

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

**ESCUELA DE PREGRADO**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**MICROPROPAGACIÓN DE *Alstroemeria pallida* Graham A TRAVÉS DE RIZOMAS  
IN VITRO**

**MARKO ESTEBAN VÁSQUEZ ROJAS**

**SANTIAGO – CHILE**

**2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

**ESCUELA DE PREGRADO**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**MICROPROPAGACIÓN DE *Alstroemeria pallida* Graham A TRAVÉS DE RIZOMAS  
IN VITRO**

**MICROPROPAGATION OF *Alstroemeria pallida* Graham THROUGH IN VITRO  
CULTURE RHIZOMES**

**MARKO ESTEBAN VÁSQUEZ ROJAS**

**SANTIAGO – CHILE**

**2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICA**

ESCUELA DE PREGRADO

**MICROPROPAGACIÓN DE *Alstroemeria pallida* Graham A TRAVÉS DE RIZOMAS  
IN VITRO**

Memoria para optar al Título Profesional de:  
Profesional de Ingeniero Agrónomo

**MARKO ESTEBAN VÁSQUEZ ROJAS**

PROFESORES GUÍAS	CALIFICACIONES
Sr. Danilo Aros O. Ingeniero Agrónomo, Ph. D.	6,6
Sra. M. Loreto Prat del Río. Ingeniero Agrónomo, Mg., Dr.	6,5
PROFESORES EVALUADORES	
Sra. Loreto Cánaves Soto Ingeniero Agrónomo, M.S.	5,0
Sr. Alejandro León S. Ingeniero Agrónomo, Ph. D.	6,3

SANTIAGO – CHILE

2016

## AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que se han cruzado en mi camino y llenado mi vida de buenos momentos, me han dado la motivación para seguir adelante y completar este proceso de mi vida y la carrera que amo. A mi familia, amigos, profesores, a mi novia incondicional en los buenos y malos momentos, y a todo aquel con el que he compartido un momento fugaz de existencia.

“Soy eterno viajero de sueños e ilusiones.  
Soy eterno viajero de amores.  
Cruzaré los mares en mi barco pirata  
con los cañones acenagados  
y mi bandera será blanca.

Dominaré los aires como un pájaro  
desprendiendo de mi cuerpo  
blancas y multicolores plumas de amor y paz.

Cabalaré por valles y montañas a lomos de mi Gitana  
Sin dejar más señal para el retorno  
que la sonrisa y la amabilidad.

Escucharé historias escalofriantes de viejos.  
Contaré historias inventadas  
a preciosos niños dulces y traviesos;

y amaré tierna y locamente  
a la mujer que merezca del amor puro  
de aquel dulce vagabundo.”

Extrechinato y Tú, 2001.

## ÍNDICE

### CONTENIDO:

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Hipótesis .....	5
Objetivos.....	5
MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
Material vegetal .....	6
Lugar del estudio .....	6
Diseño Experimental .....	6
Procedimiento.....	6
Evaluaciones .....	7
Análisis estadístico .....	8
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
Efectos de agar y BAP sobre el peso del explante .....	9
Efectos de agar y BAP sobre el largo del rizoma .....	11
Efectos de agar y BAP sobre el desarrollo de la parte aérea .....	13
Efectos de agar y BAP sobre el número de rizomas obtenidos y tasa de proliferación ...	17
Tasas de mortalidad y contaminación .....	18
Evaluación fotográfica.....	18
CONCLUSIONES.....	20
APÉNDICE I.....	21
BIBLIOGRAFÍA .....	24

## ÍNDICE DE CUADROS

### CONTENIDO:

MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
Cuadro 1. Detalle del ensayo y los tratamientos utilizando distintas concentraciones de BAP y agar en rizomas in vitro de <i>A. pallida</i> .....	6
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
Cuadro 3. Efecto de diferentes concentraciones de agar en el experimento con respecto al aumento de peso del rizoma luego de 4 y 8 semanas desde que fue montado el experimento.....	9
Cuadro 4. Efecto de diferentes concentraciones de BAP en el experimento con respecto al aumento de peso del rizoma luego de 4 y 8 semanas desde que fue montado el experimento.....	10
Cuadro 5. Promedios de largo del rizoma de <i>A. pallida</i> (cm) para cada tratamiento sometidos a distintas concentraciones de BAP (0,0; 0,5; 1,0 y 2,0 mg•L <sup>-1</sup> ) y agar (0,0; 3,5 y 7,0 g•L <sup>-1</sup> ), en las distintas fechas de evaluación (0, 4 y 8 semanas).....	11
Cuadro 6. Efecto de concentraciones de BAP en el experimento con respecto al largo del rizoma (cm) luego de 4 y 8 semanas desde que fue montado el experimento.....	12
Cuadro 7. Efecto de concentraciones de BAP en el experimento con respecto al número de brotes activos luego de 4 y 8 semanas desde que fue montado el experimento.....	12
Cuadro 8. Efecto de concentraciones de BAP en el experimento con respecto al número de brotes deshidratados luego de 4 y 8 semanas desde que fue montado el experimento.....	15
Cuadro 9. Tasa de proliferación de los diferentes tratamientos de los explantes de <i>A. pallida</i> (g) para cada tratamiento sometidos a distintas concentraciones de BAP (0,0; 0,5; 1,0 y 2,0 mg•L <sup>-1</sup> ) y agar (0,0; 3,5 y 7,0 g•L <sup>-1</sup> ) a las 8 semanas.....	16
Cuadro 10. Porcentajes de muerte y contaminación de rizomas de <i>A. pallida</i> según los respectivos agentes causantes para cada tratamiento.....	17
APÉNDICE I.....	18
Cuadro 1. Prueba de Kruskal Wallis realizada al experimento con respecto al largo de rizoma a las 4 semanas.....	21
Cuadro 2. Prueba de Kruskal Wallis realizada al experimento con respecto al promedio de largo de brotes (cm) a las 8 semanas de montado el experimento.....	22
Cuadro 3. Prueba de Kruskal Wallis realizada al experimento con respecto a la tasa de proliferación a las 8 semanas de montado el experimento.....	23

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CONTENIDO:

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
Hipótesis .....	5
Objetivos .....	5
MATERIALES Y MÉTODOS .....	6
Material vegetal .....	6
Lugar del estudio .....	6
Diseño Experimental .....	6
Procedimiento .....	6
Evaluaciones .....	7
Análisis estadístico .....	8
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	9
Efectos de agar y BAP sobre el peso del explante .....	9
Efectos de agar y BAP sobre el largo del rizoma .....	11
Efectos de agar y BAP sobre el desarrollo de la parte aérea .....	13
Efectos de agar y BAP sobre el número de rizomas obtenidos y tasa de proliferación ...	17
Tasas de mortalidad y contaminación .....	18
Evaluación fotográfica .....	18
CONCLUSIONES .....	20
APÉNDICE I .....	21
BIBLIOGRAFÍA .....	24

