormente no forman hojas, esto se ve respaldado por la afirmación de Klerk (1999), quien señala que bajo ciertas concentraciones de reguladores de crecimiento la organogénesis puede verse afectada de un tejido a otro e incluso al interior de la misma planta, o darse entre plantas de la misma especie, esto nos lleva a la conclusión que la respuesta de un determinado explante puede variar de la respuesta de otro explante bajo las mismas concentraciones de hormonas o productos.

Solange *et al* (2002), encontró que la ausencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo evitaba la formación de callos, comparado con medios suplementados con varias auxinas (2,4-D; IBA, AIA y ANA) en presencia de BAP, y observando que el mejor tratamiento para inducir callos en las diferentes especies es la combinación en igual proporción de AIA y BAP; pero no especifica las cantidades empleadas.

Krikorian (1991) reconoce que a pesar que en muchas especies vegetales puede inducirse la proliferación de tejido calloso y posteriormente la formación de brotes y raíces manipulando la relación auxina/citocinina aplicada exógenamente, no pueden universalizarse dichos acontecimientos, especialmente en cuanto a la respuesta morfogenética del callo como consecuencia de la adición exógena de citocininas.

Tisserat (1985), demostró que la producción de callos está íntimamente ligada a la adición de auxinas al medio de cultivo, y que este efecto podría verse potencializado por la adición conjunta de auxinas y citocininas en altas concentraciones en el mismo medio de cultivo. La ausencia de organogénesis a partir de callo es frecuente en varias especies, especialmente en aquellas consideradas recalcitrantes para el cultivo in vitro (Yaya *et al*., 2005). Esto presenta cierta concordancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo desde el punto de vista de la relación entre los reguladores de crecimiento, y el incremento de masa fresca de los callos proliferados con el tratamiento con 2 mg/l de bencil aminopurina y 2 mg/l de ácido indolacético (a3*b3).

Así mismo; algunos estudios señalan un efecto inhibitorio del explante sobre la ocurrencia de organogénesis cuando el callo originado se mantiene adherido a este (Litz y Jarret, 1991); los resultados obtenidos en el presente estudio afirman la anterior premisa puesto que la formación de los órganos regenerados en condiciones in vitro no ocurrió en los estados iniciales del proceso cuando el tejido de callo desarrollado y el explante se encontraban unidos en una misma estructura. En la realización del presente trabajo se tiene que adicionalmente, la separación del explante inicial del tejido calloso durante la etapa de multiplicación y posterior intento de regeneración no concluyeron con la formación de órganos al aplicarles el mismo tratamiento (2 mg/l de bencil aminopurina y 2 mg/l de ácido indolacético), una vez separados explante y callo.

Por otra parte es posible que el tipo de explante utilizado durante el estudio tenga algún efecto sobre los resultados obtenidos ya que existen reportes que sugieren la posibilidad de lograr organogénesis cuando se utiliza tejidos foliares como explante inicial para trabajos in Vitro (Sivaram y Mukundan, 2003).

5.1.6. Inicio de la formación de raíz (IFR)

Para la operacionalización de la variable se realizó la toma de datos desde el momento de la siembra, se procedió a contar los días, hasta la aparición de la primera raíz hasta la conclusión del presente trabajo, para esto se empleó todas las muestras en la evaluación en periodos de dos días, se realizó el cálculo de promedio y un análisis ANVA mostrado en el cuadro 4, se reportó un coeficiente de variación de 12.13 % lo que muestra un manejo homogéneo de todas las unidades experimentales, así mismo nos muestra que existen diferencias altamente significativas a un 1% de probabilidad, para los tratamientos aplicados con bencil aminopurina, ácido indolacético y para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético.

Los valores alcanzados durante el análisis ANVA, podrían atribuirse a que las diferentes concentraciones de las hormonas afectan e inciden en la formación de raíces, sumado a esto el manejo que se realizó durante el desarrollo de la raíz, el cambo en el tamaño del contenedor de la planta para facilitar el desarrollo de esta, además de la influencia del comportamiento propio de la especie que se halla determinada por las características genéticas y su respuesta a las condiciones del medio en el que se desarrollan. Lo anterior está relacionado con lo que explica parcialmente, por Parraguez (2001), respecto al antagonismo hormonal, ya que demuestra que la aplicación de BAP aunque fuera en cantidades ínfimas en relación al AIA, disminuye el número de raíces por explante pero mejoró la relación hoja - raíz.

Por su parte Araya (2006), señala que éste comportamiento puede explicarse en que en cada especie existe un balance entre auxinas y citocininas para mantener el crecimiento y desarrollo de órganos; mientras las auxinas (como AIA) aumentan el tamaño de la célula, las citocininas (como el bencil aminopurina) incrementan el número de éstas.

En base a los resultados obtenidos del cuadro 18, se realizó la comparación de medias con la prueba de Duncan para los factores bencil aminopurina, ácido indolacético y la interacción para inicio de la formación de raíz y cuyos resultados se muestran en los siguientes cuadros.

Cuadro 15. Comparación de promedios para inicio de la formación de raíz (días, para bencil aminopurina, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Bencil aminopurina (mg/l)
A	54.58	0.5 mg/l
B	67.68	1 mg/l
C	69.82	Testigo
D	77.71	2 mg/l

Fuente: elaboración propia

El cuadro 15, nos muestra la comparación de medias en días a la formación de raíz para el cultivo in vitro de yacon, con la aplicación de bencil aminopurina; logra el menor número de días la aplicación de 0.5 mg/l de la hormona con un promedio de 54.58 días, con valores intermedios se encuentran los tratamientos de 0.1 mg/l y el testigo con 67.68 días y 69.82 días respectivamente y en último lugar se tiene al grupo que se le aplico 2 mg/l y logra la formación de raíz en un periodo de días de 77.71.

El efecto de las concentraciones de BAP en la cantidad de días para la formación de raíz se observó en los tratamientos que incluyeron 0.5 mg/l BAP; al variar la cantidad de BAP por arriba de está valor, el número de días a la formación de raíz aumenta, la tendencia observada indica que a menor o mayor cantidad de este regulador del crecimiento en el medio de cultivo, el periodo de formación de la raíz se extiende. Esto se debe a que la concentración de ciertas cantidades de la hormona (bencil aminopurina), incita o estimulan la división celular y generan mayor número de estas provocando con ello la elongación, diferenciación y crecimiento del brote con la consiguiente formación de hojas y raíces.

Así mismo; según los resultados encontrados se puede apreciar que la presencia de citocininas en el medio de cultivo no garantiza la respuesta del callo hacia la formación del brote y por ende la formación de raíces como ocurrió con el tratamiento que tenia 2 mg de BAP; donde la mayoría de las unidades experimentales formo callo sin desarrollar raíces durante todo el proceso. Lo anterior se halla relacionado con lo mencionado por Venkatachalam *et al.* (2007), que indica que las citoquininas (bencil aminopurina), son fitohormonas que intervienen principalmente en la promoción de la división celular, aunque el efecto pudiera variar según el estado de diferenciación de las células.

Se reportó que algunas veces puede darse la ocurrencia de organogénesis directa en explantes cultivados en medios que contengan únicamente citocinina ya que esta depende de los niveles endógenos de reguladores de crecimiento vegetal en el momento de la organogénesis (Flick *et al,* 1983). Lo cual presenta cierta concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo desde el punto de vista de la formación de raíces en el tratamiento testigo; pero discrepa con los resultados encontrados con concentraciones elevadas de la hormona (para el presente caso 2 mg/l), donde la ocurrencia de formación de raíz fue mínima y el periodo fue relativamente largo.

El cuadro siguiente nos muestra los resultados alcanzados durante la comparación de medias para la aplicación de ácido indolacético en tres niveles y la presencia de un tratamiento testigo para inicio de la formación de raíz.

Cuadro 16. Comparación de promedios variable inicio de la formación de raíz (días), para ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Ácido indolacético (mg/l)
A	54.56	1 mg/l
B	67.67	0.5 mg/l
C	69.83	2 mg/l
D	78.00	Testigo

Fuente: elaboración propia

El anterior cuadro 16, nos muestra la comparación de promedios para inicio de la formación de raíz en días, para la aplicación de la hormona ácido indolacético; en base al análisis realizado y las comparaciones Duncan logra el menor tiempo en la formación de raíz la aplicación de 1 mg/l de ácido indolacético, con un promedio de 54.56 días desde el momento de la siembra, estadísticamente superior al resto. Con valores intermedios se encuentran los tratamientos de 0.5 mg/l y 2 mg/l con valores de 67.67 días y 69.83 días respectivamente esto con la aplicación de la misma hormona; en último lugar se tiene al grupo testigo que no recibió ningún tipo de hormona y que forma la raíz a los 78 días después de la siembra.

El efecto de las concentraciones de AIA en la formación de raíz se observó en los tratamientos que incluyeron 1 mg/l AIA; al aumentar la concentración de AIA por arriba de 1 mg/l, el número de días a la formación de raíz aumenta. A pesar de que se empleo este mismo regulador en cantidad inferior 0.5 mg/l esta cantidad no logro formar la raíz en menor tiempo, la tendencia observada indica que a mayor nivel de este regulador del crecimiento en el medio de cultivo, el periodo de formación de la raíz se extiende.

La formación de raíces adventicias en yemas nodales o adventicias es una etapa crítica en la propagación vegetativa de muchas especies vegetales, con cualquier método clásico de multiplicación o micropropagación. El re-establecimiento del sistema radicular de tejidos

sin meristemos preexistentes es a menudo estrictamente dependiente de la aplicación de auxina exógena. Sin embargo, las raíces formadas por tratamientos con auxina pueden ser malformadas o retardar su crecimiento (Klerk *et al*., 1999).

En el caso del testigo se evidencio la formación de raíz pero el periodo fue más prolongado con 78 días a la formación de la raíz; esto concuerda con lo manifestado por Casale y García, (1997) quien manifiesta que cuando el enraizamiento ocurre en tratamientos sin reguladores, se considera que la auxina no es necesaria para el enraizamiento, ni crecimiento de las raíces. Esto difiere de lo manifestado por Fitchet-Purnell (1993) que han reportado buenos resultados con la aplicación de 1 mg/ de AIA para inducir el enraizamiento

Capote *et al.* (2000) reconoció la capacidad de AIA en la formación de raíces en callos inducidos a partir de explantes y admiten que este evento morfogenético es indeseable en la etapa de inducción de callo, debido a que afecta el crecimiento óptimo del mismo.

La figura 10, nos muestra la comparación de promedios realizado para días a la formación de raíz en la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético; donde se aprecia que logra el menor tiempo en la formación de la raíz el tratamiento con 0.5 mg/l de la hormona bencil aminopurina y 0.5 mg/l de ácido indolacético, con un promedio de 60.82 días desde el momento de la siembra.

Los tratamientos que incluye 0.5 mg/l de BAP y 1 mg/l de AIA y 1 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AIA, estadísticamente son similares y logran producir raíces en un mismo periodo te tiempo estadísticamente hablando.

El resto de los tratamientos logran valores mayores, destacando que el tratamiento realizado con 2 mg/l de bencil aminopurina y 2 mg/l de ácido indolacético (a3*b3), no logró producir raíces debido a que este tratamiento presento formación de callos en todas sus unidades experimentales esto con relación a los otros tratamientos; en comparación el tratamiento empleado como testigo, acumulo un total de 78 días en la aparición de la raíz.

