

**ESCUELA POLITECNICA DEL EJÉRCITO  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
SANGOLQUÍ**

**“REGENERACIÓN Y CONSERVACIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE  
CRECIMIENTO MÍNIMO DE *Lupinus mutabilis* (CHOCHO ANDINO) *IN  
VITRO*”**

**PROAÑO BARAHONA ALEJANDRA DANIELA**

**INFORME DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO COMO  
REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO  
AGROPECUARIO**

**SANGOLQUÍ – ECUADOR  
2011**

**“REGENERACIÓN Y CONSERVACIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE  
CRECIMIENTO MÍNIMO DE *Lupinus mutabilis* (CHOCHO ANDINO) IN  
VITRO”**

**PROAÑO BARAHONA ALEJANDRA DANIELA**

**REVISADO Y APROBADO**

.....  
**Ing. Eduardo Urrutia**  
**DIRECTOR DE CARRERA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

Ing. César Falconí  
**DIRECTOR**

Dr. Darwin Rueda  
**CODIRECTOR**

.....  
**SECRETARÍA ACADÉMICA**

**“REGENERACIÓN Y CONSERVACIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE  
CRECIMIENTO MÍNIMO DE *Lupinus mutabilis* (CHOCHO ANDINO) IN  
VITRO”**

**PROAÑO BARAHONA ALEJANDRA DANIELA**

**APROBADO POR LOS SEÑORES MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE  
CALIFICACIÓN DEL INFORME TÉCNICO.**

	<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>FECHA</b>
Ing. César Falconí <b>DIRECTOR</b>	_____	_____
Dr. Darwin Rueda <b>CODIRECTOR</b>	_____	_____

**CERTIFICO QUE ESTAS CALIFICACIONES FUERON PRESENTADAS EN  
ESTA SECRETARÍA.**

**SECRETARÍA ACADÉMICA**

## **DEDICATORIA**

A mis padres que han sido mi apoyo siempre,  
que han sacrificado todo por amor y que son  
mi orgullo, a mis hermanos, mis abuelos, mis  
primos y mis tíos, que han estado a mi lado  
en todo momento.

**Alejandra Proaño**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por darme la oportunidad de tener todo lo que tengo y de iluminar mi camino día a día.

A mi familia por apoyarme en todo momento y ayudarme a alcanzar este triunfo.

Al Ingeniero César Falconí, por haberme apoyado incondicionalmente en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Rueda y los Ingenieros Pablo Landázuri y Jaime Villacís, por haberme brindado su ayuda y sus conocimientos para este trabajo.

A Sebastián, por su ayuda incondicional y mis amigos que estuvieron junto a mí durante toda mi carrera.

**Alejandra Proaño**

## AUTORÍA

Yo, Alejandra Daniela Proaño Barahona

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la Biblioteca virtual de la Institución del trabajo “REGENERACIÓN Y CONSERVACIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE CRECIMIENTO MÍNIMO DE *Lupinus mutabilis* (CHOCHO ANDINO) *IN VITRO*”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Quito, 6 de Mayo del 2011

---

Alejandra Daniela Proaño Barahona



enraizamiento de cultivos <i>in vitro</i>	
2.1.9.4 Ácido indolacético (IAA) utilizado en el enraizamiento de cultivos <i>in vitro</i>	18
2.1.9.5 Ácido abscísico utilizado en la conservación de cultivos <i>in vitro</i>	19
2.1.9.6 Nitrato de plata utilizado en la conservación de cultivos <i>in vitro</i>	21
2.1.9.7 Cloruro de (2-cloroetil) trimetil amonio utilizado en la conservación de cultivos <i>in vitro</i>	22
2.1.10 Semilla artificial	23
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
3.1 UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN	26
3.1.1 Ubicación política	26
3.1.2 Ubicación geográfica	26
3.1.3 Ubicación ecológica	27
3.2 MATERIALES	27
3.3 MÉTODOS	28
3.3.1 Diseño experimental	32
3.3.1.1 Factores a probar	32
3.3.1.2 Tratamientos a comparar	33
3.3.1.3 Tipo de diseño	33
3.3.1.4 Modelo matemático	34
3.3.1.5 Características de las UE	35
3.3.1.6 Croquis del diseño	36

<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>37</b>
4.1 Introducción, multiplicación, enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>L. mutabilis</i>	37
4.1.1 Introducción <i>in vitro</i> de <i>L. mutabilis</i>	37
4.1.2 Multiplicación <i>in vitro</i> de <i>L. mutabilis</i>	38
4.1.3 Crecimiento radicular <i>in vitro</i> de <i>L. mutabilis</i> , con adaptación dentro de invernadero	38
4.2 Comportamiento de brotes de <i>L. mutabilis</i> en cinco filiales de multiplicación y enraizamiento <i>in vitro</i>	41
4.2.1. Crecimiento vegetal <i>in vitro</i>	41
4.2.2 Eficiencia de multiplicación <i>in vitro</i>	43
4.2.3 Crecimiento radicular <i>in vitro</i>	46
4.2.4 Crecimiento de regenerantes de chocho en macetas bajo condiciones de invernadero	47
4.3 Fase de conservación utilizando diferentes dosis de inhibidores de crecimiento vegetal	49
4.3.1 Regeneración <i>in vitro</i> de las plantas conservadas	52
4.3.1.1 Regeneración <i>in vitro</i> de la planta de chocho Tardía #63	53
4.3.1.2 Regeneración <i>in vitro</i> de la planta de chocho Moderadamente tardía #10	54
4.3.1.3 Regeneración <i>in vitro</i> de la planta de chocho Temprana #19	55
4.4 Obtención de semilla artificial de <i>L. mutabilis</i> utilizando brotes axilares de plántulas <i>in vitro</i>	56

4.4.1 Regeneración de semilla artificial de chocho <i>L. mutabilis</i>	56
con 100,50 y 25% de sales MS	
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>58</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES</b>	<b>60</b>
<b>VII. RESUMEN</b>	<b>61</b>
<b>VIII. ABSTRACT</b>	<b>62</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>63</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N°	Pág.
<b>Cuadro 2.1:</b> Composición de ácidos grasos totales del chocho (%).	7
<b>Cuadro 2.2:</b> Composición de medios de cultivo para células vegetales.	15
<b>Cuadro 4.1:</b> Desarrollo del tamaño de planta hasta los 45 días	38
<b>Cuadro 4.2:</b> Crecimiento radicular <i>in vitro</i> de <i>L. mutabilis</i> , con adaptación dentro de invernadero	40
<b>Cuadro 4.3:</b> Análisis de varianza para tamaño de planta y número de brotes de <i>L. mutabilis</i> durante cinco generaciones	42
<b>Cuadro 4.4:</b> Promedio ( $\pm$ error estándar) de tamaño de planta y número de brotes de <i>L. mutabilis</i> durante el efecto de cinco generaciones	42
<b>Cuadro 4.5:</b> Promedio ( $\pm$ error estándar) de tamaño de planta y número de brotes de <i>L. mutabilis</i> durante el efecto de la interacción Cultivar * Tiempo	43
<b>Cuadro 4.6:</b> Eficiencia de multiplicación de brotes de chocho <i>L. mutabilis</i> durante cinco generaciones	44
<b>Cuadro 4.7:</b> Eficiencia de multiplicación de brotes de <i>L. mutabilis</i> de variedades tempranas, moderadamente tardías y tardías	45
<b>Cuadro 4.8:</b> Análisis de varianza para el tamaño y número de raíces de <i>L. mutabilis in vitro</i>	47
<b>Cuadro 4.9:</b> Análisis de varianza para el tamaño de planta y número de brotes de <i>L. mutabilis</i> en macetas dentro de invernadero	48
<b>Cuadro 4.10:</b> Análisis de varianza para el tamaño de planta y número de brotes en tres plantas de chocho <i>L. mutabilis</i>	49
<b>Cuadro 4.11:</b> Efecto de la interacción Dosis * Inhibidores en el tamaño de	50

planta y número de brotes en tres plantas de chocho *L. mutabilis*

**Cuadro 4.12:** Efecto de la interacción Inhibidores \* Planta en el tamaño de 51

planta y número de brotes en tres plantas de chocho *L. mutabilis*

**Cuadro 4.13:** Dosis máximas y mínimas óptimas de AgNO<sub>3</sub>, ABA y CCC para 52

conservación *in vitro* de *L. mutabilis*

**ÍNDICE DE GRÁFICOS**

<b>GRÁFICO N°</b>	<b>Pág.</b>
<b>Gráfico 4.1:</b> Tamaño del explante de las 15 plantas de <i>L. mutabilis</i> seleccionadas para enraizamiento <i>in vitro</i>	39
<b>Gráfico 4.2:</b> Eficiencia en la multiplicación de nuevos regenerantes de plantas tempranas, moderadamente tardías y tardías de <i>L. mutabilis</i> , durante cinco generaciones (media geométrica $\pm$ desviación estándar)	46
<b>Gráfico 4.3:</b> Efecto de Inhibidores de crecimiento para el tamaño de planta y número de brotes en la población tardía #63.	53
<b>Gráfico 4.4:</b> Efecto de Inhibidores de crecimiento para el tamaño de planta y número de brotes en la población moderadamente tardía #10.	54
<b>Gráfico 4.5:</b> Efecto de Inhibidores de crecimiento para el tamaño de planta y número de brotes en la población temprana #19.	55

## I. INTRODUCCIÓN

La búsqueda por una seguridad alimentaria sostenible ha creado interrogantes en la multiplicación y cultivo de los principales pilares alimenticios del mundo. En América del Sur los granos constituyen la base fundamental de la alimentación y economía, no solamente del sector rural sino también del urbano. Es por ello que se ha masificado el estudio de todo tipo de parámetros de crecimiento y conservación de estos alimentos. Lamentablemente son muy escasos los conocimientos científicos que permitan poseer un estándar fisiológico en algunas especies nativas, tales como el chocho, la quinua y el amaranto (Velásquez, 1993).

Estudios internacionales en materia de conservación han demostrado que la utilización de diferentes dosis de hormonas en procesos *in vitro* es la clave para mantener con éxito un cultivo asegurando, además, su regeneración y viabilidad genética.

En el Ecuador, la información acerca de la regeneración y conservación controlada de *Lupinus mutabilis* (chocho) es muy escasa, la mayoría de investigaciones acerca de este cultivo se dirigen hacia el tema fitosanitario más no a la aplicación de técnicas fisiológicas *in vitro* para la obtención de semillas híbridas. La necesidad de establecer e investigar dichos procesos deriva en la necesidad de todo investigador agrícola para asegurar el futuro alimenticio de América Latina y el mundo.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo General

- Desarrollar protocolos *in vitro* para la regeneración y conservación mediante la técnica de crecimiento mínimo de *L. mutabilis* (chocho andino).

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Desarrollar un protocolo de introducción, multiplicación y enraizamiento a partir de brotes axilares de chocho colectados en campo.
- Estudiar el comportamiento de brotes de *L. mutabilis* en cinco filiales de multiplicación y la fase de enraizamiento para obtener regenerantes completos.
- Establecer un protocolo de conservación para la dosificación de nitrato de plata, ácido abscísico y cloruro de (2-cloroetil) trimetil amonio.
- Obtener semilla artificial de *L. mutabilis* utilizando brotes axilares de las plántulas *in vitro* como un método alternativo de conservación.
- Difundir la tecnología generada mediante boletín técnico.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 GENERALIDADES

#### 2.1.1 Origen

*Lupinus mutabilis* es una leguminosa anual, de la cual se utiliza el grano en la alimentación. Conocido como chocho en el norte de Perú y Ecuador, tarwi en el centro y tauri en el sur del Perú y Bolivia (Torres, 1976).

