



## Reguladores de Crecimiento (BAP y ANA) en la Propagación *in vitro* de Queñoa (*Polylepis rugulosa* Bitter)

### Growth Regulators (BAP and ANA) for *in vitro* Propagation of Queñoa (*Polylepis rugulosa* Bitter)

Carmen Mollohuanca Ccuno<sup>1,\*</sup>; Luis Mayta Anco<sup>1</sup>; Roxana Bardales Alvarez<sup>2</sup>

1 Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Sociedad Minera Cerro Verde, Av. de Las Tradiciones S/N, Congata, Uchumayo, Arequipa, Perú.

2 Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Urb. Aurora S/N, Arequipa, Perú.

\* Autor corresponsal: [c.mollohuanca@conexxaperu.com](mailto:c.mollohuanca@conexxaperu.com) (C. Mollohuanca Ccuno).

ID ORCID de los autores

C. Mollohuanca Ccuno:  <http://orcid.org/0000-0002-9105-8501>

L. Mayta Anco:  <http://orcid.org/0000-0001-8359-4876>

R. Bardales Alvarez:  <http://orcid.org/0000-0002-5137-4067>

#### RESUMEN

Dentro del marco del Programa de forestación e investigación forestal de Sociedad Minera Cerro Verde se realizó el presente estudio, con la finalidad de establecer un protocolo de propagación vegetativa mediante la técnica de propagación *in vitro* de yemas de queñoa (*Polylepis rugulosa* Bitter) para su conservación, por ser una especie forestal en peligro, para lo cual se realizó el cultivo con diferentes concentraciones de auxina y citoquinina en la fase de multiplicación *in vitro*, pasando por la fase de establecimiento la cual fue superada con un alto porcentaje de sobrevivencia siguiendo el protocolo de esterilización con etanol al 96% e hipoclorito de sodio al 2,5% las cuales fueron cultivadas en medio Murashige & Skoog. En la fase de multiplicación se usaron 3 concentraciones de ANA y 5 concentraciones de BAP, siendo el de mejor respuesta la combinación de 0,25  $\mu\text{M}$  ANA + 2  $\mu\text{M}$  BAP con 15,8 brotes, los mismos que alcanzaron 9 mm de tamaño, 2,7 hojas en promedio por explante y no presentaron formación de callo, posteriormente se realizó dos subcultivos de este tratamiento cuya tasa de multiplicación resultó 1:17 brotes en 30 días.

**Palabras clave:** *Polylepis rugulosa*; propagación *in vitro*; reguladores de crecimiento; establecimiento; multiplicación.

#### ABSTRACT

Within the framework of the forestry research and afforestation program of Sociedad Minera Cerro Verde, this study was carried out, in order to establish a protocol for vegetative propagation using the *in vitro* propagation technique of queñoa buds (*Polylepis rugulosa* Bitter) for their conservation, as it is an endangered forest species, for which the cultivation was carried out with different concentrations of auxin and cytokinin in the *in vitro* multiplication phase, passing through the establishment phase which was overcome with a high percentage of survival following the protocol sterilization with 96% ethanol and 2.5% sodium hypochlorite which were cultured in Murashige & Skoog medium. In the multiplication phase, 3 concentrations of ANA and 5 concentrations of BAP were used, with the best response being the combination of 0.25  $\mu\text{M}$  ANA + 2  $\mu\text{M}$  BAP with 15.8 shoots, the same ones that reached 9 mm in size, 2.7 leaves on average per explant and did not show callus formation, subsequently two subcultures of this treatment were carried out, whose multiplication rate was 1:17 shoots in 30 days.

**Keywords:** *Polylepis rugulosa*; *in vitro* propagation; growth regulators; establishment; multiplication.

Recibido: 04-05-2021.

Aceptado: 07-06-2021.



Esta obra está publicada bajo la licencia [CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

## INTRODUCCIÓN

El género *Polylepis* se encuentra con la mayor distribución de forma natural en Perú (Mamani, 2018), se tiene un reporte de 19 especies, considerándose, así como el país que presenta la más alta diversidad de este género, de la cual resulta Cusco y Ayacucho con la mayor cantidad de especies presentes en dichas zonas (Mendoza & Cano, 2011).

Los árboles de *Polylepis* tienen una corteza y hojas que les permite adaptarse a extremas condiciones climáticas de la región de los Andes (Zapata et al., 2012). Son importantes dado que albergan diferentes especies de flora y fauna (Ames et al., 2019), en especial aves (Ríos et al., 2018), así mismo la presencia de este género reduce los efectos del cambio climático y regula los recursos hídricos (Mamani, 2018). Sin embargo los peligros que afronta este género está relacionado con las actividades humanas y las perturbaciones (Ríos et al., 2018), haciéndolos cada vez más vulnerables debido a la deforestación y el pastoreo (Zutta et al., 2012). Por otro lado, las semillas que pudieron coleccionar Canales & Huarasa (2020) de la especie *Polylepis incana* fueron sometidas a tres tratamientos, obteniendo un 9% de poder germinativo del tratamiento con agua residual. De

igual manera Vega et al. (2018), encontraron porcentajes de germinación entre 2% y 19% en tres especies de *Polylepis*. Lo cual demuestra que la queñoa es una especie que presenta dificultad en su propagación por semillas botánicas.