## RESUMEN

Comúnmente las plantas de alstroemeria (*Alstroemeria* L.) son propagadas vegetativamente por división de su rizoma, pero este proceso consume tiempo y contribuye a la propagación de enfermedades. Es por esto que la mayoría de los híbridos de alstroemeria hoy en día son micro propagados *in vitro* mediante división de sus rizomas. La micropropagación es un método eficiente, limpio y prolijo. El objetivo de este estudio fue evaluar diferentes medios de cultivo con distintas concentraciones de agar (0,0; 3,5; 7,0 g•L<sup>-1</sup>) y citoquininas en forma de BAP (6-Benzylaminopurine) (0,0; 0,5; 1,0 y 2,0 mg•L<sup>-1</sup>) con el fin de determinar las mejores condiciones de estos factores para desarrollar un método eficiente de micropropagación para *Alstroemeria pallida* Graham. Se evaluó el peso del explantes (g), el número de brotes del rizoma y el largo de estos (cm), la longitud del rizoma (cm), el número de rizomas obtenidos y las tasas de proliferación, de mortalidad y de contaminación, también se hizo un registro fotográfico de los explantes. La concentración media de agar (3,5 g•L<sup>-1</sup>) y mayores concentraciones de BAP (2,0 mg•L<sup>-1</sup>) presentaron explantes sanos con mayores pesos (4,59 g), mayores largos de rizoma (2,44 cm) y una mayor cantidad y homogeneidad en sus brotes. Por el contrario, los tratamientos con menores rendimientos fueron los que se cultivaron en ausencia de BAP (0,0 mg•L<sup>-1</sup>), los cuales presentaron un menor peso (2,40 g), menor largo de rizoma (1,48 cm), mayor cantidad de brotes deshidratados, rizomas levemente desarrollados y con mayores deficiencias, lo que produjo una mayor pérdida en general por muerte de los explantes en estos tratamientos. Para este experimento se concluyó que las citoquininas (en este caso en forma de BAP) son fundamentales para la propagación *in vitro* de *A. pallida*, pues afectan directamente el desarrollo del largo de rizoma y la cantidad de sus brotes diferenciados con diferencias significativas.

Palabras clave: Alstroemeria, alstroemeria *pallida*, cultivo in vitro, micropropagación, agar, BAP, medio líquido.



## ABSTRACT

*Alstroemeria* (*Alstroemeria* L.) plants are normally vegetatively propagated by rhizome division. However, this is a time-consuming process and contributes to the propagation of diseases. This is the reason why, nowadays, most *alstroemeria* hybrids are *in vitro* micropropagated through the division of its rhizomes. Micropropagation is a more efficient, clean and meticulous method. The aim of this study was to assess different media culture with different concentrations of agar (0,0; 3,5; 7,0 g•L<sup>-1</sup>) and BAP (6-Benzylaminopurine) (0,0; 0,5; 1,0 and 2,0 mg•L<sup>-1</sup>) in order to determine the best conditions of these factors in order to develop an efficient method of micropropagation for *Alstroemeria pallida* Graham. Explant weight (g), number and length of sprouting rhizomes (cm), rhizome length (cm), number of rhizomes and proliferation, mortality and contamination rates were evaluated. Also a photographic record of the explants was taken. Medium concentration of agar (3.5 g•L<sup>-1</sup>) and high concentration of BAP (2.0 mg•L<sup>-1</sup>) presented the healthier explants with higher weight (4.59 g), rhizome length (2.44 cm), and homogeneity of the sprouts. On the contrary, treatments without BAP (0.0 mg•L<sup>-1</sup>), presented lower weight (2.40 g), rhizome length (1.48 cm) and high number of dehydrated sprouts, producing high loss of explant during these treatments. It was concluded that cytokinins (BAP in this case) are essential for the *in vitro* propagation of *A. pallida*, since they directly affect the rhizome length development and the amount of its sprouts with significant differences.

Key words: *Alstroemeria*, *alstroemeria pallida*, *in vitro* culture, micropropagation, agar, BAP, liquid medium.

## INTRODUCCIÓN

*Alstroemeria* L. (*Alstroemeriaceae*) es un género endémico de América del Sur. En Chile, este género se distribuye desde el extremo norte hasta la Patagonia, y la mayor diversidad de especies se encuentra en la zona central (Baeza *et al.*, 2006). Este género, comprende alrededor de 50 especies distribuidas desde Venezuela hasta Argentina y Chile, y habitan desde el nivel del mar hasta los 4.500 m.s.n.m. (Aagesen y Sanso, 2003; Ravenna, 1988; Sanso 2002).

*Alstroemeria* es uno los géneros de la flora vascular chilena más diversificados y debido a la amplia gama de colores y tamaños de flores que presentan, las especies de este género presentan un alto potencial económico como cultivos ornamentales (Baeza y Ruiz, 2011). En cuanto a su importancia a nivel mundial, alstroemeria es una de las flores de corte más importantes en el mercado, que actualmente también se comercializa como planta de maceta, por lo tanto, su estudio resulta ser muy importante tanto para su desarrollo comercial como para su conservación (Baeza *et al.*, 2011).

Dentro del género está *Alstroemeria pallida* Graham la cual tiene una distribución restringida (Cavieres *et al.*, 1998), habitando la zona centro entre Los Andes (32°50'S) y el Rio Maipo (34°10'S). Esta especie se encuentra entre los 1.500 y 2.800 m de altitud, presentando flores rosado pálido con una franja amarilla en los dos tépalos superiores (Bayer, 1987; Muñoz y Moreira, 2003). Posee tallo erecto hasta más o menos postrado, glabro de color café a verde en el ápice. Presenta una inflorescencia compleja bracteosa y flores de tamaño medio a grande. El color de la corola varía de blanco a rosado brillante; el par superior interno se encuentra achurado de color café-rojizo, con una banda oblicua de color amarillo (Cavieres *et al.*, 1998).

Comúnmente las plantas de *Alstroemeria* son propagadas vegetativamente por división de su rizoma, pero este proceso consume tiempo y contribuye a la propagación de enfermedades (Van Zaayen, 1995). Es por esto que la mayoría de los híbridos de *Alstroemeria* hoy en día son micro propagados *in vitro* mediante división de sus rizomas cada 3-4 semanas (Lin *et al.*, 1997). Además, la micropropagación es un método mucho más eficiente, limpio y prolijo (Chiari y Bridgen, 2000).

El sistema de micropropagación es un método que contribuye tanto a propagar masivamente material escaso, como también a acelerar el proceso de multiplicación de nuevos cultivares (Kyte *et al.* 2013). El éxito de este método depende de distintos factores como el genotipo, el medio de cultivo, los reguladores de crecimiento y el tipo de explantes utilizado. El más importante de estos parámetros lo constituyen los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo (Bridgen, 1994).

Los reguladores de crecimiento actúan como señales que estimulan, inhiben o regulan el crecimiento durante el desarrollo de la planta (Rahim *et al.*, 2013). Citoquininas y auxinas juegan un rol crucial como promotores de la división celular y actúan en la

inducción y desarrollo de los centros meristemáticos que conducen a la formación de órganos (Ebrahim, 2004).

Las citoquininas juegan un rol importante como regulador de crecimiento en la micro propagación de alstroemeria, causando inducción en la generación de nuevos brotes mediante la estimulación de la división celular y una inhibición de la dominancia apical (Rahim *et al.*, 2013; Kyte *et al.* 2013). Se ha visto que el uso de auxinas no afecta la formación de brotes, pero estimula su crecimiento (Pierik *et al.*, 1988). Sin embargo, su efecto principal es la estimulación del enraizamiento (mediante NAA e IBA) (Khaleghi *et al.*, 2008). Investigaciones en diferentes variedades de alstroemeria (Grabryszewska y Hempel, 1985; Pierik *et al.*, 1988; Khaleghi *et al.*, 2008), indican que tanto la formación de raíces y brotes, así como la formación del rizoma y el crecimiento del explante, están relacionadas con el balance de auxinas/citoquininas en el medio. El desarrollo de alstroemeria *in vitro* puede ser dirigido mediante la aplicación de los reguladores de crecimiento. De acuerdo a estudios, se recomienda para la micropropagación de alstroemeria, BAP para multiplicación y NAA para enraizamiento (Grabryszewska y Hempel, 1985).

En la propagación de alstroemeria la regeneración del rizoma es más importante que la proliferación de los brotes (Khalegi *et al.*, 2008). Micropropagación de alstroemeria cv. 'Fuego' obtuvo un mayor número de rizomas (3,93 rizomas por explante) asociado a mayores concentraciones de BAP ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y el menor observado (0,56 rizomas por explante) sin BAP ( $0,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Estos resultados indican que la presencia o ausencia de BAP en el medio de cultivo es en la micropropagación de esta especie (Khaleghi *et al.*, 2008).