El chocho presenta gran variabilidad morfológica y de adaptación ecológica en los Andes, por lo cual se ha sugerido a tres subespecies (Gross, 1982):

- *Lupinus mutabilis*, chocho (norte de Perú y Ecuador), de mayor ramificación, muy tardío, mayor pilosidad en hojas y tallos, algunos ecotipos se comportan como bianuales, tolerantes a la antracnosis.
- *Lupinus mutabilis*, tarwi (centro y sur de Perú), de escasa ramificación, medianamente tardío, algo tolerante a la antracnosis.
- *Lupinus mutabilis*, tauri (altiplano de Perú y Bolivia), de menor tamaño (1-1,40 m) con un tallo principal desarrollado, muy precoz, susceptible a la antracnosis.

Según Mc Bride (1957), en los Andes se pueden diferenciar 83 especies del género *Lupinus*. El tarwi se debe haber originado probablemente de una mutación espontánea de una o varias especies.

Gade (1969) supone que el cultivo del chocho no ha podido competir con otras leguminosas introducidas como el haba y la arveja, lo que ha motivado la declinación en el área cultivada.

## **2.1.2. Taxonomía**

### **2.1.2.1 Descripción botánica**

El lupino perteneciente a la familia de las fabáceas (papilionáceas), está representado por más de 300 especies.

La hoja de *Lupinus* es de forma digitada, generalmente compuesta por ocho folíolos que varían entre ovalados a lanceolados. En la base del pecíolo existen pequeñas hojas estipulares, muchas veces rudimentarias. Se diferencia de otras especies de *Lupinus* en que las hojas tienen menos vellosidades. El color puede variar de amarillo verdoso a verde oscuro, dependiendo del contenido de antocianina (Gross, 1982).

Según el tipo de ramificación que presente la planta, puede tener hasta tres floraciones sucesivas. La coloración de la flor varía entre el inicio de su formación hasta la maduración de un azul claro hasta uno muy intenso

y de allí se origina su nombre científico, mutabilis, es decir que cambia. Los colores más comunes son los tonos azul e incluso púrpura y los menos frecuentes los colores blanco, crema, rosado y amarillo (Tapia, 1994).

Las semillas de chocho están incluidas en número variable en una vaina de 5 a 12 cm, varían su forma (redonda, ovalada a casi cuadrangular), miden entre 0,5 a 1,5 cm. Un kilogramo tiene 3500 a 5000 semillas. La variación en tamaño depende tanto de las condiciones de crecimiento como del ecotipo o variedad. La semilla está recubierta por un tegumento endurecido que puede constituir hasta el 10% del peso total. Los colores del grano incluyen blanco, amarillo, gris, ocre, pardo, castaño, marrón ó colores combinados como marmoleado, media luna, ceja y salpicado (Blanco, 1980).

La altura de la planta está determinada por el eje principal que varía entre 0,5 a 2,00 m. El tallo de chocho es generalmente muy leñoso y se puede utilizar como combustible. Su alto contenido de fibra y celulosa, hace que se lo emplee como material de combustión, sin embargo podría permitir un proceso de industrialización. El color del tallo oscila entre verde oscuro y castaño. En las especies silvestres es rojizo a morado oscuro. El número de ramas varía desde unas pocas hasta 52 ramas. El número de vainas y de ramas fructíferas tiene correlación positiva con una alta producción (Ticona, 1975).

Como leguminosa, el chocho tiene una raíz pivotante vigorosa y profunda que puede extenderse hasta 3 metros de profundidad.

En la raíz se desarrolla un proceso de simbiosis con bacterias nitrificantes que forman nódulos de variados tamaños (1 a 3 cm), se localizan principalmente en la raíz primaria, por encima de la ramificación radicular, e incluso en las raíces secundarias (McBride, 1957).

### **2.1.3. Valor Nutritivo**

Las semillas son excepcionalmente nutritivas. Las proteínas y aceites constituyen más de la mitad de su peso, estudios realizados en más de 300 diferentes genotipos muestran que la proteína varía de 41- 51% y el aceite de 14-24% (Gross *et al*, 1988) (Cuadro 2.1).

En base a análisis bromatológico, la semilla posee en promedio 35.5% de proteína, 16.9% de aceites, 7.65% de fibra cruda, 4.145% de cenizas y 35.77% de carbohidratos, encontrando correlación positiva entre proteína y alcaloides, mientras que es negativa entre proteína y aceite.

**Cuadro 2.1.** Composición de ácidos grasos totales del chocho (%).

<b>ACIDOS</b>	<b>%</b>
Oléico (Omega 9)	40,4
Linoleico (Omega 6)	37,1
Linolénico (Omega 3)	2,9
Palmítico	13,4
Palmitoleico	0,2
Esteárico	5,7
Mirístico	0,6
Araquídico	0,2
Behénico	0,2
Erúsico	0
Cociente Polisat/Satur	2

**Fuente:** Gross, 1988

#### **2.1.4. Condiciones de Cultivo: Clima y Suelos**

Se cultiva en las zonas templadas y frías del Altiplano, en valles interandinos de 2.000-3.850 m. En cuanto a la precipitación pluvial, sus requerimientos se sitúan en 350-850 mm, siendo cultivado exclusivamente en condiciones de secano. Es susceptible al exceso de humedad y moderadamente susceptible a la sequía durante la floración y envainado. No tolera las heladas en las fases iniciales y en la formación de vainas, aunque algunos ecotipos cultivados en el Altiplano y a orillas del Lago Titicaca tienen mayor resistencia al frío (Mujica, 1994).

Los suelos que requiere deben ser francos y franco-arenosos con balance adecuado de nutrientes y buen drenaje, así como un pH que oscila entre 5 y 7. En suelos ácidos, la fijación de nitrógeno por el *Rhizobium lupini* es muy escasa, debiendo utilizarse en lo posible cepas nativas de cada zona de cultivo.

El cultivo se mantiene en forma tradicional en Bolivia, Perú y Ecuador en los valles interandinos, aunque en la actualidad se han efectuado introducciones en Venezuela, Colombia, Chile, Argentina, México y países de Europa con buenos resultados (Tapia, 1994).

#### **2.1.5. Aspectos Agrotécnicos**

La práctica tradicional de cultivo consiste en sembrar con laboreo mínimo sobre todo en suelos delgados y zonas altas. La densidad de siembra óptima a 0.70 m entre surcos, 0.30 m entre golpes y tres semillas por golpe, usando 80 kg/ha de semilla (Mujica, 1994), seleccionada y desinfectada contra *C. acutatum* que produce antracnosis en la planta (Talhinhas *et al*, 2002).

Las labores culturales se limitan a una escarda y deshierbe (Mujica 1977). La técnica de cultivo mejorada consiste en sembrar en suelo previamente preparado y fertilizado con la fórmula NPK 0-60-0 ó 0-80-60, de acuerdo a la fertilidad del suelo. Se ha determinado a las principales plagas que afectan al cultivo. Las más importantes: masticadores de follaje y

barrenadores de tallo (*Copitarsia turbata* y *Agromyza sp.*) y picadores chupadores (*Frankliniella tuberosi* y *Myzus sp.*). Respecto a enfermedades: Antracnosis (*Colletotrichum acutatum*) (Talhinhas *et al*, 2002), roya (*Uromyces lupini*) y fusariosis (*Fusarium oxisporium*). La escarda se realiza en la fase de ramificación, controlando al gorgojo barrenador (*Apiun sp.*). La cosecha se realiza cuando las plantas han alcanzado la madurez plena. Se separan los granos de la vaina mediante golpes con palos curvos o pisoteo del ganado.

#### **2.1.6. Rendimiento**

Los rendimientos del chocho alcanzan 3500-5000 kg/ha, cuando el cultivo es conducido en forma adecuada y se le proporciona todos sus requerimientos en forma oportuna. También tiene potencial la producción de alcaloides para uso como biocidas o repelentes de las principales plagas que afectan los cultivos de la zona andina (Mujica, 2004).

#### **2.1.7. Usos del Chocho**

Este vegetal da lugar a infinidad de preparaciones en la gastronomía, como por ejemplo: ceviche de chocho, crema de chocho, tortilla de chocho, entre otros (Zapata, 2006).

Los alcaloides (esparteína, lupinina, lupanidina, etc) se emplean para controlar ectoparásitos y parásitos intestinales de los animales (Luglio, 1980).

En estado de floración, la planta se incorpora a la tierra como abono verde, con buenos resultados mejorando la cantidad de materia orgánica, estructura y retención de humedad del suelo (Bernal, 1982).

### **2.1.8. Cultivos *IN VITRO***

Las aplicaciones más importantes del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* en agricultura se orientan a la propagación, al saneamiento y a la mejora genética (García, 1991).

Ball fue el pionero de la multiplicación vegetativa *in vitro* o micropropagación ya que en 1946, obtuvo el desarrollo *in vitro* de plantas enteras a partir de meristemos apicales de vástagos de *Tropaeolum majus* y de *Lupinus albus* L. Esta línea requiere que el material a cultivar esté aséptico (esterilizado) y que se cultive en un medio nutritivo estéril, constituido principalmente por sales minerales de macronutrientes y micronutrientes, vitaminas, hormonas (citoquininas y/o auxinas principalmente), azúcar (sacarosa y/o glucosa entre otras), etc. Los medios nutritivos pueden permanecer en estado líquido o solidificarse con agar en base al tipo de cultivos *in vitro*. El medio ya sembrado se deposita en cámara de incubación o germinadora, equipada de factores ambientales

controlados (luz, temperatura, humedad relativa) u optimizados para cada tipo de cultivo (Inciarte, 2001).

La propagación vegetativa *in vitro* o clonación puede ser una alternativa económicamente rentable, frente a los métodos de multiplicación clásicos (el sexual y el asexual). La micropropagación masiva de clones puede obtenerse vía organogénesis directa, es decir, a partir de meristemo o yema aislada de un vástago. Esta vía aporta estabilidad genética o ausencia de mutaciones, y también plantas libres de virus (saneamiento), mediante el cultivo de ápices meristemáticos de vástago. La vía indirecta o callo, consiste en regenerar plantas a partir de células desorganizadas y diferenciadas. Sin embargo, la vía "callo" se utiliza para obtener variantes somaclonales y mutantes, entre otros (Gautheret, 1983).

#### **2.1.8.1. Morfogénesis en el meristemo apical**

Las pruebas para cultivar ápices y meristemas aislados de diferentes angiospermas datan del siglo pasado. En 1893 Reehinger intentó crecer en arena, con y sin nutrientes adheridos, yemas aisladas de *Populus nigra* y *Fraxinus ornus* L.; se observó formación de callos basales y una ligera expansión de las partes superficiales, aunque no hubo desarrollo del sistema radicular (Barlass, 1978).

Posteriormente, Robbins (1922) hizo los primeros intentos para cultivar ápices aislados en un medio artificial (*in vitro*).

Ball (1960) probó el cultivo de meristemas apicales de *Lupinus albus* L. en un medio que contenía aminoácidos, leche de coco, ácido giberélico y vitaminas, observando sólo una pequeña elongación del meristemo. Al repetir el experimento, dejó algunos primordios de hoja a los meristemas y obtuvo plantas completas.

Shabdé y Murashige (1977) demostraron la dependencia de fuentes hormonales de los meristemas apicales de clavel en hojas subyacentes y tejidos en tallo. Esto se debe a que cuando se inocula el demo meristemático en ausencia de primordios de hojas expandidas se deben incluir auxinas y citoquininas exógenas en el medio.