De acuerdo a la información obtenida del cultivo *in vitro* del género *Polylepis* se encontraron trabajos realizados por Mamani et al. (2015) y Taborga et al. (2016) que desarrollaron la propagación hasta la fase de multiplicación en las especies *Polylepis pepeii* y *Polylepis besseri* respectivamente, mientras que Vega et al. (2007) desarrollaron hasta la fase de enraizamiento en la especie *Polylepis tomentella*, de todo estos trabajos realizados por diferentes autores se pudo revisar que obtuvieron entre 3,1 y 5 brotes por explante en la fase de multiplicación. Mediante la técnica de propagación *in vitro*, es posible desarrollar un protocolo de propagación que permita su conservación y producción masiva de plantas en el menor tiempo posible y en cualquier época del año lo cual favorecerá la reforestación y restauración de bosques de queñoa. Por todo lo expuesto el objetivo de esta investigación fue generar un mayor número de brotes mediante la combinación adecuada de la auxina (ANA) y citoquina (BAP).

## MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología de Sociedad Minera Cerro Verde, distrito de Uchumayo, Arequipa, Perú; llevándose a cabo en tres etapas:

### Etapa 1

#### **Extracción de los explantes**

El material vegetal que se utilizó provino de plantas madre de 90 cm de altura promedio, aclimatadas bajo condiciones de vivero (**Figura 3a**), donde se les realizó tratamientos previos como lavado de hojas, aplicación de fungicida y bioestimulantes.

### Etapa 2 Establecimiento

#### **Desinfección de explantes**

Se extrajeron brotes idealmente juveniles entre 4 y 5 cm de longitud promedio y que no presenten síntomas de enfermedades, los cuales fueron colectados el mismo día que se realizó la siembra. Los explantes (**Figura 3b**) fueron lavados con abundante agua y jabón líquido por 3 minutos, seguidamente inmersos en etanol al 90% durante 1 minuto en constante agitación, luego sumergidos en solución de hipoclorito de sodio al 2,5% por 5 minutos y finalmente se enjuagó tres veces con agua destilada esterilizada.

#### **Siembra del material vegetativo**

Se sembraron 5 yemas por frasco (**Figura 3d**), se empleó el medio Murashige & Skoog al cual se agregó 3% de sacarosa y 0,6% de agar, el pH fue ajustado a 5,7; una vez concluida la siembra, los recipientes de plástico fueron colocados durante 4

días a oscuridad absoluta y de esta manera reducir el nivel de fenolización, para su evaluación se utilizó la escala cualitativa que empleó Concepción et al. (2005) adaptado de Ramírez y Salazar (1998), transcurrido el tiempo estos fueron colocados en la cámara de incubación a una temperatura de 25°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Dos semanas después de la siembra se efectuó la remoción de sustancias fenólicas de la base de los explantes, en esta fase se evaluó en porcentaje de contaminación y fenolización.

### Etapa 3 Multiplicación

Se emplearon explantes provenientes de la fase de establecimiento los cuales fueron cultivados en el medio de cultivo nutritivo de Murashige & Skoog al cual se le adicionó diferentes concentraciones de ANA (0, 0,25 y 0,5µM) y BAP (0, 2, 4, 6 y 8µM) bajo un Diseño de Bloques Completamente al Azar con arreglo factorial 5 x 3, distribuidos en 15 tratamientos, 5 repeticiones y 75 unidades experimentales, con análisis de varianza (ANOVA) y se estableció diferencias significativas con la prueba de especificidad de LSD Fisher para los caracteres cuantitativos. Para obtener los datos del peso de masa de los explantes/frasco (**Tabla 3**) se realizó 4 evaluaciones a partir de la semana 3 con el uso de una balanza analítica y la evaluación final con respecto a las variables: número de brotes, longitud de brotes, número de hojas y formación de callo se realizó a los 45 días después de la siembra.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Fase de establecimiento

Se pudo apreciar que los explantes presentaron únicamente contaminación del tipo fungoso en un 9.8% (bajo), debido a que el material previamente fue instalado bajo condiciones de vivero. Cabe mencionar que para reducir el porcentaje de contaminación se debe realizar tratamientos previos a las plantas madre de las que se extraerán los explantes, como lo concluyen Jones y Flores-Mora (2007): un buen manejo agronómico del material en invernadero disminuye la presencia de microorganismos, como también lo indicaron Cancino-Escalante et al. (2015); Abdelnour-Esquivel y Muñoz (2005) mencionan que los explantes provenientes de estacas mantenidas en vivero hicieron que los desinfectantes como el hipoclorito de calcio e hipoclorito de sodio sean efectivos.

Sigarroa-Rieche y García (2011), Martínez-Cruz et al. (2013) y Núñez et al. (2017) indican que antes del proceso de desinfección con etanol e hipoclorito de sodio, lavaron sus explantes con agua y jabón líquido comercial. Roca y Mroginski (1991) sugieren que lavar los explantes con agua y detergente mejora la desinfección de explantes; del mismo modo se realizó en el presente trabajo.

Se utilizó el hipoclorito de sodio (NaClO) como desinfectante ya que tiene la ventaja de enjuagarse más fácilmente de las superficies después de la esterilización y así eliminar los agentes contaminantes no deseados. La solución de hipoclorito de sodio (NaClO) a concentraciones entre 1% a 3 % son las más usadas en el proceso de esterilización de explantes siempre que no afecte el estado de los tejidos (Borges et al., 2009).

