

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**EFFECTO DEL AGAR Y CITOQUININAS (BAP) EN LA
MICROPROPAGACIÓN DE *Alstroemeria exserens* Meyen A TRAVÉS DE
RIZOMAS IN VITRO**

CRISTIAN EDUARDO MUÑOZ AVILES

**Santiago, Chile
2017**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**EFFECTO DEL AGAR Y CITOQUININAS (BAP) EN LA
MICROPROPAGACIÓN DE *Alstroemeria exserens* Meyen A TRAVÉS DE
RIZOMAS IN VITRO**

**EFFECT OF AGAR AND CYTOKININS (BAP) IN THE MICROPROPAGATION
OF *Alstroemeria exserens* Meyen THROUGH IN VITRO CULTURE RIZHOME**

CRISTIAN EDUARDO MUÑOZ AVILES

**Santiago, Chile
2017**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

**EFEECTO DEL AGAR Y CITOQUININAS (BAP) EN LA
MICROPROPAGACIÓN DE *Alstroemeria exserens* Meyen A TRAVÉS DE
RIZOMAS IN VITRO**

Memoria para optar al título profesional de:
Ingeniero Agrónomo.

CRISTIAN EDUARDO MUÑOZ AVILES

Profesores Guías	Calificaciones
Sr. Danilo Aros. O. Ingeniero Agrónomo, Ph. D.	6,5
Profesores Evaluadores	
Sr. Ricardo Pertuzé C. Ingeniero Agrónomo, Ph. D.	5,5
Sr. Marco Schwartz M. Químico, Mg. Sc. Dr.	6,5

Santiago, Chile
2017

AGRADECIMIENTOS

Agradecido de todos quienes han creído en mí, al poner esperanzas y darme ánimos para terminar esta trascendental etapa de mi vida, agradecer a mi familia, amigos y profesor quienes fueron empáticos con todas las problemáticas que se me presentaron durante este camino. Me voy con una herramienta que me servirá para toda la vida, para contribuir desde lo micro a lo macro en la sociedad, y para seguir indagando en temas de interés personal que se irán integrando poco a poco con la carrera que siempre quise estudiar, infinitas gracias.

“Así es que jardinear también es treparse a un árbol, oler hojas flores, deleitarse con la sombra de un árbol frondoso, alabar milenarias araucarias, respirar hondo el perfume dulzón del heliotropo, regocijarse con los pétalos de las rosas preñadas de rocío, alegrarse cuando a las seis de la mañana el griterío de los pájaros compite con el despertador”
Ánonimo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Hipótesis.....	4
Objetivos.....	4
MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
Lugar de estudio.....	5
Materiales.....	5
Diseño experimental.....	5
Procedimiento.....	5
Evaluaciones.....	6
Análisis Estadístico.....	7
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
Etapa I: Propagación de explantes.....	8
Tasa de prolificidad.....	8
Etapa II: Evaluación de agar y BAP.....	9
Mortalidad y contaminación.....	9
Peso de explantes.....	12
Efecto del agar en el peso de los explantes.....	12
Efectos del BAP en el peso de los explantes.....	14
Largo de rizoma.....	15
Efecto del BAP sobre el largo de rizoma.....	16
Efecto del agar sobre el largo del rizoma.....	17
Largo de brotes.....	18
Efecto del agar en el largo de brotes.....	18
Efecto del BAP en el largo de brotes.....	19
Número de brotes activos y senescentes.....	20
CONCLUSIONES.....	22
BIBLIOGRAFÍA.....	23
APÉNDICE.....	29

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CONTENIDO:

MATERIALES Y MÉTODOS

Cuadro 1. Descripción del ensayo y los tratamientos aplicados a rizomas in vitro de <i>A. exserens</i> . Filas indican concentraciones de agar (g L^{-1}) y columnas concentración de 6-Bencilaminopurina (mg L^{-1}).....	5
--	---

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 1. Estimación de los síntomas de senescencia y contaminación observada en los explantes de <i>A. Exserens</i> luego de 8 semanas cultivados en condiciones in vitro.....	10
Cuadro 2. Promedios de peso (g) de los explantes de <i>Alstroemeria exserens</i> sometidos a distintas concentraciones de BAP (0,0; 0,5; 1,0 y 2,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y agar (0,0; 3,5 y 7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), a la semana 0 y 4.	12
Cuadro 3. Efecto de diferentes concentraciones de agar (0,0, 3,5 y 7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en el peso del explantes de <i>A. exserens</i> luego de 4 semanas cultivadas in vitro.	13
Cuadro 4. Efecto de diferentes concentraciones de BAP (0,0, 0,5, 1,0 y 2,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en el peso de explantes de <i>A. exserens</i> luego de 4 semanas cultivadas in vitro.....	15
Cuadro 5. Promedios de largo del rizoma de <i>A. exserens</i> (cm) para cada tratamiento sometidos a distintas concentraciones de BAP (0,0; 0,5; 1,0 y 2,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y agar (0,0; 3,5 y 7,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), en las distintas fechas de evaluación (0 y 4 semanas).....	16
Cuadro 6. Efecto del BAP en el aumento del largo de rizoma (cm) de <i>A. exserens</i> , luego de 4 semanas cultivadas in vitro.....	16
Cuadro 7. Efecto del agar en el aumento de largo de rizoma (cm) de <i>A. exserens</i> , luego de 4 semanas cultivadas in vitro.....	17
Cuadro 8. Promedio de largo de brote (cm) de los explantes de <i>Alstroemeria exserens</i> sometidos a distintas concentraciones de BAP (0,0; 0,5; 1,0 y 2,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y agar (0,0; 3,5 y 7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), a la semana 0 y 4.....	18
Cuadro 9. Efecto del agar en el aumento de largo de brote (cm) de <i>A. exserens</i> , luego de 4 semanas cultivadas in vitro.....	19
Cuadro 10. Efecto del BAP en el aumento de largo de brote (cm) de <i>A. exserens</i> , luego de 4 semanas cultivadas in vitro.....	19
Figura 2. Gráfico de barras apiladas sobre el número de brotes (nuevos) activos y senescentes en <i>A. exserens</i> a las 4 semanas.....	21

RESUMEN

Alstroemeria (L.) es uno de los géneros más diversificados de la flora vascular chilena. *Alstroemeria exserens* Meyen resulta atractiva por el color de sus flores y la resistencia al frío que posee. Comúnmente estas especies se propagan por división de rizomas pero al ser este un método poco eficiente y con alta posibilidad de contaminación, es que se optó por la micropropagación ya que es un método prolijo. Considerando que el agar y los reguladores de crecimiento son los componentes más determinantes en los medios de cultivos in vitro, el objetivo de este estudio fue determinar si existe un efecto combinado de 6-bencilaminopurina (BAP) (0,0; 0,5; 1,0 y 2,0 mg•L⁻¹) y agar (0,1; 3,5 y 7,0 g• L⁻¹) sobre la micropropagación de *A. exserens*. Cada 4 semanas se evaluó el peso de la planta (g), longitud de rizoma (cm), longitud de brotes (cm) y número de brotes. En la primera etapa se calculó una tasa de prolificidad considerando las 24 semanas previas al ensayo, partiendo con 12 explantes iniciales y llegando a 111 rizomas con un brote, se obtiene una tasa de 1,54 nuevos explantes cada 4 semanas. En la segunda etapa ocurre una contaminación que ocasiona pérdidas del 75% al final del ensayo (8 semanas), haciendo inviable los análisis finales, por tanto se discutió con lo obtenido hasta la semana 4. El análisis estadístico arrojó que no existe interacción entre los factores. Al no existir un efecto combinado, se analizó por separado cada factor. La concentración de 3,5 g L⁻¹ agar presenta la mejor respuesta con medias de 1,06 cm y 3,16 g, en largo de rizoma y peso de explante respectivamente. Respecto al efecto del BAP, en todas las concentraciones (0,5, 1,0 y 2,0 mg• L⁻¹) se observó un efecto en el control de la longitud de brotes mediante la inhibición de la dominancia apical. En este experimento se concluyó que el medio semi-sólido (3,5 g• L⁻¹) es la mejor concentración de agar, al presentar explantes sanos con mayor aumento de peso y largo del rizoma. De esta manera, este estudio colabora con el avance hacia un protocolo de propagación in vitro de forma masiva para *A. exserens*.

Palabras clave: *Alstroemeria*, *exserens*, proliferación, medio de cultivo, agar, BAP.