Como se sabe, un balance adecuado de auxinas y citoquininas *in vitro* induce la formación de yemas y/o raíces, dependiendo de la concentración de ambas y de la especie en que esté actuando, lo que implica que las hojas jóvenes son capaces de producir las auxinas necesarias para el desarrollo adicional de la raíz y que cuando maduran sintetizan citoquininas que promueven la formación de brotes, ya sean primordios y hojas o yemas laterales (la principal fuente de citoquininas son las raíces) (Wetmore, 1954).

Cabe recordar que la relación auxina – citoquinina *in vitro* es indispensable para la morfogénesis de los meristemas. Las investigaciones actuales se centran en encontrar la concentración óptima,

tanto de auxina como de citoquinina, tomando en cuenta las variaciones de respuesta inter específica que presentan los vegetales (Morel, 1949).

#### **2.1.8.2. Multiplicación masiva de vegetales**

La facilidad de usar la técnica de cultivo de tejidos vegetales para la multiplicación masiva produce material vegetal *in vitro* por la iniciación de brotes adventicios, bulbos, tubérculos, embriones asexuales o por crecimiento de brotes de yemas axilares y producción masiva de plántulas a partir de meristemos (Hurtado, 1994).

Los propagadores comerciales ya tienen estandarizado el método de mantenimiento de un lote comercial de material madre *in vitro*, en donde, a demás de tener la ventaja de mantener este material, se considera el gran número que se puede mantener en un espacio reducido con las condiciones ambientales requeridas y la calidad y sanidad deseables. Esto es debido al potencial morfogenético que tienen los meristemos y otros tejidos de la planta en la producción de brotes (Merino, 1994).

#### **2.1.8.3. Recuperación de plantas libres de patógenos**

Muchos cultivos comerciales vegetales, particularmente los que son propagados vegetativamente, contiene virus sistémicos, los cuales afectan su funcionamiento o abaten su rendimiento. Por tanto, antes de librarse

comercialmente es deseable producir plantas libres de virus, que pueden ser clonalmente multiplicadas (Hurtado, 1994).

En muchas especies lo anterior puede lograrse con tratamientos con calor de varios órganos *in vitro*, o de plantas compuestas, así como con la aplicación de productos químicos (García, 1991).

Actualmente la alternativa de más éxito es el cultivo de meristemas apicales, frecuentemente combinado con quimioterapia o con tratamientos de calor. Cuando estos métodos son usados, las plantas no solo son liberadas del virus, sino también de hongos y otros patógenos (Barlass, 1978).

### **2.1.9. Medios de Cultivo y Hormonas Utilizadas en Cultivos**

#### **IN VITRO**

Es importante señalar que el medio de cultivo es un factor esencial, ya que en él juegan un papel vital los requerimientos nutricionales, hormonales y ambientales, específicos de la especie que se esté cultivando; éstos deben de ser semejantes a los que se tienen en condiciones naturales (Merino, 1994).

**Cuadro 2.2** Composición de medios de cultivo para células vegetales.

Componentes	Características y ejemplos
Agua destilada	Representa el 95% del medio nutriente.
Fuente de carbono	Generalmente se usa sacarosa. La fuente de carbono se necesita porque los explantos no son completamente autótrofos, y no pueden cubrir sus necesidades con la fotosíntesis que pueden realizar <i>in vitro</i> .
Sustancias inorgánicas	Macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) y microelementos (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I), en una proporción adecuada según la planta elegida.
Vitaminas	Vitaminas B1, B2, B6, vitamina H, vitamina E, ácido fólico, ácido nicotínico, entre otras.
Hormonas y reguladores del crecimiento	Auxinas: promueven la elongación celular, la formación de callos y raíces adventicias, inhiben la formación de brotes axilares adventicios y, a veces, inhiben la embriogénesis. Citoquininas: promueven la división celular, regulan el crecimiento y el desarrollo de los tejidos vegetales. Otras: giberelinas, ácido abscísico, etileno.
Mezclas de sustancias poco definidas	Extracto de levadura, extractos vegetales.
Materiales inertes	Se usan como soporte: agar, agarosa, otros polisacáridos, lana de vidrio, papel de filtro, arena.

**Fuente:** Biotecnología, UNQ 2006.

### **2.1.9.1. Ácido Giberélico (AG<sub>3</sub>) utilizado en la germinación de cultivos *in vitro***

El ácido giberélico o giberelina A3, AG, y AG<sub>3</sub> es una fitohormona que se la encuentra en plantas. Su fórmula química es C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>. Cuando es purificada, es un polvo cristalino blanco a pálido amarillo, soluble en etanol y algo soluble en agua (Barcello, 1995).

Este ácido estimula a las células de las semillas germinantes a producir moléculas de ARN mensajero (ARNm) que codifican las enzimas hidrolíticas. Es una hormona potente cuya presencia natural en plantas controla su desarrollo. Sabiéndose de su poder regulatorio, las aplicaciones de muy bajas concentraciones pueden resultar en profundos efectos, mientras que muy altas pueden dar el efecto opuesto. Se lo usa generalmente en concentraciones de 0,01 a 10 mg/L (García, 1991).

Las giberelinas tienen un número de efectos sobre el desarrollo vegetal que son las siguientes: estimulan rápido crecimiento de tallos, inducen divisiones mitóticas en las hojas de algunas especies e incrementan la tasa de germinación de semillas (Bonner, 1933).

El AG se usa a veces en laboratorio y en invernadero para acelerar la germinación de semillas que de otro modo permanecerían en dormancia. Es muy usado en la industria de las vides como la hormona inductora de la producción de más largos sarmientos (Barcello, 1995).

#### **2.1.9.2. Bencil amino purina (BAP) utilizado en la regeneración de cultivos *in vitro***

Los reguladores del crecimiento son muy empleados en el cultivo *in vitro*, ya que sus efectos favorecen en gran medida el crecimiento y desarrollo de las plantas (Quemada, 2006).

La hormona bencil amino purina es una citoquinina que se sintetiza en los meristemos apicales de las raíces, aunque también se producen en los tejidos embrionarios y en las frutas (Bonner, 1933).

El transporte en la planta es por vía acropétala, desde el ápice de la raíz hasta los tallos, moviéndose a través de la savia en los vasos correspondientes al xilema (Harzie, 1998).

Esta hormona cumple con las siguientes funciones: estimular la división celular y el crecimiento de la planta, inhibir el desarrollo de raíces laterales, romper la latencia de las yemas axilares, a la vez promueve la organogénesis en los callos celulares, retrasa la senescencia ó envejecimiento de los órganos vegetales, promueve la expansión celular en cotiledones y hojas y el desarrollo de los cloroplastos (Jordan, 2007).

### **2.1.9.3. Ácido naftalenacético (ANA) utilizado en el enraizamiento de cultivos *in vitro***

El ácido naftalenacético es un ácido carboxílico derivado de naftaleno. A temperatura ambiente se presenta como un olor ácido sólido blanco (Devlin, 1975).

Es un regulador del crecimiento vegetal utilizado en diversos cultivos en la agricultura, es una auxina utilizada en el cultivo celular de los tejidos vegetales (García, 1991).

Cumple con las siguientes funciones: promueve la división celular en el cambium vascular y diferenciación del xilema secundario, aumenta el crecimiento de los tallos, estimula la formación de raíces adventicias, promueve la síntesis de etileno (influye en los procesos de maduración de los frutos), inhibe la abscisión o caída de los frutos (Jordan y Casaretto, 2007).

#### **2.1.9.4. Ácido indolacético (IAA) utilizado en el enraizamiento de cultivos *in vitro***

El ácido indolacético es un ácido que actúa a nivel de los ápices, en los que hay tejido meristemático, el cual es indiferenciado (Sivori, 1980).

Las funciones de este ácido son las siguientes: inhibir el desarrollo de las yemas axiales dando origen a un fenómeno que se conoce como dominancia apical, provocar el desarrollo de raíces laterales y adventicias, promover el fototropismo positivo y estimular el desarrollo de los frutos. La influencia de éste en las yemas depende del ángulo de crecimiento de la rama ya que la distribución de esta hormona presenta sentido basipeto (desde el ápice hacia abajo) (Barcello, 1995).

La planta ha desarrollado 4 procedimientos para regular de forma precisa el nivel de IAA para que produzca un determinado efecto fisiológico.

Los procesos son: Biosíntesis, Transporte, Catabolismo, Conjugación. La interacción entre estos 4 procesos es la que determina el nivel de este ácido en los tejidos, a esto se le denomina Homeostasis del IAA (regulación de niveles hormonales) (Bidwell, 1993).

#### **2.1.9.5. Ácido abscísico (ABA) utilizado en la conservación de cultivos *in vitro***

El ABA en su papel de regulador esencial del crecimiento de las plantas, se ve influenciado adicionalmente por su interacción con auxinas, citoquininas y giberelinas, la hormona se encuentra en todas las especies tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, también en hongos fitopatógenos, algas verdes, cianobacterias y algunos musgos (Zacarías y Lafuente, 2000), sintetizándose en bajas cantidades en casi todas las células que contienen cloroplastos o amiloplastos, en especial tejidos vasculares no sometidos a estrés, semillas, ovarios y frutos, distribuyéndose en todos órganos y tejidos vegetales (Jordán y Casaretto, 2007).

Al igual que otras hormonas, las respuestas a ABA dependen de la concentración en el tejido y la sensibilidad del tejido a la hormona. De este modo la biosíntesis y concentración de ABA fluctúa en forma importante en tejidos específicos en respuesta a cambios en las condiciones medioambientales, sin embargo procesos de degradación,

compartimentalización, conjugación y transporte también son factores que regulan su concertación (Taiz y Zeiger, 2006).

El ABA es transportado por vía floema, xilema a brotes y raíces, también a las células de parénquima fuera de las haces vasculares, aumentando su concentración en condiciones de estrés en estas vías, la magnitud de este cambio depende de las especies (Taiz y Zeiger, 2006).

Los efectos fisiológicos del ABA son: la inducción de latencia en yemas y semillas, inhibe la producción de proteínas inducida por las giberelinas en las semillas, induce la senescencia y abscisión en hojas, inhibe el crecimiento de los tallos, la elongación celular, favorece la maduración de semillas, reduce la transpiración, participa en la formación de frutos, realiza una detención del crecimiento activo de órganos, participa en la tolerancia que tienen algunas plantas a condiciones de estrés y realiza un control de la apertura estomática (Quemada, 2006).

Los efectos *in vitro* del ABA son: Esencial para la maduración y crecimiento normal de embriones somáticos y crioconservación de órganos y semillas con bajo contenido hídrico. El menor contenido hídrico disminuye la posibilidad de formar hielo que afecta negativamente la viabilidad de estructuras, por tanto, la conservación a bajas temperaturas es posible (Sondheimer y Galson, 1966).

#### **2.1.9.6. Nitrato de plata utilizado en la conservación de cultivos *in vitro***

El nitrato de plata es una sal inorgánica ( $\text{AgNO}_3$ ). Este compuesto es utilizado para detectar la presencia de cloruro en otras soluciones. Cuando está diluido en agua, reacciona con el cobre formando nitrato de cobre, se filtra y lo que queda en el filtro es plata (Suárez, 2000).

En la farmacopea de numerosos países el nitrato de plata, junto con la propia plata, se utiliza como antiséptico y desinfectante aplicado por vía tópica. También se utiliza como cauterizante en hemorragias superficiales o para refrescar úlceras encallecidas. Se utiliza en citoquímica para teñir el retículo endoplasmático rugoso (García, 1999).