### Fenolización / Oxidación

Se pudo evitar que la fenolización sea muy alta al someter los explantes sembrados a oscuridad durante 4 días, ya que la queñoa, por ser leñosa, tiene la tendencia a fenolizar, se obtuvo 89.16% de fenolización, con un nivel de poco fenolizado. Méndez-Álvarez et al. (2014) realizaron un trabajo en donde después de haber desinfectado y sembrado los explantes, los colocaron en un cuarto de crecimiento donde permanecieron en oscuridad durante una semana, posteriormente los

transfirieron a una intensidad lumínica de 2000 lux con un fotoperiodo de 16 horas luz.

En el trabajo desarrollado por Jacinto (2018), menciona que todos sus tratamientos presentaron oxidación, atribuyendo al daño que sufren los tejidos en el momento de realizar los cortes de la parte basal del material lo cual concuerda con el presente trabajo, ya que se obtuvo también un porcentaje alto de fenolización en la parte basal de los explantes (Figura 3c).

Azofeifa (2009) alude que existen varias estrategias para evitar la oxidación de los explantes. En primer lugar está la prevención y disminución de las causas que provocan o estimulan el estrés oxidativo. Sin embargo si no se pudiera evitar se puede recurrir a otros procedimientos con la finalidad de controlar el proceso oxidativo; por lo cual, transcurridas dos semanas después de la siembra, se procedió con la remoción de sustancias fenólicas, se pudo notar que, al realizar esta actividad, los explantes empezaban a desarrollarse ya que el estar en el medio inicial no les permitía desarrollarse.

### Fase de multiplicación

#### Crecimiento en peso

En la Tabla 1 se muestra los datos obtenidos del peso de masa de brotes/explante de las semanas 3, 4, 5 y 6 en la fase de multiplicación, mediante la prueba estadística ANOVA ( $p > 0,05$ ) nos indica que existe diferencia significativa entre los tratamientos en las semanas 3, 4, 5 y 6; en tanto la prueba de especificidad de LSD Fisher muestra que durante la semana 3 el tratamiento 0  $\mu\text{M}$  ANA + 2  $\mu\text{M}$  BAP presentó el más alto valor, con 0.83 g en comparación al restos de tratamientos; durante la semana 4 los tratamientos 0  $\mu\text{M}$  ANA + 2  $\mu\text{M}$  BAP y 0,25  $\mu\text{M}$  ANA + 2  $\mu\text{M}$  BAP presentaron los más altos valores de peso promedio con 1,08 y 1,24 g respectivamente; en la semana 5 el tratamiento 0,25  $\mu\text{M}$  ANA + 2  $\mu\text{M}$  BAP presentó el más alto valor en peso con 2,25 g y finalmente en la semana 6, el tratamiento 0,25  $\mu\text{M}$  ANA + 2  $\mu\text{M}$  BAP presentó el más alto valor en peso con 4,22 g con respecto al resto de tratamientos. Los pesos iniciales a los 21 días podrían estar influenciados por el tamaño de los explantes; sin embargo, al momento de la siembra se trató de emplear yemas de un tamaño uniforme.

**Tabla 1**

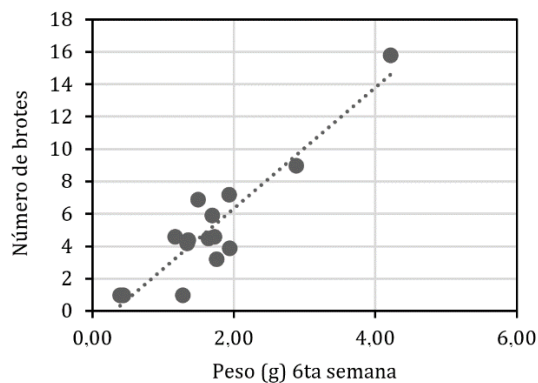
Peso de masa de brotes/explante de *Polylepis rugulosa* Bitter en 15 tratamientos combinados de ANA y BAP

Tratamiento	ANA ( $\mu\text{M}$ )	BAP ( $\mu\text{M}$ )	Peso promedio (g) en semana			
			3	4	5	6
T1	0 +	0	0,67 bc	0,83 b	1,04 def	1,28 fg
T2		2	0,83 a	1,08 a	1,77 b	2,88 b
T3		4	0,48 ef	0,64 cd	1,14 cde	1,64 cdef
T4	0,25 +	6	0,41efgh	0,66 cd	1,05 ef	1,72 cd
T5		8	0,36 fgh	0,54 def	0,85 fg	1,35 efg
T6		0	0,34gh	0,36 g	0,37 h	0,39 h
T7		2	0,77ab	1,24 a	2,25 a	4,22 a
T8		4	0,60 cd	0,86 b	1,33 c	1,94 c
T9		6	0,29 h	0,46 efg	0,67 g	1,17 g
T10	0,5 +	8	0,53 df	0,84 b	1,27 cd	1,76 cd
T11		0	0,36 fgh	0,38 fg	0,39 h	0,44 h
T12		2	0,37 fgh	0,55 de	0,88 f	1,49 defg
T13		4	0,46 efg	0,65 cd	0,95 ef	1,34 efg
T14		6	0,37 fgh	0,59 cde	0,97 ef	1,69 cde
T15		8	0,50 de	0,72 bc	1,10 de	1,94 c

a, b, c... corresponden a la prueba LSD Fisher  $\alpha=0,05$ .