Por otro lado, las propiedades físicas del medio de cultivo son también importantes. El agar es el agente más comúnmente usado para solidificar el medio de cultivo y altas concentraciones de agar pueden inhibir el crecimiento de los explantes por efecto de una disminución del agua disponible (Bridgen, 1994 y Kyte *et al.* 2013).

Diversos investigadores (Debergh, 1983; Zimmerman y Robacker, 1988; Ibrahim, 1994; Ebrahim y Ibrahim, 2000) sugieren que el contacto existente entre los explantes y el medio líquido puede aumentar la disponibilidad de citoquinina, aumentar la toma de nutrientes y hormonas, diluir los exudados de los explantes en el medio líquido y también generar una mejor aireación. Todo esto ayuda a mejorar el crecimiento y multiplicación de los explantes. En complemento, Ebrahim (2004), en su experimento realizado en cala (*Zantedeschia aethiopica* L.), indica que los medios con agar son mejores para el enraizamiento de los explantes, en comparación a los medios líquidos sin agar (Ebrahim, 2004).

La concentración de agar afecta la eficiencia de la micropropagación, por ejemplo, en otras especies como *Ceropegia thwaitessi* Hook (Muthukrishnan *et al.*, 2013) y también en *Boswellia serrata* Roxb (Suthar *et al.*, 2011). En ambos casos se comprobó un crecimiento mucho más rápido en menores concentraciones de agar y medio líquido, el cual corresponde a un medio elaborado en ausencia de agar.

En base a los antecedentes expuestos y considerando el potencial ornamental de *A. pallida*, por el color de sus flores y su resistencia al frío dado su hábitat natural, este estudio se enfocó a proponer una estrategia para la micro propagación de esta especie.

### **Hipótesis**

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

### **Objetivos**

Objetivo general: Desarrollar un método eficaz de micropropagación para *Alstroemeria pallida* Graham.

Objetivos específicos:

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

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

El material vegetal corresponde a selecciones de *A. pallida* obtenidos a partir de embriones rescatados *in vitro*, de una recolección de frutos que fue realizada durante enero de 2014 en la localidad de Farellones, Región Metropolitana, a una altitud de 2.300 m.s.n.m.

### 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.

### Diseño Experimental

Se realizó un diseño completamente aleatorizado con estructural factorial, donde el experimento estuvo determinado por dos factores relacionados con el medio de cultivo: concentración de agar y de citoquinas en forma de 6-Benzylaminopurine (BAP), con tres y cuatro niveles respectivamente (Cuadro 1). Se realizaron 8 repeticiones en cada tratamiento y la unidad experimental correspondió a una sección de rizoma de aproximadamente 1 a 2 cm con un brote principal, cultivada dentro de un frasco de vidrio de 200 ml.

Cuadro 1. Detalle del ensayo y los tratamientos utilizando distintas concentraciones de BAP y agar en rizomas *in vitro* de *A. pallida*.

Concentración agar (g L <sup>-1</sup> )	Concentración BAP (mg L <sup>-1</sup> )			
	0,0	0,5	1,0	2,0
0,0	T1	T2	T3	T4
3,5	T5	T6	T7	T8
7,0	T9	T10	T11	T12

### Procedimiento

Antes de montar el experimento se realizó una etapa previa, a partir del material inicial, para obtener el número de individuos suficientes para llevar a cabo el experimento, que consistió en propagación *in vitro* utilizando rizomas, los cuales fueron cultivados en frascos de vidrio de 200 mL con un contenido de 42 mL de medio de cultivo compuesto por 4,43 g•L<sup>-1</sup> de medio Murashige & Skoog (MS) (*Phytotechnology Laboratories*)

suplementado con  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa (D-Sacarosa, Cristalina.  $\beta$ -D-Fructofuranosil- $\alpha$ -D-glucopiranosido azúcar, *Phytotechnology Laboratories*),  $7,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de agar (Poder de gelificación:  $1150 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , *Phytotechnology Laboratories*),  $2,0 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$  de 6-Bencilaminopurina (N6 – Benciladenina, *Phytotechnology Laboratories*) y pH ajustado a 5,7. Los cultivos fueron dispuestos en una cámara de crecimiento a  $23^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo 16/8 h.

Una vez que se contó con el material suficiente para el experimento, se llevó a cabo el ensayo, que incluyó un total de 96 individuos. Los frascos fueron rellenados con 42 mL de medio de cultivo con  $4,43 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  MS,  $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa y concentraciones de agar (0,0; 3,5 y  $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y BAP (0,0; 0,5; 1,0 y  $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) según lo establecido para cada tratamiento (Cuadro 1), con pH ajustado a 5,7. Para los medios sin agar, se utilizó un algodón como sostén para las plantas. Al montar el experimento se registró el peso y tamaño (longitud) del rizoma inicial.

### Evaluaciones

Cada cuatro semanas luego de iniciado el experimento, los individuos fueron traspasados a nuevos frascos para renovar el medio de cultivo. En cada traspaso se mantuvieron las mismas condiciones iniciales de los tratamientos, y además fueron realizadas las evaluaciones de peso y largo del rizoma, número y largo de brotes.

Luego de 8 semanas se realizaron las evaluaciones finales sobre el número de rizomas obtenidos y la tasa de proliferación, con la finalidad de ver la efectividad de propagación de los distintos tratamientos.

A continuación, se detalla cada una de estas evaluaciones realizadas:

**Peso del explante (g):** Los rizomas fueron pesados utilizando una balanza de precisión (Belltronic Scales, ES-300HA). Se registró por separado el peso del frasco y el peso del frasco con el rizoma. De esta manera se logró determinar los cambios en el peso del rizoma a través del tiempo.

**Número de brotes del rizoma y largo (cm):** Se realizó un recuento del número de brotes verdes y deshidratados presentes en el rizoma junto con el registro del largo de cada uno de los brotes verdes mediante el uso de una regla milimétrica autoclavada.

**Longitud del rizoma (cm):** Mediante uso de una regla milimétrica autoclavada se registró el crecimiento del rizoma en el tiempo.

**Número de rizomas obtenidos y tasa de proliferación:** Estas evaluaciones se llevaron a cabo una vez terminado el experimento. Se dividió el explante final bajo el mismo criterio que se utilizó al montar el ensayo, con el fin de obtener el número total de nuevos individuos obtenidos. La tasa de proliferación se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de proliferación} = \frac{\text{N}^\circ \text{ explantes finales}}{\text{N}^\circ \text{ explantes iniciales}}$$

Tasa de mortalidad y contaminación: Se registraron los problemas que se presentaron en los tratamientos por contaminación y muerte de rizomas durante el experimento y se evaluaron las pérdidas totales al final de este.

Registro fotográfico: Al final del proceso, se realizó un registro fotográfico de los distintos tratamientos utilizando una cámara Nikon D3000 10 Mpx Black (Nikon Co., Tokio, Japan). De este modo, se evaluó cualitativamente las diferencias de vigor observadas entre los tratamientos. Para hacer más notoria las diferencias entre los tratamientos se retocaron y editaron las fotografías mediante el software 'Adobe Photoshop CS6'.

### **Análisis estadístico**

Para cada evaluación los resultados obtenidos fueron analizados a través de un análisis de varianza (ANDEVA). Cuando se presentaron diferencias entre tratamientos se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey con un nivel del 5%.

Se utilizaron como co-variables los pesos y largos registrados al inicio del experimento, vale decir, las condiciones iniciales de los rizomas que se cultivaron. Ambas co-variables resultaron significativas durante el análisis.

Para cada caso, se realizó una revisión de los supuestos del ANDEVA, realizando una prueba de normalidad de los errores y de la homocedasticidad.