El nitrato de plata ha sido identificado como un efectivo inhibidor de etileno y ha logrado prolongar la conservación *in vitro* de yuca (*Manihot esculenta*) por 18 meses (Mafla *et al*, 2000).

También ha sido utilizado en propagación *in vitro* de Rosa damascena var. Jwala mediante la inducción directa de las yemas a partir de explantes de hojas *in vitro* (Escalettes y Dosba, 1993).

**2.1.9.7. Cloruro de (2-cloroetil) trimetil amonio utilizado**  
**en la conservación de cultivos *in vitro***

Durante las dos últimas décadas un gran número de compuestos han sido sintetizados en laboratorio con el efecto de crecimiento lento de anti-giberelinas (Lockhart, 1962).

Los compuestos de anti-giberelinas son llamados así por el efecto de mínimo crecimiento en plantas, generalmente son conocidos como retardantes de crecimiento. Numerosos estudios nos muestran que la actividad inhibitoria influye en el crecimiento retardado de la planta que puede ser contrarrestado con la aplicación de ácido giberélico (GA). Por ejemplo (Lockhart *et al*, 1962) demostró que la influencia inhibitoria de CCC y Fosfon D en el alargamiento del tallo en fréjol puede ser completamente contrarrestado por GA3. En otro estudio, (Kende *et al*, 1963), encontró que AMO y CCC inhiben GA3 producción de cultivos de *Gibberella* pero no afecta en ninguna otra manera de crecimiento del hongo. Desde este y muchos otros estudios se concluye que el AMO, CCC y Fosfon D retardan el crecimiento de las plantas inhibiendo la biosíntesis de GA.

Algunos argumentan que estos retardantes de crecimiento producen sus efectos por interferencia con la acción de GA en lugar de alguna manera bloquear su biosíntesis. Sin embargo, se puede notar que en tejidos vegetales donde la respuesta a GA depende completamente en un

exógeno suplemento de la hormona, incluso las dosis masivas de los retardadores tienen poco o ningún efecto (Lang, 1970).

Un trabajo realizado por Dr. Charles West y sus colegas de la Universidad de California fue señalado como el actual sitio de acción inhibitoria por AMO, CCC y Fosfon D. Parece que los tres retardantes bloquean la conversión de pirofosfato de Geranylgeraniol a pirofosfato de copalyl; al hacerlo ellos inhiben la síntesis de Kaurene y otros compuestos que son derivados de este compuesto. Fosfon D es menos específico en la acción inhibitoria que AMO y CCC en el cual también se bloquea la conversión de pirofosfato de copalyl a kaurene (Kende, 1963).

#### **2.1.10. Semilla Artificial**

Muchas especies de plantas tienen la capacidad de conservar en su estado de semilla un poder vital por largo tiempo si las condiciones no son favorables para desarrollarse, pudiendo llegar a ser veinte años o más (Muñoz, 2006).

Llegando a obtener de ellas varios beneficios, bien sea usándolas como alimento o como tejidos entre otros muchos usos. Pero existen muchas especies vegetales que no presentan ciertas cualidades para su explotación, ya sea porque sus semillas no son resistentes o porque no se desarrollan en determinadas condiciones (González, 2004).

Gracias a estos inconvenientes se han desarrollado métodos que permitan modificar algunas de estas cualidades, como por ejemplo la creación de semillas artificiales o embriogénesis somática, con la finalidad de crear semillas de plantas, mejoradas y con características apropiadas según interés (González, 2004).

La semilla artificial es una estructura vegetal que tiene un origen normalmente asexual y que es obtenida *in vitro* a partir de cultivo de tejidos intentando imitar una semilla natural. Estará formada por tejido meristemático totipotente con la capacidad de producir una planta completa o por brotes originados por cultivos de meristemas, una cubierta y endosperma artificiales en el caso de tenerlos (Castillo, 1998).

Los embriones somáticos pasan por los mismos estados morfológicos de desarrollo que un embrión cigótico que son los siguientes: proembrión globular, trapezoidal, embrión cordiforme y torpedo (Barcello, 1995).

El desarrollo de semillas artificiales se lo realiza para la producción de plantas que sean genéticas y morfológicamente iguales a la especie de la que derivan ya que interesa conservar individuos o grupos de plantas que tengan un cierto valor. En la agricultura sería de mucha utilidad el cultivo de plantas con una producción y calidad apropiadas, así como la posibilidad de obtener semillas resistentes y duraderas de plantas que de otra manera no se podrían cultivar (Fuji, 1987).

En el laboratorio los embriones obtenidos son frágiles y muy pequeños, siendo incapaces de soportar las condiciones medioambientales y las técnicas de manejo a las que tendrían que someterse para su desarrollo. Por esto es necesario proteger su viabilidad, tomando en cuenta los siguientes métodos de producción de semillas:

1- Fabricando un sistema hidratado mediante una encapsulación en hidrogeles (Radenbaugh, 1986).

2- Utilizando un sistema de desecación de los embriones (Kitto y Janick, 1985).

El segundo método se asemeja más a las semillas naturales, este sistema elimina los problemas causados por los hidrogeles como la deshidratación de los mismos, la germinación prematura del embrión y el rápido deterioro de éste (Kitto y Janick, 1985).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN

##### 3.1.1. Ubicación Política

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Control Biológico de la Carrera de Ciencias Agropecuarias-IASA Área de Cultivo de Tejidos de la Escuela Politécnica del Ejército ESPE, República del Ecuador, Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Parroquia San Fernando, en la Hacienda “El Prado”. Las condiciones de temperatura se encuentran entre 20-25°C y humedad relativa entre 43 y 60%.

La recolección de muestras se realizó en la Provincia de Cotopaxi, Cantón Latacunga, Parroquia Aláquez, en el Instituto Tecnológico Agropecuario Simón Rodríguez, de plantas de chocho S1 desarrolladas por Ing. César Falconí.

##### 3.1.2. Ubicación Geográfica

La Hacienda “El Prado” se encuentra en una posición geográfica de 78°24'44'' (O) y 0° 23' 20'' (S) y a una altitud de 2748 m.s.n.m.

El Instituto Tecnológico Agropecuario Simón Rodríguez se encuentra en una posición geográfica de 00° 02.628' (N) y 78° 08.809' (O) y a una altitud de 2859 m.s.n.m.

### **3.1.3. Ubicación Ecológica**

El laboratorio de Control Biológico, se encuentra ubicado en la zona de vida: Bosque húmedo pre-montano, Altitud: 2748 m.s.n.m., Temperatura mínima: 8,08°C, Temperatura máxima: 20,06°C: Temperatura promedio: 16, 35°C, Precipitación: 1200mm/año, Vegetación: Bosque primario andino (Árboles, arbusto y pastos).

## **3.2. MATERIALES**

Los materiales que se utilizaron para la desinfección de muestras de chocho fueron: jabón líquido, yodo (povidin), benlate, agua destilada estéril, frascos de 1 litro, soluciones nutritivas, fundas ziploc.

Para la fase de cultivo *in vitro*, conservación y semilla artificial se utilizó: tubos de ensayo, cajas petri, envases plásticos de 1 litro, soluciones nutritivas, hormonas de crecimiento, inhibidores de crecimiento, alginato de sodio, cloruro de calcio, material vegetal, parafilm, mascarillas, guantes quirúrgicos, papel periódico, papel toalla, alcohol antiséptico,

alcohol industrial, papel aluminio, reglas de papel aluminio graduadas de 1cm.

En la fase de campo se utilizaron macetas plásticas, material vegetal y sustrato (fibra de coco).

Los equipos que se utilizaron fueron: Esterilizador o incubadora, auto clave, pH-metro, balanza analítica, agitador - calentador, refrigeradora, cámara de flujo laminar, cuarto de crecimiento, cámara de fotos.

Las herramientas que se utilizaron fueron: pinzas anatómicas, mecheros, probetas, pipetas, goteros, vasos de precipitación, buretas, botellas graduadas.

### **3.3. MÉTODOS**

En este proyecto se realizaron cuatro fases:

1.- Fase de introducción, multiplicación, enraizamiento *in vitro* con adaptación dentro de invernadero de *L. mutabilis*: Primeramente se recolectó el material vegetal (100 plantas madres de chocho S1 desarrolladas por Ing. César Falconí del cultivar I-450 ANDINO) ubicado en el Instituto Tecnológico Agropecuario Simón Rodríguez. Se realizó un proceso de desinfección, colocando los brotes axilares de chocho en una solución de agua destilada con 1 gr. de benlate, 5 ml de yodo y 10 ml de

jabón líquido por 2 minutos agitándolos constantemente. Se realizaron dos lavados en agua destilada estéril por 5 minutos y finalmente se introdujeron los brotes axilares en fundas ziploc con medio nutritivo (medio MS al 100%). Al momento de la introducción en laboratorio se procedió a utilizar el siguiente medio de multiplicación: solución MS con la mitad de sus macroelementos, Fe EDTA 5 ml., vitaminas MS normal, con 30 gr. de sucrosa, 7 gr. de Agar y 0,1 ppm de BAP, pH de 5,6 a 5,8. Se realizaron evaluaciones a la segunda, cuarta y sexta semana tomando en cuenta el tamaño y número de brotes de cada planta.

Al final de la sexta semana se eligieron 15 plantas que pasaron a un medio de enraizamiento, con 25% de macroelementos y 50% de microelementos de la solución MS, 100 ppm de Mio Inositol, 1 ppm de ácido nicotínico, 0,1 ppm de piridoxina, 10 ppm de tiamina HCl, 3 ppm de AIA, 1 ppm de ANA, 30 gr. de sucrosa, 7 gr. de Agar y 1 gr. de carbón activado. La solución tuvo un pH de 5,7 a 5,8.

A los 62 días se evaluaron las quince plantas enraizadas tomando en cuenta el tamaño y número de raíces. Se pasaron a macetas plásticas con sustrato. Se evaluó el tamaño de cada una y el número de brotes de cada planta, luego de 82 días.

2.- Comportamiento de brotes de *L. mutabilis* en cinco filiales de multiplicación y enraizamiento *in vitro*: En esta fase se utilizaron semillas de tres grupos S1 de chocho desarrolladas por Ing. César Falconí: 5

plantas tempranas, 5 plantas moderadamente tardías y 5 plantas tardías. Las semillas fueron colectadas en el Instituto Tecnológico Agropecuario Simón Rodríguez. Las semillas se sembraron en laboratorio en un medio de germinación de 9 gr./l de agar y 250 ppm de ácido giberélico diluidos en 2 ml de etanol. Esta solución tuvo un pH de 5,6 a 5,8. Luego de 8 días se realizó la siembra de las semillas germinadas en el medio de multiplicación antes mencionado. Se recogieron brotes de cada planta hasta por cinco generaciones y se evaluó enraizamiento al cabo de 140 días. También se evaluó el tamaño y número de brotes para determinar la eficiencia de multiplicación.

3.- Fase de conservación utilizando diferentes dosis de inhibidores de crecimiento vegetal: Se utilizaron tres inhibidores de crecimiento vegetal: nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), ácido abscísico (ABA) y cloruro de (2-cloroetil) trimetil amonio (CCC). Se introdujeron 38 brotes axilares de chocho por cada inhibidor de crecimiento. Se realizaron mediciones cada 8 días hasta los dos meses del tamaño de cada planta y se tomó en cuenta también el número de brotes. Posteriormente, se realizó la regeneración de estas plantas utilizando el medio de multiplicación mencionado anteriormente con sus respectivos explantes. Luego de un mes se tomaron los datos de tamaño y número de brotes de cada plántula.