Se puede observar (Tabla 1) que cada semana que transcurría se producía un incremento del peso notándose que los tratamientos 0  $\mu\text{M}$  ANA + 2  $\mu\text{M}$  BAP y 0,25  $\mu\text{M}$  ANA + 2  $\mu\text{M}$  BAP mantuvieron los más altos valores de peso durante las semanas evaluadas por otro lado los tratamientos 0,25  $\mu\text{M}$  ANA + 0  $\mu\text{M}$  BAP y 0,5  $\mu\text{M}$  ANA + 0  $\mu\text{M}$  BAP presentaron los valores más bajos durante las semanas evaluadas y no existe mucha diferencia en el aumento de peso durante las 4 semanas evaluadas, a diferencia del resto de tratamientos, lo cual demuestra que al no aplicar citoquinina BAP a estos tratamientos no hubo división celular por lo tanto tampoco formación de nuevos brotes lo que hizo que el aumento en peso no sea tan notorio en cada semana y al contener únicamente auxina ANA se mantuvo la dominancia apical.

Posteriormente se realizó el análisis de correlación entre el peso y el número de brotes obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.92 entre las variables lo cual indica que es una relación lineal positiva y fuerte según las consideraciones de interpretación de Martínez et al. (2009). Dicho resultado se corrobora con el trabajo realizado por Colmenares y Giménez (2003), en el cual para el banano cv. 'Williams' obtuvieron la mayor cantidad de brotes (8,4) y mayor peso fresco por explante en SIT (19,9 g) que en medio de cultivo sólido que proporcionó la menor cantidad de brotes (2,4) y peso fresco (4,4 g) ambos datos lo obtuvieron a los 30 días de su cultivo, mencionando que existe una correlación directa entre el peso fresco y el incremento del número de brotes. En la **figura 1** se puede apreciar que a medida que incrementa el peso también se incrementa el número de brotes.

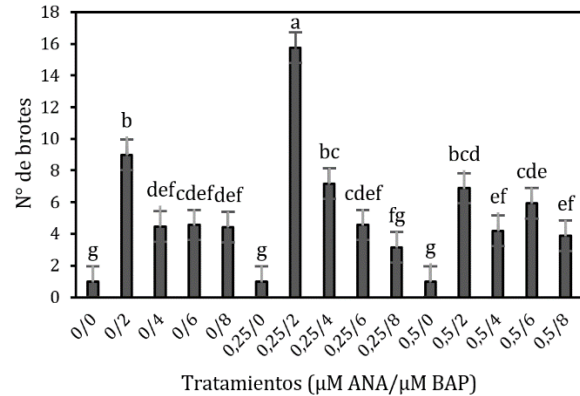


**Figura 1.** Relación lineal positiva y fuerte entre las variables de peso y número de brotes.

### Número de brotes

El número de brotes obtenidos de los quince tratamientos durante el primer subcultivo (Figura 3f) en la fase de multiplicación mediante la prueba estadística ANOVA ( $P > 0,05$ ), nos indica que existe diferencia significativa entre los tratamientos, la prueba de especificidad de LSD Fisher nos indica que el tratamiento 0,25  $\mu\text{M}$  ANA + 2  $\mu\text{M}$  BAP muestra los mejores resultados con 15,8 brotes (Figura 2), lo cual concuerda con lo que menciona Pierik (1997): las citoquininas generalmente promueven la división celular, especialmente si se agrega con una auxina; también coincide con los

trabajos que desarrollaron Mamani y Murillo (2020), Medina et al. (2014) y Castellanos et al. (2006) obteniendo en la interacción de citoquinina y auxina que los explantes empleados promovieron mayor número de brotes, siendo necesaria la presencia de ambos reguladores de crecimiento para la fase de multiplicación.



**Figura 2.** Número de brotes a los 45 días en la fase de multiplicación *in vitro* de yemas de *Polyalepis rugulosa* (queñoa) en diferentes concentraciones de citoquina y auxina.

Es necesario mencionar que todos los tratamientos que contenían citoquinina BAP presentaron formación de nuevos brotes (Figura 3e) a pesar de que algunos no contenían auxina, lo cual se relaciona con los resultados mostrados por Torres y Suárez (2013), en los que, para la aplicación de citoquininas en su caso de estudio emplearon el BAP, vieron que es necesaria para incrementar el número de brotes en la fase de multiplicación a partir de explantes en condiciones *in vitro*. Por lo tanto, los tratamientos que tienen cero concentraciones de citoquinina presentaron nula formación de nuevos brotes comprobando que las citoquininas promueven la formación de brotes axilares (Pierik, 1997). Así mismo Solis et al. (2011) afirma que el número de brotes es una variable importante en la fase de multiplicación ya que permitirá obtener la tasa de multiplicación.

Con relación a los resultados según factores principales, al realizar la prueba de especificidad de LSD Fisher se observa (Tabla 2) que la mejor respuesta para el factor principal citoquinina (BAP) es de 10,55 brotes por explante de la concentración 2  $\mu\text{M}$  diferente estadísticamente al resto de las concentraciones, mientras que el menor valor lo representa la concentración 0  $\mu\text{M}$  de BAP, con un promedio de 1 brote por explante similar resultado obtuvieron Rodríguez et al. (2003) en la propagación *in vitro* de *Artemisia absinthium* en donde el tratamiento sin BAP (testigo), obtuvo el menor e igual número de brotes en cada uno de los períodos evaluados (20, 30 y 40 días). Respecto a los resultados para el factor principal auxina (ANA) la concentración que permitió la multiplicación de brotes es de 0,25  $\mu\text{M}$  con 6,33 brotes por explante, mientras que las concentraciones 0  $\mu\text{M}$  y 0,50  $\mu\text{M}$  presentaron 4,70 y 4,38 brotes / explante respectivamente, y ambas concentraciones no presentan diferencia significativa.