ABSTRACT

Alstroemeria (L.) is one of the most diversified genus of the Chilean vascular flora. *Alstroemeria exserens* Meyen is attractive because of its flowers and cold resistance. This species is commonly propagated by rhizome division, but since this is an inefficient and highly exposed to contamination method, micropropagation was chosen since this an clean method. Considering that agar and growth regulators are the most determinant components in vitro culture media, the objective of this research was to determine if there is a combined effect when testing 6-benzylaminopurine (BAP) (0,0; 0,5; 1.0 and 2.0 mg•L⁻¹) and agar (0,1; 3,5 and 7,0 g•L⁻¹). Plant's weight (g), rhizome lenght (cm), shoots lenght (cm) and number of shoots were evaluated every 4 weeks. In the first stage prolificacy rate was calculated considering the 24 weeks prior to the trial, starting with 12 initial explants and reaching 111 rhizomes with a shoot, obtaining a rate of 1.54 new explants every 4 weeks. In the second stage, contamination occurs causing losses of 75% at the end of the trial (8 weeks), making the final analysis unfeasible. Therefore, discussion was performed with the results obtained up to week 4. The statistical analysis showed that there was no interaction between the factors, since there was no combined effect, each factor was analyzed separately. The concentration of 3.5 g•L⁻¹ agar presents the best response with averages of 1.06 cm and 3.16 g, in length of rhizome and explant weight respectively. Regarding BAP effect, all concentrations (0.5; 1.0 and 2.0 mg•L⁻¹) showed inhibition to apical dominance controlling shoot length. In this experiment it was concluded that semi-solid medium (3.5 g•L⁻¹) is the best concentration of agar to present healthy explants with higher rhizome length and increasing weight. Thus this study collaborates progressing towards an in vitro protocol for massive propagation of *A. exserens*.

Key words: *Alstroemeria*, *exserens*, proliferation, culture medium, agar, BAP.

INTRODUCCIÓN

En la agronomía, el estudio de plantas ornamentales se ha hecho cada vez más relevante debido a su potencial económico y a las características que posee Chile como exportador en contra estación a los mercados del hemisferio norte (ODEPA, 2014), esto es un incentivo a la domesticación y mejoramiento de plantas nativas que sean atractivas para el mercado de las flores de corte, tanto en el mercado nacional como en la exportación.

En particular, *Alstroemeria* (*Alstroemeriaceae*) es uno de los géneros de la flora vascular chilena más diversificados, presentando una amplia gama de colores y tamaños de flores, lo que implica que las especies de este género presenten un alto potencial económico como cultivos ornamentales (Baeza y Ruiz, 2011). A nivel mundial, este género posee una de las flores de corte más importantes en el mercado, y actualmente también se comercializa como planta de maceta (Baeza et al., 2011). El género es endémico de América del Sur, comprende hierbas erectas o enredaderas que viven en una amplia variedad de hábitat. La familia contiene alrededor de 75 especies (Bayer, 1987) distribuidas desde Venezuela hasta Argentina y Chile abarcando una diversidad de ecosistemas comprendidos entre el nivel del mar hasta los 4.500 m.s.n.m. En Chile se distribuye desde el extremo norte hasta la Patagonia encontrándose su mayor diversidad de especies en la Zona Central del país (Aagesen y Sanso, 2003; Ravenna, 1988; Sanso 2002).

Entre las especies de alstroemerias se encuentra *Alstroemeria exserens* Meyen, una planta que resulta interesante por el color de sus flores y la resistencia al frío que posee al habitar entre los 1.900 y 2.700 m.s.n.m. en suelos pedregosos de la cordillera de los Andes abarcando desde Villa Paulina, Farellones (33°15'S) en la Región Metropolitana, hasta Laguna del Maule, Región del Maule (36°04'S). Florece entre diciembre y febrero dando sus frutos entre febrero y marzo. Posee inflorescencias de 2 a 5 rayos generalmente uniflores de 1,5 a 2,2 cm de largo, tépalos abiertos, rosado intenso a lilacino pudiendo alcanzar una altura de hasta 35 cm (Muñoz y Moreira, 2003).

Tradicionalmente las alstroemerias han sido propagadas dividiendo su rizoma. Este método no es muy eficiente para multiplicar las plantas, ya que demora y aumenta la susceptibilidad de contaminaciones (Van Zaayen, 1995). Es por esto que actualmente se utiliza la micropropagación como una herramienta eficiente para producir plantas. Este método permite obtener plantas idénticas a la planta madre y de forma masiva, puede ser mediante tejidos o células cultivadas asépticamente en recipientes in vitro, donde se puedan controlar con prolijidad las condiciones de ambiente y la nutrición (Hartmann y Kester, 1999). Hoy en día las alstroemerias se micropropagan cada 3 ó 4 semanas dividiendo su rizoma para obtener ejemplares genéticamente iguales lo que es favorable para la industria (Lin et al., 1997).

En la micropropagación, el medio de cultivo es el principal factor que genera cambios fisiológicos o respuesta en la planta. Dentro de este se encuentran los reguladores de

crecimiento, que son los que influyen directamente sobre la morfogénesis y los distintos órganos generados. Los reguladores de crecimiento actúan como señales que estimulan, inhiben o regulan el crecimiento durante el desarrollo de la planta (Rahim et al., 2013). Las citoquininas en forma de BAP (6-bencilaminopurina) se suelen usar en la micropropagación de alstroemeria para la generación de nuevos brotes mediante el aumento de la división celular y la inhibición de la dominancia apical (Rahim et al., 2013). Si bien cada hormona por sí sola no se caracteriza por un efecto específico (debido a que un efecto puede derivar en varios efectos), variando sus concentraciones entre ellas desencadenan diferentes respuestas (Jordán y Casaretto, 2006).

Estudios realizados en orquídeas (*Encyclia microtos* (Rchb. f.) Hoehne) han demostrado que a concentraciones de 2 mg L^{-1} de BAP se logra un mayor número de brotes por planta (Condemarín et al., 2007). En alstroemeria cv. "Fuego" al usar concentraciones de $1 \text{ mg} \bullet \text{L}^{-1}$ de BAP obtuvo mayor número de rizomas con respecto a los que no poseían la hormona en el medio (Khaleghi et al., 2008). Otro elemento importante dentro del medio es el agar, el cuál brinda solidificación al medio. En altas concentraciones puede afectar la disponibilidad de agua y nutrientes (Bridgen, 1994). En *Philodendron sp.* se han usado concentraciones de hasta $8 \text{ g} \bullet \text{L}^{-1}$ de agar obteniendo buenos resultados. Para Alstroemeria se señala que al aumentar la concentración se genera una disminución del crecimiento y la proliferación de brotes (Aros et al., 2017; Vázquez, 2016). Otro autores señalan que el medio líquido puede favorecer la absorción de nutrientes, hormonas y agua (Zimmerman y Robacker; Ibrahim 1994, Hussien, 2014).

El presente ensayo experimental evalúa el efecto combinado de reguladores de crecimiento y concentración de agar en el desarrollo de los rizomas de *Alstroemeria exserens*, ya que al ser determinantes en la micropropagación de la especie contribuiría a la domesticación de esta especie endémica para su potencial uso ornamental.

Hipótesis: El efecto combinado de concentraciones de agar y de citoquininas pueden producir distintas respuestas en la micro propagación de *Alstroemeria exserens*.

Objetivo general: Evaluar el efecto de la concentración de citoquininas y agar en la micropropagación de *Alstroemeria exserens* Meyen.

Objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto de distintas concentraciones de agar sobre la micro propagación de *A. exserens* en el peso de la planta, longitud del rizoma, longitud de brotes y número de brotes.
2. Evaluar el efecto de distintas concentraciones de citoquininas sobre la micro propagación de *A. exserens* en el peso de la planta, longitud del rizoma, longitud de brotes y número de brotes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

El material vegetal inicial correspondió a secciones de rizoma de *A. exserens* obtenidos a partir de embriones rescatados *in vitro*, de una recolección de frutos que fue realizada en la localidad de Farellones a una altitud de 2.400 m.s.n.m., durante febrero de 2014.

Lugar del estudio

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile ubicada en la Zona Central de Chile, Comuna de La Pintana, Región Metropolitana.

Diseño experimental

Se realizó un diseño completamente aleatorizado (DCA) con estructural factorial de tratamientos, donde la combinación del factor agar con 3 niveles y el factor BAP con 4 niveles dio un total de 12 tratamientos, los cuales se detallan en el Cuadro 1. Se realizaron 8 repeticiones en cada tratamiento y la unidad experimental correspondió a una sección de rizoma de aproximadamente 1 cm con un brote.