4.- Obtención de semilla artificial de *L. mutabilis* utilizando brotes axilares de plántulas *in vitro*: Para esta fase se utilizaron 30 semillas S1 de lupinus I-450. Se realizó la siembra en el medio de germinación

mencionado anteriormente. Luego de 8 días se procedió a pasar los explantes al medio de multiplicación. Después de 14 días se realizó la semilla artificial utilizando brotes laterales de 0,5 cm de largo de las plantas S1 de lupinus ya multiplicadas. Se sumergieron en medio MS con los siguientes porcentajes (100%, 50% y 25%) adicionando alginato de sodio al 1%.

Luego se mezcló la solución antes mencionada con los brotes de lupinus sobre una caja petri; con una pipeta de 10 ml se trasladó a la solución de cloruro de calcio (1%) para la formación terminal de la perla que constituyó la semilla artificial. Luego de treinta minutos se realizaron tres lavados a las perlas en agua destilada estéril y secado sobre un papel filtro.

Posteriormente, se separaron los medios MS en las tres concentraciones antes mencionadas en distintas cajas petri para colocar diez perlas por cada caja, sellándolas con parafilm. Se mantuvo a 4 centígrados hasta su posterior utilización como semilla.

Luego de dos meses se realizó la regeneración de las semillas artificiales, el medio que se utilizó para este proceso fue: solución MS con la mitad de sus macroelementos, Fe EDTA 5 ml., Acido nicotínico 5 ppm, Piridoxina.HCL 0,5 ppm, Tiamina.HCL 5 ppm, Glicina 2 ppm con 30 gr. de sucrosa, 1000 ppm de mio inositol y 7 gr. de Agar, con un pH de  $7 \pm 0,2$ . Además se adicionó 50 mg/l de Claforam como antibiótico.

### **3.3.1. Diseño experimental**

#### **3.3.1.1 Factores a probar**

##### **FASE DE RECOLECCIÓN**

- 100 plantas madres de chocho S1 desarrolladas por Ing. César Falconí cultivar I-450 ANDINO, ECU-8415 y cruzas I-450 x ECU-8415

##### **FASE DE REGENERACIÓN**

- Dosis de BAP en multiplicación, ANA y AIA en enraizamiento: Para esto se utilizó 0,1 ppm de BAP en multiplicación, 3 ppm de AIA y 1 ppm de ANA en enraizamiento.

##### **FASE DE CONSERVACIÓN**

- Diferentes dosis de cada inhibidor de crecimiento vegetal: Nitrato de plata, ABA y CCC.

##### **OBTENCIÓN DE SEMILLA ARTIFICIAL**

- En esta fase se probaron tres dosis diferentes de medio MS en los siguientes porcentajes: 100, 50 y 25%.

### **3.3.1.2. Tratamientos a comparar**

#### **FASE DE CONSERVACIÓN**

- Dosis de nitrato de plata (A): 0 ppm (A0), 5 ppm (A1), 7,5 ppm (A2) y 10 ppm (A3) (Mafla, 2000).

- Dosis de ácido abscísico (B): 0 ppm (B0), 5 ppm (B1), 7,5 ppm (B2) y 10 ppm (B3) (Espinosa, 2003).

- Dosis de Cloruro de (2-cloroetil) trimetil amonio (C): 0 ppm (C0), 5 ppm (C1), 7,5 ppm (C2) y 10 ppm (C3) (Salas, 2008).

### **3.3.1.3. Tipo de diseño**

Para la fase de regeneración se utilizó un análisis descriptivo usando las siguientes fórmulas (Pniewski, Kapusta y Femiak, 1995):

#### **Media Aritmética:**

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Donde:

$\bar{x}$  = Media aritmética de los brotes recientemente formados

$\sum x$  = Suma de los brotes recientemente formados

$n$  = Número de brotes parentales

**Desviación estándar:**

$$S = \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n}}$$

Donde:

$S$  = Desviación estándar de la población

$\sum x_i^2$  = Suma de los cuadrados de los brotes recientemente formados

$n$  = Número de brotes parentales

**Índice de multiplicación:**

$$\text{Índice de multiplicación} = \frac{\text{Media geométrica de regenerantes nuevos de todos los pases}}{\text{Media geométrica de regenerantes parentales de todos los pases}}$$

**Media Geométrica:**

$$M_G = \sqrt[N]{\prod_{i=1}^{i=N} x_i}$$

Donde:

$M_G$  = Media geométrica

$\prod x_i$  = Producto de los brotes recién formados o parentales

$N$  = Número de pases

Para la fase de conservación se utilizó el diseño experimental Completamente al azar con tres repeticiones en arreglo factorial (4x3x3): cuatro dosis, tres cultivares de chocho y tres inhibidores de crecimiento, en el cual se distribuyeron los diferentes tratamientos en las mismas condiciones físicas.

**3.3.1.4. Modelo Matemático**

Se utilizó el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijk} = u + D_i + V_j + I_k + DV_{ij} + DI_{ik} + VI_{jk} + DVI_{ijk} + e_{ijk}$$

Donde:

**$Y_{ijk}$**  = Variable aleatoria

**$u$**  = Media general

**$D_i$**  = Efecto de la  $i$  – ésima dosis

**$V_j$**  = Efecto de la  $j$  – ésimo cultivar

**$I_k$**  = Efecto de la  $k$  – ésima inhibidor

**$DV_{ij}$**  = Efecto de la interacción Dosis x Cultivar

**$DI_{ik}$**  = Efecto de la interacción Dosis x Inhibidor

**$VI_{jk}$**  = Efecto de la interacción Cultivar x Inhibidor

**$DVI_{ijk}$**  = Efecto de la interacción Dosis x Cultivar x Inhibidor

**$e_{ijk}$**  = Error experimental

Se realizaron comparaciones ortogonales, efecto lineal cúbico de Dosis y de Inhibidores.

### **3.3.1.5. Características de las UE**

La unidad experimental para la fase de conservación se estableció como el tubo de ensayo con la muestra vegetal, el tamaño del tubo de ensayo fue de 20 cm de largo y 2,5 cm de diámetro.

**3.3.1.6. Croquis del diseño**

V1A0	V2B3	V2C0	V3B0	V2A0	V2B0	V1C0	V3B0	V1C1	V3B3	V2A1	V3A1
V3B1	V1B3	V3A2	V1A1	V3C3	V1C3	V1A2	V3B3	V2B1	V1B2	V3C1	V2B2
V2C0	V2A2	V3C2	V1B1	V3C0	V3A3	V3B2	V3A2	V3C2	V1A0	V3B1	V2B1
V1B0	V1C1	V3C0	V3B2	V2A2	V2A0	V3C1	V2B3	V3A0	V3C3	V2A1	V1B0
V2B1	V3A0	V1A3	V1C2	V1B1	V1B0	V3A2	V1A3	V1C2	V1B2	V3C0	V1A2
V1A2	V1B3	V1C0	V2A0	V2C3	V1B2	V2B0	V1C3	V3C3	V2A1	V3B2	V2C3
V3C1	V2C1	V2B0	V2C1	V1A0	V3A0	V2B2	V3A3	V3B1	V1C1	V2C2	V3B0
V2A3	V3A1	V2A2	V3A1	V2C2	V3C2	V2A3	V1C2	V1C3	V3A3	V1A1	V2C0
V1C0	V1A1	V2B3	V2C2	V2A3	V1B3	V2C1	V1A3	V2B2	V2C3	V3B3	V1B1

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Introducción, multiplicación, enraizamiento *in vitro* de *L. mutabilis*

Los brotes axilares se recolectaron de 100 plantas madres de un genotipo de chocho I-450 ANDINO cultivado en el Instituto Agropecuario Simón Rodríguez, Latacunga. Los regenerantes o muestras de semilla corresponden a plantas cuyos números ó códigos se asignaron en estudios anteriores, estas se mantuvieron en el presente estudio.

#### 4.1.1 Introducción *in vitro* de *L. mutabilis*

El material vegetal que se obtuvo de las 100 plantas madres de *L. mutabilis* para la introducción *in vitro*, fue llevado al medio de iniciación para controlar la sanidad y la viabilidad, luego de seguir el proceso de desinfección mencionado en la metodología para la eliminación de contaminantes externos. Los brotes axilares tuvieron una contaminación del 15% con hongos y bacterias, siendo considerado este porcentaje como bajo. Según datos obtenidos por Rivero (2001) en investigaciones realizadas en el establecimiento *in vitro* de *Annona muricata*, se presentó un rango de contaminación entre 4,28% a 16,66%. Explantes que no presentaron contaminación y que lograron tener crecimiento vegetal, fueron seleccionados para la fase de multiplicación *in vitro*.

#### **4.1.2 Multiplicación *in vitro* de *L. mutabilis***

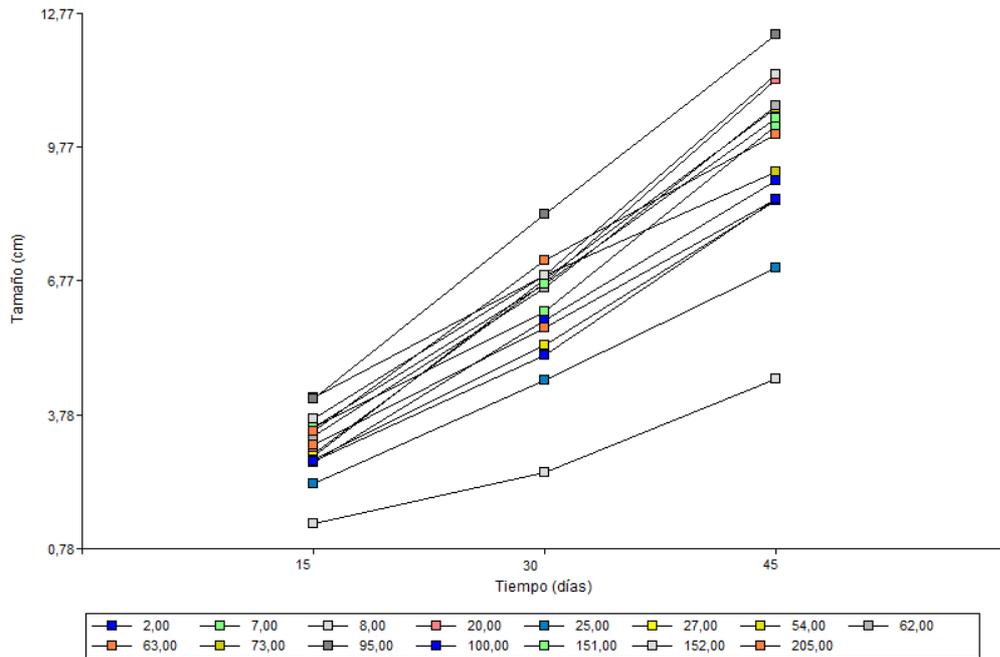
Cuarenta y nueve plantas de chocho fueron seleccionadas para la multiplicación *in vitro*, tomando en cuenta que estas sobrevivieron en la fase de introducción mostrando crecimiento de planta, presentando nuevos brotes y sin contaminación. Al utilizar 0,1 ppm de BAP en el medio y cuantificar su tamaño a los 15, 30 y 45 días, se obtuvieron medias de 2,87; 5,48 y 8,71cm, respectivamente (Cuadro 4.1). Kapusta (1995) estableció que 0,1 - 0,05ppm de BAP son concentraciones adecuadas para la regeneración de lupino.