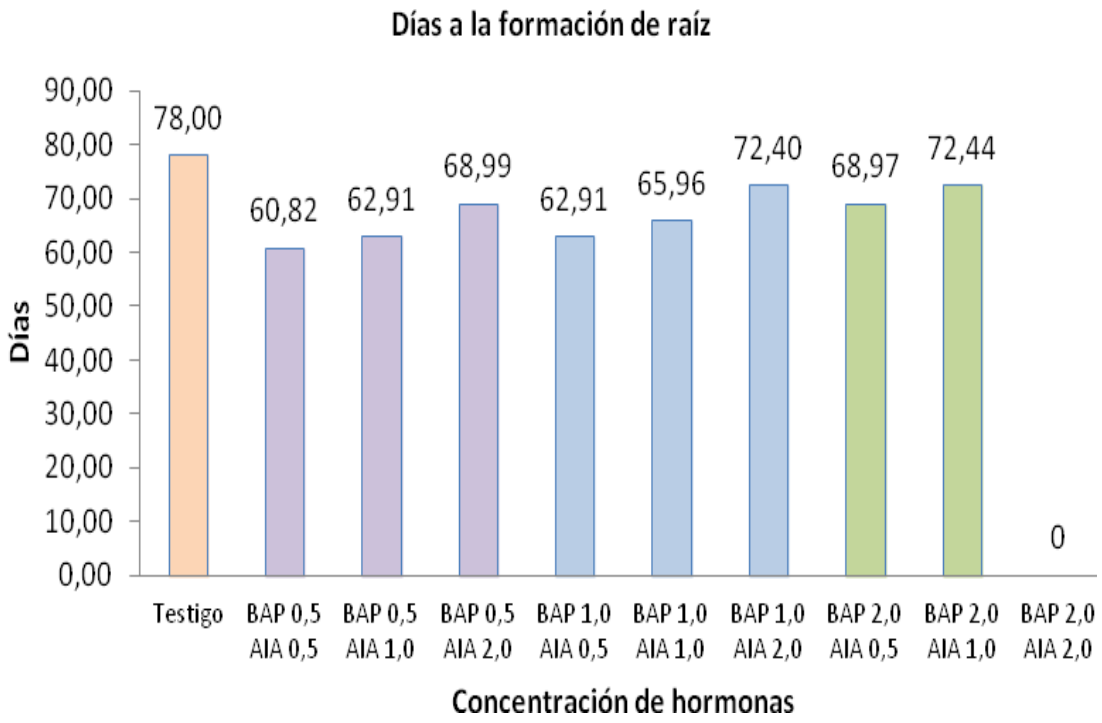


Figura 10. Comparación de promedios variable días a la formación de raíz, para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5%

Este comportamiento puede explicarse en que en cada especie existe un balance entre auxinas y citocininas para mantener el crecimiento y desarrollo de órganos; mientras las auxinas (como AIA) aumentan el tamaño de la célula, las citocininas incrementan el número de éstas.

Así mismo; esto se puede atribuir a que concentraciones elevadas, en el medio de cultivo de las hormonas empleadas (para el presente trabajo 2 mg/l); si bien estimulan y aceleran la división celular y generan mayor número células provoca la formación de callos, los cuales posteriormente no forman raíces.

Las combinaciones de auxinas y citocininas han demostrado contribuir con la proliferación in vitro de tejidos de callo en algunas especies. Montoya (1991), explica que además de los tipos de reguladores de crecimiento y las cantidades en que son suplementadas en el medio son las interacciones cuantitativas entre los reguladores de crecimiento presentes,

las que mayoritariamente proporcionan el mecanismo de regulación de los fenómenos morfogenéticos durante el cultivo in vitro.

Litz y Jarret (1991), afirman que la concentración de reguladores de crecimiento requeridos para la organogénesis puede variar de un tejido a otro dentro de la misma planta, o entre plantas de la misma especie, lo cual supone que la respuesta de un determinado explante puede variar de la respuesta de otro explante bajo las mismas concentraciones de hormonas o productos.

En algunos cultivos se obtuvieron callos y raíces en explantes foliares al ser establecidos en cultivos suplementados con ácido indolacetico (1.0 mg/l), esto en condiciones de luz como en oscuridad; se evaluaron las mismas concentración de ácido indolacetico combinada con diferentes citosinas; observando la formación de callos; cuando se combinaron 1.0 mg/l de ácido indolacetico con 1.0 mg/l bencil amino purina, formando también tallos y raíces en forma simultánea (Montoya, 1991). Estos resultados respaldan los datos obtenidos en el presente trabajo, comprobándose la influencia del AIA en combinación con BAP, en la inducción de callo y la formación de órganos adventicios, respectivamente.

Tisserat (1985), demostró que la producción de callos está íntimamente ligada a la adición de auxinas al medio de cultivo, y que este efecto podría verse potencializado por la adición conjunta de auxinas y citocininas en altas concentraciones en el mismo medio de cultivo.

Solange *et al* (2002), encontró que la ausencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo evitaba la formación de callos, comparado con medios suplementados con varias auxinas (2,4-D; IBA, AIA y ANA) en presencia de BAP, y observando que el mejor tratamiento para inducir callos en las diferentes especies es la combinación en igual proporción de AIA y BAP; pero no especifica las cantidades empleadas.

Krikorian (1991) reconoce que a pesar que en muchas especies vegetales puede inducirse la proliferación de tejido calloso y posteriormente la formación de brotes y raíces manipulando la relación auxina/citocinina aplicada exógenamente, no pueden

universalizarse dichos acontecimientos, especialmente en cuanto a la respuesta morfogenética del callo como consecuencia de la adición exógena de citocininas.

Esto presenta cierta concordancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo desde el punto de vista de la relación entre los reguladores de crecimiento, y el incremento de masa fresca de los callos proliferados con el tratamiento con 2 mg/l de bencil aminopurina y 2 mg/l de ácido indolacético (a3*b3).

Así mismo; algunos estudios señalan un efecto inhibitorio del explante sobre la ocurrencia de organogénesis cuando el callo originado se mantiene adherido a este (Litz y Jarret, 1991); los resultados obtenidos en el presente estudio afirman la anterior premisa puesto que la formación de los órganos regenerados en condiciones in vitro no ocurrió en los estados iniciales del proceso cuando el tejido de callo desarrollado y el explante se encontraban unidos en una misma estructura.

Adicionalmente, la separación del explante inicial del tejido calloso durante la etapa de multiplicación y posterior intento de regeneración no concluyeron con la formación de órganos al aplicarles el mismo tratamiento (2 mg/l de bencil aminopurina y 2 mg/l de ácido indolacético), una vez separados explante y callo. Por otra parte es posible que el tipo de explante utilizado durante el estudio tenga algún efecto sobre los resultados obtenidos ya que existen reportes que sugieren la posibilidad de lograr organogénesis cuando se utiliza tejidos foliares como explante inicial para trabajos in Vitro (Sivaram y Mukundan, 2003).

5.1.7. Número de raíces (NR)

Para la operacionalización de la variable se realizó la toma de datos desde el momento en que apareció la primera raíz hasta la conclusión del presente trabajo, se tomó a toda la cabellera radicular, para esto se empleó todas las muestras en la evaluación en periodos de dos días y en la fase inicial se empleó un estereoscopio, con los datos obtenidos se realizó un análisis ANVA (cuadro 4); éste reporto un coeficiente de variación de 12.57 % lo que muestra un manejo homogéneo de todas las unidades experimentales, así mismo nos muestra que existen diferencias altamente significativas a un 5% de probabilidad, para los

tratamientos aplicados con bencil aminopurina, ácido indolacético y para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético.

Los valores alcanzados durante el análisis ANVA, podrían atribuirse al efecto de las diferentes concentraciones de las hormonas empleadas durante el estudio que inciden en la formación de la raíz, sumado a esto el manejo que se realizó durante el desarrollo del brote al cambiar el tamaño de la planta; también se cambió el tamaño del contenedor para facilitar el desarrollo, además de la influencia del comportamiento propio de la especie que se halla determinada por las características genéticas y su respuesta a las condiciones del medio en el que se desarrollan.

En base a los resultados obtenidos del cuadro 4, se realizó la comparación de medias con la prueba de Duncan para los factores bencil aminopurina, ácido indolacético y la interacción para inicio de la formación de raíz y cuyos resultados se muestran en los siguientes cuadros.

Cuadro 17. Comparación de promedios para el número de raíces (días), para bencil aminopurina, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Bencil aminopurina (mg/l)
A	5.40	0.5 mg/l
B	4.42	1 mg/l
C	2.56	2 mg/l
D	2.50	Testigo

Fuente: elaboración propia

El cuadro 17, nos muestra la comparación de medias para el número de raíces en el cultivo in vitro de yacón, con la aplicación de bencil aminopurina; logra el mayor número de raíces la aplicación de 0.5 mg/l de la hormona con un promedio de 5.40 raíces por

planta, con valores intermedios se encuentran los tratamientos de 1 mg/l y 2 mg/l que alcanzan a 4.42 y 2.56 raíces por planta y en último lugar se tiene al grupo testigo que no recibió ningún tipo de hormona y logra un número de 2.5 raíces por planta.

El efecto de las concentraciones de AIA para el número de raíces se observó en los tratamientos que incluyeron 0.5 mg/l AIA; al aumentar la concentración de AIA por arriba de 0.5 mg/l, el número de raíces no aumenta. Y con concentraciones igual a 2 mg/l no se logró formar la raíz solo formaron callos, la tendencia observada indica que a mayor nivel de este regulador del crecimiento en el medio de cultivo, el número de raíces no se incrementa.

Esto se debe a que la concentración de ciertas cantidades de la hormona (bencil aminopurina), incita o estimulan la división celular y generan mayor número de estas provocando con ello la elongación, diferenciación y crecimiento del brote con la consiguiente formación de hojas y raíces, esto se relaciona con los manifestado por Flick y Jarret (1991), reporto que algunas veces puede darse la ocurrencia de organogénesis directa en explantes cultivados en medios que contengan únicamente citocinina ya que esta depende de los niveles endógenos de reguladores de crecimiento vegetal en el momento de la organogénesis.

Por los resultados alcanzados se puede apreciar que la presencia de citocininas en el medio de cultivo no garantiza la respuesta del callo hacia la formación de la raíces como ocurrió con el tratamiento que tenía 2 mg/l de BAP; donde la mayoría de las unidades experimentales formo callo sin desarrollar raíces durante todo el proceso. Lo anterior se halla relacionado con lo mencionado por Venkatachalam *et al.* (2007), que indica que las citoquininas (bencil aminopurina), son fitohormonas que intervienen principalmente en la promoción de la división celular, aunque el efecto pudiera variar según el estado de diferenciación de las células.

Lo cual presenta cierta concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo desde el punto de vista de la formación de raíces en el tratamiento testigo; pero discrepa con los resultados encontrados con concentraciones elevadas de la hormona (para el presente

caso 2 mg/l), donde la ocurrencia de formación de raíz fue minima y el periodo fue relativamente largo.

El cuadro siguiente nos muestra los resultados alcanzados durante la comparación de medias para la aplicación de ácido indolacético en tres niveles y la presencia de un tratamiento testigo para el número de raíces por planta.