Cuadro 1. Descripción del ensayo y los tratamientos aplicados a rizomas *in vitro* de *A. exserens*. Filas indican concentraciones de agar ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y columnas concentración de 6-Bencilaminopurina ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

BAP($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)/ Agar($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,1	3,5	7,0
0,0	T1	T5	T9
0,5	T2	T6	T10
1,0	T3	T7	T11
2,0	T4	T8	T12

Procedimiento

Etapa I : Propagación de explantes

Para obtener las unidades experimentales necesarias se realizó una etapa de micropropagación previa comenzando con doce rizomas de *A. exserens* los cuales se subdividieron cada 3-4 semanas de acuerdo a su crecimiento. La técnica utilizada a la

hora de repicar fue la separación de los brotes con un trozo de rizoma mediante un corte limpio y longitudinal entre los tallos, se eliminaron con el bisturí las partes oscurecidas del corte para evitar la acumulación de compuestos fenólicos y para proporcionar una mejor absorción por parte del explante (Azofeifa, 2009). Este procedimiento fue realizado en frascos de vidrio (200 mL) con un contenido de $4,43 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de medio Murashige y Skoog (MS) (*Phytotechnology Laboratories*). Suplementado con $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa (D-Sacarosa, Cristalina. β -D-Fructofuranosil- α -D-glucopiranosido azúcar, *Phytotechnology Laboratories*), $7\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar (Poder de gelificación: $1.150 \text{ g}/\text{cm}^2$, *Phytotechnology Laboratories*), $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 6-Bencilaminopurina (N6 – Benciladenina, *Phytotechnology Laboratories*) y pH ajustado a 5,7 antes del autoclavado a 121°C por 30 minutos. Las plantas fueron dispuestas en una cámara de crecimiento a 23°C con un fotoperiodo 16/8 h. Una vez se logró obtener el material para la investigación luego de 6 meses se llegó a un total de 111 plantas que poseían un brote y rizoma de 1 cm de longitud.

Etapa II: Efecto de agar y BAP

Se traspararon los explantes de la Etapa I a los respectivos tratamientos en frascos del mismo volumen adicionando 42 mL de medio de cultivo con $4,43 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MS (Murashige and Skoog, 1962) suplementado con $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa y concentraciones de agar (0; 3,5 y $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y BAP (0; 0,5; 1,0 y 2,0) según lo establecido para cada tratamiento (Cuadro 1), con pH ajustado a 5,7. Los medios líquidos contenían un algodón que sostenía el explante para evitar que se sumergiera por completo la planta.

Evaluaciones

Se estimó una tasa de prolificidad, la cual fue rescatada del proceso de micropropagación previo (24 semanas), utilizando la siguiente fórmula:

Tasa de prolificidad: $(N^\circ \text{ explantes finales} / N^\circ \text{ explantes iniciales})$ Cada 4 semanas.

Una vez montado el experimento se pretendía realizar dos evaluaciones cada cuatro semanas, obteniendo así una duración total de 8 semanas hasta la última medición (lo que no pudo ocurrir por causas que se darán más adelante), cada vez que se realizaron las mediciones, las unidades experimentales fueron traspasadas a nuevos frascos para renovar el medio de cultivo de cada tratamiento. Las variables medidas fueron longitud de rizoma y de brote (cm), para esto se utilizó una regla milimétrica autoclavada. El peso del rizoma (g) se midió traspasando el material a frascos estériles vacíos, de esta forma se registró por separado el peso del frasco y el peso del frasco con el rizoma determinando los cambios de peso a través del tiempo. Para esta evaluación se utilizó

una balanza de precisión (Belltronic Scales, ES-300HA). Cada unidad experimental fue registrada con el nombre del tratamiento y el número de repetición al que pertenece. Se hizo también un conteo del número de brotes del rizoma, tomando en cuenta los verdes y descartando los deshidratados. Al momento de medir se distinguía el brote inicial de cada explante de los que estaban recién apareciendo. Se registraron los problemas que se presentaron en los tratamientos por contaminación y muerte de explantes, se evaluaron las pérdidas totales con una revisión del proceso de la etapa final y los diversos factores que influyen en el éxito de la micropropagación.

Análisis Estadístico

Para cada evaluación los resultados obtenidos se analizaron a través de un análisis de varianza (ANDEVA) previa comprobación de los supuestos de normalidad de los errores y homocedasticidad. Cuando se encontraron diferencias entre tratamientos se realizó la prueba de comparación múltiple de LSD Fisher con un nivel de significancia del 5%.

Se utilizó como covariable los pesos, largos de rizoma y largo de brotes registrados al inicio del experimento, es decir, cada unidad experimental fue evaluada de acuerdo a su condición inicial. Las covariables resultaron ser significativas para todas las variables medidas. Se evaluó la existencia de interacción entre los factores y al no existir efecto combinado entre Agar y BAP se evaluó las diferencias de los niveles de cada factor por separado.

Para número de brotes, al no pasar la comprobación de supuestos, se realizó un modelo lineal generalizado y para la verificación de los supuestos se hace el test de Wald.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa I: Propagación de explantes

Tasa de prolificidad estimada

En Abril de 2015 fueron seleccionados 12 explantes de *A. exserens* los cuales se multiplicaron por 24 semanas, de esta manera en Noviembre del mismo año se obtienen las unidades experimentales para montar el ensayo (111 explantes). La cantidad de rizomas nuevos obtenidos a partir de un número inicial de explantes cultivados durante un tiempo determinado es lo que se llama tasa de proliferación, esto nos permitió evaluar la velocidad de propagación (Chiari y Bridgen, 2000). En todos los ensayos el material vegetal utilizado procedía de brotes sanos, con estos antecedentes se calculó una tasa de prolificidad estimada de 1,54 nuevos rizomas por planta cada 4 semanas. Esta tasa de multiplicación es baja para la propagación masiva, comparado con lo obtenido por algunos autores. Ambrena et al. (2016) logró 2,75 en *Alstroemeria* cv. Pluto; 3,57 en *Alstroemeria pallida* (Vázquez, 2016), ambos en medios con $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar y $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BAP y divididos cada 4 semanas. En los sistemas in vitro convencionales, alstroemeria presenta baja tasa de multiplicación y riesgos de manejo a consecuencia de la contaminación endógena y la oxidación (Cruz y Mosquera, 2003).

El crecimiento del rizoma es esencial para obtener mayor cantidad de plantas ya que en base a su tamaño se subdivide la planta, dejando un trozo de rizoma con uno o dos brotes (Hamidoghli et al., 2007). Para aumentar el tamaño del rizoma en *Alstroemeria* cv. “Fuego” Khaleghi et al. (2008) señalan que combinaciones de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP y $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (ácido naftalenacético) permiten obtener las mayores tasas de proliferación (4,12) y a medida que aumentaba la dosis de BAP (hasta $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP) la tasa de multiplicación se volvía cada vez más baja (1,75). Así mismo en *Alstroemeria* cv. “Jamaica” Hamidoghli et al. (2007) observan una óptima micropropagación con tratamientos utilizando $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP y $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de NAA. El efecto principal de las auxinas (NAA) es la estimulación del enraizamiento y la elongación celular (Datta et al., 2006). Diversos estudios realizados en alstroemerias (Grabryszewska y Hempel, 1985; Pierik et al., 1988; Khaleghi et al., 2008) indican que un balance de citoquininas/auxinas está relacionado con el crecimiento del explante y a la formación de brotes, raíces y rizoma. Se puede sugerir un desbalance hormonal en las plantas de *A. exserens* considerando que se observó una mayor proliferación de brotes que aumento en el tamaño del rizoma, lo que provocaría pocas subdivisiones de las

plantas al destinar más recursos a la proliferación que al crecimiento rizomático. Debido a esto agregar auxinas en bajas concentraciones podría aumentar la tasa de prolificidad. En la propagación de alstroemerias, la regeneración del rizoma es más importante que la proliferación de brotes (Khaleghi et al., 2008), en esta etapa es relevante concentrarse en la regeneración del rizoma para obtener explantes con mayor capacidad para regenerarse y establecer plantas con buen tamaño inicial.

Etapas II: Evaluación de agar y BAP

Mortalidad y contaminación

Al momento de la última medición (semana 8) todos los tratamientos disminuyeron las repeticiones debido a mortalidad y contaminación. Durante toda la propagación de los explantes (etapa I) se obtuvo un bajo porcentaje de contaminación (17%) por lo que en cada cambio de medio de cultivo no hubo mayores problemas y las plantas se desarrollaron de manera óptima. Los problemas se presentaron en la etapa II observándose 72 (de 96) plantas contaminadas y/ o senescentes, obteniendo un porcentaje de mortalidad de 75 %. La gran cantidad de pérdidas pudo haber estado relacionada a una inadecuada manipulación del material vegetal en el laboratorio, lo que quizás propició problemas como la contaminación a partir de microorganismos endógenos y exógenos (Azofeifa, 2009) y senescencia relacionada a acumulación de compuestos fenólicos en el medio (Leifert and Cassels, 2001) (Figura 1). Los contaminantes más comunes en cultivos in vitro corresponden a hongos filamentosos, bacterias y en menor grado levaduras, virus, viroides o incluso micro artrópodos (ácaros y trips) (Leifert and Cassels, 2001). Algunos microorganismos no son conocidos por provocar daños a las plantas en campo pero en los cultivos in vitro se vuelven un problema ya que los medios de cultivo tienen las condiciones para su reproducción (Alvarado, 1998); es por esto que para referirse a patógenos en micropropagación se usa el término vitropatógenos (Habiba, 2002).