**Cuadro 4.1: Desarrollo del tamaño de planta hasta los 45 días**

<b>Variable</b>	<b>Media</b>	<b>E.E</b>	<b>Mín.</b>	<b>Máy.</b>
Tamaño de planta 15 días	2,87	0,11	0,93	4,65
Tamaño de planta 30 días	5,48	0,2	2,33	8,33
Tamaño de planta 45 días	8,71	0,29	3,9	12,38

#### **4.1.3 Crecimiento radicular *in vitro* de *L. mutabilis*, con adaptación dentro de invernadero**

Quince plantas de chocho se seleccionaron considerando el mayor tamaño de explante de la fase de multiplicación después de 45 días, con resultados de: 8,23cm para la planta #95; 7,33cm de la #152; 6,88cm para la #62; 5,56cm para la #54; obteniendo así los resultados de las plantas seleccionadas (Gráfico 4.1).



**Gráfico 4.1: Tamaño de explante de 15 plantas de *L. mutabilis* seleccionadas para enraizamiento *in vitro***

Al analizar las 15 plantas que entraron en la fase de enraizamiento *in vitro* con 3 ppm de AIA y 1 ppm de ANA, se obtuvieron resultados de cinco plantas codificadas con los números 25, 54, 62, 63 y 100, presentando sistema radicular, siendo evaluadas en su tamaño y número, a los 62 días. El 33,33% de plantas enraizaron, considerando bajo este porcentaje. Sroga (1987) obtuvo un 96% de eficiencia en enraizamiento de *L. angustifolius* al utilizar un medio con 0,1ppm de ANA.

La planta codificada con el número 63 desarrolló 21 raíces, con un tamaño de raíz de 9,1cm, presentando los valores más altos; mientras que la planta número 25 tuvo 9 raíces y 6,6cm en tamaño de raíz. En el Cuadro 4.2 se observa las medias tanto de número como de tamaño de raíz, a los 62 días.

A los 82 días, el tamaño de planta tuvo una media de 14,5cm y el número de brotes fue de 11,2, presentando un 33,33% de capacidad y adaptación frente al medio de enraizamiento con AIA y ANA.

**Cuadro 4.2: Crecimiento radicular *in vitro* de *L. mutabilis*, con adaptación dentro de invernadero**

<b>Variable</b>	<b>Media</b>	<b>E.E</b>	<b>Mín.</b>	<b>Máx.</b>
Número de raíces 62 días	14,4	2,23	9	21
Tamaño de raíz 62 días	7,66	0,44	6,6	9,1
Tamaño de planta 82 días	14,5	0,98	11,5	17,2
Número de brotes 82 días	11,2	1,16	8	15

## **4.2 Comportamiento de brotes de *L. mutabilis* en cinco filiales de multiplicación y enraizamiento *in vitro***

El objetivo fue determinar la variabilidad regenerativa que podrían presentar las plantas de chocho, a través del tamaño de planta, número de brotes y comportamiento radicular durante cinco generaciones. Kapusta (1995) determinó que algunos cultivares de lupino fueron multiplicados por 20 pases o más para poder determinar su variabilidad regenerativa.

### **4.2.1 Crecimiento vegetal *in vitro***

Para este estudio se tomó en cuenta 15 plantas de lupino, que fueron clasificadas en tres grupos, tomando en cuenta su precocidad para llegar a floración y producción, así: 1. Tempranas (P), 2. Moderadamente Tardías (MT) y 3. Tardías (T) (Falconí, 2009).

Al analizar las 15 plantas dentro de las 5 generaciones, se determinó un efecto significativo para el factor generación ( $p < 0,0001$ ), para tamaño de planta y número de brotes, para los factores cultivar ( $p < 0,0079$ ) y tiempo ( $p < 0,0302$ ) para el número de brotes y para la interacción cultivar \* tiempo ( $p < 0,0028$ ) para tamaño de planta, ( $p < 0,0038$ ) para número de brotes (Cuadro 4.3).

**Cuadro 4.3: Análisis de varianza para tamaño de planta y número de brotes de *L. mutabilis* durante cinco generaciones**

F.V	Tamaño de planta	Número de brotes
Generación	<0,0001	<0,0001
Cultivar	0,0401	0,0079
Tiempo	0,0793	0,0302
Generación * Cultivar	0,9973	0,9466
Generación * Tiempo	0,9687	0,9199
Cultivar * Tiempo	0,0028	0,0038
Generación * Cultivar * Tiempo	0,2986	0,5011
CV%	30,67	27,69

Tamaño de planta y número de brotes asociados a cada fuente de variación

Se pudo determinar que el tamaño de planta y número de brotes mostraron diferencias significativas en cuanto al efecto de las generaciones, indicando que hasta la segunda generación hubo variabilidad para las dos variables, luego se estabilizó hasta la quinta generación. La segunda generación presentó valores de 7,92cm para tamaño de planta y 4,32 para número de brotes (Cuadro 4.4).

**Cuadro 4.4: Promedio ( $\pm$  error estándar) de tamaño de planta y número de brotes de *L. mutabilis* durante el efecto de cinco generaciones**

Generación	Tamaño de Planta	Número de Brotes
1	2,59 $\pm$ 0,57	2,15 $\pm$ 0,33
2	7,92 $\pm$ 0,57	4,32 $\pm$ 0,33
3	5,95 $\pm$ 0,57	3,70 $\pm$ 0,33
4	5,55 $\pm$ 0,57	3,81 $\pm$ 0,33
5	5,58 $\pm$ 0,57	3,40 $\pm$ 0,33
CV%	30,67	27,69
p-valor	<0,0001	<0,0001

Tamaño de planta y número de brotes, muestran que letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0,05$

Al analizar el tamaño de planta y número de brotes durante las cinco filiales se estableció diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para cultivar \* tiempo. La interacción de los tratamientos C1T2, C1T3 y C2T2 tuvieron los resultados

más altos siendo estadísticamente similares, con un coeficiente de variación de 30,67%. Para el número de brotes los tratamientos C1T1, C1T2, C1T3 y C2T2 presentaron valores significativos ( $p < 0,05$ ), siendo los más altos con un coeficiente de variación de 27,69% (Cuadro 4.5).

**Cuadro 4.5: Promedio ( $\pm$  error estándar) de tamaño de planta y número de brotes de *L. mutabilis* durante el efecto de la interacción Cultivar \* Tiempo**

Cultivar	Tiempo	Tamaño de Planta	Número de Brotes
C1	T1	5,33 $\pm$ 0,35 def	3,46 $\pm$ 0,21 ef
C1	T2	5,72 $\pm$ 0,39 efg	4,04 $\pm$ 0,23 F
C1	T3	7,09 $\pm$ 0,45 g	4,41 $\pm$ 0,27 F
C2	T1	0 a	0 a
C2	T2	6,9 $\pm$ 0,78 fg	4,14 $\pm$ 0,46 F
C2	T3	4,3 $\pm$ 0,78 de	2,26 $\pm$ 0,46 d
C3	T1	0 c	0 c
C3	T2	0 b	0 B
C3	T3	3,76 $\pm$ 0,78 d	2,54 $\pm$ 0,46 de
CV%		30,67	27,69
p-valor		0,0028	0,0038

Tamaño de planta y número de brotes, muestran que letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0,05$

#### **4.2.2 Eficiencia de multiplicación *in vitro***

En el Cuadro 4.6 se observan las diferentes varianzas durante el proceso de multiplicación tomando en cuenta las distintas generaciones. El número de brotes fue la variable que se tomó en cuenta para analizar la eficiencia de multiplicación debido a que indica el número de individuos que se puede obtener de una planta. Las medias presentaron diferencias significativas en la primera, segunda y tercera generación, con valores de 4 brotes en la planta 32 I-450 que es la que presentó el valor más alto en la primera generación, en cuanto a las medias de la segunda generación las plantas: 206 I-450, 31 I-450,

3 8415, 32 I-450, 41 I-450 y 63 I-450 no mostraron diferencias significativas, siendo estas las más altas para esta filial. En la tercera generación los mayores resultados obtuvieron las plantas: 31 I-450 y 63 I-450 que no indicaron diferencias significativas. Las medias obtenidas de la cuarta y quinta generación no presentaron diferencias significativas. En la multiplicación *in vitro* de cuatro especies de lupino, Kapusta (1995) obtuvo un promedio de la eficiencia de multiplicación de brotes en 10 generaciones, obteniendo datos con diferencias significativas hasta esta filial.

**Cuadro 4.6: Eficiencia de multiplicación de brotes de chocho *L. mutabilis* durante cinco generaciones**

Tiempo	Variedades	Generaciones									
		I		II		III		IV		V	
<b>Tempranas</b>	206 I-450	2,67±0,33	abc	5,67±0,33	b	4,33±0,88	ab	4,33±0,33	a	4,00±0,58	a
	31 I-450	2,33±0,33	abc	5,33±1,20	b	6,67±1,45	b	5,67±0,33	a	4,33±0,33	a
	62 I-450	1,33±0,88	ab	3,33±1,67	ab	3,33±1,76	ab	3,00±1,53	a	2,67±1,33	a
	201 I-450	1,67±0,33	ab	4,33±0,33	ab	3,67±0,67	ab	3,00±1,53	a	2,67±1,33	a
	19 I-450	1,33±0,88	ab	3,00±1,53	ab	2,33±1,20	a	2,67±1,33	a	3,00±1,53	a
<b>Mod. Tardías</b>	10 I-450	2,00±1,00	abc	4,33±0,33	ab	4,67±0,88	ab	4,67±0,33	a	2,67±1,33	a
	3 8415	2,00±0,58	abc	5,67±0,33	b	3,67±0,33	ab	5,33±0,33	a	4,00±0,00	a
	32 I-450	4,00±0,58	c	6,00±1,00	b	4,33±0,33	ab	5,00±0,58	a	3,33±1,67	a
	41 I-450	2,00±0,58	abc	5,33±0,33	b	5,67±0,33	ab	5,33±0,67	a	5,00±0,58	a
	27 I-450	3,00±0,58	abc	5,00±0,58	ab	2,67±1,33	a	2,67±1,33	a	3,00±1,53	a
<b>Tardías</b>	20 X	1,00±0,58	a	4,00±2,08	ab	2,67±1,45	a	2,33±1,20	a	2,67±1,33	a
	5 8415	2,33±1,20	abc	1,67±0,88	a	2,33±1,20	a	2,33±1,20	a	2,67±1,33	a
	20 I-450	2,67±0,33	abc	4,67±0,88	ab	4,67±0,67	ab	5,00±0,58	a	5,00±0,00	a
	63 I-450	3,33±0,88	bc	5,67±0,67	b	6,33±0,88	b	4,33±2,19	a	3,67±1,86	a
	95 I-450	3,00±0,00	abc	4,67±0,33	ab	4,33±0,67	ab	5,00±1,15	a	3,67±0,33	a

Generaciones muestran que letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0,05$

Al analizar la eficiencia de multiplicación durante las cinco generaciones entre las variedades tempranas, moderadamente tardías y tardías de *L. mutabilis* no se encontraron diferencias significativas (Cuadro 4.7).