Dependiendo de si existió interacción, se evaluaron las posibles diferencias de los niveles de cada factor por separado. Si no se presentaron interacciones se evaluó cada factor de forma independiente del otro.

En los casos que los supuestos del ANDEVA no se cumplieron se realizó una transformación raíz cuadrada, en los casos que esto no fue suficiente para el cumplimiento de los supuestos fue necesario realizar una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efectos de agar y BAP sobre el peso del explante

El mayor peso en promedio de explantes se alcanzó en el T8 tanto a las 4 semanas (3,31 g) como a las 8 semanas (5,55 g), mientras que los menores resultados se encontraron en T9 a las 4 semanas (1,86 g) y las 8 semanas (2,09 g). En general los tratamientos con la menor concentración de BAP ( $0,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) tendieron a ser los que presentaron un menor peso promedio, mientras que los tratamientos con mayor concentración de BAP ( $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) presentaron un mayor peso promedio (Cuadro 2).

Cuadro 2. Promedios de peso (g) de los explantes de *A. pallida* 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, 4 y 8 semanas).

Semanas	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
0	0,96	0,95	1,09	1,32	1,08	1,04	0,91	1,21	1,13	1,33	1,14	1,24
4	2,21	2,33	2,61	2,21	2,24	2,61	3,10	3,31	1,86	2,14	2,11	2,40
8	2,48	2,69	3,02	3,84	2,63	3,35	3,62	5,55	2,09	2,73	2,77	4,39

Con respecto al aumento de peso del rizoma, no se presentó interacción entre las concentraciones de agar y BAP, por lo que éstos se analizaron de forma independiente.

Dentro de las distintas concentraciones de agar analizadas de forma independiente del nivel de BAP, se presentó un mayor peso promedio de explantes en los tratamientos con una concentración de  $3,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Como se puede apreciar en el Cuadro 3, los explantes que fueron cultivados en un medio con una concentración de  $3,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de agar presentaron una mayor ganancia de peso, este efecto se hace más notorio con el paso del tiempo a las 8 semanas siendo estadísticamente significativo por sobre los tratamientos con 7,0 y  $0,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Por otra parte, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de 7,0 y  $0,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de concentración de agar.



Cuadro 3. Efecto de diferentes concentraciones de agar en el experimento con respecto al aumento de peso del rizoma luego de 4 y 8 semanas desde que fue montado el experimento.

Conc. agar g•L <sup>-1</sup>	Peso del explante (g)					
	0 Semanas		4 Semanas		8 Semanas	
0,0	1,08	a	2,34	b	3,01	b
3,5	1,06	a	2,81	a	3,79	a
7,0	1,21	a	2,13	b	2,99	b

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

Menores concentraciones de agar promueven la proliferación de brotes y el aumento de peso de los explantes, probablemente asociado a una captación más rápida del BAP y una mejor absorción de agua y nutrientes por parte de las plantas (Surthar *et al.*, 2011). Estas mejores condiciones para promover la captación de elementos necesarios explicarían el mayor desarrollo y ganancia de peso de los explantes frente a los que se cultivaron con mayores concentraciones de agar de 7,0 g•L<sup>-1</sup> en este experimento.

Con respecto al medio líquido (0,0 g•L<sup>-1</sup> de agar) Debergh *et al.* (1981) y Ebrahim (2004) mencionan el fenómeno de hiperhidratación o intoxicación por agua, lo que explicaría el menor desarrollo de explantes cultivados sin agar en relación a los cultivados con 3,5 g•L<sup>-1</sup>. La adición de agar disminuye la hiperhidratación y permite obtener plantas más saludables. En medios líquidos la hiperhidratación puede ser clara e inducir necrosis (Ebrahim, 2004). En este estudio, las plantas sometidas a medio líquido presentaron ciertos niveles de vitrificación en los brotes asociados a este problema.

El término vitrificación fue usado en un comienzo por Debergh *et al.* (1981) para describir la apariencia morfológica de órganos o tejidos que se veían empapados de agua, traslucidos y ‘‘vidriosos’’. Sin embargo, en una publicación posterior define que el término más correcto para referirse a este fenómeno es el de hiperhidratación o plantas hiperhídricas (Debergh *et al.*, 1992). El fenómeno de vitrificación o hiperhidratación se puede ver expresado de distinta forma, dependiendo de las respuestas fisiológicas específicas de la especie y las condiciones de cultivo. Se ha registrado que la hiperhidratación ocurre más frecuentemente en medios líquidos que sólidos, y dentro de los medios sólidos con menor concentración de agente gelficante, se presenta más que en comparación a los con mayor concentración de agar (Debergh *et al.*, 1992).

Por otro lado, es posible que la retención y liberación del medio líquido realizado por el algodón que fue usado como sostén, actúe de manera similar al agar con respecto a la concentración de agar de 7,0 g•L<sup>-1</sup> afectando el potencial hídrico del sistema.

Dentro de las distintas concentraciones de BAP analizadas de manera independiente, se presentó un mayor peso promedio de explantes en los tratamientos con mayores

concentraciones con un valor máximo para  $2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (4,59 g) y mínimo para  $0,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (2,40 g) a las 8 semanas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto de diferentes concentraciones de BAP en el experimento con respecto al aumento de peso del rizoma luego de 4 y 8 semanas desde que fue montado el experimento.

Conc. BAP $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Peso del Explante (g)					
	0 Semanas		4 Semanas		8 Semanas	
0,0	1,06	a	2,10	b	2,40	b
0,5	1,11	a	2,36	ab	2,92	b
1,0	1,05	a	2,61	a	3,14	b
2,0	1,26	a	2,64	a	4,59	a

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

Las citoquininas en forma de BAP promueven la división celular en la región meristemática (Khaleghi *et al.*, 2008). Gabryszewska y Hempel (1985), indican que un aumento de BAP puede estimular la proliferación del rizoma. Similares resultados indica Pierik *et al.* (1988), quien sugirió que el BAP estimularía la formación y desarrollo del rizoma, mientras que NAA e IBA no tendrían ningún efecto al respecto.

El experimento realizado por Khaleghi *et al.* (2008) sobre rizomas de *Alstroemeria cv 'fuego'*, demuestra que medios que no fueron suplementados con BAP ( $0,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) presentaron menor desarrollo (0,56 explantes nuevos por rizoma), obteniendo los mayores resultados con explantes cultivados con  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para esa especie (3,93 explantes nuevos por rizoma). Este estudio está en concordancia con los resultados de Khaleghi *et al.* (2008) ya que para los explantes de *alstroemeria* desarrollados en ausencia de BAP fue menor su ganancia de peso, y según los resultados obtenidos, se presenta un mayor desarrollo y crecimiento del rizoma para *A. pallida* cultivada con  $2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP.

### Efectos de agar y BAP sobre el largo del rizoma

El mayor largo promedio de rizoma se alcanzó en T3 a las 4 semanas (2,00 cm) y en T8 a las 8 semanas (2,48 cm), mientras que los menores resultados se encontraron en T9 y T10 a las 4 semanas (1,43) y en T9 a las 8 semanas (1,57). En general los tratamientos sin aplicación de BAP ( $0,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) tendieron a ser los que presentaron un menor largo del rizoma y los que fueron cultivados con la concentración más alta de BAP ( $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) presentaron valores más altos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Promedios de largo del rizoma de *A. pallida* (cm) para cada tratamiento sometidos a distintas concentraciones de BAP (0,0; 0,5; 1,0 y 2,0 mg•L<sup>-1</sup>) y agar (0,0; 3,5 y 7,0 g•L<sup>-1</sup>), en las distintas fechas de evaluación (0, 4 y 8 semanas).