Se dividen las causas en tres grupos, por un lado las bacterias con un total de 32 plantas contaminadas (33,3%), luego los hongos con 19 plantas (19,7%) y por último la senescencia con 21 plantas (21,8 %) (Figura 1), éstas son estimaciones realizadas mediante la observación de la sintomatología de las plantas y el medio de cultivo. Las principales bacterias encontradas en cultivos in vitro corresponden a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Enterobacter* y *Staphylococcus* (Habiba et al.,

2002; Kulkarni et al., 2007) y los hongos pertenecientes a los generos *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor* y *Penicillium* (Altan et al., 2010).

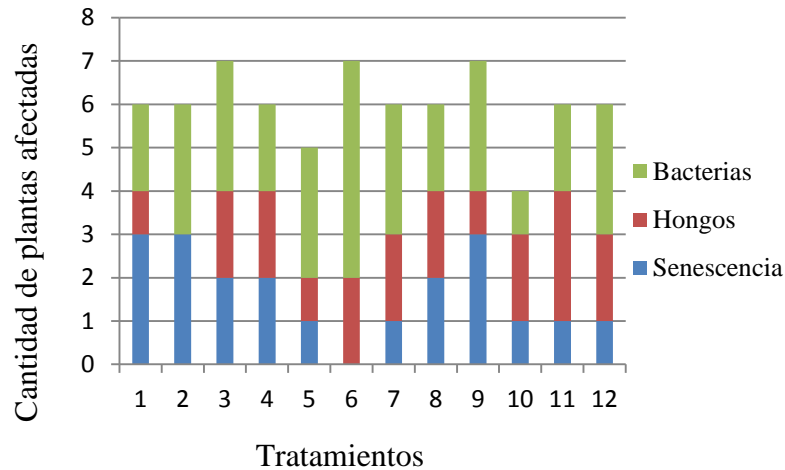


Figura 1. Estimación de los síntomas de senescencia y contaminación observada en los explantes de *A. exserens* luego de 8 semanas cultivados en condiciones in vitro.

En todos los tratamientos se observó presencia bacteriana, que resulta más difícil de controlar respecto a los hongos ya que colonizan en mucho menor tiempo el medio de cultivo y luego la planta. Al momento de determinar el tipo de patógeno estos últimos se diferenciaban por su crecimiento miceliar. Dos pueden ser las formas de contaminación, por un lado microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante (endófitos) y microorganismos introducidos durante la manipulación en el laboratorio (Alvarado et al., 1998). La contaminación endógena no es controlable por métodos de desinfección superficial (Kulkarni et al., 2007) y está asociada principalmente a bacterias (Thomas and Soly, 2009). Algunas bacterias manifiestan crecimiento inmediatamente y otras permanecen latentes durante largos periodos de tiempo en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces vasculares y luego que incrementan su número al interior de la célula o cuando las condiciones in vitro se lo permiten, aparecen súbitamente. (Alvarado et al., 2003; George, 1993). Altas concentraciones de sales, sacarosa o variaciones del pH inhiben su expresión hasta que una condición de estrés desencadene su ataque dentro de la planta (Bridgen, 1994).

La senescencia principalmente vinculada a deshidratación del explante y pardeamiento también tuvo pérdidas considerables. Ambreena (2016) realizó un estudio en

Alstroemeria sp., concluyendo que una de las principales pérdidas in vitro se debe a exudados por parte de los explantes. Estos exudados son metabolitos secundarios de la planta (compuestos fenólicos) responsables de la oxidación y oscurecimiento de explantes (George, 1993). Un alto contenido de estos compuestos fenólicos causa oxidación en el medio de cultivo además de ser reconocidos como inhibidores del crecimiento (Matos, 2000). El corte realizado al dividir las plantas provoca liberación y acumulación de estos metabolitos cercanos a la herida, muchas veces causando la muerte debido a que la planta no puede absorber correctamente los componentes del medio (Qu et al., 2012).

Existen antioxidantes como el ácido cítrico y el carbón activado que se aplican a cultivos in vitro para reducir los efectos de senescencia y oscurecimiento producido por compuesto inhibidores del crecimiento y metabolitos tóxicos (Azofeifa, 2009). Esta opción resulta viable a la hora de mejorar las condiciones de los explantes. Thomas (2008) menciona que la adición de carbón activado al medio promueve el crecimiento y la diferenciación, además de oscurecer al medio evitando así la formación de radicales libres por oxidación de compuestos fenólicos.

En *Aloe barbadensis* se obtiene menores pérdidas en medios líquidos debido a que los exudados pueden diluirse con el medio de cultivo, sin embargo en medios sólidos se evidenció mayor ennegrecimiento en la superficie de contacto con el medio de cultivo debido a una menor tasa de difusión (Albany et al., 2015). En los medios de cultivo sólidos, el agente gelificante favorece la retención de fenoles u otras sustancias dañinas en las cercanías del explante (George 1993).

Tal como se señala en la etapa I de este estudio, las plantas al ser traspasadas eran limpiadas con el bisturí, raspando las zonas oscurecidas cercanas al lugar donde se efectuó el corte de rizoma. Esta labor se realiza para mejorar la condición del explante y evitar la acumulación de compuestos que inhiben el desarrollo de las plantas. Este procedimiento no se realizó durante la etapa II (específicamente en la semana 4), para que no afectara a la medición de peso de explante. En ese mismo momento las plantas fueron pasadas del medio antiguo a frascos estériles vacíos para medir su peso y luego de eso se pasaban a los frascos con los tratamientos nuevos. Es posible que esta metodología pudiera haber generado condiciones de estrés en las plantas, desencadenando la contaminación y senescencia anteriormente descrita. Vázquez (2016), realizando el mismo procedimiento metodológico en *Alstroemeria pallida*, no observó mayores inconvenientes aunque presentó tasas de mortalidad cercanas al 30%. Considerando la poca cantidad de repeticiones por tratamientos que quedaron luego de las pérdidas anteriormente descritas, se omitieron las mediciones finales (semana 8) y se

realizaron los análisis con los datos obtenidos hasta la semana 4.

Peso de explantes

De acuerdo al peso de explantes el tratamiento testigo T1 logró 1,13 g de peso y T5 3,8 g, ambos valores extremos entre sí (Cuadro 2). Considerando los pesos promedio iniciales de cada tratamiento las mayores diferencias (peso promedio final - peso promedio inicial) se presentan en los tratamientos T10, T5, T6 y T7 con (2,54 g), (3,14 g), (2,6 g) y (2,19 g) respectivamente. Esto nos muestra el aumento de peso promedio de cada tratamiento de acuerdo a su condición promedio inicial. Los tres últimos tratamientos corresponden a la concentración de agar $3,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Por otro lado las menores diferencias de aumento promedio de peso se obtuvieron en T1 (0,27 g), seguido de T3 (0,60 g), T11 (0,64 g) y T2 (0,67 g).

Cuadro 2. Promedio de peso (g) de los explantes de *Alstroemeria exserens* sometidos a distintas concentraciones de BAP (0,0; 0,5; 1,0 y 2,0 mg L^{-1}) y agar (0,0; 3,5 y 7 g L^{-1}) a la semana 0 y 4.

Semanas	T12	T11	T10	T9	T8	T7	T6	T5	T4	T3	T2	T1
0	0,73	0,63	0,96	0,72	0,62	0,51	0,69	0,66	0,81	0,83	0,87	0,86
4	1,77	1,27	3,50	1,96	2,07	2,70	3,29	3,80	2,01	1,43	1,54	1,13

Por una parte, el agar brinda el sostén y facilita la absorción de nutrientes por parte de los tejidos pero un exceso en el medio podría reducir la absorción y aumentar la retención de los componentes del medio (Alcaraz-Melendez, 2002). BAP a determinadas concentraciones le brinda la planta la capacidad de aumentar su división celular y disminuir la dominancia apical. En consecuencia con estos efectos se deberían observar aumentos en la masa del explante y proliferación de brotes adventicios (Zuñiga et al., 2010). Se pueden observar efectos de ambos factores en el crecimiento de las plantas, al observar que el tratamiento testigo no reacciona satisfactoriamente al aumento de peso. No existe interacción entre los factores agar y BAP ($p\text{-valor} > 0,05$), por tanto se rechaza la hipótesis y se analizan las variables de forma independiente.

Efecto de Agar en el peso de los explantes. Los tratamientos con $3,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar (T4, T5, T6 y T7) fueron aquellos que presentaron mayor aumento de peso con un valor promedio de 3,16 g. Las concentraciones de 0 y $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar no presentaron diferencias estadísticamente significativas con pesos promedio de 2,04 y 1,24 g respectivamente (Cuadro 3). Se han reportado en diversos estudios que este agente convencional tiene una serie de inconvenientes que afectan negativamente al crecimiento y diferenciación del cultivo (Hussien et al., 2014). Estudios realizados en rizomas de *Aloe barbadensis* Mill. una planta similar en morfología a *Alstroemeria* señalan que al disminuir la concentración de agar hasta $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ hubo una mayor

ganancia de peso ya que la concentración del agente gelificante influye en la absorción de agua y otros componentes del medio (Albany et al., 2015). En la misma especie Tanabe y Horiuchi (2006) demostraron que el porcentaje de ganancia de peso aumentaba a medida que se disminuía la concentración del agente gelificante obteniendo 74% más de ganancia de peso a concentraciones de $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar. En esta evaluación los medios semi-sólidos fueron significativamente mayores lo que explica la mejor condición a la que se exponen los explantes. En consecuencia, esta concentración de agar se considera equilibrada, permitiendo un mayor crecimiento sin perder las propiedades sostenedoras del agar.