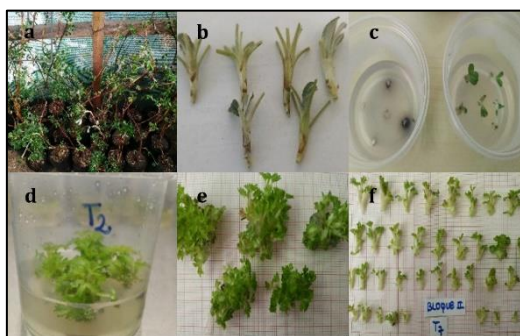
**Tabla 2**

Número de brotes a los 45 días después de la siembra a nivel de factores principales en la fase de multiplicación *in vitro* de yemas de *Polylepis rugulosa* Bitter (queñoa)

Factores principales					
Citoquina	Concentración BAP	Promedio	Auxina	Concentración ANA	Promedio
C2	2 $\mu$ M BAP	10,55 a	A2	0,25 $\mu$ M ANA	6,33 a
C3	4 $\mu$ M BAP	5,28 b	A1	0,00 $\mu$ M ANA	4,70 b
C4	6 $\mu$ M BAP	5,01 b	A3	0,50 $\mu$ M ANA	4,38 b
C5	8 $\mu$ M BAP	3,83 b			
C1	0 $\mu$ M BAP	1,00 c			

a,b,c... corresponden a la prueba LSD Fisher  $\alpha=0,05$ .

En el presente trabajo también se determinó la tasa de multiplicación para ello se realizó dos siembras adicionales del tratamiento 0,25 $\mu$ M ANA+ 2 $\mu$ M BAP ya que presentó la mayor cantidad de brotes, en el segundo subcultivo se obtuvo un promedio de 15,4 yemas por cada yema sembrada inicialmente, mientras que el tercer subcultivo 19,5 yemas por cada yema sembrada; finalmente con los tres subcultivos realizados se sacó el promedio obteniendo una tasa de multiplicación de 1:17. El número de brotes es una variable importante en la fase de multiplicación ya que a mayor número de brotes se tendrá una mayor tasa de multiplicación



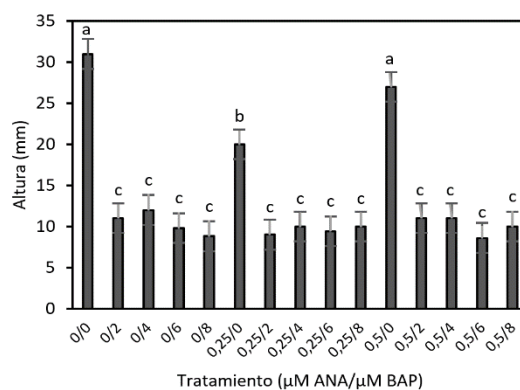
**Figura 3.** Secuencia de la micropropagación en *Polylepis rugulosa* Bitter. (a) Plantas madre, (b) Brotes diseccionados, (c) Poca fenolización y traslado de yemas (d) Explantes en medio de multiplicación, (e) Proliferación de brotes/explante/frasco, (f) Brotes aislados por explante.

### Longitud de brotes

Mediante la prueba estadística ANOVA ( $P > 0,05$ ) muestra que existe diferencia significativa con respecto a la altura de los brotes, la prueba de especificidad de LSD Fisher indicó que los tratamientos 0  $\mu$ M ANA + 0  $\mu$ M BAP y 0,5  $\mu$ M ANA + 0  $\mu$ M BAP presentaron los mejores resultados (31 y 27 mm respectivamente), seguido del tratamiento 0,25  $\mu$ M ANA + 0  $\mu$ M BAP con 20 mm; mientras que el resto de los tratamientos no presentaron diferencias significativas entre sí (Figura 4).

Se pudo observar que aquellos tratamientos en los cuales estuvo presente la citoquinina BAP presentan alturas entre 8,6 mm y 12 mm como máximo, mientras que aquellos tratamientos en los cuales no se aplicó citoquinina BAP presentan los valores más altos en altura, lo cual demuestra que sin la incorporación de citoquinina obtenemos una mayor altura foliar mientras que la presencia de citoquinina en los tratamientos la altura disminuye, coincidiendo con lo que menciona Pierik (1997) sobre cómo las citoquininas disminuyen la

dominancia apical, y también con Arredondo (2000), citado por Uribe y Cifuentes (2004), señalando que para obtener explantes de mayor longitud, es necesario que el medio de cultivo sea suplementado con una menor concentración de citoquininas, ya que con esto se logra disminuir la división celular y favorecer la elongación del tejido por la acción de las auxinas, los resultados obtenidos concuerdan con lo que obtuvo Cob et al. (2016), que al bajar la concentración de citoquinina en la relación AIB/BAP, el tamaño de los explantes de *Quillaja Saponaria* aumentaron; la altura optima lo alcanzaron con el tratamiento T9 (1,5/0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB/BAP). En contraste, los microtallos que fueron cultivados en el tratamiento T5 (1,0/3,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB/BAP) no elongaron, y observaron explantes en forma de roseta.