Cuadro 18. Comparación de promedios variable número de raíces, para ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Ácido indolacético (mg/l)
A	5.30	0.5 mg/l
B	4.73	1 mg/l
C	2.56	2 mg/l
D	2.50	Testigo

Fuente: elaboración propia

El cuadro 18, nos muestra la comparación de promedios para el número de raíces por planta, para la aplicación de la hormona ácido indolacético; en base al análisis realizado y las comparaciones Duncan logra el mayor número la aplicación de 0.5 mg/l de ácido indolacético, con un promedio de 5.30 raíces por planta desde el momento del inicio de la formación de raíz hasta la finalización del presente trabajo.

Con valores intermedios se encuentran los tratamientos de 1 mg/l y 2 mg/l con valores de 67.67 días y 69.83 respectivamente y que resultan menores estadísticamente con la aplicación de la misma hormona; en último lugar se tiene al grupo testigo que no recibió ningún tipo de hormona y que formo 2.5 raíces.

Las concentraciones de AIA en el número de raíces se observó en los tratamientos que incluyeron 0.5 mg/l AIA; al aumentar la concentración de AIA por arriba de 0.5 mg/l, el número de días a la formación de raíz aumenta. A pesar de que se empleó este mismo regulador en cantidad superiores a 0.5 mg/l; esta cantidad no logro aumentar la cantidad de raíces, la tendencia observada indica que a mayor nivel de este regulador en el medio de cultivo, el número de raíces no aumenta y si la formación de callos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los de Matos *et al*. (1995), quienes obtuvieron callos y raíces en varias especies al ser establecidos sobre medios de cultivo suplementados con AIA (1.0 mg L-1) tanto en condiciones de luz como en oscuridad; en un segundo experimento, los mismos autores evaluaron la misma concentración de AIA combinada con kinetina (0.1 mg L-1) observando solo la formación de callos; sin embargo, cuando se combinaron 1.0 mg L-1 AIA con 1.0 mg L-1 BAP hubo formación tanto de callos, tallos y raíces en forma simultánea.

En el caso del testigo se evidencio la formación de raíz pero el periodo fue más prolongado con 78 días a la formación de la raíz; esto concuerda con lo manifestado por Casale y García (1997), quien manifiesta que cuando el enraizamiento ocurre en tratamientos sin reguladores, se considera que la auxina no es necesaria para el enraizamiento, ni crecimiento de las raíces. Esto difiere de lo manifestado por Fitchet-Purnell (1993), que han reportado buenos resultados con la aplicación de 1 mg.L-1 de AIA para inducir el enraizamiento

La formación de raíces adventicias en yemas nodales o adventicias es una etapa crítica en la propagación vegetativa de muchas especies vegetales, con cualquier método clásico de multiplicación o micropropagación. El re-establecimiento del sistema radicular de tejidos sin meristemos preexistentes es a menudo estrictamente dependiente de la aplicación de auxina exógena. Sin embargo, las raíces formadas por tratamientos con auxina pueden ser malformadas o retardar su crecimiento (Klerk *et al*., 1999).

Capote *et al.* (2000) reconoció la capacidad de AIA en la formación de raíces en callos inducidos a partir de explantes y admiten que este evento morfogenético es indeseable en la etapa de inducción de callo, debido a que afecta el crecimiento óptimo del mismo.

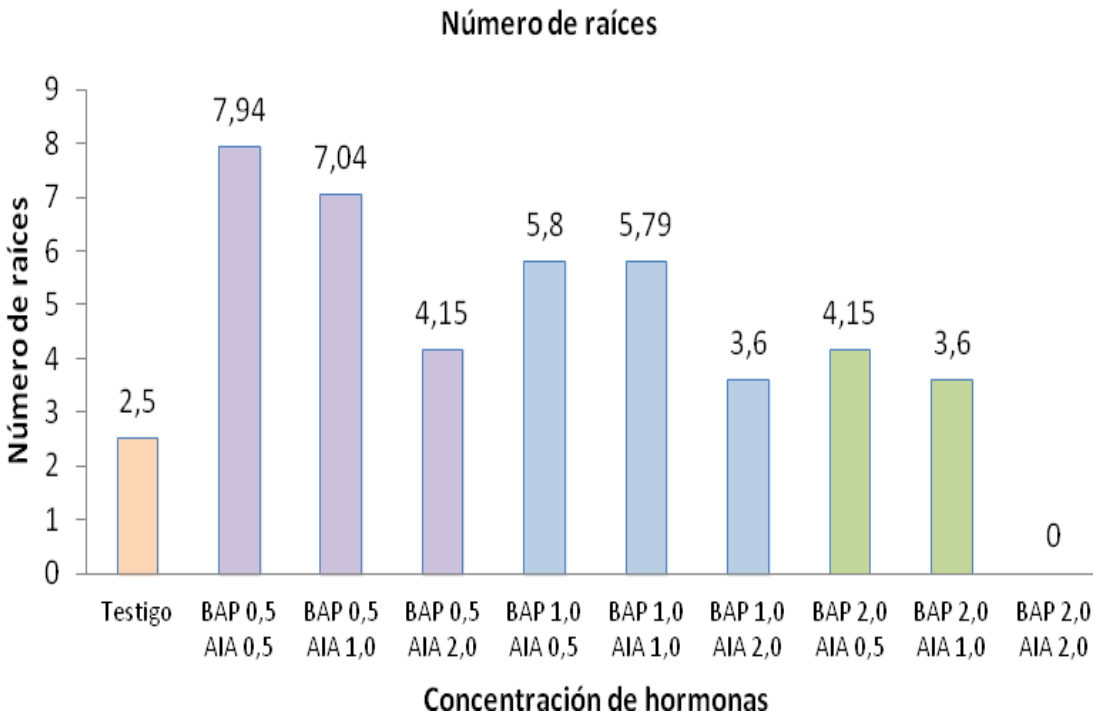


Figura 11. Comparación de promedios variable número de raíces, para la interacción bencil aminopurina*ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5%

La figura 11, nos muestra la comparación de promedios realizado para número de raíces por planta, en la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético; donde se aprecia que logra el menor tiempo en la formación de la raíz el tratamiento realizado con 1 mg/l de la hormona bencil amino purina y 1 mg/l de ácido indolacético (tratamiento a1b1), con un promedio de 7.94 raíces por planta.

El resto de los tratamientos logran valores mayores, destacando que el tratamiento realizado con 2 mg/l de bencil aminopurina y 2 mg/l de ácido indolacético (a3*b3), no logró producir raíces debido a que este tratamiento presento formación de callos en todas sus unidades experimentales esto con relación a los otros tratamientos; en comparación el tratamiento empleado como testigo, acumulo un total de 2.5 raíces por planta. El efecto de

las concentraciones de los reguladores de crecimiento en el número de raíces se observó el tratamiento que incluyo 1 mg/l AIA y 1 mg/l BAP; al modificar la concentración de AIA y BAP, por encima o debajo de esta cantidad, el número de raíces por planta disminuye, la tendencia observada nos muestra dicha aseveración.

Este comportamiento puede explicarse en que en cada especie existe un balance entre auxinas y citocininas para mantener el crecimiento y desarrollo de órganos; mientras las auxinas (como AIA) aumentan el tamaño de la célula, las citocininas incrementan el número de éstas permitiendo una mayor diferenciación. Las combinaciones de auxinas y citocininas han demostrado contribuir con la proliferación in vitro de tejidos de callo en algunas especies. Montoya (1991), explica que además de los tipos de reguladores de crecimiento y las cantidades en que son suplementadas en el medio son las interacciones cuantitativas entre los reguladores de crecimiento presentes, las que mayoritariamente proporcionan el mecanismo de regulación de los fenómenos morfogenéticos durante el cultivo in vitro.

Litz y Jarret (1991), afirman que la concentración de reguladores de crecimiento requeridos para la organogénesis puede variar de un tejido a otro dentro de la misma planta, o entre plantas de la misma especie, lo cual supone que la respuesta de un determinado explante puede variar de la respuesta de otro explante bajo las mismas concentraciones de hormonas o productos.

Matos *et al*. (1995), obtuvieron callos y raíces en explantes al ser establecidos sobre medios de cultivo suplementados con AIA (1.0 mg L-1) tanto en condiciones de luz como en oscuridad; en un segundo experimento, los mismos autores evaluaron la misma concentración de AIA combinada con diferentes citocinas (0.1 mg L-1) observando solo la formación de callos; sin embargo, cuando se combinaron 1.0 mg L-1 AIA con 1.0 mg L-1 BAP hubo formación tanto de callos, tallos y raíces en forma simultánea.

Tisserat (1985), demostró que la producción de callos está íntimamente ligada a la adición de auxinas al medio de cultivo, y que este efecto podría verse potencializado por la adición conjunta de auxinas y citocininas en altas concentraciones en el mismo medio de cultivo.

Estos resultados respaldan los datos obtenidos en el presente trabajo, comprobándose la influencia del AIA en combinación con BAP, en la inducción de callo y la formación de órganos adventicios, respectivamente.

Solange *et al* (2002), encontró que la ausencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo evitaba la formación de callos, comparado con medios suplementados con varias auxinas (2,4-D; IBA, AIA y ANA) en presencia de BAP, y observando que el mejor tratamiento para inducir callos en las diferentes especies es la combinación en igual proporción de AIA y BAP; pero no especifica las cantidades empleadas.

Krikorian (1991) reconoce que a pesar que en muchas especies vegetales puede inducirse la proliferación de tejido calloso y posteriormente la formación de brotes y raíces manipulando la relación auxina/citocinina aplicada exógenamente, no pueden universalizarse dichos acontecimientos, especialmente en cuanto a la respuesta morfogenética del callo como consecuencia de la adición exógena de citocininas. Asi mismo; la ausencia de organogénesis a partir de callo es frecuente en varias especies, especialmente en aquellas consideradas recalcitrantes para el cultivo in vitro (Yaya *et al*., 2005).

Esto presenta cierta concordancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo desde el punto de vista de la relación entre los reguladores de crecimiento, y el incremento de masa fresca de los callos proliferados con el tratamiento con 2 mg de bencil aminopurina y 2 mg de ácido indolacético (a3*b3); algunos estudios señalan un efecto inhibitorio del explante sobre la ocurrencia de organogénesis cuando el callo originado se mantiene adherido a este (Litz y Jarret, 1991); los resultados obtenidos en el presente estudio afirman la anterior premisa puesto que la formación de los órganos regenerados en condiciones in vitro no ocurrió en los estados iniciales del proceso cuando el tejido de callo desarrollado y el explante se encontraban unidos en una misma estructura.

Por esta razón adicionalmente, se realizó la separación del explante inicial del tejido calloso durante la etapa de multiplicación en el presente trabajo y se procedió posteriormente a la regeneración, éste no concluyo con la formación de órganos al

aplicarles el mismo tratamiento (2 mg/l de bencil aminopurina y 2 mg/l de ácido indolacético), una vez separados explante y callo.

Por otra parte es posible que el tipo de explante utilizado durante el estudio tenga algún efecto sobre los resultados obtenidos ya que existen reportes que sugieren la posibilidad de lograr organogénesis cuando se utiliza tejidos foliares como explante inicial para trabajos in Vitro (Sivaram y Mukundan, 2003).

5.1.8. Largo de raíz (LR)

Para la operacionalización de la variable se realizó la toma de datos desde el momento en que apareció la primera raíz hasta la conclusión del presente trabajo, se tomó a la raíz más larga de toda la cabellera radicular se midió en mm, para esto se empleo todas las muestras en la evaluación, en periodos de dos días y en la fase inicial se empleo un estereoscopio, con los datos obtenidos se realizó un análisis ANVA (cuadro 4), el cual reporto un coeficiente de variación de 13.01 % lo que muestra un manejo homogéneo de todas las unidades experimentales, así mismo nos muestra que existen diferencias altamente significativas a un 5% de probabilidad, para los tratamientos aplicados con bencil aminopurina, ácido indolacético y para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético.