Cuadro 3. Efecto de diferentes concentraciones de agar ($0,0$, $3,5$ y $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) en el peso de explantes de *A. exserens* a las 4 semanas de montado el experimento.

Conc. agar $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Peso del explante (g)			
	0 Semanas		4 Semanas	
0,0	0.84	A	1,24	B
3,5	0,78	A	3,16	A
7,0	0.80	A	2,04	B

Medias con una letra común verticalmente no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Este resultado se homologa a otros estudios realizados por Surthar (2011) en los cuales los medios con concentraciones medias de agar fueron satisfactorios para la micropropagación de *Boswellia serrata*, indicando que concentraciones bajas de agar ($3,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) ayudan a la proliferación de brotes y al aumento de biomasa ya que de esta forma la planta puede mejorar su absorción tanto de nutrientes como de agua y por consiguiente una captación más rápida del BAP por parte de las plantas. Este efecto descrito, en el que baja la concentración de agar aumentaría el efecto de la citoquinina no se pudo evidenciar en este estudio, ya que la hormona no presentó interacción estadísticamente significativa con el agar. Se ha comprobado que los medios de cultivo gelificados limitan la absorción de nutrientes ya que éstos pasan a formar parte de la matriz del gel y los explantes requieren mayor tiempo para manifestar crecimiento (Moreno et al., 2001). El agente gelatinizador es sin duda uno de los componentes esenciales en los medios de cultivo, es por esto que en ausencia de agar, las plantas respondieron de manera distintas llegando algunas a tomar un aspecto vidrioso o lo que se identifica como hiperhidratación o vitrificación (Debergh et al., 1981). Este fenómeno se caracteriza por la aparición de grandes espacios intercelulares, menos cera epicuticular, menos estomas en las hojas y cloroplastos con granas pequeñas. (Ivanova 2010; Rojas-Martínez 2010). Entre las principales causas de la hiperhidratación están el potencial osmótico y la concentración de agar en el medio de cultivo (George, 1993; Cárdenas y Villegas, 2002) es por esto que el medio líquido se suele usar cuando el agar se considera una limitación en los sistemas de cultivo (Lee et al., 1986).

Los tratamientos en medio líquido llevaban un algodón como soporte bajo el explante, este material puede haber influido, al igual que los tratamientos con $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ afectando las propiedades físicas y aumentando la retención de los componentes del medio, lo que afecta la absorción de nutrientes por parte de las plantas (Sakina, 1984). Estudio realizados en *Zingiber officinale* al evaluar el uso de papel filtro, algodón y luffa (*Luffa aegyptiaca* o esponja vegetal) en medios líquidos, concluyen que luffa y papel filtro son los mejores soportes, mientras que algodón presenta ciertos inconvenientes para las plantas y no respondieron positivamente (Hussien et al., 2014). Según Vázquez (2016) la retención y liberación del medio líquido al poseer un algodón como soporte, actúa de forma similar al agar en concentraciones de $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, afectando el potencial hídrico del sistema. Alcaraz-Meléndez (2002) mencionan que las metodologías donde se incluyen medios líquidos facilitan la absorción de nutrientes por parte de los tejidos, disminuyendo el tiempo requerido para su desarrollo sin prescindir del agente gelificante. Contrario a esto Moreno (2001) en *Cymbopogon citratus* utilizando medios líquidos no obtuvo un crecimiento óptimo en comparación a tratamientos con $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar, los cuales permitieron un mejor comportamiento de los explantes. Entre estos dos, la concentración de $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ fue más efectiva. Este resultado se atribuye a que en medios sin agar y con sostén, la planta no se encuentra en contacto directo con el medio de cultivo y sus componentes, si no que éstos son absorbidos lentamente por capilaridad a través del soporte utilizado, encontrándose en condiciones similares los medios líquidos con los medios sólidos ($7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Debido a estos resultados de aumento de peso se observaron mejores respuestas en un medio con la mitad de concentración de agar al estar a una concentración equilibrada, permitiendo una adecuada absorción de agua y nutrientes. El medio semi-sólido cumplió además el rol de soporte satisfactoriamente por tanto es una opción viable.

Es importante el considerar la reducción en los niveles de agar en los medios de cultivo, ya que contribuye además a reducir los costos de producción (Priel, 2005; Aggarwal y Barna, 2004). El agar es uno de los componentes más costosos dentro de la micropropagación, siendo aproximadamente el 70% de los costos del medio de cultivo (Prakash et al., 2004). Algunos autores sugieren el uso de algunas alternativas como el alginato, agarosa o gerlita (Hussein, 2014), ya que el agar comercial contiene muchas impurezas que pueden alterar las características químicas y físicas del medio, afectando así directamente los tejidos y células cultivados (Tanabe y Hiorichu, 2006).

Efecto de BAP en el peso de explantes. Respecto a la influencia de BAP en el peso del explante, no se obtuvieron diferencias significativas en ninguna concentración del regulador de crecimiento (0,5, 1,0 y $2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Khaleghi et al. (2008) realizaron un estudio en el cultivo in vitro de *Alstroemeria* cv. Fuego indicando que a mayores concentraciones de BAP ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) se puede estimular la proliferación y aumento de tamaño del explante. Según Aros et al. (2017), en *Alstroemeria pallida* la mejor

concentración para obtener un mayor peso de explantes es $2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP a la 8 semanas. En la semana 4 al igual que en este estudio, no se encontraron diferencias significativas. Ambos autores señalan que durante el cultivo in vitro de alstroemeria, en ausencia de la citoquininas se observa la disminución del aumento de peso del rizoma.

Cuadro 4. Efecto de diferentes concentraciones de BAP en el peso de explantes de *A. exserens* luego de 4 semanas cultivadas in vitro.

Conc. BAP $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Peso promedio de explantes (g)			
	0 Semanas		4 Semanas	
0,0	0,74	A	2,25	A
0,5	0,85	A	2,64	A
1,0	0,65	A	1,42	B
2,0	0,72	A	1,91	A B

Medias con una letra común verticalmente no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

A pesar de los resultados obtenidos, varios autores señalan a BAP como estimulador en la formación y crecimiento del rizoma, lo que no pudo observarse en este ensayo para peso del explante. Concentraciones desde $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ hasta $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de citoquininas se han ocupado en micropropagación de plantas (Hartman, 1999). Estudios realizados en *Elettaria cardamomum* (L.) Maton sugieren que a concentraciones por sobre los $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP no es conveniente para la multiplicación in vitro ya que debido a ciertos desordenes generados por anormalidades mitóticas, los explantes resultantes son amorfos, indicando que es importante el nivel endógeno de hormonas de la planta para evitar resultados contraproducentes en las especies cultivadas (Zuñiga et al., 2010). De esta misma forma, la aplicación de altas concentraciones de BAP ($3,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en *Musa acuminata* fueron perjudiciales para los cultivos debido al alto índice de anomalías que estos presentaban (Jafari, 2011). Debido a que las evaluaciones solo corresponden hasta la semana 4 y no a la semana 8, como en el caso de Aros et al. (2017), es que quizás el efecto de BAP aún no se hace perceptible en términos de aumento de biomasa.

Largo de rizoma

De acuerdo al aumento de largo de rizoma se presenta T11 (0,71 cm) y T7 (1,21 cm) como los tratamientos con valores más extremos entre sí (Cuadro 5). El largo de rizoma no presenta interacción entre los factores agar y BAP (p -valor $> 0,05$), por tanto las variables se analizaron de forma independiente.

Cuadro 5. Promedios de largo del rizoma (cm) de *A. exserens* sometidos a distintas concentraciones de BAP y agar, en las distintas fechas de evaluación (0 y 4 semanas)

Semanas	T12	T11	T10	T9	T8	T7	T6	T5	T4	T3	T2	T1
0	0,71	0,66	0,88	0,66	0,73	1,08	0,78	0,92	0,93	0,92	0,75	0,76
4	0,92	0,71	1,12	0,75	0,91	1,21	0,91	1,17	1,03	1,08	0,77	0,80

Efecto de BAP sobre el largo de rizoma. El efecto de BAP en la longitud de los rizomas no genera diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, resultando todas las concentraciones con el mismo crecimiento en longitud horizontal (Cuadro 6). El aumento en el largo de rizoma está influenciado directamente por la disminución de la dominancia apical que destina sus recursos a la división celular, provocando aumento en la cantidad de brotes adventicios, que a su vez potencian el crecimiento del rizoma. Este proceso es inducido principalmente por BAP (Qu et al., 2000). No obstante en esta experiencia la influencia de este regulador de crecimiento sobre el largo de rizoma no se observa, de manera que todas las concentraciones obtienen la misma respuesta. Varios autores señalan en cultivo in vitro de *Zingiber officinale*, que dosis elevadas de BAP (4-6 mg•L⁻¹) generan desbalances en la planta, provocando problemas en su crecimiento y desarrollo normal (Thayamini, 2013; Hiremath, 2006 y Dipti, 2005). Según señala Han et al. (1994) en *Alstroemeria* sp. la adición de pequeñas concentraciones de auxinas (IAA 0,3 mg•L⁻¹ o NAA 0,2 mg•L⁻¹) al medio de cultivo en combinación de BAP (1 o 2 mg•L⁻¹) fueron beneficiosas para el crecimiento del rizoma respecto a las que solo contenían BAP. Bajas concentraciones de auxinas en la propagación de *A. exserens* posiblemente hubiesen mostrado una tendencia diferente, ya que como se ha mencionado en diversos estudios las plantas crecen de manera estable al generarse un equilibrio de los reguladores de crecimiento en el interior de la planta.