**Figura 4.** Longitud de brotes a los 45 días en la fase de multiplicación *in vitro* de yemas de *Polylepis rugulosa* (queñoa) en diferentes concentraciones de citoquinina y auxina.

en donde encontraron que el tamaño de los explantes aumentaron al bajar la concentración de citoquinina en la relación AIB/BAP

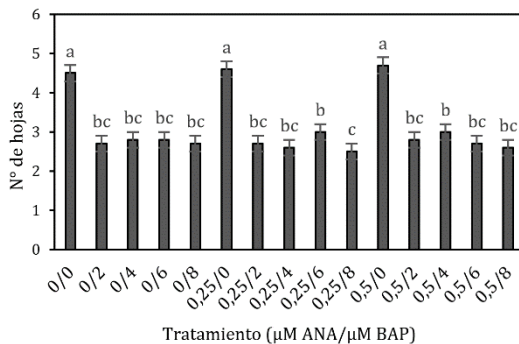
El tratamiento 0  $\mu$ M ANA+ 0  $\mu$ M BAP presentó la mayor altura (31 mm) en comparación al resto de tratamientos, resulta importante mencionar que este tratamiento no contiene reguladores de crecimiento lo cual coincide con los resultados obtenidos por Rodríguez et al. (2003), donde evaluaron el comportamiento de la altura de los brotes, en el cual el tratamiento testigo (T-1), sin reguladores, obtuvo los mayores valores en 3 períodos evaluados (20, 30 y 40 días) que fueron estadísticamente diferentes entre ellos y con el resto de los tratamientos y similar resultado se encontró con el trabajo realizado por Gutierrez-Rozeti y Gonzales (2019).

Se pudo notar que los tratamientos que obtuvieron los más altos valores en cuanto a la variable

longitud de brote presentaron los valores más bajos respecto a la variable número de brotes, semejante resultado fue obtenido por Vega et al. (2007), ya que observaron que el grupo 1A presentó el mayor promedio en cuanto a la altura de explantes y al mismo tiempo el menor número de brotes a los 30 días de evaluación. Esta observación demuestra una relación inversamente proporcional respecto a estas variables; es decir, que a mayor longitud del explante se registró una menor formación de brotes y viceversa; no obstante, estos resultados difieren de los encontrados por Mamani et al. (2015) debido a que el tratamiento que presentó el mayor número de brotes mostró a su vez una mayor longitud y número de hojas.

### Número de hojas

Con respecto al número de hojas la prueba estadística ANOVA ( $P > 0,05$ ) nos indica que existe diferencia significativa entre los tratamientos, la prueba de especificidad de LSD Fisher muestra que los tratamientos 0  $\mu\text{M}$  ANA + 0  $\mu\text{M}$  BAP; 0,25  $\mu\text{M}$  ANA + 0  $\mu\text{M}$  BAP y 0,5  $\mu\text{M}$  ANA + 0  $\mu\text{M}$  BAP presentaron los más altos valores, con 4,7; 4,6 y 4,5 hojas en promedio por brote respectivamente (Figura 5).



**Figura 5.** Número de hojas a los 45 días en la fase de multiplicación *in vitro* de yemas de *Polylepis rugulosa* (queñoa) en diferentes concentraciones de citoquinina y auxina.

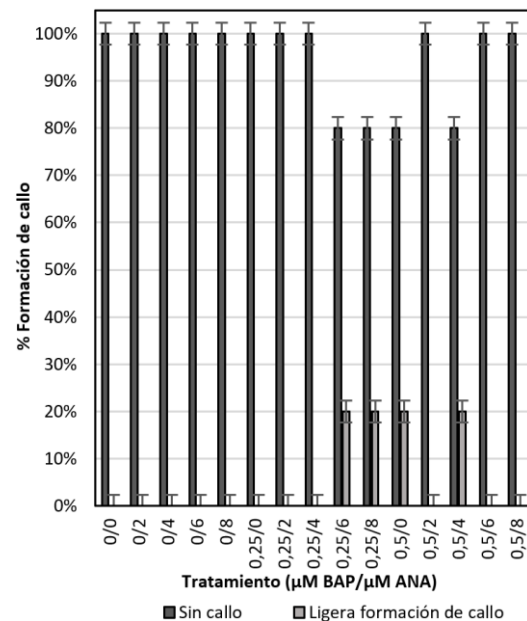
Los tratamientos que obtuvieron los más altos valores en cuanto a la variable longitud de brote también presentaron los más altos valores respecto a la variable número de hojas, lo cual permite afirmar para el caso del estudio realizado que el número de hojas es directamente proporcional a la longitud de brotes, lo que quiere decir que a mayor longitud mayor número de hojas, similar resultado encontrado por Villa y Arbeláez (2019) con relación a las variables de altura y número de hojas en uno de sus tratamientos empleados. Respecto a las variables número de brotes y número de hojas se observaron resultados inversamente

proporcionales, lo cual difiere con lo obtenido por Vega et al. (2007) en donde observaron una relación directamente proporcional entre la formación de brotes y el número de hojas diferenciadas en los explantes evaluados.