Semanas	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
0	0,93	0,94	1,00	1,03	1,05	1,04	0,92	1,27	1,15	1,32	1,12	1,25
4	1,68	1,64	2,00	1,97	1,59	1,63	1,94	1,74	1,43	1,43	1,56	1,72
8	1,81	1,82	2,18	2,44	1,72	1,86	2,26	2,48	1,57	1,76	2,09	2,30

A las 4 semanas de montado el experimento, no se registraron diferencias estadísticamente significativas en el largo del rizoma, por lo que se realizó una prueba no paramétrica Kruskal Wallis (Apendice I, Cuadro 1), la que presentó un p-valor > 0.05, confirmando que todos los tratamientos son iguales. Es decir, a las 4 semanas no se presentó un efecto de los niveles de agar y BAP con respecto a un aumento en largo del rizoma, ya que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

Según las mediciones realizadas a las 8 semanas, no se presentó interacción entre el agar y BAP. Solamente se identificó un efecto del BAP sobre el aumento de longitud del rizoma.

Los tratamientos cultivados en concentraciones de BAP de 2,0 y 1,0 mg•L<sup>-1</sup> presentaron un mayor aumento en longitud del rizoma con respecto a los que se cultivaron en concentraciones de 0,5 y 0,0 mg•L<sup>-1</sup> de BAP (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de concentraciones de BAP en el experimento con respecto al largo del rizoma (cm) luego de 4 y 8 semanas desde que fue montado el experimento.

Conc. BAP mg•L <sup>-1</sup>	Largo del Rizoma (cm)					
	0 Semanas		4 Semanas		8 Semanas	
0,0	1,04	a	1,57	a	1,70	b
0,5	1,10	a	1,57	a	1,82	b
1,0	1,01	a	1,84	a	2,18	a
2,0	1,18	a	1,81	a	2,40	a

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

Mayores concentraciones de BAP pueden estimular la proliferación y aumento de tamaño del explante. El BAP también estimula la formación y crecimiento del rizoma (Khaleghi *et al.*, 2008). Es por esto que encontramos un rizoma más largo en los tratamientos que presentan concentraciones más altas de BAP (2,0 y 1,0 mg•L<sup>-1</sup>) en el experimento.

### Efectos de agar y BAP sobre el desarrollo de la parte aérea

En cuanto al desarrollo de la parte aérea, el análisis se llevó a cabo evaluando los brotes activos (verdes) y los deshidratados (muertos o senescentes), como se indica en las figuras 1 y 2, donde se puede observar las diferencias entre el promedio de brotes de estas clasificaciones para cada tratamiento.

Luego de 4 semanas no se evidencia una gran diferencia entre los brotes activos y brotes deshidratados de cada tratamiento (Figura 1), sin embargo, los efectos se hacen más notorios en los resultados a las 8 semanas (Figura 2), donde se puede apreciar notoriamente que los tratamientos en los que no se usó BAP (T1, T5 y T9) presentan una menor cantidad de brotes activos (2,46; 2,05 y 1,28 respectivamente) y una mayor cantidad de brotes deshidratados (3,79; 3,93 y 4,25).

Según los resultados, el mejor tratamiento fue el T8, ya que presenta un mayor número de brotes activos (4,6), con un promedio mayor de brotes totales (7,79) en total a las 8 semanas (Figura 2).

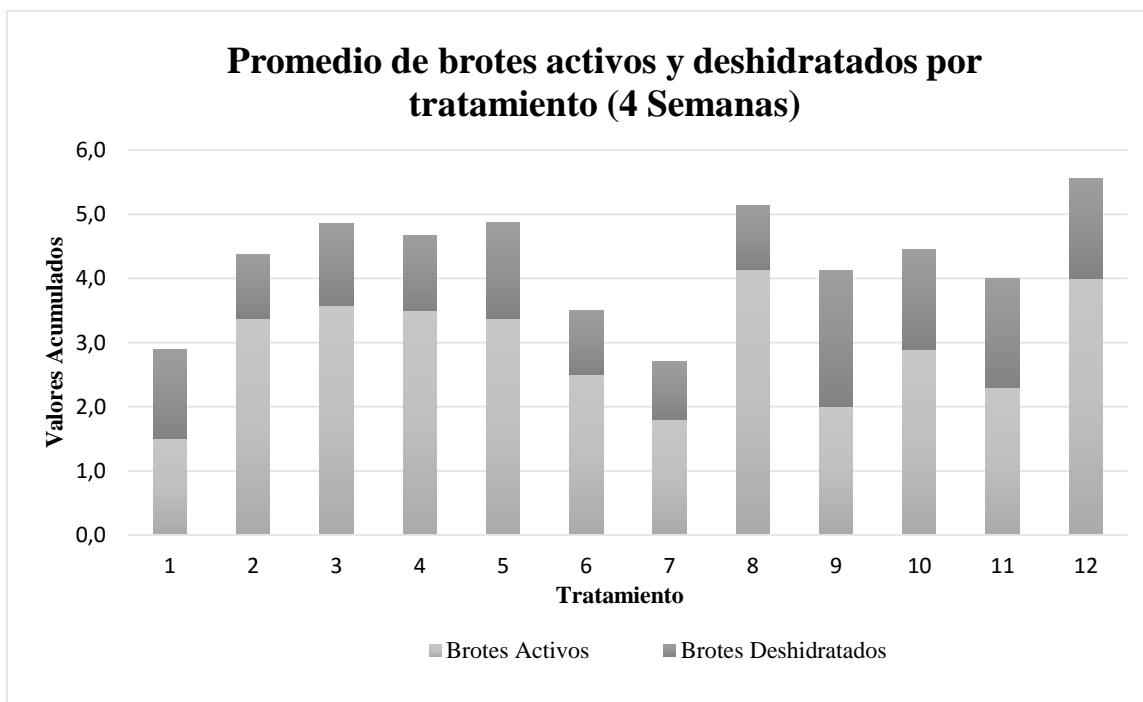


Figura 1. Gráfico de barras apiladas con respecto al promedio de brotes activos y deshidratados en la primera medición (4 semanas) de los explantes de *A. pallida* (g) para cada tratamiento, sometidos a distintas concentraciones de BAP (0,0; 0,5; 1,0 y 2,0 mg•L<sup>-1</sup>) y agar (0,0; 3,5 y 7,0 g•L<sup>-1</sup>).