Cuadro 6. Efecto del BAP en el aumento del largo de rizoma (cm) de *A. exserens*, luego de 4 semanas cultivadas in vitro.

Conc. BAP mg•L ⁻¹	Largo rizoma (cm)	
2,0	0,99	A
1,0	0,95	A
0,5	0,86	A
0,0	0,90	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

En la evaluación de esta variable es más compleja observar diferencias en las plantas, ya que BAP como función principal estimula la división celular y asocia al aumento de brotes repartiendo primeramente los asimilados en estos órganos. El crecimiento del rizoma también se ve influenciado pero este lo hace de manera secundaria, tomándole un poco más de tiempo presentar aumentos en la longitud de estos (Lin et al., 2000). Similares resultados obtienen Aros et al. (2017) a las 4 semanas al no observar diferencias significativas, luego a las 8 semanas observa que BAP a 1,0 y 2,0 mg•L⁻¹ son las concentraciones con mayor efecto en el aumento de la longitud del rizoma. Dado esto es que los resultados de esta variable no registran diferencias significativas en este estudio.

Efecto del agar sobre el largo del rizoma. Respecto al efecto del agar sobre el largo del rizoma se observó que la concentración de 3,5 g•L⁻¹ de agar es significativamente diferente de los medios líquidos y sólidos presentando un largo promedio de 1,73 cm (Cuadro 7). Los tratamientos con concentraciones de 7 y 0 mg•L⁻¹ de agar no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos con pesos promedio de 1,21 g y 1,15 g respectivamente por lo cual se comportaron de la misma manera.

Cuadro 7. Efecto del agar en el aumento de largo de rizoma (cm) de *A. exserens*, luego de 4 semanas cultivadas in vitro.

Conc Agar g•L ⁻¹	Largo rizoma (cm)	
3,5	1,73	A
7,0	1,21	B
0,0	1,15	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05).

En algunas plantas ornamentales se ha informado que el uso de medios líquidos con frecuencia aumentó el crecimiento de brotes y largo de los explantes (Sandal et al., 2001; Preece, 2011). En este estudio no ocurrió lo mencionado ya que estos medios suelen ocuparse en caso que la planta no prescindiera del agar para su cultivo y se ha demostrado que las plantas de *A. exserens* requieren al menos la mitad de agar (3,5 g•L⁻¹) para su establecimiento in vitro (Aros et al., 2017). En medios sólidos como ya se ha mencionado, es claro el efecto en la reducción del crecimiento, viéndose afectados principalmente la disponibilidad de agua y nutrientes. De acuerdo a los antecedentes expuestos el medio semi-sólido es el más adecuado para el cultivo de *A. exserens*, en condiciones in vitro.

Largos de brotes

De acuerdo al largo de brotes destacan los tratamientos T5 (6,48 cm), T9 (5,47 cm), T6 (5,02) y T12 (2,75 cm) (Cuadro 8). No existe interacción entre los factores agar y BAP (p -valor $> 0,05$), por lo tanto se analizaron las variables en forma independiente.

Se puede observar que tanto T4 como T12 presentaron bajos promedios de largo de brotes (Cuadro 8), ambos tratamientos presentaron $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP en su preparación. Esta concentración evidencia el mayor control de la dominancia apical expresada como menores largos de brote.

Cuadro 8. Promedio de largo de brote (cm) de los explantes de *A. exserens* sometidos a distintas concentraciones de BAP (0,0; 0,5; 1,0 y $2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y agar (0,0; 3,5 y $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), a la semana 0 y 4.

Semanas	T12	T11	T10	T9	T8	T7	T6	T5	T4	T3	T2	T1
0	2,10	2,36	2,61	2,08	2,15	2,06	2,75	2,07	2,8	2,57	2,56	2,62
4	2,75	3,21	4,46	5,47	3,41	4,91	5,02	6,48	3,55	3,54	3,28	3,55

El crecimiento de la parte aérea está influenciado mayormente por la concentración de hormonas que por la concentración de agar. El agar influye en facilitar en mayor o menor medida los nutrientes, los reguladores de crecimiento y el agua (Podwyszynska et al., 1997). Las citoquininas como reguladores de crecimiento, causan la inducción de brotes, promoviendo la división celular y disminuyen la dominancia apical, generalmente estimulan la proliferación de brotes e inhiben la elongación de estos (Venkataiah et al., 2006).

Efecto del agar en el largo de brote. Respecto al largo de brote se observa que en medios líquidos resulta un largo promedio de 3,26 cm, en los medios sólidos un largo promedio de 4,08 cm y en los medios semi-sólidos alcanzan un promedio de 5,08 cm (Cuadro 9). Estos no presentan diferencias significativas entre tratamientos por lo que el agar tiene el mismo efecto en la elongación de los brotes en todas las concentraciones utilizadas, evidenciando la poca influencia que tiene el factor agar sobre largo de brote. La cantidad del agar puede afectar, en principio, a todos los procesos de desarrollo, siendo la regeneración de los brotes y raíces adventicios los más sensibles (Scholten y Pierik, 1998).

Cuadro 9. Efecto del agar en el aumento de largo de brote (cm) de *A. exserens*, luego de 4 semanas cultivadas in vitro.

Conc Agar $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Largo brote (cm)	
3,5	5,08	A
7,0	4,08	A B
0,0	3,26	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Mayores concentraciones de agente gelificante determina que los compuestos disueltos sean absorbidos por las plantas en menor medida dentro del medio de cultivo (Hussein et al., 2014). Como hemos visto, de acuerdo a su concentración (en peso explante y largo de rizoma) el agar permite que los nutrientes, el agua y los reguladores de crecimiento estén disponibles y esto determina la influencia en el largo de los brotes (George, 1993; Datta, 2006). En este estudio, este efecto no queda evidenciado al obtener el mismo comportamiento en los medios sólidos, líquidos y semi-sólidos. Si bien los medios con $3,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar muestran largos promedio mayores (T5, T6 y T7), estos resultados no son significativos para determinar algún efecto sobre el largo de los brotes.

Efecto de BAP en el largo de brote. El efecto de la hormona BAP se evidencia a través de la obtención de brotes más cortos en todas las concentraciones de citoquininas (0,5; 1,0 y $2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Por otro lado, los tratamientos sin aplicación de este regulador de crecimiento, mantienen su dominancia apical independiente de las concentraciones de agar, logrando mayores largos de brote (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efecto del BAP en el aumento de largo de brote (cm) de *A. exserens*, luego de 4 semanas cultivadas in vitro.

Conc. BAP $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Largo brote (cm)	
2,0	3,32	A
1,0	3,95	A
0,5	4,01	A
0,0	5,30	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Según Shahriari et al. (2012), en *Alstroemeria* Calaris, el uso de BAP dio lugar a brotes con menores alturas. Son las citoquininas las que inducen la formación de brotes y reducen su altura a través de la inducción del crecimiento celular y la reducción de la dominancia apical (Ranjan et al., 2003). De la misma manera se obtienen en *Alstroemeria pallida* resultados similares en el largo de los brotes siendo aquellos sin aplicación los que presentaron mayores largos (Aros et al., 2017). Debido a una menor inducción de brotes, la energía y los recursos se distribuyen a un menor número de fuentes receptoras, influyendo en el alargamiento de los brotes (Lin et al., 2000; Vázquez, 2016). Khalegui et al. (2008) señalan que las auxinas naturales estimulan el crecimiento de brotes y se manifiesta la dominancia apical en tratamientos sin aplicación y que a la mínima concentración de BAP los explantes comienzan a disminuir el largo de sus brotes. Es claro el efecto del BAP en la disminución de los largos de brotes, en todas las concentraciones utilizadas.