### Formación de callo

En la Figura 6 se muestra los porcentajes de la formación de callo que presentaron los explantes sometidos a diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (auxina y citoquinina), se puede notar que la mayoría de tratamientos no presentaron formación de callo a excepción de los tratamientos 0,25  $\mu\text{M}$  ANA + 6  $\mu\text{M}$  BAP; 0,25  $\mu\text{M}$  ANA + 8  $\mu\text{M}$  BAP; 0,5  $\mu\text{M}$  ANA + 0  $\mu\text{M}$  BAP y 0,5  $\mu\text{M}$  ANA + 4  $\mu\text{M}$  BAP con una ligera formación de callo, sin embargo al realizar el análisis estadístico la prueba estadística ANOVA ( $P > 0,05$ ) indica que todos los tratamientos son iguales, por lo que cada uno de los tratamientos pueden ser empleados.

Roca y Mroginski (1991), mencionan que la propagación clonal trae consigo producir un nuevo individuo con los mismos genes de su progenitor y hasta el momento los explantes más usados en la propagación *in vitro* son puntas de tallos y yemas laterales. Por tal motivo en la micropropagación muy pocas veces se usan callos. Cabe mencionar que para el caso del estudio realizado está orientado a producir nuevas plantas a través de la organogénesis directa es decir producir una nueva planta a partir de yemas sin formación de callo.



**Figura 6.** Porcentaje de formación de callo a los 45 días en la fase de multiplicación *in vitro* de yemas de *Polylepis rugulosa* (queñoa) en diferentes concentraciones de citoquinina y auxina.

## CONCLUSIONES

La concentración de citoquinina de 2  $\mu\text{M}$  BAP en combinación con la auxina de 0,25  $\mu\text{M}$  ANA generó la mayor proliferación de brotes de 1:17. Se recomienda realizar el subcultivo de explantes a los 60 días en la fase de multiplicación para probar superar el número de brotes obtenidos. Realizar

investigaciones en otras especies de queñoa, con la concentración que permitió obtener la mayor cantidad de brotes en *Polylepis rugulosa* Bitter, para probar el mismo resultado en la fase de multiplicación.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento de esta investigación a Sociedad Minera Cerro Verde, que permitió se haga posible el desarrollo del trabajo de investigación bajo el contrato N° 37031903237 -