Los valores alcanzados durante el análisis ANVA, podrían atribuirse al efecto de las diferentes concentraciones de las hormonas empleadas durante el estudio que inciden en la formación de la raíz, sumado a esto el manejo que se realizo durante el desarrollo del brote al cambiar el tamaño de la planta; también se cambió el tamaño del contenedor para facilitar el desarrollo, además de la influencia del comportamiento propio de la especie que se halla determinada por las características genéticas y su respuesta a las condiciones del medio en el que se desarrollan.

En base a los resultados obtenidos del cuadro 4, se realizó la comparación de medias con la prueba de Duncan para los factores bencil aminopurina, ácido indolacético y la

interacción para inicio de la formación de raíz y cuyos resultados se muestran en los siguientes cuadros.

Cuadro 19. Comparación de promedios para longitud de raíz (días), para bencil aminopurina, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Bencil aminopurina (mg/l)
A	61.4	0.5 mg/l
B	53.11	1 mg/l
C	41.0	Testigo
D	36.48	2 mg/l

Fuente: elaboración propia

El cuadro 19, nos muestra la comparación de medias para el número de raíces en el cultivo in vitro de yacón, con la aplicación de bencil aminopurina; logra el mayor largo de raíz la aplicación de 0.5 mg/l de la hormona con un promedio de 61.4 mm, con valor intermedio se encuentra el tratamiento de 1 mg/l que alcanzan una longitud de 53.11 mm; luego se ubica el tratamiento testigo que no recibió ningún tipo de hormona y logra un largo de 41.0 mm y en último lugar se halla la aplicación de 2 mg/l con solo 36.46 mm.

Lo anterior se halla relacionado con lo mencionado por Venkatachalam *et al.* (2007), que indica que las citoquininas (bencil aminopurina), son fitohormonas que intervienen principalmente en la promoción de la división celular, aunque el efecto pudiera variar según el estado de diferenciación de las células.

El efecto de las concentraciones de BAP para la longitud de raíz se observó el tratamiento que incluyeron 0.5 mg/l BAP; al aumentar la concentración de BAP por encima de 0.5 mg/l, la longitud de raíz disminuye y con concentraciones igual a 2 mg/l se obtuvo menores longitudes y la formaron callos, la tendencia observada indica que a mayor nivel de esta hormona de crecimiento en el medio de cultivo, la longitud de raíz decrece.

Flick *et al*. (1983) reporto que algunas veces puede darse la ocurrencia de organogénesis directa en explantes cultivados en medios que contengan únicamente citocinina ya que esta depende de los niveles endógenos de reguladores de crecimiento vegetal en el momento de la organogénesis, esto presenta cierta concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo desde el punto de vista de la formación de raíces en el tratamiento testigo; pero discrepa con los resultados encontrados con concentraciones elevadas de la hormona (para el presente caso 2 mg/l), donde la ocurrencia de formación de raíz fue minima y el periodo fue relativamente largo.

Esto concuerda con lo manifestado por Pérez (1998), que señala que en la etapa de enraizamiento, es importante obtener un mayor número de raíces, aún de poca longitud, ya que las plantas obtenidas de cultivo *in vitro* requieren de un buen sistema radicular (mayor número de raíces) para tener éxito en transplante y adaptación a condiciones de invernadero, a diferencia de otras especies que son propagadas convencionalmente en forma asexual y que no requieren de raíces o muy pocas para ser transplantadas a sustrato.

El cuadro siguiente nos muestra los resultados alcanzados durante la comparación de medias para la aplicación de ácido indolacético en tres niveles y la presencia de un tratamiento testigo para el número de raíces por planta.

Cuadro 20. Comparación de promedios variable longitud de raíz (mm), para ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Ácido indolacético (mg/l)
A	59.31	0.5 mg/l
B	55.37	1 mg/l
C	40.46	Testigo
D	36.88	2 mg/l

Fuente: elaboración propia

El cuadro 20, nos muestra la comparación de promedios para la variable longitud de raíz por planta, para la aplicación de la hormona ácido indolacético; en base al análisis realizado y las comparaciones Duncan logra la mayor longitud la aplicación de 0.5 mg/l de ácido indolacético por litro, con un promedio de 59.31 mm por planta desde el momento del inicio de la formación de raíz hasta la finalización del presente trabajo. Con un valor intermedio se encuentran el tratamiento de 1 mg/l que alcanza una longitud de 55.37 mm, con valores inferiores estén el tratamiento testigo que no recibió ningún tipo de hormona y que logro 40.46 mm en longitud de raíz; así mismo, la longitud menor se tiene con la aplicación de 2 mg/l que alcanza solo 36.88 mm de longitud de raíz.

Por lo anteriormente detallado el efecto de las concentraciones de AIA en la longitud de raíz, se observó en los tratamientos que incluyeron 0.5 mg/l AIA; al aumentar la concentración de AIA por arriba de 0.5 mg/l, el número de días a la formación de raíz aumenta. A pesar de que se empleó este mismo regulador en cantidad superiores a 0.5 mg/l; esta cantidad no logro provocar mayor elongación radicular, la tendencia observada indica que a mayor nivel de este regulador en el medio de cultivo, la longitud de raíz tiende a decrecer y estimula la formación de callos.

Si bien los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los de Matos *et al* (1995), quienes obtuvieron callos y raíces en varias especies al ser establecidos sobre medios de cultivo suplementados con AIA (1.0 mg/l) tanto en condiciones de luz como en oscuridad; y al ser combinada con 1.0 mg/l BAP hubo formación tanto de callos, tallos y raíces en forma simultánea, en el presente trabajo se logró mejores resultados con concentraciones inferiores. Esto difiere de lo manifestado por Fitchet-Purnell (1993), que han reportado buenos resultados con la aplicación de 1 mg/l de AIA para inducir el enraizamiento.

En el caso del testigo se evidencio la formación de raíz y la elongación de la misma que supero incluso a la aplicación de 2 mg/l de la hormona; esto concuerda con lo manifestado por Casale y García, (1987), quien manifiesta que cuando el enraizamiento ocurre en tratamientos sin reguladores, se considera que la auxina no es necesaria para el enraizamiento, ni crecimiento de las raíces.

La formación de raíces adventicias en yemas nodales o adventicias es una etapa crítica en la propagación vegetativa de muchas especies vegetales, con cualquier método clásico de multiplicación o micropropagación. El re-establecimiento del sistema radicular de tejidos sin meristemos preexistentes es a menudo estrictamente dependiente de la aplicación de auxina exógena. Sin embargo, las raíces formadas por tratamientos con auxina pueden ser malformadas o retardar su crecimiento (Klerk *et al*., 1999).

Capote *et al.* (2000) reconoció la capacidad de AIA en la formación de raíces en callos inducidos a partir de explantes y admiten que este evento morfogenético es indeseable en la etapa de inducción de callo, debido a que afecta el crecimiento óptimo del mismo.

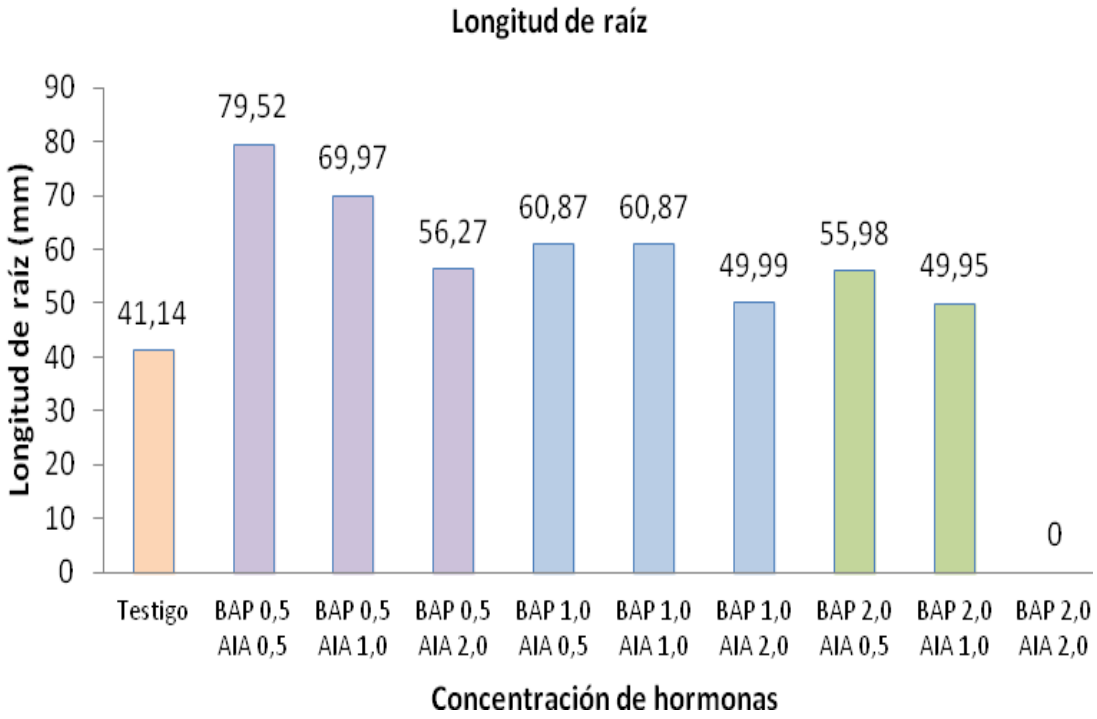


Figura 12. Comparación de promedios variable longitud de raíz (mm), para la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético, según la prueba de Duncan al 5%

La figura 12, nos muestra la comparación de promedios realizado para la longitud de raíz por planta, en la interacción bencil aminopurina por ácido indolacético; donde se aprecia que logra la mayor longitud de raíz el tratamiento realizado con 1 mg/l de la hormona

bencil amino purina y 1 mg/l de ácido indolacético (tratamiento a1b1), con un promedio de 79.52 mm por planta.

El resto de los tratamientos logran valores menores, destacando que el tratamiento realizado con 2 mg/l de bencil aminopurina y 2 mg/l de ácido indolacético (a3*b3), no logró producir raíces debido a que este tratamiento presento formación de callos en todas sus unidades experimentales esto con relación a los otros tratamientos; en comparación el tratamiento empleado como testigo, acumulo una longitud total de 41.14 mm por planta.

El efecto de las concentraciones de los reguladores de crecimiento en el número de raíces se observó el tratamiento que incluyo 1 mg/l AIA y 1 mg/l BAP; al modificar la concentración de AIA y BAP, por encima o debajo de esta cantidad, la longitud de raíz por planta disminuye, la tendencia observada nos muestra dicha aseveración.

Este comportamiento puede explicarse en que en cada especie existe un balance entre auxinas y citocininas para mantener el crecimiento y desarrollo de órganos; mientras las auxinas (como AIA) aumentan el tamaño de la célula, las citocininas incrementan el número de éstas permitiendo una mayor diferenciación.

Las combinaciones de auxinas y citocininas han demostrado contribuir con la proliferación in vitro de tejidos de callo en algunas especies. Montoya (1991), explica que además de los tipos de reguladores de crecimiento y las cantidades en que son suplementadas en el medio son las interacciones cuantitativas entre los reguladores de crecimiento presentes, las que mayoritariamente proporcionan el mecanismo de regulación de los fenómenos morfogenéticos durante el cultivo in vitro.