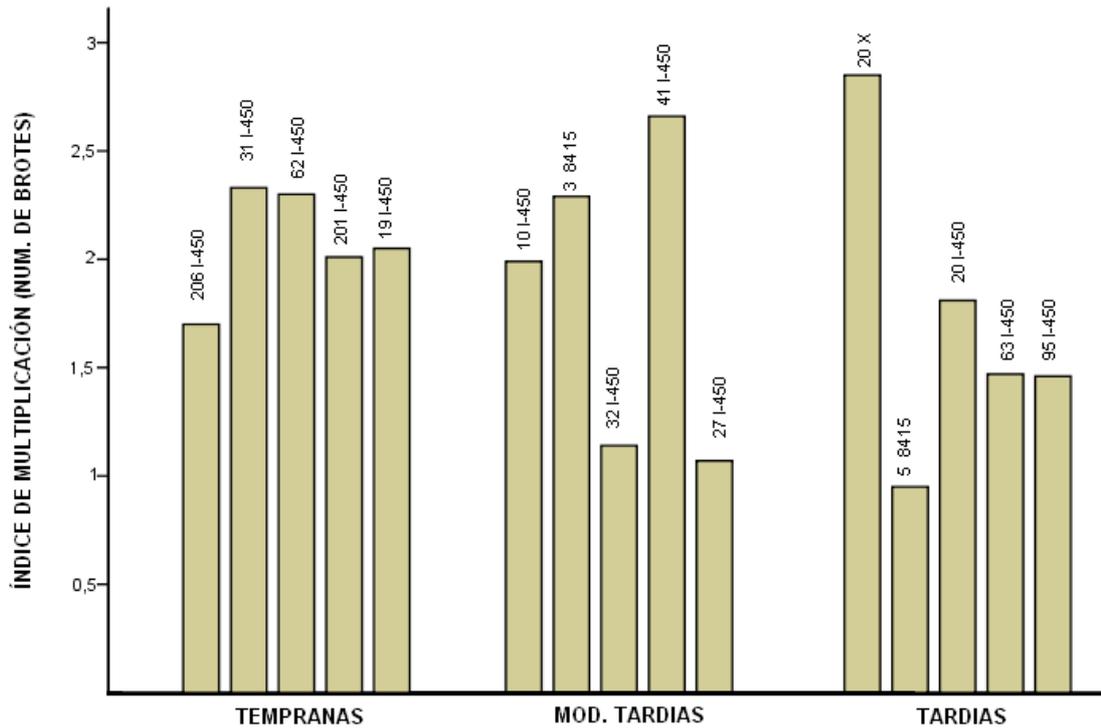
**Cuadro 4.7: Eficiencia de multiplicación de brotes de *L. mutabilis* de variedades tempranas, moderadamente tardías y tardías**

Tiempo	Generaciones									
	I		II		III		IV		V	
Tempranas	1,87 $\pm$ 0,27	a	4,33 $\pm$ 0,52	a	4,07 $\pm$ 0,61	a	3,73 $\pm$ 0,53	a	3,33 $\pm$ 0,46	a
Mod. Tardías	2,60 $\pm$ 0,34	a	5,27 $\pm$ 0,27	a	4,20 $\pm$ 0,39	a	4,60 $\pm$ 0,39	a	3,60 $\pm$ 0,51	a
Tardías	2,47 $\pm$ 0,35	a	4,13 $\pm$ 0,56	a	4,07 $\pm$ 0,55	a	3,80 $\pm$ 0,61	a	3,53 $\pm$ 0,51	a

Generaciones muestran que letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0,05$

El grafico 4.2 muestra la eficiencia de multiplicación de cada una de las plantas en estudio, usando la fórmula de índice de multiplicación basado en las medias geométricas aplicadas para la eficiencia de regeneración completa. Se aplicó la media geométrica porque este parámetro ayudó a diferenciar la eficiencia multiplicativa de las plantas a través de generaciones sucesivas.

Se observó estabilidad en la eficiencia multiplicativa de las plantas Tempranas (P), mostrando un equilibrio entre las cinco plantas dentro de este grupo. Las plantas de chocho Moderadamente Tardías (MT) mostraron mayor variación en cuanto a eficiencia, tomando en cuenta que las plantas 32 y 27 (I-450) quedaron rezagadas por la variable multiplicación de brotes que mide la capacidad de multiplicación generacional. Por otro lado, la planta 20X presentó el mayor índice de multiplicación de 2,85, siendo un alto valor. En comparación con datos obtenidos por Kapusta (1995) quien alcanzó 2,7 como índice de multiplicación en *L. mutabilis*.



**Gráfico 4.2: Eficiencia en la multiplicación de nuevos regenerantes de plantas tempranas, moderadamente tardías y tardías de *L. mutabilis*, durante cinco generaciones (media geométrica ± desviación estándar).**

#### **4.2.3 Crecimiento radicular *in vitro***

Se realizó el análisis radicular de las plantas de lupino al finalizar la regeneración. En la primera generación (parental) no se colectaron datos ya que las plantas pasaron directamente a multiplicación de la segunda generación, por tanto se obtuvieron plantas enraizadas desde la segunda hasta la quinta filial. Las variables evaluadas fueron tamaño de raíz y número de raíces.

Al analizar la capacidad de crecimiento radicular *in vitro*, se determinó un efecto significativo para la generación ( $p < 0,0962$ ) y tiempo ( $p < 0,0867$ ) considerando la variable tamaño de raíz, con un coeficiente de variación de

22,83%. En cuanto a la variable número de raíces no se obtuvieron efectos significativos (Cuadro 4.8).

**Cuadro 4.8: Análisis de varianza para el tamaño y número de raíces de *L. mutabilis in vitro***

F.V	Tamaño de raíz	Número de raíces
Generación	0,0962	0,6257
Cultivar	0,6958	0,8093
Tiempo	0,0867	0,2844
Generación * Tiempo	0,3479	0,6771
Cultivar * Tiempo	0,429	0,4158
CV%	22,83	38,65

Tamaño de raíz y número de raíces asociados a cada fuente de variación

#### **4.2.4 Crecimiento de regenerantes de chocho en macetas bajo condiciones de invernadero**

Las plantas regeneradas fueron analizadas por su crecimiento radicular *in vitro* también fueron evaluadas por su crecimiento y adaptación en macetas dentro de un invernadero, en base al tamaño de planta y número de brotes, en cada generación.

En el Cuadro 4.9, se presentó el efecto significativo para los factores de cultivar ( $p < 0,0439$ ), la interacción generación \* tiempo ( $p < 0,0488$ ) y cultivar \* tiempo ( $p < 0,0715$ ) considerando la variable tamaño de planta. En cuanto a la variable número de brotes los factores que presentaron efecto significativo fueron generación ( $p < 0,0053$ ) y la interacción generación \* tiempo ( $p < 0,0801$ ).

**Cuadro 4.9: Análisis de varianza para el tamaño de planta y número de brotes de *L. mutabilis* en macetas dentro de invernadero**

<b>F.V</b>	<b>Tamaño de planta</b>	<b>Número de brotes</b>
Generación	0,1171	0,0053
Cultivar	0,0439	0,4408
Tiempo	0,1238	0,3811
Generación * Tiempo	0,0488	0,0801
Cultivar * Tiempo	0,0715	0,4617
CV%	5,17	10,94

Tamaño de planta y número de brotes asociados a cada fuente de variación

### 4.3 Fase de conservación utilizando diferentes dosis de inhibidores de crecimiento vegetal

Para esta fase se seleccionaron tres plantas: tardía #63, moderadamente tardía #10 y temprana #19, conservadas durante dos meses con inhibidores de crecimiento vegetal (AgNO<sub>3</sub>, ABA y CCC) a diferentes dosis. La eficiente conservación se evaluó en base al tamaño de planta y número de brotes, cada ocho días.

El análisis de varianza indicó que el tamaño de planta y número de brotes, tuvo un efecto altamente significativo para inhibidores ( $p < 0,0001$ ), para la interacción dosis \* inhibidores (tamaño de planta  $p < 0,0001$  y número de brotes  $p < 0,0009$ ) y para la interacción inhibidores \* planta (tamaño de planta  $p < 0,0373$ ), con coeficientes de variación de 68,39% y 69,17%. Los otros factores no presentaron diferencias significativas (Cuadro 4.10).

**Cuadro 4.10: Análisis de varianza para el tamaño de planta y número de brotes en tres plantas de chocho *L. mutabilis***

F.V	Tamaño de planta	Número de brotes
Dosis	0,8943	0,3786
Inhibidores	<0,0001	<0,0001
Planta	0,3161	0,0515
Repeticiones	0,8567	0,9638
Dosis * Inhibidores	0,0001	0,0009
Dosis * Planta	0,2089	0,4219
Inhibidores * Planta	0,0373	0,4984
Dosis * Inhibidores * Planta	0,4664	0,4433
CV%	68,39	69,17

Tamaño de planta y número de brotes asociados a cada fuente de variación

Como se indica en el cuadro 4.11, para la variable tamaño de planta se encontraron diferencias significativas entre las diferentes dosis e inhibidores,

destacando que con 10ppm de CCC se obtuvo un valor de 0,78cm que es el más bajo y el más alto de 4,70cm con 10ppm de AgNO<sub>3</sub>; en cuanto a la variable número de brotes con 10ppm de CCC se obtuvo un valor de 0,89 siendo el más bajo y el valor más alto de 6,44 con 10ppm de AgNO<sub>3</sub>. Mafla (2000), utilizó AgNO<sub>3</sub> para inhibir el crecimiento vegetal en *Solanum quitoense* (Naranjilla) y *Solanum betaceum* (Tomate de árbol) mostraron resultados similares a las variables estudiadas, el análisis de varianza mostró que para *S. quitoense* el tamaño de planta varió entre 4,1 y 11,4 cm al ocupar 10 ppm de nitrato de plata, observándose un menor crecimiento cuando se utilizaron concentraciones de 4,0 y 8,0 ppm; en cuanto a *S. betaceum* no se observaron diferencias significativas.

**Cuadro 4.11: Efecto de la interacción Dosis \* Inhibidores en el tamaño de planta y número de brotes en tres plantas de chocho *L. mutabilis***

Dosis (ppm)	Inhibidores	Tamaño de Planta		Número de Brotes	
0	AgNO <sub>3</sub>	1,89±0,53	bc	3,89±0,88	bcd
0	ABA	1,58±0,53	c	2,67±0,88	abc
0	CCC	3,71±0,53	a	6,33±0,88	de
5	AgNO <sub>3</sub>	3,24±0,53	ab	4,89±0,88	cde
5	ABA	1,40±0,53	c	3,56±0,88	bc
5	CCC	1,61±0,53	c	2,67±0,88	abc
7,5	AgNO <sub>3</sub>	3,82±0,53	a	6,33±0,88	de
7,5	ABA	1,57±0,53	c	2,00±0,88	ab
7,5	CCC	1,52±0,53	c	3,33±0,88	abc
10	AgNO <sub>3</sub>	4,70±0,53	a	6,44±0,88	e
10	ABA	1,11±0,53	c	1,89±0,88	ab
10	CCC	0,78±0,53	c	0,89±0,88	a
CV%		68,39		69,17	
p-valor		0,0001		0,0009	

Tamaño de planta y número de brotes, muestran que letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0,05$

La interacción inhibidores \* planta presentó diferencias significativas en su tamaño con AgNO<sub>3</sub> en la planta temprana #19 un valor de 3,66cm siendo el más alto y con el inhibidor ABA en la planta temprana #19 la de menor valor 1,00cm, con un coeficiente de variación de 68,39%; considerando la variable número de brotes el AgNO<sub>3</sub> en la planta tardía #63 presentó el valor más alto de 5,58 y con ABA en la planta Moderadamente Tardía #10 presentó el menor valor de 1,33 y un coeficiente de variación de 69,17% (Cuadro 4.12).