Número de brotes activos y senescentes

Se contaron los brotes verdes (activos) y brotes deshidratados (inactivos o senescentes). Considerando el brote inicial de cada explante, se observó los nuevos brotes que surgen por tratamiento. El número de brotes observado en T6 (3,5 agar $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y 0,5 BAP $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) contó con 10 nuevos brotes, seguido viene T7 (3,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ agar y 1,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP) con 8 nuevos brotes activos y luego T11 (7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar y 1,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP) con 7 brotes activos, estos tratamientos evidenciaron la proliferación de brotes adventicios y no poseen ningún brote deshidratado (Figura 2). Debido a que el número de brotes no poseía distribución normal, se aplicó el modelo lineal generalizado con función de distribución Poisson, se realizó el Test de Wald y no se encontraron diferencias estadísticas en ninguno de los tratamientos (Apéndice).

Zuñiga et al. (2010) menciona que, dependiendo del nivel endógeno de la fitohormona la adición de reguladores de crecimiento puede provocar resultados contradictorios, por lo cual encontrar la dosis adecuada para la micropropagación de acuerdo a cada especie es esencial para evitar anomalías mitóticas. Diversos autores señalan concentraciones óptimas para la proliferación de brotes adventicios en rizomas de alstroemeria que van entre los 2 y 3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP para subdividir cada 4 semanas (Vázquez, 2016; Zuñiga, 2010 y Khalegi, 2008).

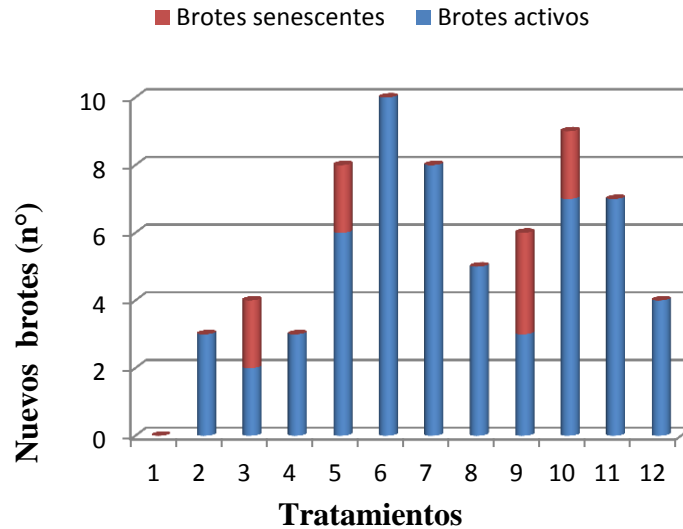


Figura 2. Barras apiladas sobre el número de brotes (nuevos) activos y senescentes en *A. exserens* a las 4 semanas.

Se puede apreciar que T1 fue el único tratamiento que no presentó aumento en el número de brotes. Por su parte, el tratamiento testigo nos permite visualizar que el efecto de los reguladores de crecimiento y gelificantes del medio como parte esencial en la multiplicación de *A. exserens*, en los diversos resultados no ha presentado respuestas significativas. Al observar todos los medios líquidos (T1, T2 T3 y T4), y sin importar la concentración de BAP que éstos tuvieran, fueron los que presentaron tendencia de no generar brotes nuevos. Este efecto se relaciona a los resultados anteriores (largo rizoma y peso de explante) en que los medios líquidos no obtuvieron aumentos significativos de estas variables.

Los tratamientos con mayor cantidad de brotes deshidratados fueron el T9 seguido del T10 y T3 (Figura 2). El efecto de senescencia de algunos brotes se relacionan a bajas concentraciones de BAP, en el cual debido a una expresión de la relación endógena de auxinas/citoquininas que presenta, la planta tiende a provocar senescencia en brotes adventicios con el fin de mantener los brotes centrales (Jordan y Casaretto, 2006). Es la dominancia apical la que destina recursos a los brotes principales causando la muerte de brotes adventicios (Gabryszewska y Hempel, 1985).

CONCLUSIONES

Se rechaza la hipótesis inicial, ya que no se identifica en ninguna de las variables un efecto combinado de concentraciones de agar y BAP que produjese distintas respuestas en la micropropagación de *A. exserens*., sin embargo, se observan los efectos de ambos en forma separada.

El uso de citoquinas (BAP) resulta fundamental para el cultivo in vitro de *A. exserens*. Este regulador de crecimiento a cualquier concentración se observa que genera efecto sobre las plantas. Respecto al agar se concluye que los medios líquidos y sólidos actúan de igual forma sobre la planta en términos de absorción de nutrientes y agua, siendo el medio semisólido ($3,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) el más conveniente para la micropropagación de esta especie.

La tasa de prolificidad de *A. exserens* no es satisfactoria para la propagación masiva. Puede ser mejorada si se adicionan bajas concentraciones de auxinas ($0,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de NAA)

Los resultados pueden ser poco concluyentes considerando que solo se tomaron dos evaluaciones durante 4 semanas. Con lo obtenido en esta experiencia, se tiene una aproximación a un método de micropropagación masiva. El uso de citoquininas y agar son fundamentales en la propagación de *A. exserens* y es necesario mejorar los métodos de propagación aún más cuando el material es escaso.

BIBLIOGRAFÍA

- Aagesen, L. and M. Sanso. 2003. The phylogeny of the alstroemeriaceae, based on morphology, rps16 Intron, and rbcL sequence data. Systematic Botany, 28(1):47-69.
- Ambreena D.; T. Imtiyaz; M. Nazki; S. Wanid; N. Malik and Z. Rather. 2016. Development of in vitro protocol of *Alstroemeria Hybrida* cv “Pluto”. Indian Journal of Ecology . 43 (Special Issue-2): 675-680
- Albany N.R.; J. A. Vilchez y S. León de Sierralta. 2015. Medios de cultivo líquidos: un avance para la micropropagación comercial de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.). Revista colombiana de biotecnología, 0123-3475
- Altan F., B. Burun and N. Sahin. 2010. Fungal contaminants observed during micripropagation of *Lilium candidum* L. and the effect of chemotherapeutic substances applied after sterilization. African Journal of biotechnology, 9(7), 991-995’
- Alcaraz-Meléndez, L., S. Real-Cosío, y M. L. Robert. 2002. Morphological comparison of damiana (*Turnera diffusa*, Willd.) regenerated in vitro from leaves cultured in solidified medium and liquid cultures. Scientia horticultrae, 96(1), 293-301
- Alvarado Y.C., C. M. Martín, N. P. González, L. G. Águila, M. F. Seijo, 2003. Estrategias de trabajo para la prevención y el control de la contaminación bacteriana en la micropropagación de la caña de azúcar. Biotecnología vegetal.2: 77-82.
- Alvarado Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo in vitro de plantas. En J.N. Pérez-Ponce (Ed.). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología* (pp. 81-104). Santa Clara, Cuba: Ediciones GEO.
- Aros D., M. Vásquez, C. Rivas and M. L. Prat. 2017. An efficient method for in vitro propagation of *Alstroemeria pallida* Graham rhizomes. Chilean journal of agricultural research, 77(1).
- Azofeifa. A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. Agronomía mesoamericana, 20(1):153-175
- Baeza, C. y E. Ruiz. 2011. *Alstroemeria hookeri* Lodd. Subsp. *sansebastianana* C. M. Baeza & E. Ruiz, nueva para la flora de Chile. Gayana Botanica, 68(2):313-315.
- Baeza, C.; G. Rojas y E. Ruiz. 2011. El cariotipo fundamental de *Alstroemeria patagónica* (Alstroemeriaceae). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 46(3-4):313-315.

Bayer, E. 1987. Die gattung alstroemeria in Chile. Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München 24:79-83

Blanco M. y R. Valverde. 2004. Micropropagación de Philodendron sp. Agronomía costarricense. 28(1): 39-46

Bridgen M.P. 1994. A review of plant embryo culture. HortScience, 29(11): 1243-1246.

Cárdenas L. y M. Villegas, 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación in vitro. Revista fitotecnológica de México. (2): 213-217.

Chiari A. and M.P. Bridgen. 2000. Rhizome splitting: a new micropropagation technique to increase in vitro propagule yield in Alstroemeria. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 62(1):39-46.

Condemarán C. J. y C. Vargas. 2007. Efecto del Ácido indolbutírico(IBA) y 6-bencilaminopurina(BAP) en el desarrollo in vitro de yemas axilares de Encylia microtos(RCHB.F.) Hoehne (*Orchidaceae*). Lankesteriana 7(1-2): 247-254.

Cruz G.I. y A.A. Mosquera. 2003. Inducción de embriogénesis somática en Alstroemeria Sp. Agronomía Colombiana. 21(3): 121-128.

Datta M.M.; A. Majumder and S. Jha. 2006. Organo-genesis and plant regeneration in Taxus wal-lichiana (Zucc.). Plant Cell Rep. 25: 11-18.

Debergh P.; P. Zimmerman and H. Richard. 1991. Micropropagation: Technology and Application Dordrecht, the netherlands: Kluwer Academic Publishers. 496p.

Dipti, T.; R. B. Ghorade; M. Swati and B. V. Pawar. 2005. Rapid multiplication of tumeric by micropropagation. Annal plant physiology, 19:35-37.

George E.F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The Technology. Exergetics Ltd. Edington, Wilts. England. 574 p.