CLS-236-2019. También se agradece a Eduardo Molinari-Novoa (Chess Consulting & Project) por sus comentarios al presente manuscrito.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelnour-Esquivel, A., & Muñoz, A. (2005). Micropropagación de teca (*Tectona grandis* Lf). Kurú: Revista Forestal (Costa Rica) 2(5), 2005.
- Ames-Martínez, F. N., Quispe Melgar, H. R., Zúñiga López, D. G., Segovia Salcedo, M. C., & Kessler, M. (2019). *Bosques de Polylepis: Biodiversidad en la región central del Perú*. Universidad Continental.
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), 153-175.
- Borges, G. M., Estrada, A. E., Pérez, R. I., Meneses, R. S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de *Discorea alata* L. clon caraqueño. Cuba.
- Canales, Á., & Huarasa, Y. R. (2020). Poder germinativo de *Polylepis incana* con aplicación de diferentes tratamientos de agua. *Revista Cubana de Ciencias Forestales*, 8(3), 495-506.
- Cancino-Escalante, G. O., García, E. Q., Villamizar, C. E., & Carvajal, C. D. (2015). Propagación in vitro de materiales seleccionados de *Rubus glaucus* Benth. (mora de Castilla) en la provincia de Pamplona, región nororiental de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 7-15.
- Castellanos, O., Rodríguez, A., Rodríguez, J., y Rodríguez, B. (2006). Organogénesis indirecta y enraizamiento in vitro de *Paulownia elongata*. *e-Gnosis*, 4.
- Cob, J., Ríos, D., Sabja, A., Cartes, P., & Sánchez, M. (2016). Organogénesis directa para la propagación in vitro de *Quillaja saponaria* Molina en Sudamérica Austral. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 7(34), 57-68.
- Colmenares, M., & Giménez, C. (2003). Multiplicación in vitro de *Musa* spp. mediante sistema de inmersión temporal. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 20(4), 468-477.
- Concepción, O., Nápoles, L., Pérez, A. T., Peralta, N., Hernández, M., & Trujillo, R. (2005). Efecto de tres antioxidantes en el cultivo in vitro de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.). Relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. *Cultivos tropicales*, 26(1), 33-39.
- Gutierrez-Rosati, A.; Gonzales, P. (2019). Reguladores de crecimiento en el cultivo in vitro de tres cultivares portainjertos de vid (*Vitis vinifera* L.) para su uso en la industria del pisco. *Scientia Agropecuaria*, 10(4), 461-468.
- Jacinto, M. (2018). Evaluación de tres niveles de auxinas y citoquininas para la obtención de plantas madre de rosa (*Rosa* sp.) variedad 'Freedom' en condiciones in vitro. *Apthapi*, 4(2), 1073-1081.
- Jones, F., & Flores-Mora, D. M. (2007). Establecimiento in vitro y pruebas preliminares de micropropagación en medio semisólido y líquido de frambuesa (*Rubus idaeus* L.). *Revista Tecnología En Marcha*, 20(3), 46.
- Mamani, M. S. (2018). Diversidad genética de poblaciones de *Polylepis canoi* W. Mendoza y *Polylepis rodolfo-vasquezii* L. Valenzuela & L. Villalba mediante el uso de microsátélites (SSR) en la región Junín.
- Mamani, B., Rocabado Koya, P., & Rey Ortíz, L. (2015). *Establecimiento y multiplicación in vitro de Polylepis pepeii* (No. CIDAB-S531-151r-5/2015). Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (Bolivia).
- Mamani, B., & Murillo, R. A. (2020). Micropropagación de dos variedades de frutilla (*Fragaria Ananassa* Duch.) En diferentes medios de cultivo. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 7(1), 69-78.
- Martínez, R. M., Tuya, L. C., Martínez, M., Pérez, A., & Cánovas, A. M. (2009). El coeficiente de correlación de los rangos de Spearman caracterización. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 8(2), 0-0.
- Martínez-Cruz, N. S., Arévalo-Niño, K., Verde-Star, M. J., Oranday-Cárdenas, A., Rivas-Morales, C., Treviño-Neávez, J., & Morales-Rubio, M. E. (2013). Germinación in vitro e inducción de callo en *Rubus adenotrichus* Schldt. *Polibotánica*, (35), 99-107.
- Medina, M., Mosquera, H., & Aguilar, C. (2014). Micropropagación clonal y enraizamiento ex vitro de tres cultivares de piña *Ananas comosus* (L. Merr.) del Chocó, Colombia. *Revista Biodiversidad Neotropical*, 4(2), 133-140.
- Méndez-Álvarez, D., & Abdelnour-Esquivel, A. (2014). Establecimiento in vitro de *Terminalia amazonia* (Gmel.) Excell. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 11(27), 7-21.
- Mendoza, W., & Cano, A. (2011). Diversidad del género *Polylepis* (Rosaceae, Sanguisorbeae) en los Andes peruanos. *Revista peruana de biología*, 18(2), 197-200.
- Núñez, J. E. N., Quiala, E., de Fera, M., Mestanza, S., & Teanga, S. (2017). Propagación in vitro de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz a partir de yemas axilares de árboles plus seleccionados. *Biotecnología Vegetal*, 17(2).
- Pierik, R. (1997). *In vitro culture of higher plants*. Springer science & business media.
- Ríos, C. S. S., Rodewald, A. D., & Morales, L. V. (2018). Ecología y conservación de las aves asociadas con *Polylepis*: ¿qué sabemos de esta comunidad cada vez más vulnerable? *Ecología Austral*, 28(1-bis), 216-228.
- Roca, W. M., & Mroginski, L. (1991). Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. (CIAT) No. 151.
- Rodríguez, H., Hechevarría, I., Rodríguez, C. A., & Rivera, M. M. (2003). Propagación in vitro de *Artemisia absinthium* L. en Cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 8(1), 0-0.
- Sigarroa-Rieche, A. K., & García-Delgado, C. L. (2011). Establecimiento y multiplicación in vitro de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.) variedad sin espinas, mediante ápices meristemáticos. *Acta agronómica*, 60(4), 347-354.
- Solis, R., Olivera, J., & La Rosa, R. S. (2011). Propagación in vitro de *Carica papaya* var. PTM-331 a partir de meristemas apicales. *Revista peruana de biología*, 18(3), 343-348.
- Taborga, A. D. A., León, R. M., Poma, D. V., García, V., & Rojas, J. J. V. (2016). Desarrollo de un protocolo para el establecimiento in vitro de Kewiña (*Polylepis bessi* Hieron.) a partir de yemas apicales. *Revista Científica de Investigación Info-Iniaf*, 1(8), 43-49.
- Torres, L. A., & Suarez, I. E. (2013). Propagación in vitro de *Acacia mangium* Willd. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 11(1), 81-87.
- Uribe, M. & Cifuentes, L. (2004). Aplicación de técnicas de cultivo in vitro en la propagación de *Legrandia concinna*. *Bosque (Valdivia)*, 25(1), 129-135.
- Vega, C. K., Villegas, C. G., Rocabado, P. A., Quezada, J. A., López, M. Y., & Quevedo, A. W. (2018). Biología reproductiva de tres especies de *Polylepis* (*P. neglecta*, *P. incarum* y *P. pacensis*), con énfasis en su comportamiento germinativo. *Ecología Austral*, 28(1-bis), 310-324.
- Vega, C., Bermejo-Franco, J. C., & Villegas-Alvarado, G. (2007). Propagación masiva de *Polylepis tomentella* Weddell ssp. *nana* mediante técnicas de cultivo in vitro. *Ecología en Bolivia*, 42(2), 102-120.
- Villa, R., & Arbeláez, L. M. (2019). Micropropagación in vitro de rosa rosa sp. a partir de yemas axilares y respuesta calogénica. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 1(31), 10-17.
- Zapata, F., Dourojeanni, P., Gagliardi, G., & Cordero, D. (2012). El Clima Cambia, Cambia Tú También. Adaptación al cambio climático en comunidades locales del Perú. *Lima, Sociedad Peruana de Derecho Ambiental*.
- Zutta, B. R., Rundel, P. W., Saatchi, S., Casana, J. D., Gauthier, P., Soto, A. & Buermann, W. (2012). Prediciendo la distribución de *Polylepis*: bosques Andinos vulnerables y cada vez más importantes. *Revista Peruana de Biología*, 19(2), 205-212.