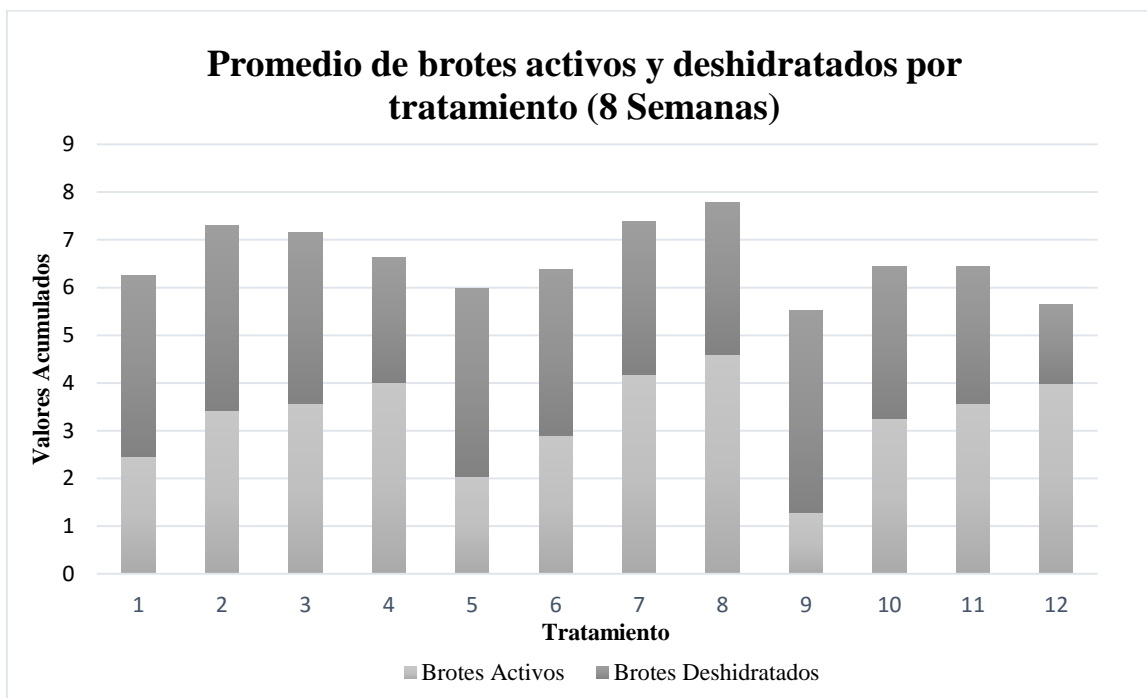


Figura 2. Gráfico de barras apiladas con respecto al promedio de brotes activos y deshidratados en la segunda medición (8 semanas) de los explantes de *A. pallida* (g) para cada tratamiento sometidos a distintas concentraciones de BAP (0; 0,5; 1,0 y 2,0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y agar (0,0; 3,5 y 7,0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

No se identificó interacción entre las concentraciones de agar y BAP. Sin embargo, se presenta un efecto individual de BAP con respecto al número de brotes activos.

Según el Cuadro 7, a las 8 semanas se puede apreciar que en presencia de BAP existe una mayor cantidad de brotes activos, mientras que, en ausencia de éste, el número de estos brotes es menor, debido a que no se estimula la división celular para la generación de nuevos brotes.

Mehdi et al. (2014) reporta resultados similares en *Chlorophytum borivillianum*, indicando que la multiplicación de brotes en presencia de BAP es significativamente mayor comparado a los tratamientos de control (sin BAP). Sin embargo, no existen diferencias significativas entre las distintas concentraciones de BAP y el número de brotes producidos por explante, tal cual se repite en los resultados de este experimento entre las dosis (0,5; 1,0 y 2,0) suplementadas con BAP. Se puede concluir que la adición de BAP como citoquinina es ciertamente esencial para la inducción de brotes en *A. pallida*.

Cuadro 7. Efecto de concentraciones de BAP en el experimento con respecto al número de brotes activos luego de 4 y 8 semanas desde que fue montado el experimento.

Conc. BAP mg•L <sup>-1</sup>	Número de Brotes Activos			
	4 Semanas		8 Semanas	
0,0	2,86	ab	1,93	b
0,5	2,90	ab	3,19	a
1,0	2,66	b	3,76	a
2,0	3,73	a	4,20	a

Para brotes deshidratados, no existe una interacción entre el agar y el BAP. Solamente se presenta un efecto del BAP con respecto al número de brotes deshidratados.

Se identificó una mayor cantidad de brotes deshidratados en los explantes cultivados con 0 y 0,5 mg•L<sup>-1</sup> de BAP (Cuadro 8). No están muy claras las razones de cuál es la causa de esto, pero es posible que debido a la dominancia apical y la relación de auxinas/citoquininas presentes en los explantes sin BAP generen una muerte celular programada de los nuevos brotes con el fin de desarrollar más los brotes dominantes (Gabryszewska & Hempel, 1985).

Cuadro 8. Efecto de concentraciones de BAP en el experimento con respecto al número de brotes deshidratados luego de 4 y 8 semanas desde que fue montado el experimento.

Conc. BAP mg•L <sup>-1</sup>	Brotes Deshidratados			
	4 Semanas		8 Semanas	
0,0	1,72	a	3,99	a
0,5	1,18	a	3,51	a
1,0	1,35	a	3,23	ab
2,0	1,12	a	2,48	b

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

Para los brotes tanto activos como los deshidratados se puede observar un efecto del BAP con respecto a la cantidad de estos.

Las citoquininas como reguladores de crecimiento causan la inducción de brotes, estimulando la división celular y disminuyen la dominancia apical, generalmente estimulan la proliferación de brotes e inhibe la elongación de estos (Venkataiah *et al.*, 2006). Lo anterior se ve reflejado en este experimento a las 8 semanas, donde los explantes expuestos a mayores dosis de BAP (2,0 y 1,0 mg•L<sup>-1</sup>) entregaron un mayor número de brotes activos, más cortos y un menor número de brotes deshidratados, mientras que los explantes sometidos a menores concentraciones de BAP (0,0 mg•L<sup>-1</sup>) menor número de brotes activos, más largos y con un mayor número de brotes deshidratados (cuadros 7, 8 y Figura 3).

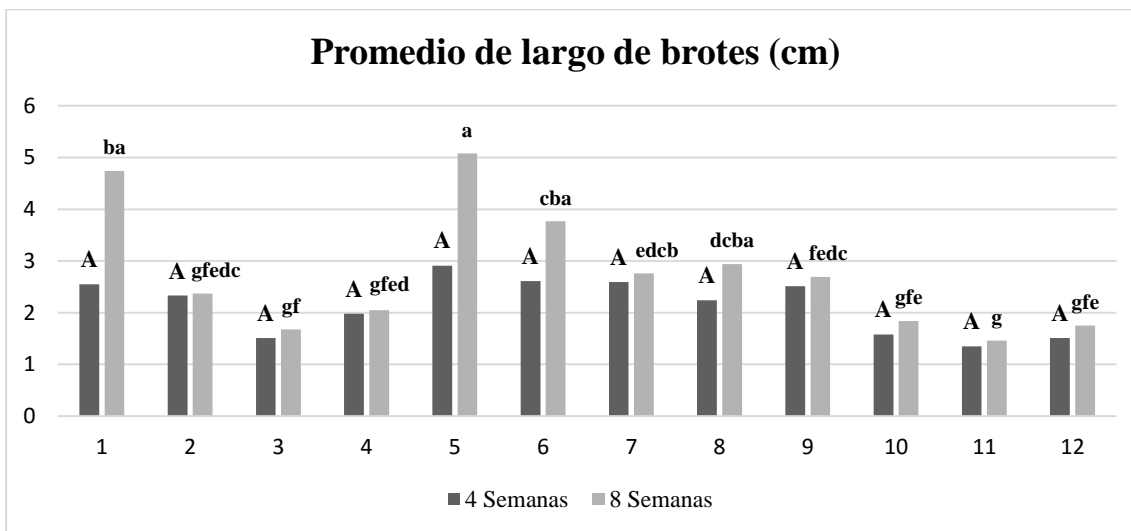


Figura 3. Promedio de largo de brotes (cm) de los explantes de *A. pallida* (g) a las 4 y 8 semanas para cada tratamiento sometidos a distintas concentraciones de BAP (0,0; 0,5; 1,0 y 2,0 mg•L<sup>-1</sup>) y agar (0,0; 3,5 y 7,0 g•L<sup>-1</sup>), en las distintas fechas de evaluación (0, 4 y 8 semanas). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Mayúsculas 4 semanas, minúsculas 8 semanas.

A las 4 semanas no se encontraron diferencias significativas del efecto de BAP sobre los explantes. A las 8 semanas se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para la evaluación de diferencias en el largo promedio de brotes de los distintos tratamientos (Apéndice I, Cuadro 2). Los resultados aparecen en forma ascendente y corresponden al promedio del largo de todos los brotes activos presentes, por lo que T11 presenta el menor promedio de largo de brotes (1,46 cm) y el T5 el mayor promedio de largo de brotes (5,08 cm) (Figura 3).