Litz y Jarret (1991), afirman que la concentración de reguladores de crecimiento requeridos para la organogénesis puede variar de un tejido a otro dentro de la misma planta, o entre plantas de la misma especie, lo cual supone que la respuesta de un determinado explante puede variar de la respuesta de otro explante bajo las mismas concentraciones de hormonas o productos.

Matos *et al*. (1995), obtuvieron callos y raíces en explantes al ser establecidos sobre medios de cultivo suplementados con AIA (1.0 mg L-1) tanto en condiciones de luz como en oscuridad; en un segundo experimento, los mismos autores evaluaron la misma concentración de AIA combinada con diferentes citocinas (0.1 mg L-1) observando solo la formación de callos; sin embargo, cuando se combinaron 1.0 mg L-1 AIA con 1.0 mg L-1 BAP hubo formación tanto de callos, tallos y raíces en forma simultánea. Estos resultados respaldan los datos obtenidos en el presente trabajo, comprobándose la influencia del AIA en combinación con BAP, en la inducción de callo y la formación de órganos adventicios, respectivamente.

Solange *et al* (2002), encontró que la ausencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo evitaba la formación de callos, comparado con medios suplementados con varias auxinas (IBA, AIA y ANA) en presencia de BAP, y observando que el mejor tratamiento para inducir callos en las diferentes especies es la combinación en igual proporción de AIA y BAP; pero no especifica las cantidades empleadas.

Krikorian (1991) reconoce que a pesar que en muchas especies vegetales puede inducirse la proliferación de tejido calloso y posteriormente la formación de brotes y raíces manipulando la relación auxina/citocinina aplicada exógenamente, no pueden universalizarse dichos acontecimientos, especialmente en cuanto a la respuesta morfogenética del callo como consecuencia de la adición exógena de citocininas.

Esto presenta cierta concordancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo desde el punto de vista de la relación entre los reguladores de crecimiento, y el incremento de masa fresca de los callos proliferados con el tratamiento con 2 mg/l de bencil aminopurina y 2 mg/l de ácido indolacético (a3*b3).

Así mismo; algunos estudios señalan un efecto inhibitorio del explante sobre la ocurrencia de organogénesis cuando el callo originado se mantiene adherido a este (Litz y Jarret, 1991); los resultados obtenidos en el presente estudio afirman la anterior premisa puesto que la formación de los órganos regenerados en condiciones in vitro no ocurrió en los

estados iniciales del proceso cuando el tejido de callo desarrollado y el explante se encontraban unidos en una misma estructura.

Por esta razón adicionalmente, se realizó la separación del explante inicial del tejido calloso durante la etapa de multiplicación en el presente trabajo y se procedió posteriormente a la regeneración, éste no concluyo con la formación de órganos al aplicarles el mismo tratamiento (2 mg/l de bencil aminopurina y 2 mg/l de ácido indolacético), una vez separados explante y callo.

Por otra parte es posible que el tipo de explante utilizado durante el estudio tenga algún efecto sobre los resultados obtenidos ya que existen reportes que sugieren la posibilidad de lograr organogénesis cuando se utiliza tejidos foliares como explante inicial para trabajos in Vitro (Sivaram y Mukundan, 2003).

5.1.9. Porcentaje de contaminación

En la realización del presente trabajo los hongos contaminantes correspondieron a los géneros: *Aspergillus, Cladosporium, Curvularia,Fusarium, Helminthosporium, Penicillium* y *Rhizoctonia.* La descripción de los hongos se señala en el cuadro 21. Los hongos *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. *Alternaria* sp.en conjunto generaron un 8,9 % de explantes contaminados y los hongos *Fusarium* sp., *Rhizoctonias* sp. Y *Cladosporium* sp. presentaron el mayor porcentaje 10,0 %, considerándose los hongos con mayor predominación.

Estos resultados son análogos a los encontrados por Yañez *et al* (2006), quienes detectaron los hongos *Alternaria* sp.y *Rhizopus* sp. durante el cultivo *in vitro* de apéndices caulinares. Trabajos realizados en cultivo *in vitro* de yemas de cultivos de raíz registraron los hongos *Aspergillus* sp. y *Cladosporium* sp. como los predominantes. (Borges *et al.* 2005), detectaron los hongos *Fusarium* sp. *Botryodiplodia* sp. *Alternaria* sp. y *Aspergillus* sp. durante el cultivo de ápices de racacha.

Sin embargo, contrastan con los observados por Viloria (2003), quien indicó al hongo *Fusarium* sp. como el microorganismo que predominó en los segmentos de diferentes especies cultivadas en condiciones *in vitro* y en menor cuantía a otros tales como: *Aspergillus* sp. *Penicillium.* sp. *Curvularia* sp., *Syncephalastrum* sp en diferentes cultivos de raíz. Estas diferencias pueden estar afectadas por el momento o época de recolección del material vegetal y a la técnica de desinfección superficial utilizada. Lo anterior se fundamenta en el hecho que durante la época lluviosa se ha registrado en otros cultivos que los porcentajes de contaminación son altos, lo cual coincide con lo indicado por Amin y Jaiswal (2003), quienes señalaron que la época del año tiene influencia sobre la contaminación de los explantes, ya que durante los meses secos encontraron menor contaminación.

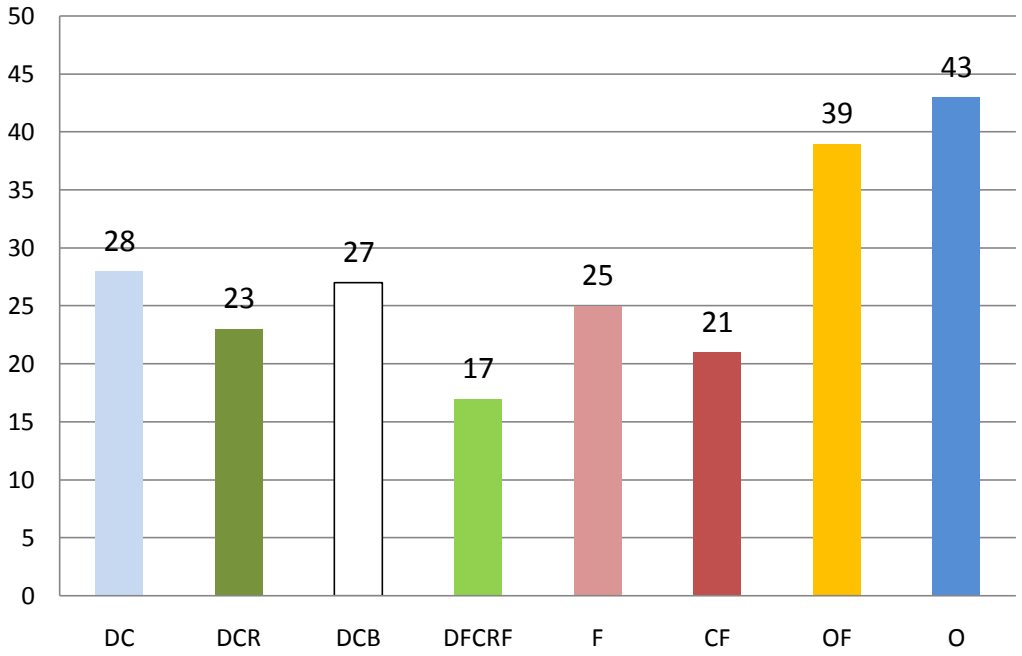


Figura 13. Número de plantas que presentaron crecimiento anormal en el cultivo de yacón en condiciones *in vitro*.

DC: Desarrollo y formación de callo; DCR: Desarrollo con formación de raíz y callo; DCB: Desarrollo con formación de callo y presencia de brotes; DFCRF: Desarrollo con formación de callo raíz y presencia de hongos; F: Presencia de hongos; CB: Presencia de callo y hongo; OF: Oxidación y hongos; O: Oxidación.

En relación a la desinfección superficial utilizada en el presente trabajo, también podría haber diferencias con respecto a los contaminantes presentes, ya que no todos los

desinfectantes superficiales permiten remover en igual forma las bacterias y hongos exógenos en el explante. Los contaminantes pueden estar en la superficie o en el interior, o en ambas partes. Los internos son más difíciles de eliminar que los externos, requiriéndose la inclusión de fungistáticos o antibióticos en el medio y de otras técnicas que permitan disminuir su presencia como se hizo en el presente estudio.

Cuadro 21. Descripción de los hongos detectados e identificados durante el cultivo *in vitro* del yacón (*Smallanthus sonchifolius*).

Hongo	Descripción del hongo
Aspergillus sp.	Conidioforos erectos, simples, terminando en un ensanchamiento, globoso o clavado, presentando fialides en el ápice o en toda la superficie; conidios (fialoesporas) unicelulares, globosa, a menudo de variados colores en masa, en cadenas secas basipetalas.
Cladosporium sp.	Conidioforos largos, oscuros, erectos, ramificados en el ápice, simples o agrupados; conidios (blastoporas) oscuras, de 1-2 células, variables en forma y tamaño, ovoides a cilíndricas e irregulares, algunas típicamente en forma de limón.
Curvularia sp.	Conidioforos marrones, simples, con esporas apicales o en nuevos puntos de crecimiento simpodiales; conidios (poroesporas) oscuras, células terminales claras, de 3-5 células, más o menos fusiformes, típicamente curvadas, con una de las células centrales más alargada.
Fusarium sp.	Micelio extensivo y algodonoso en medios de cultivo, a menudo con una coloración rosada, púrpura o amarilla, en el medio o en el micelio; conidioforos variables, simples y suaves, o rígidos, cortos, ramificados irregularmente o presentando un conjunto de fialides simples o agrupados en un esporodoquio; conidios (fialoesporas) hialinos, variables, principalmente de dos tipos, a menudo formadas en pequeñas cabezuelas húmedas. Macroconidios con varias células ligeramente curvadas o dobladas en los extremos, típicamente en forma de canoa; microconidios unicelulares ovoides u oblongos, individuales o en cadenas; algunos conidios intermedios, de 2-3 células, oblongos o ligeramente curvados.
Helminthosporium sp	Micelio oscuro, estroma a menudo presente; conidioforos simples o en grupos, altos, erectos, marrones; conidios (poroesporas) creciendo lateralmente a través de poros debajo de los septos mientras que el ápice continúa desarrollándose, a veces en conjuntos o individuales, subhialinos a marrón, obclavado, fragmoesporas, seudoseptadas, con una cicatriz basal prominente.
Alternaria sp.	Conidioforos oscuros, generalmente simples, cortos o elongados, típicamente con conidios (poroesporas) oscuras, típicamente con septos longitudinales o transversales; de forma variada, obclavados a elípticos, u ovoides, frecuentemente formados acropetalmente en cadenas largas; en algunas instancias formados individualmente y presentando un apéndice apical simple o ramificado.

Fuente: elaboración propia

Al respecto, Borges *et al.* (2005), encontraron que en la época seca lograron retardar la presencia de los contaminantes durante el establecimiento *in vitro* de ápices de yuca, al agregar fungicidas y antibióticos en el medio de cultivo, así mismo; señalan que las irregularidades presentes en la superficie del explante pueden servir de depósito de los contaminantes como, los cuales afectarían el éxito de la desinfección superficial si los productos no logran llegar y desinfectar esas áreas microscópicas.