Gabryszewska E. and M. Hempel. 1985. The influence of cytokinins and auxins on Alstroemeria in tissue culture. Acta Horticulturae, 167:295-300.

Habiba U.; S. Reza; M. L. Saha; M. R. Khan and S. Hadiuzzaman. 2002. Endogenous bacterial contamination during in vitro culture of table banana: Identification and prevention. Plant Tissue Culture. 12 (2), 117-124.

Hamidoghli Y.; S. Bohloli and A. Hatamzadeh. 2007. In vitro propagation of *Alstroemeria* using rhizome explants derived in vitro and in pot plants. *African Journal of Biotechnology*, 6:2147-2149.

Han B.H.; Y. J. Kim; J. K. Choi. 1994. Micropropagation of *Alstroemeria* sp through rhizome tip culture. *Journal of the Korean society for horticultural science*, 440-310

Hartmann, H. y Kester, D. 1999. Propagación de plantas: principios y prácticas. Séptima reimpresión, México: Editorial continental S.A. de C.V. 758 p.

Hiremath, R.C. 2006. Micro propagation of Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). M. Sc. Thesis. Department of Horticulture college of Agriculture, Dharwad University of Agricultural Sciences, Dharwad.

Hussien F.; M. A. Osman and T. Idris, 2014. The influence of liquid media support, gelling agents and liquid overlays on performance of in vitro cultures of ginger (*Zingiber officinale*). *International Journal of scientific and research publications*. ISSN 2250-3153

Ivanova, M., and J. Van Staden, 2010. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schonland ex Pillans. *Plant Growth Regulation*, 60(2), 143–150.

Jordán, M. y J. Casaretto. 2006. Fisiología vegetal, La Serena, Chile. Hormonas y reguladores de crecimiento: Auxinas, giberelinas y citocininas. Ediciones universidad de la Serena.

Kulkarni A.; A. Kelkar; M. G. Watwe and K.V. Krishnamurthy. 2007. Characterization and control of endophytic bacterial contaminant in in vitro cultures of *Piper spp.*, *Taxus Baccata* subsp., *Wallichiana*, and *Withania somnifera*. *Canadian journal of Microbiology*. 53(1), 63-74.

Kyte, L.; J. Kleyn; H. Scoggins and M. Bridgen. 2013. Plants from tubes: an introduction to micropropagation, 4th edition. Portland, Oregon: Timber Press, Inc. 269p.

Leifert C.; A. C. Cassels. 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 37(2), 133-138.

Lin, H.S.; M.J. De Jeu and E. Jacobsen. 1997. Direct Shoot regeneration from excised leaf explants of *in vitro* grown seedlings of *Alstroemeria* L. *Plant Cell Reports*, 16(11):770-774.

Lin, H. S.; D. M. Jeu and E. Jacobsen. 2000. The application of leafy explant

micropropagation protocol in enhancing the multiplication efficiency of *Alstroemeria*. Scientia Horticulturae 85: 307-318

Matos, A.; J. Molina y D. Acosta. 2000. Establecimiento de una metodología eficiente para el cultivo in vitro de *Aloe vera* L. *Ciencia*, 8(3), 280-284.

Moreno J. R.; M. fernandez, y K. Alvarado, 2001. Influencia de la concentración de agar sobre la multiplicación in vitro de *Cymbopogon citratus*(D.C.) Stapf. *Centro de estudios de biotecnología Vegetal*, 2:77-81

Muñoz, M. y A. Moreira. 2003. *Alstroemerias de Chile: Diversidad, Distribución y Conservación*. Santiago, Chile: Museo Nacional de Historia Natural, Fondo del Libro y la Lectura, Taller La Era. 140p.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologiae Plantarum 15:473-497

ODEPA (Oficina de estudios y políticas agrarias), 2014. Mercado de las flores de corte. [En línea]. Santiago, Chile. Recuperado en: <<http://www.odepa.cl/articulo/caracterizacion-del-mercado-de-las-flores-en-chile-mayo-de-2014/>>. Consultado el: 6 de mayo de 2015.

Prakash S.; M. Hoque y T. Brinks. 2004. Culture media and containers. En *Low cost options for tissue culture technology in developing countries*. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture (pp. 29-40).

Preece, J.E. 2011. Micropropagation in stationary liquid media. Propagation of Ornamental Plants, 10(4): 183-187

Preil W. 2005. General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for in vitro culture. En A.K. Hvoslef-Eide y W. Preil (Eds.). *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* (pp. 1-18). Dordrecht, Holanda: Springer

Qu, L.; J. Polashock, and N. Vorsa. 2000. A high efficient in vitro cranberry regeneration system using leaf explants. Horticultural Science 35:948-952

Rahim S.; B. Kaviani y N. Dehkaei. 2013. The effect of different concentrations of NAA and BAP on micropropagation of *Alstroemeria*. European Journal of Experimental Biology, 3(5):133-136.

Ranjan R; S. Purohit and V. Prasad. 2003. *Plant Hormones: Action and Application*, Agrobios, India, 245 p.

- Ravenna, P. 1988. New or noteworthy species of *Alstroemeria*. Phytologia, 64(4):281-288
- Rojas-Martinez, L.; R. G. Visser, and G. J. Klerk. 2010. The hyperhydricity syndrome: Waterlogging of plant tissues as a major cause. Propagation of Ornamental Plants, 10(4), 169–175
- Scholten J. S. and L. M. Pierik. 1998. Agar as a gelling: differential biological effects in vitro. Scientia horticultrae.12(2), 115-223
- Shahriari A.G.; A. Bacheri; A. Sharifi and N. Moshtaghi. 2012. Efficient regeneration of “calaris” *Alstroemelia* from rhizome explants. Notulae Scientia biologicae. 4(2):86-90
- Sandal I.; A. Bhattacharya and P. S. Ahuja. 2001. An efficient liquid culture system for tea shoots proliferation. Plant Cell Tissue. Organ. Cult. 65: 75-80.
- Sanso, A. 2002. Chromosome studies in Andean taxa of *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae). Botanical Journal of the Linnean Society, 138(4):451-459.
- Suthar, R.; N. Habibi and S. Purohit. 2011. Influence of agar concentration and liquid medium on in vitro propagation of *Boswellia serrata* Roxb. Indian Journal of Biotechnology, 10: 224-227.
- Taiz L. y E. Zeiger. 2006. Fisiología vegetal. Tercera edición. Universidad Jaime I. 581p.
- Tanabe M. J. and K. Horiuchi, 2006. Aloe barbadensis Mill. Ex vitro autotrophic culture. Journal Hawaiian Pacific Agriculture. 13: 55-59.
- Thayamini H. S. 2013. In vitro propagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) through direct organogenesis: A review. Pakistan journal of biological sciences. 16(24):1826-1835.
- Thomas T. D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances, 26(6), 618–631
- Thomas, P. and T. A. Soly. 2009. Endophytic bacteria associated with growing shoot tips of banana (*Musa sp.*) cv. Grand Naine and the affinity of endophytes to the host. Microbial Ecology, 58(4), 952-964
- Van Zaayen, A. 1995. Alstroemeria. pp 237-249 In: Loebestein G.; Lawson R.H. y Brunt A.A. Virus and virus-like diseases of bulbs and flower crops. Chichester,UK:

Wiley Publishers. 556 p.

Vázquez M., 2016. Micropropagación de *Alstroemeria pallida* Graham a través de rizomas in vitro. Memoria Ingeniero Agrónomo. Santiago, Chile. Facultad de ciencias agrónomicas, Universidad de Chile. 33h.

Venkataiah P.; C. Thamidala and S. Karampuri. In vitro shoot multiplication and plant regeneration in four *Capsicum* species using thidiazuron. Scientia Horticulturae, 107: 117-122

Zuñiga D. S.; S. Hoyos y L. Afanador, 2010. Evaluación de plántulas de Cardamomo (*Elettaria cardamomum* (L.) Maton) por su resistencia in vitro al filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum*. Revista de la facultad de química farmacéutica, volumen 17: p 155-164

APÉNDICE

Cuadro 1. Prueba de hipótesis marginal del modelo (Wald test) realizado al experimento con respecto al número de brotes de *A. exserens* a las 4 semanas de cultivo in vitro

Variable	Valor F	P-valor
BAP	0,28	0,84
AGAR	2,22	0,11
BAP: AGAR	0,47	0,82

Cuadro 2. Medias ajustadas según el modelo propuesto.

BAP	AGAR	Medias	E.E
0,0	3,5	2,25	0,53
0,5	7,0	2,00	0,50
0,5	3,5	1,75	0,47
2,0	7,0	1,75	0,47
1,0	3,5	1,63	0,45
1,0	7,0	1,50	0,43
2,0	3,5	1,50	0,43
0,5	0,1	1,38	0,41
0,0	7,0	1,38	0,41
1,0	0,1	1,25	0,40
2,0	0,1	1,13	0,37
0,0	0,1	0,88	0,33

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.