Los tratamientos expuestos a menores concentraciones de BAP (por ejemplo, T5 y T1 con 0,0 mg•L<sup>-1</sup>) tendieron a tener brotes más alargados. Esto se debería a que, al existir una menor inducción de brotes y mayor dominancia apical, como ya se ha discutido, los brotes principales tenderían a crecer más pues toda la energía y recursos se distribuyen a un menor número de fuentes receptoras. Khaleghi *et al.* (2008) sugiere que en los medios sin presencia de BAP (0,0 mg•L<sup>-1</sup>), las auxinas naturales estimulan el crecimiento de brotes y se muestra una clara dominancia apical, y que incrementando las concentraciones de BAP (1,0; 1,5; 2,5 mg•L<sup>-1</sup>), el largo de brotes de los explantes disminuye.

## Efectos de agar y BAP sobre el número de rizomas obtenidos y tasa de proliferación

El número de rizomas nuevos obtenidos, a partir de los explantes desarrollados durante las 8 semanas es lo que se denomina tasa de proliferación, y permite evaluar la efectividad de los distintos tratamientos en base al fin buscado, obtener la mayor cantidad de rizomas nuevos con el objetivo de una mayor propagación.

Como se puede apreciar en el Cuadro 9, el mejor tratamiento fue el T8 donde se obtuvieron 3,5 rizomas/explante y el peor T5, que entregó 1,5 rizomas/explante en promedio, para un tiempo total de 8 semanas.

Cuadro 9. Tasa de proliferación de los diferentes tratamientos de los explantes de *A. pallida* (g) para cada tratamiento sometidos a distintas concentraciones de BAP (0,0; 0,5; 1,0 y 2,0 mg•L<sup>-1</sup>) y agar (0,0; 3,5 y 7,0 g•L<sup>-1</sup>) a las 8 semanas.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
Tasa de proliferación	1,00c	1,75b	2,00ab	2,29ab	1,5c	1,71bc	2,13ab	3,5a	1,63bc	2,00ab	2,11ab	2,5ab

Para evaluar la tasa de proliferación estadísticamente y ver la existencia de diferencias significativas fue necesario realizar una prueba no paramétrica, (prueba de Kruskal Wallis; Apéndice I, Cuadro 3). Los resultados se presentan ordenados en el Cuadro 9, donde T5 presenta la menor tasa de proliferación (1,57) y T8 la mayor tasa de proliferación (3,57). Esto implica que se puede obtener un mayor número de rizomas nuevos en el mismo tiempo de explantes cultivados bajo las condiciones presentes en el T8 (3,5 g•L<sup>-1</sup> de agar y 2,0 mg•L<sup>-1</sup> BAP)

Los tratamientos T5 y T8 poseen la misma cantidad de agar (3,5 g•L<sup>-1</sup>), su diferencia está en la concentración de BAP, donde T8 tiene 2,0 mg•L<sup>-1</sup> y T5, 0 mg•L<sup>-1</sup>. Esto es un indicio de que la tasa de proliferación o el número de rizomas obtenidos de los explantes, está principalmente condicionado por la dosis de BAP.

La obtención de un mayor número de nuevos rizomas se asocia a la presencia de explantes más desarrollados, con un rizoma más largo y mayor cantidad de brotes por efecto del BAP, como ya se ha discutido con anterioridad a lo largo de las distintas evaluaciones realizadas.



### Tasas de mortalidad y contaminación

Se presentaron pérdidas en algunos tratamientos debido a contaminación y muerte de los explantes. Se puede apreciar en el Cuadro 10 el detalle de los distintos agentes causantes y el porcentaje de daño presente para cada uno de los tratamientos.

Cuadro 10. Porcentajes de muerte y contaminación de rizomas de *A. pallida* según los respectivos agentes causantes para cada tratamiento.

Causa	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
% Deshidratados	0	20	20	20	0	0	0	20	20	10	0	0
% Bacteria	30	0	0	10	0	30	20	10	0	0	0	0
% Hongos	0	0	10	0	20	0	0	0	0	0	0	10
% Mortalidad												
Total	30	20	30	30	20	30	20	30	20	10	0	10

La contaminación por bacterias resultó ser la más compleja de manejar, ya que cuando se lograban identificar ya era demasiado tarde para rescatar el explante. La contaminación por hongos se logró controlar mejor cuando se presentó, pues se separaba del medio el explante del micelio del hongo a la brevedad, lo que se tradujo en un menor porcentaje de pérdidas por esta causa.

### Evaluación fotográfica

Se realizó un esquema con una selección de fotografías representativas del efecto de cada tratamiento sobre los explantes. Se utilizaron fotos reales tomadas al final del experimento y se editaron para poder apreciar con mejor claridad la forma y el desarrollo de brotes y rizomas (Figura 3).

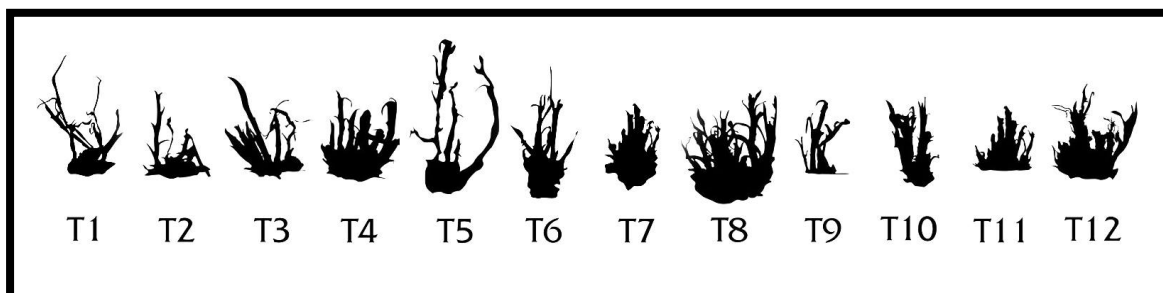


Figura 4. Representación esquemática realizada mediante fotografías reales de los explantes de *A. pallida* sometidos a distintas concentraciones de BAP (0; 0,5; 1,0 y 2,0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y agar (0,0; 3,5 y 7,0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a las 8 semanas.

Las diferencias de crecimiento son notorias entre los distintos tratamientos. El mayor crecimiento de los rizomas se asocia principalmente a la dosis de BAP como ya se ha

discutido con anterioridad. Por ejemplo, en T12, T8 y T4 con  $2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP se observa un rizoma más grande, una mayor cantidad de brotes y más vigorosos, en cambio en otros como T2 ( $\text{BAP} = 0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), T5 y T9 ( $\text{BAP} = 0,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) se puede ver un rizoma muy poco desarrollado, pocos brotes y alargados por efecto de la dominancia apical. También se notó que estos brotes eran menos vigorosos y tendían a morir en un menor tiempo y con mayor frecuencia comparado a los brotes de los tratamientos donde se aplicó una mayor dosis de BAP.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio son una primera aproximación a un método de micropropagación masiva de *A. pallida*. El desarrollo de este método resulta en un protocolo posible de usar tanto en estudios de conservación de la especie como en planes de mejoramiento genético, con el fin de desarrollar líneas con características atractivas desde el punto de vista ornamental.

Del experimento se puede concluir que las citoquininas (en este caso en forma de BAP) son fundamentales para la propagación *in vitro* de *A. pallida* pues afectan directamente el desarrollo del largo de rizoma y la cantidad de brotes al romper la dominancia apical.

Se rechaza la hipótesis inicial, pues no se identificó un efecto combinado de concentraciones de agar y de citoquininas que produjese distintas respuestas en la micropropagación de *Alstroemeria pallida*. Sin embargo, se encontró un efecto independiente de la concentración de agar sobre el peso de los explantes y de la concentración de BAP sobre el peso de los explantes, longitud del rizoma y el desarrollo de la parte aérea de los explantes.