En el presente trabajo el no aplicar antioxidantes no tuvo un efecto marcado en la sobrevivencia de los explantes de yacón, realizándose solo trabajos de regulación de la intensidad lumínica en la cual se desarrolló logrando con esto un mayor número de plantas sobrevivientes. Sobre el tema de acuerdo con George y Sherrington (2000), la aplicación de antioxidantes no previene la oxidación, sino que la función de estos es la de realizar la rápida remoción de cualquier quinona que se forma durante el desarrollo del cultivo.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Sánchez y Cuevas (2001), quienes lograron obtener los mejores resultados de sobrevivencia de 80% de explantes de pimentero, libres de oxidación, con la adición de PVP (0,5 y 1,0 g/l) en presencia de luz.

De acuerdo con Davies y Creasy, citados por George y Sherington (2000), las enzimas involucradas en la biosíntesis y la oxidación de fenoles se incrementan con la luz, por lo que es conveniente mantener los explantes en la oscuridad unos días antes de pasarlos a una intensidad lumínica baja.

En este trabajo, los resultados indicaron que la sobrevivencia de los explantes se incrementó en ausencia de luz, con o sin la adición de antioxidantes. Así mismo, a pesar de George y Sherrington (2000), indican que en ápices de algunos cultivos la adición de la poliamida PVP fue esencial para la sobrevivencia de los explantes, al remover los componentes fenólicos, en el yacón la mortalidad de los explantes fue baja. Por último, no es frecuente observar oxidación de tejidos de otros cultivo y son pocos los cultivares que presentan ennegrecimiento (Villalobos y Pérez, 1991).

Cuadro 22. Desarrollo de las yemas de yacón en los diferentes tratamientos 90 días después de la siembra expresado en porcentajes

Tratamiento	Nº Vasos	Nº PDN	Nº DC	Nº DCR	Nº DCB	Nº DFCRF	Nº F	Nº CF	Nº OF	Nº O
Testigo	100	75	3	3	3	2	3	2	6	3
BAP 0,5+AIA 0,5	100	92	1	0	0	0	1	0	2	4
BAP 0,5+AIA 1,0	100	88	4	2	5	2	3	3	3	5
BAP 0,5+AIA 2,0	100	71	3	4	3	1	3	3	3	8
BAP 1,0+AIA 0,5	100	84	4	3	3	3	2	2	4	4
BAP 1,0+AIA 1,0	100	85	3	2	4	2	3	2	4	2
BAP 1,0+AIA 2,0	100	73	3	3	3	2	2	2	4	8
BAP 2,0+AIA 0,5	100	80	2	3	2	2	2	3	4	6
BAP 2,0+AIA 1,0	100	76	2	3	2	3	3	2	4	5
BAP 2,0+AIA 2,0	100	73	3	0	3	0	3	2	5	11
Total	**1000**	**777**	**28**	**23**	**27**	**17**	**25**	**21**	**39**	**43**

PDN: Plantas con desarrollo normal; DC: Desarrollo con formación de callo; DCR: Desarrollo con formación de raíz y callo; DCB: Desarrollo con formación de callo y presencia de brotes; DFCRF: Desarrollo con formación de callo raíz y presencia de hongos; F: Presencia de hongos; CB: Presencia de callo y hongo; OF: Oxidación y hongos; O: Oxidación.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1. Conclusiones

En base a los resultados alcanzados en la realización del presente trabajo se llegaron a las siguientes conclusiones:

1) El material genético empleado en el presente estudio fue recolectado en la zona de Toriri, comunidad que pertenece al cantón Licoma del municipio de Villa Libertad de Licoma, provincia Inquisivi del departamento de La Paz, consto de rizóforos de 20 a 30 cm, fue sometido a un proceso de desinfección durante el proceso de colecta, luego sometidos a un proceso de aclimatación, material del que posteriormente se obtuvieron esquejes de 15 cm de longitud; para su introducción al proceso de *in vitro*, fueron sometidos a un choro continuo de agua por espacio de 5 minutos y posteriormente desinfectados con etanol al 70 % y la aplicación de hipoclorito al 3 %, de este material, se tomaron muestras de 5 a 10 mm, que fueron sometidas a un nuevo proceso de desinfección y posteriormente sembradas en el medio de cultivo.

2) La aplicación de bencil aminopurina con ácido indolacético en una concentración de 0,5 mg/l para cada uno de estos; logra los mejores promedios en las variables porcentaje de prendimiento con un valor de 88.28 %; días al formación del brote con un promedio de 9.71 días; número de brotes por explante con 5.27; largo de hoja con 48.18 mm; 60.82 días para la formación de raíz; 7.94 raíces por planta y un largo promedio de 79.52 mm. Solo con el tratamiento de BAP 0.5 mg/l y AIA 1.0 mg/l logra el mayor valor en número de hojas.

3) Los peores resultados se lograron con los tratamientos que fueron realizados con BAP 20 mg/l y AIA 2.0 mg/l, y el tratamiento testigo que no uso ningún tipo de hormona; en las variables días a la formación de raíz, número de raíces y longitud de raíz; variable en la cual el tratamiento con concentraciones de 2.0 mg/l de BAP y AIA no logran respuesta.

4) Se observó en la realización del presente trabajo que los hongos contaminantes correspondieron a los géneros: *Aspergillus, Cladosporium, Curvularia, Fusarium, Helminthosporium, Penicillium* y *Rhizoctonia*, así mismo; los hongos *Cladosporium*

sp., *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. en conjunto generaron un 18,9 % de daños en los explantes; para el caso de oxidación su porcentaje fue de 4,3 %, en conjunto generan una pérdida del 23.2 %.

5) Se determinó que el desarrollo de un protocolo para evaluar el crecimiento *in* vitro del yacón gira en torno al proceso de desinfección y aplicación de hormonas y que requiere ser ampliado a la diversificación de otros compuestos que aceleren el crecimiento morfológico de esta especie y reduzca las perdidas por contaminación.

6.2. Recomendaciones

1) Se recomienda continuar con el proceso de establecimiento en campo de los plantines obtenidos en el presente trabajo para determinar sus características productivas y desarrollo de enfermedades bajo condiciones de producción.

2) Si bien durante la realización del presente trabajo no se hizo empleo de productos destinados a prevenir el proceso de oxidación es necesario llevar adelante estudios con su aplicación esto con el fin de reducir los porcentajes de pérdida por este suceso durante el proceso de reproducción.

3) Es necesario realizar estudios de aplicación de diversos fungicidas y antibióticos para el control de enfermedades fúngicas y bacterianas que podrían desarrollase, ya sea en laboratorio o en campo durante el proceso de reproducción, para este cultivo.

4) Finalmente, se recomienda proseguir estudios con la aplicación de otras hormonas (sintéticas y naturales), y otras concentraciones con el fin de lograr un protocolo adaptable a diferentes condiciones y al proceso de multiplicación.

BIBLIOGRAFIA

ABDELNOUR, A y ESCALANT, J. 1999. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Cartago, Costa Rica. Editorial del CATIE. 38 p.

ALTUNA, B.; ACOSTA, C. 2005. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

AMES DE ICOCHEA, T. 1997. Enfermedades fungosas y bacterianas de raíces y tubérculos andinos. Centro Internacional de la Papa. Lima Perú. 172 p.

AMIN, W.; JAUWAL, F. 2003. Culture. Techniques for Micropropagation and Breeding. Macmillan Publishing. USA. 1: 82-123.

ARAYA, J. 2006. Establecimiento *in vitro* de cuatro variedades de caña de azúcar a partir de explantes foliares y yemas axilares. Tesis Ingeniero Agrónomo, Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. Pp22.

AZCON, T. TALLO, I. 1993. Propagación in vitro de *Stevia rebaudiana* BERT. (Asteraceae-Eupatorieae) a través de organogénesis. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela

BARCELÓ Sánchez, D.; HUAMANÍ, K.; PASCUAL, E.; SÁNCHEZ, H. Y ESTRADA, R. 1980. Fisiología vegetal. Editorial Pirámide

BARTHELEMY, R. DAWSON, J. LEE, A. (1977) Técnicas para el laboratorio de biología. Compañía Editorial Continental

BIDWELL, R. G. S. 1993. Fisiología vegetal. AGT Editor. México, D. F.

BORGES, R.; URIZAR, M., FLORES R. Y RODRÍGUEZ E. 2005. Adaptación de un método de embriogénesis somática para la regeneración de embriones asexuales de pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder). CONCYT.

BOHM, L. 2000. Micropropagación in vitro de Arracacia. Tesis para optar al

título de Ingeniero Agrónomo Universidad Católica de Valparaíso,
Escuela de Agronomía Quillota Chile. 117 p.

BRACK, A**.** 2008 La Biodiversidad como una fuente y oportunidad de bionegocios. Universidad Nacional de la Amazonía. Perú.

BRAVO, F. 1997. Desarrollo de un sistema de cultivo in vitro para los explantes nodales de caoba (*Swietenia macrophylla* King.). Tesis MSc. Centro Agronómico Tropical de investigación y enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica, 1997.

CAMBARA, P. 1998. Evaluación de la respuesta de tres variedades de caña de azúcar (Saccharum sp.) a la propagación in vitro, utilizando explantes apicales y dos sustancias antioxidantes. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 45p.

CAPDEVIELLE, F.; CASTILLO, A. 2004. Un sistema de apoyo para el sector agrobiotecnológico de Uruguay, junio 2004, I Seminario de Arándanos y Frambuesas, Uruguay

CAPOTE, A. 2000 Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. Revista Oficial de INASE, Nº 6

CASTILLO. P.; MÁRQUEZ, J.; RUBLUO, A.; HERNANDEZ, G. AND LARA, M. 2000, Plant regeneration from callus and suspension cultures of *Valeriana edulis* ssp. *procera* via simultaneous organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant Sci.***, 151**, 115-119.

CASTILLO, G. 2004. Desarrollo de Métodos Cromatográficos para la Determinación de Giberelinas y Auxinas para el estudio de su Biosíntesis. Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad de la Habana.

CIZA DE LION P. 1999. Crónicas del Perú y Descripción de Smallanthus sonchifolius. Universidad Católica de Perú y la Academia de Historia. Segunda edición. Lima Perú.

CHANG A, KLINAR S, JAIME S. 2000. Evaluación de la actividad antioxidante de *Polimnia sonchifolia* “yacón”.

DALLA, M. 1999. La Biotecnología aplicada a la producción de ajo. Revista oficial de INIASE. Pp 3-20.

DAQUINTA, P. 1998. Estudios de condiciones óptimas para la regeneración in vitro de *Swietenia macrophylla* King (caoba).Trabajo Especial de Grado. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela, 1990.

DE LA CRUZ, G. 2007. "Cultivo in vitro de anteras de papa *Solanum tuberosum* e inducción callogénica, BOLETIN INFORMATIVO AYACUCHO – PERÚ. 28pp.

DIVO DE SESAR, M. 2005. Integración de estudios fisiológicos, histológicos y bioquímicos realizados durante el enraizamiento, rustificación y crecimiento posterior de especies de interés agronómico suplementadas con citoquininas. Disponible en divomart@agro.uba.ar

DOSTERT, N.; ROQUE, J.; CANO, A.; LA TORRE M.; WEIGEND, M. 2009. Hojas Botánicas: Yacón – *Smallanthus sonchifolius*. Américas pp 20- 25.

FAO. 2008. Manual de intercambio y propagación de germoplasma a través de micro bulbillos. Santiago de Chile. 45pp.

FAO. 1994. Memoria - Consulta de expertos sobre productos forestales no madereros para América Latina y el Caribe. SERIE FORESTAL N° 1 Santiago de Chile http://www.fao.org/docrep/T2354S/t2354s0c.htm#perú

FERNÁNDEZ C., PÉREZ V., ROBLES CH, VIEHMANNOVA I. 2005. Screening of yacon (Smallanthus sonchifolius) in Bilbao Rioja and Charcas provinces of department Potosí of in Bolivia. Agricultura tropica et subtropica.; 38(1).

FLICK, A. *et al.* 1983. Rajeunissement de clones matures d´Hevea brasiliensis (Müll,Arg.) par microgreffage in vitro. *Can. J. Plant. Sci.* **74:**623 – 630, 1994.

FLORES, E. 1998a. La planta: Estructura y función. 2da edición. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 501 p.

FLORES, G. 2000b. Uso del yacón y achira en la industria alimentaria. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC). Centro de Investigación en Cultivos Andinos (CICA); Asociación Arariwa. IX congreso internacional de cultivos andinos: Libro de resúmenes. Cusco (Perú). p. 56.

GEORGE, H.; SHERRINGTONG, B. 2000. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. En: Ixon, R. (Ed). Plant Cell Culture, A Practical Approach. IRL Press, Oxford, p79-105

GRAU, A. 2001. "¿El retorno del Yacón?" Ciencia Hoy, Vol 11 Nº 63 Junio/Julio 2001. (COSUDE) Lima - Perú 60 pp.

GÓMEZ, M. 2007. Efecto de tratamientos antioxidantes en el establecimiento *in vitro* de dos genotipos de caña de azúcar del Ingenio La Grecia. Honduras. Tesis Ingeniero Agrónomo, Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. 36 p.

GRAEFE S.; HERMANN, M.; MANRIQUE, I.; GOLOMBEK, S..; BUERKERT, A. 2004. Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacón roots in the Peruvian Andes. Field Crops Research 86: 156-165.

HARTMANN, H. y KESTER, D. 1987. Propagación de plantas, principios y prácticas. Mexico, CECSA. Pp 649 - 608 p.
KRIKORIAN, A. 1991. Propagación clonal in vitro. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali, p195-200

LITZ, R. y JARRET, R. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: Embriogénesis somática y organogénesis. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali, p 143-171

MANRIQUE, I. (2004). Yacón Ficha Técnica. Centro Internacional de la Papa (CIP) Lima, Perú.

MARINO, V. 1997. *Micropropagación de Philodendron sp. (Posiblemente P. corcovadense). Agronomía Costarricense 28(1): 39-46*

MARINO, W. (1997). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali, p 128-141

MARZA, C. 2009. Enraizamiento y producción de mandioca en función de la posición del propagulo. Hort. Brasileira 10(1):42.

MATOS, A.; DA COSTA, M. Y HANDRO, W. 1995. Morphogenesis and plant regeneration in leaf explants and callus tissues of *Capraria biflora* cultured in vitro. Revista Brasileira de Fisiología Vegetal 7(2):171-174

MONTOYA, H. 1991. Desarrollo de tratamientos para mejorar la germinación de las semillas. Memorias I Convención de Centro América de Semillas Forestales. Honduras. p. 252-260.

MURASHIGE, T. y F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth on biossays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497.

MUÑOZ, M. (2006) Biotecnología. Editorial Universidad Nacional de Quilmes

NINA, M. 1999. El cultivo de Llacon. INIA. Editoria Minerva. Lima Perú

NORMA CUBANA EXPERIMENTAL. 2001. Guía para la Validación de Métodos de Ensayos Químicos para Alimentos. Proyecto para circular. 7ª Revisión.1ª Edición. Oficina Nacional de Normalización (NC).

OKABE, K. 1997. Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales (volumen 2) Informe final. ICTA (Instituto de Ciencias y Tecnología Agrícola). Voluntarios Japoneses en Cooperación Técnica con el Extranjero (JOCV). Bárcena. Guatemala. p. 90.

ORELLANA, P. 1998 a. Introducción a la propagación masiva. pp 125-133. Ed. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba.
ORELLANA, P. 1998b. Propagación vía organogénesis. pp 151-178. Ed. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba.

PATTEN, L. & GLICK, BR. 1996. Bacterias de biosíntesis de acido indolacetico. Canadian Journal of Microbiology 42: 207-220

PÉREZ, J. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Volumen I y II. Santa Clara, Cuba.

PERDOMO, D.; PÁEZ DE CÁSARES, J. 1989. Avance en la producción de plantas *in vitro a* partir de ápices caulinares de papa. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. Alcance NQ 38, 109-119.

PERROT- RECHENMANN, C. AND R. M. NAPIER. 2005. Auxins. Vitam. Horm. Pp 203-233.

PIERIK, R. 2001a. El Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Departamento de Horticulturae, Agricultura Universidad Wageningen, Holanda.

PIERIK, R. 1998 b. Preparación y composición del medio de cultivo. En: Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores, pp. 45-86. 3a. ed. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.

PISANO, J.; CASTILLO A. 2002 a. Avances en experimentación de frutales alternativos: arándanos y otros berries. Serie Técnica N° 286, 14 de mayo 2002

POSPISILOVA *et al*. (1999). Temporal requirements for phytohormone balance in the control of organogenesis in vitro. Developmental Biology 112:494

PROIMPA, 2009. Manual de intercambio y propagación de germoplasma a través de micro bulbillos. Cochabamba – Bolivia. 45pp.

REA, J. 2002. Raíces andina. En: Cultivos marginales. Roma, FAO. (Colección FAO, 26). Pp. 163-177.

RODRIGUEZ, S. 2000. Manual de tesis de grado para ciencias y tecnología. Facultad de Ciencias y Tecnología UMSS Cochabamba Bolivia. pp 125 -129.

ROCA, W y MROGINS K. 1999. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Publicación CIAT No 151 Cali Colombia.

ROJAS, F. 2006 Catalogo de plantas. Fac. de Agronomía UMSA. La Paz - Bolivia 78p.
SARALEQUI, R. 2006. Con el ritmo del Caracol. Productores locales de yacón participan de feria alimenticia en Italia. La Nación, de Miami , pág. 1

SAAVEDRA, D. 1999. Impacto actual del cultivo de tejidos de plantas.

SANCHES, G.; CUEVAS, D. 2001. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali, P 45

SEELVE *et al*. (2003), Aplicaciones del Cultivo de Tejidos en especies forestales. Ciencia y Desarrollo, CONACYT. México. 51: 43-59.

SEVERN, A.; ELLIS, A. 1998. Aplicación de biotecnología para el mejoramiento de los cultivares de banano en Sudáfrica. MUSARAMA: Boletín Bibliográfico Internacional sobre Bananos y Plátanos Francia.138pp.

SIDDIQUE, A.; DAVIES P.; CEPPA M.; DEL PINO G.; BONILLA B. 2003. Ajuste de un sistema de multiplicación *in vitro* para la especie nativa *Aloysia chamaedrifolia* (Verbenacea), Revista Oficial de INASE, Nº 3, Mayo 1999.

SILVARAM, D.; MUKUNDAN, G. 2003. Plant Tissue Culture, Techniques and xperiments. 2da. Edición. Academic Press. San Diego. 231 pp. Principles and Practices. Prentice Hall, 770 pp.

SORIA J.; CABRERA D.; PISANO J.; CASTILLO A. 2000. Avances de Investigación en Frutales de Carozo y Arándanos. Serie Actividades de Difusión Nº 237, 11 de octubre de 2000.

SOLANGE, D. PLOZCHAK, M. LEE, S. AND RAO, A. 2002. Plant Propagation: Principles and Practices. Prentice Hall, 770 pp.

SRIVASTAVA, A. 1999. La Biotecnología Aplicada a la Producción de Ajo Semilla Revista Oficial de INASE, Nº 3, Mayo 1999.

TAVEIRA, A. (2009). *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.). La Promoción, conservación y uso de cultivos sub utilizados y abandonados

TISSERAT, A. 1999. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Revista Oficial de INASE, Nº 3.

TORRES, A.; CALDAS, L. 1998. Técnicas y aplicaciones en el cultivo de tejidos de plantas. Brasília: Empresa de Pesquisa Agropecuaria, 1990. p 18-25.

TORO, M. 2009 Establecimiento de protocolos para regeneración *in vitro* de cerezo dulce (*Prunus avium* L.) var. Lambert Tesis de Grado Temuco – Chile 2004

VALDERRAMA, M. y MANRIQUE, I. 2003. El yacón fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. CIP, UNC, COSUDE, Lima, Perú, 60p.

VALENTOVÁ K. Y J. ULRICHOVÁ. 2003. Smallanthus sonchifolius and Lepidium meyenii Prospective andean crops for the prevention of chronic Diseases. Biomed. Papers 147 (2):119-130.

VENKATACHALAM, G; ALTUNA, B; MICHELENA, G; SÁNCHEZ, J. & ACOSTA, M. 2005 Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) 2005

VIETMEYER, N. 1994. Los cultivos olvidados de los Incas. CERES 3(17): 37-40.

VILORIA, T. 2003. Adaptación de un método de embriogénesis somática para la regeneración de embriones asexuales de pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder) (Fase II). CONCYT. Informe Final Proyecto 30-00. 2003.

VILLALOBOS, A. y PÉREZ, J. 1991. Presentación de resultados experimentales de arándano, Jornada de divulgación 20 de febrero de 1991, Paysandú Uruguay

YAYA M, RODRÍGUEZ O, USAQUÉN W Y CHAPARRO W. 2005. Efecto de las auxinas y citoquininas en la callogénesis sobre explantes nodales e internodales de *Tropaeolum tuberosum (r. and p.)* mashua. Memorias XIV Reunión científica ICBAR, Lima

ZEGARRA, A. y GRANADO, D. 1999. Medios de cultivo. La Abana Cuba. Pp 12 -30.

ZANDONADI, D.B., L. P. CANELLAS, ANDA. R. FAÇANHA. 2006. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H+ pumps activation. Pp 1583-1595.

ZHAO, Y. 2008. El rol de la biosintesis de auxina y citocina al interior de las plantas. Curr. Opin. Plant Biol. 11: 16-22.

ANEXOS

ANEXO 1. Fotos del estudio

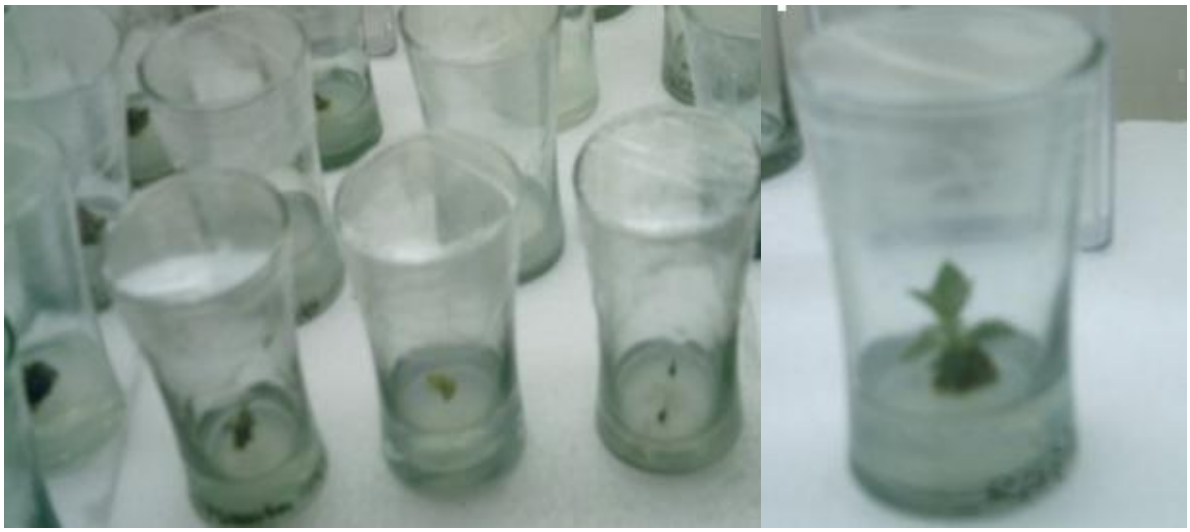
A. El proceso de preparación del medio de cultivo.