Resultaría interesante evaluar el desarrollo de los explantes a futuro en medio líquido utilizando un menor volumen de medio para evitar hiperhidratación, además buscar utilizar rizomas más grandes que no requieran de sostén para descartar que el algodón utilizado limite la absorción del medio.

La micropropagación resulta una técnica muy interesante y útil para la multiplicación de *A. pallida*, pues demostró desarrollarse rápidamente bajo las condiciones adecuadas. Se recomienda según este experimento utilizar  $3,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de agar y  $2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BAP. Este es el primer paso para la obtención de explantes masivos a partir de material escaso para guiar a futuro la investigación sobre la especie y poder desarrollar nuevas variedades comerciales aprovechando sus atributos y valor ornamental.

## APÉNDICE I

Cuadro 1. Prueba de Kruskal Wallis realizada al experimento con respecto al largo de rizoma a las 4 semanas.

Variable	Tratamiento	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Largo Rizoma (cm)	1	1,51	0,53	1,60	14,37	0,2089
Largo Rizoma (cm)	2	1,45	0,35	1,35		
Largo Rizoma (cm)	3	1,93	0,44	2,10		
Largo Rizoma (cm)	4	2,02	0,33	2,05		
Largo Rizoma (cm)	5	1,55	0,36	1,65		
Largo Rizoma (cm)	6	1,56	0,51	1,60		
Largo Rizoma (cm)	7	1,72	0,57	1,80		
Largo Rizoma (cm)	8	1,93	0,65	2,00		
Largo Rizoma (cm)	9	1,49	0,51	1,45		
Largo Rizoma (cm)	10	1,71	0,41	1,80		
Largo Rizoma (cm)	11	1,60	0,48	1,65		
Largo Rizoma (cm)	12	1,90	0,42	2,00		

Cuadro 2. Prueba de Kruskal Wallis realizada al experimento con respecto al promedio de largo de brotes (cm) a las 8 semanas de montado el experimento.

Variable	Tratamiento	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Largo Brotes (cm.)	1	4,74	1,41	5,45	52,04	<0,0001
Largo Brotes (cm.)	2	2,37	0,85	2,28		
Largo Brotes (cm.)	3	1,68	0,54	1,78		
Largo Brotes (cm.)	4	2,05	0,63	2,20		
Largo Brotes (cm.)	5	5,08	1,32	4,83		
Largo Brotes (cm.)	6	3,77	1,17	4,15		
Largo Brotes (cm.)	7	2,76	0,91	2,41		
Largo Brotes (cm.)	8	2,94	0,58	2,92		
Largo Brotes (cm.)	9	2,69	1,56	2,90		
Largo Brotes (cm.)	10	1,84	0,38	1,82		
Largo Brotes (cm.)	11	1,46	0,50	1,40		
Largo Brotes (cm.)	12	1,75	0,33	1,72		

Trat.	Ranks						
11	18,83	g					
3	25,14	g	f				
12	27,56	g	f	e			
10	31,11	g	f	e			
4	39,14	g	f	e	d		
2	44,38	g	f	e	d	c	
9	49,06		f	e	d	c	
7	53,93			e	d	c	b
8	59,79				d	c	b a
6	68,14					c	b a
1	77,57						b a
5	82,50						a

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

Cuadro 3. Prueba de Kruskal Wallis realizada al experimento con respecto a la tasa de proliferación a las 8 semanas de montado el experimento.

Variable	Tratamiento	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Rizomas Nuevos	1	1,00	0,00	1,00	26,72	0,0005
Rizomas Nuevos	2	1,75	0,71	2,00		
Rizomas Nuevos	3	2,00	0,58	2,00		
Rizomas Nuevos	4	2,29	1,11	2,00		
Rizomas Nuevos	5	1,57	0,53	2,00		
Rizomas Nuevos	6	1,71	0,49	2,00		
Rizomas Nuevos	7	2,13	0,35	2,00		
Rizomas Nuevos	8	3,57	1,41	4,00		
Rizomas Nuevos	9	1,63	0,52	2,00		
Rizomas Nuevos	10	2,00	0,00	2,50		
Rizomas Nuevos	11	2,11	0,33	2,00		
Rizomas Nuevos	12	2,50	1,51	2,50		

Trat.	Ranks		
1	12,50	c	
5	34,21	c	
9	36,25	c	b
6	39,64	c	b
2	40,06		b
3	49,43		b a
10	50,50		b a
12	53,63		b a
4	53,71		b a
11	53,89		b a
7	54,31		b a
8	76,86		a

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

## 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.
- 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.
- Baeza, C.; O. Scharader; E. Ruiz y M. Negritto. 2006. Análisis comparativo del cariotipo en poblaciones de *Alstroemeria ligtu* sub sp. *ligtu* y *A. ligtu* subsp. *simsii* (Alstroemeriaceae) de Chile. Darwiniana, 44(2):313-318.
- Bayer, E. 1987. Die Gattung *Alstroemeria* in Chile. Mitteilungen der Botanischen Staatsamml. Munchen, 24: 241–362.
- Bridgen M.P. 1994, nov. A review of plant embryo culture. HortScience, 29(11): 1243-1246.
- Cavieres L.; A. Peñaloza y M. arroyo. 1998. Efectos del tamaño floral y densidad de flores en la visita de insectos polinizadores en *Alstroemeria pallida* Graham. Gayana Botanica, 55(1):1-10.
- 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.
- Debergh P.; P. Harbaoui and R. Lemeur. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara Scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. Physiologia plantarum, 53: 181-187.
- Debergh P.; J. Aitken-Christie; D. Cohen; B. Grout; S. von Arnold and M. Ziv. 1992. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 30: 135-140.
- Debergh P.; Zimmerman P. and Richard H. 1991. Micropropagation: Technology and Application. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 496 p.
- Debergh, P. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. Physiologia Plantarum. 59: 270-276.

Ebrahim, M. 2004. Comparison, determination and optimizing the conditions required for rhizome and shoot formation, and flowering of *in vitro* cultured calla explants. Scientia Horticulturae, 101: 305-313.

Ebrahim, M. and I. Ibrahim. 2000. Influence of medium solidification and pH value on *in vitro* propagation of *Maranta leuconeura* cv. Kerchoviana. Scientia Horticulturae. 86: 211-221.

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

Ibrahim A. 1994. Effects of gelling agent and activated charcoal on the growth and development of *Cordyline terminalis* cultured *in vitro*. In: Proceedings of the first conference of ornamental horticulture. pp. 55-67.

Khaleghi, A.; A. Khalighi and A. Sahraroo. 2008. *In vitro* propagation of *Alstroemeria* cv. 'fuego'. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences, 3(3):492-497.

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

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

Mehdi, A.; A. Maheran; K. Nurashikin and I. Ismanizan. 2014. Effect of cytokinin types, concentrations and their interactions on *in vitro* shoot regeneration of *Chlorophytum borivilianum* Sant. & Fernandez. Electronic Journal of Biotechnology. 17:275-249.

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.

Muthukrishnan, S.; J. Benjamin and M. Rao. 2013. Influence of agar concentration and liquid medium on *in vitro* propagation of *Ceropegia thwaitesii* Hook- an endemic species. Journal of Agricultural Technology, 9(4): 1013-1022.

Pierik, R.; A. Van Voorst; G. Booy; C. Van Acker; C. Lelivelt and J. de Wit. 1988. Vegetative propagation of *Alstroemeria* hybrids *in vitro*. Acta Horticulturae, 226: 81-89.

Rahim S.; B. Kaviani and 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.

Ravenna, P. 1988. New or noteworthy species of *Alstroemeria*. Phytologia, 64(4): 281-288.



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.

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.

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.

Zimmerman, T and C. Robacker. 1988, sep.-jul. Media and gelling agent effect on cotton callus initiation. Plant cell, tissue and organ culture, 15(3): 269-274.