B. baso con medio de cultivo más reguladores de crecimiento.

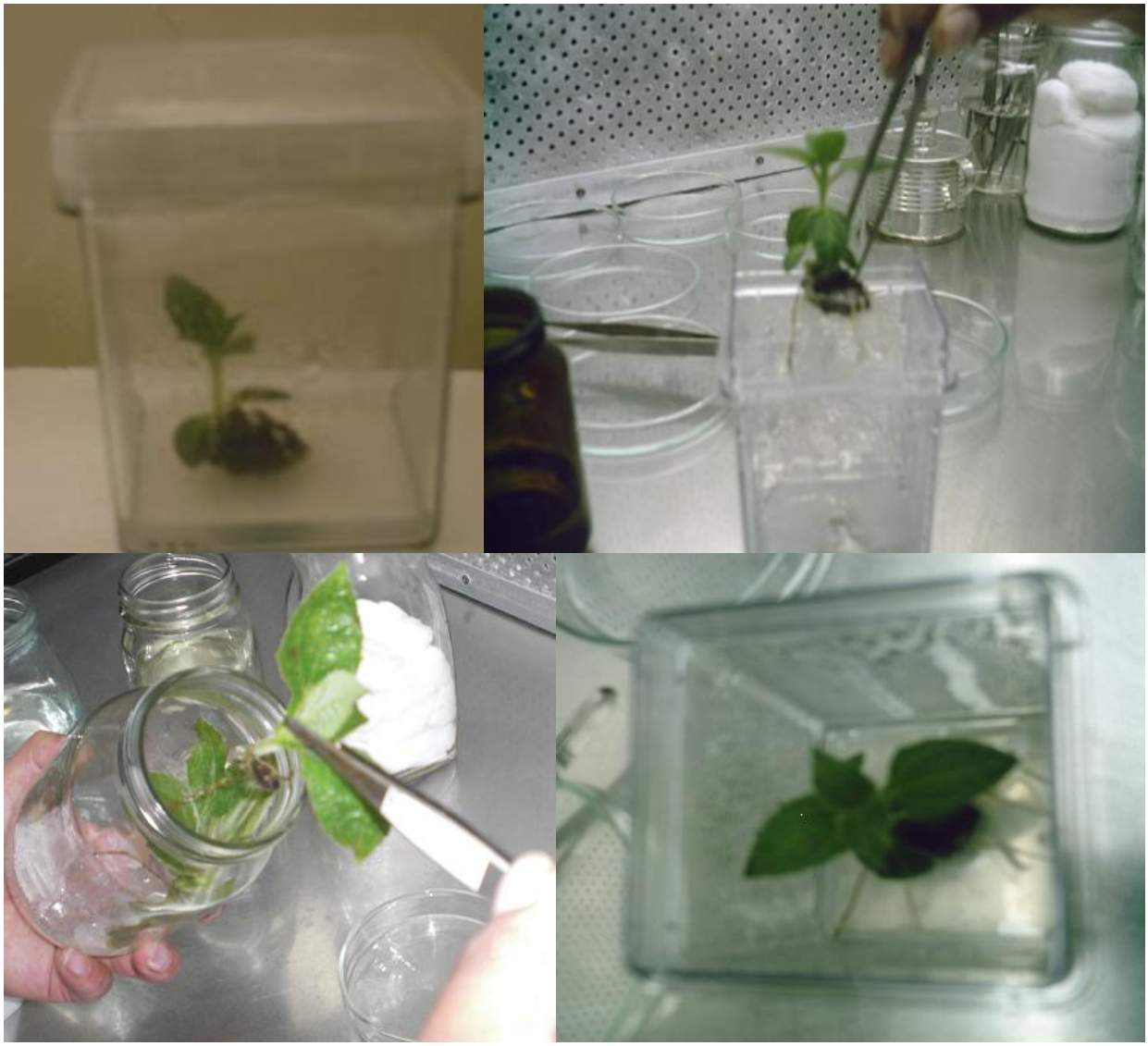
C. proceso del autoclabado

D. proceso de siembra de meristemos de yacón

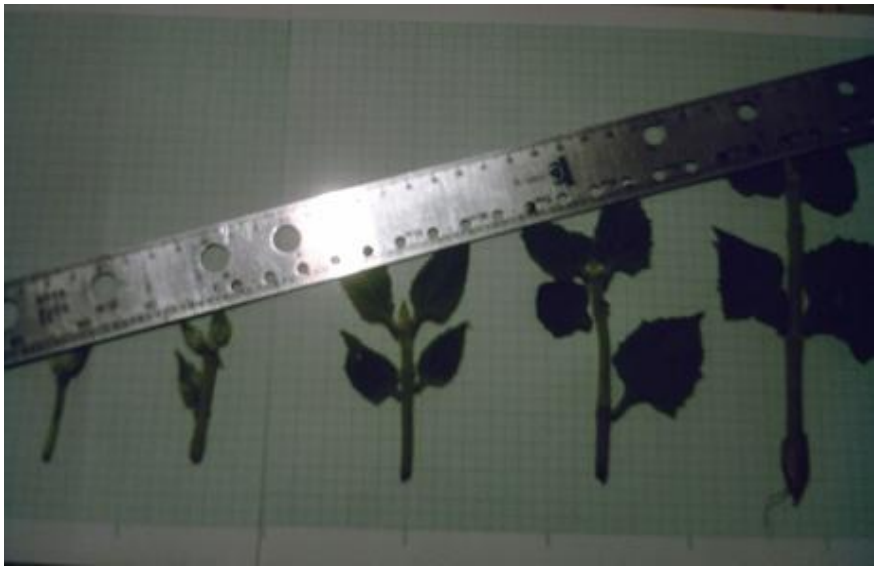
E. el material en la cámara de desarrollo fase inicial del estudio



F. El desarrollo de los explantes



G. desarrollo de hojas y raíces de las vitro plantas



H. toma de datos

ANEXO 2. Vista de las diferentes partes del yacón

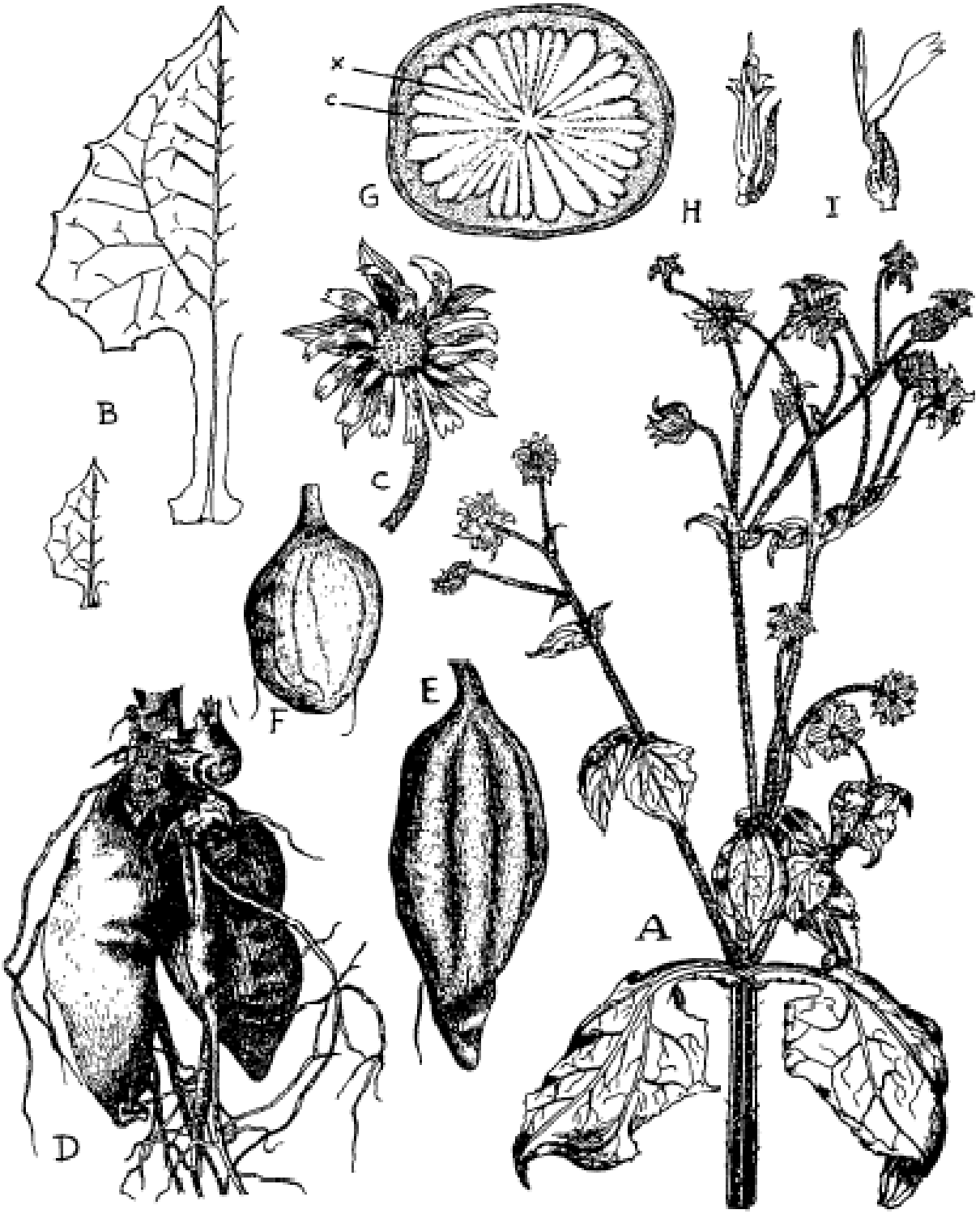


Fig. 3. Yacon *(Smallanthus sonchifolius)* morphological aspects (from León 1964). A: flowering branches. B: leaves. C: flowerhead. D-F: tuberous roots. G: transverse section of the tuberous root (x, xylem; c, cortex tissues). H: staminate disk flower. I: pistilate ray flower.

ANEXO 3. Estructuras moleculares de diversas auxinas y citoquininas empleadas para la preparación de medios de cultivo in vitro.

ANEXO 4. Concentración de sales minerales de la disolución nutritiva diseñada por Murashige-Skoog

Sales de macronutrientes	($mg \cdot L^{-1}$)	Sales de micronutrientes	($mg \cdot L^{-1}$)
NH_4NO_3	1650	KI	0.83
KNO_3	1900	H_3BO_3	6.2
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.3
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6
KH_2PO_4	170	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
		$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
		$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
		$Na_2 \cdot EDTA$	37.3
		$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.8

Desarrollo de raíces de vitro plantas de yacón