**Cuadro 4.12: Efecto de la interacción Inhibidores \* Planta en el tamaño de planta y número de brotes en tres plantas de chocho *L. mutabilis***

Inhibidores	Planta	Tamaño de Planta		Número de Brotes	
AgNO <sub>3</sub>	Temprana #19	3,66±0,44	a	5,42±0,74	a
AgNO <sub>3</sub>	Mod. Tardía #10	3,84±0,44	a	5,17±0,74	ab
AgNO <sub>3</sub>	Tardía #63	2,75±0,44	ab	5,58±0,74	a
ABA	Temprana #19	1,00±0,44	e	2,33±0,74	cd
ABA	Mod. Tardía #10	1,03±0,44	de	1,33±0,74	d
ABA	Tardía #63	2,22±0,44	bcde	3,92±0,74	abc
CCC	Temprana #19	1,12±0,44	cde	2,42±0,74	cd
CCC	Mod. Tardía #10	2,34±0,44	bc	3,17±0,74	bcd
CCC	Tardía #63	2,25±0,44	bcd	4,33±0,74	abc
CV%		68,39		69,17	
p-valor		0,0373		0,4984	

Tamaño de planta y número de brotes, muestran que letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0,05$

Al realizar el análisis de regresión entre el tamaño de planta y número de brotes con cada inhibidor de crecimiento (AgNO<sub>3</sub>, ABA y CCC), se pudo obtener la dosis mínima y máxima óptimas de cada uno, ya que se encontró que el crecimiento vegetal está en función de las dosis de los inhibidores utilizados. Estas fueron explicadas mediante el modelo de regresión lineal cúbica.

Al realizar las primeras derivadas a las ecuaciones de las regresiones, se obtuvieron resultados como: AgNO<sub>3</sub> para la variable tamaño de planta no se obtuvieron resultados, mientras que para el número de brotes se obtuvieron datos con dosis máxima que es la que produce mayor número y una dosis mínima que logra obtener un menor número de brotes; en cuanto al ABA y CCC presentaron valores máximos y mínimos para las dos variables. Como se puede observar en el cuadro 4.13, las dosis máximas y mínimas óptimas obtenidas se encuentran dentro de los rangos de las dosis utilizadas en el presente estudio.

**Cuadro 4.13: Dosis máximas y mínimas óptimas de AgNO<sub>3</sub>, ABA y CCC para conservación *in vitro* de *L. mutabilis***

Inhibidor	Dosis ppm	Tamaño de planta	Número de brotes
AgNO <sub>3</sub>	Máxima	-	3,51
	Mínima	-	0,92
ABA	Máxima	2,7	3,55
	Mínima	1,96	1,68
CCC	Máxima	3,17	3,10
	Mínima	2,38	2,06

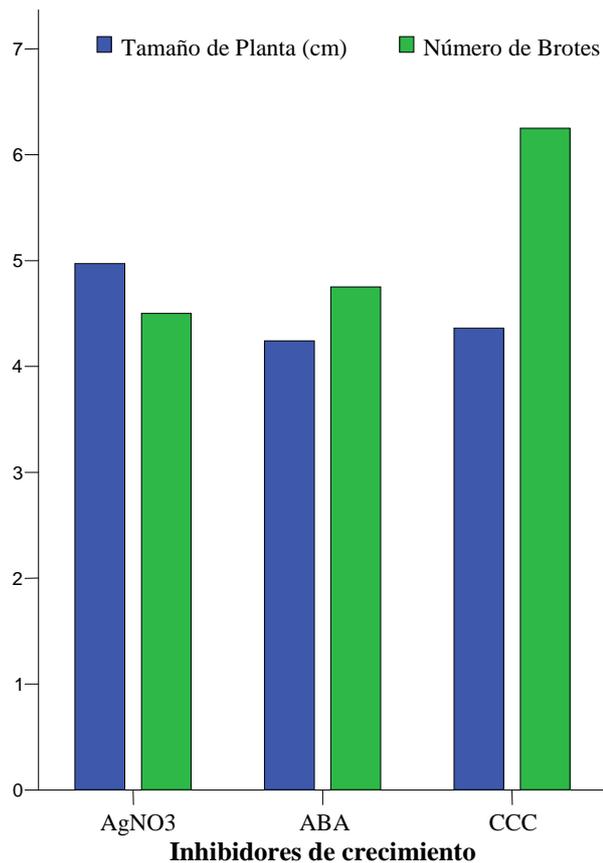
#### **4.3.1 Regeneración *in vitro* de las plantas conservadas**

Las plantas de chocho que fueron tratadas con inhibidores de crecimiento durante dos meses, se sometieron a una prueba de regeneración *in vitro* con el medio utilizado en la fase de multiplicación para comprobar su capacidad de regeneración. Se analizó el tamaño de planta y número de brotes de las tres plantas de chocho *L. mutabilis*.

#### **4.3.1.1 Regeneración *in vitro* de la planta de chocho tardía**

##### **#63**

Para la planta tardía #63 se tuvo una influencia del AgNO<sub>3</sub> con una media de 4,97 cm en el tamaño de planta, seguido por CCC con 4,36 cm y finalmente con 4,24 cm para ABA. En cuanto al número de brotes el CCC presentó los mejores resultados con 6,25, seguidos por 4,75 con ABA y 4,5 con AgNO<sub>3</sub>, demostrando una regeneración positiva (Gráfico 4.3).

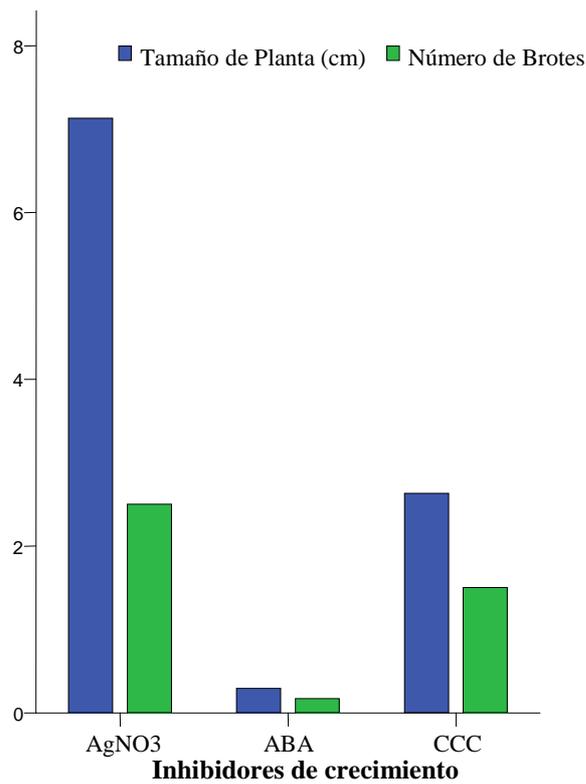


**Gráfico 4.3: Efecto de Inhibidores de crecimiento para el tamaño de planta y número de brotes en la planta de chocho tardía #63.**

#### **4.3.1.2 Regeneración *in vitro* de la planta de chocho**

### moderadamente tardía #10

Para la planta moderadamente tardía #10, el AgNO<sub>3</sub> presentó una media de 7,13cm para el tamaño de planta y 2,5 en número de brotes, 2,63 cm en el tamaño de planta y 1,5 número de brotes con CCC y 0,29 cm para el tamaño de planta y 0,17 brotes con ABA, indicando que los datos obtenidos para el primer inhibidor fueron los mejores en la regeneración para esta planta (Gráfico 4.4).

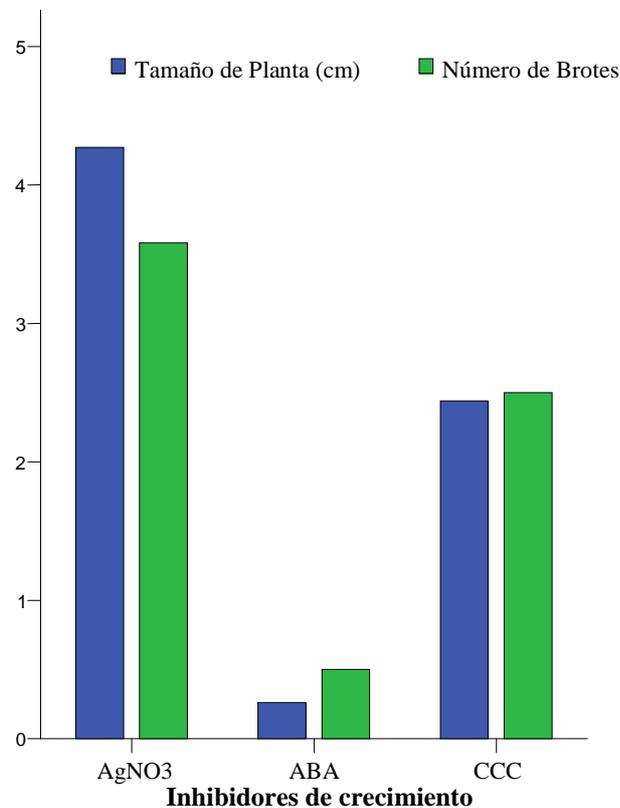


**Gráfico 4.4: Efecto de Inhibidores de crecimiento para el tamaño de planta y número de brotes en la planta de chocho moderadamente tardía #10.**

#### 4.3.1.3 Regeneración *in vitro* de la planta de chocho

**temprana #19**

El AgNO<sub>3</sub> presentó el valor más alto para el tamaño de planta (4,27 cm) y para el número de brotes de 3,58. Seguido por el CCC con 2,44cm y 2,5 brotes y para ABA 0,26 cm y 0,5 brotes. Se muestra que la prueba de regeneración *in vitro* que se realizó arroja valores positivos para el primer inhibidor, valores medios para el tercero y bajos para el segundo (Gráfico 4.5).



**Gráfico 4.5: Efecto de Inhibidores de crecimiento para el tamaño de planta y número de brotes en la planta de chocho temprana #19.**

**4.4 Obtención de semilla artificial de *L. mutabilis* utilizando brotes**

### **axilares de plántulas *in vitro***

Al utilizar brotes axilares de plántulas *in vitro* de *L. mutabilis*, se logró obtener semilla artificial, utilizando el protocolo descrito en metodología como un método alternativo de conservación de material vegetal, llegando a obtener semillas con buenas características en cuanto a su forma y textura para su conservación durante dos meses.

Después de transcurrido este tiempo de conservación de la semilla en sales MS a bajas temperaturas, los resultados que presentó en cuanto a su forma y textura fueron adecuados ya que se mantuvieron intactos durante el tiempo que estuvieron almacenados. Con estos resultados se realizó la regeneración de la semilla artificial ocupando el medio de regeneración mencionado en la metodología propia para semilla artificial, se sembraron diez semillas de cada tratamiento y se analizó el tamaño de la planta después de un mes.

#### **4.4.1 Regeneración de semilla artificial de chocho *L. mutabilis* con 100, 50 y 25% de sales MS**

De las diez semillas que fueron sembradas en el medio de regeneración con 100% de sales MS, solamente cinco semillas mostraron resultados, demostrando un 50% de eficacia en este proceso, obteniendo valores en el tamaño de planta como 3,9cm como el mayor y 0,7cm como el menor valor. Para el caso del medio con el 50% de sales MS se obtuvieron cuatro semillas con resultados de regeneración, siendo equivalente a un 40% de germinación,

presentando el valor más alto en el tamaño de planta de 3,1cm. Finalmente cuando se utilizó el 25% de sales MS se obtuvo un porcentaje de regeneración de 60%, al comparar este porcentaje de germinación con la investigación de Cartes (2003), se observó una similitud en su porcentaje, en cuanto al valor más alto para el tamaño de planta de 4,1cm. La germinación de las semillas se vio afectada por el grado de vigor o madurez que presentaron los embriones al momento de encapsularse, ya que la resistencia mecánica ofreció un encapsulado excesivamente duro (Jimenez y Quiala, 1998).

Se realizó un análisis de regresión para establecer el porcentaje óptimo de medio MS para la conservación y la posterior regeneración de la semilla artificial, tomando en cuenta la variable tamaño de planta, utilizando un modelo de regresión lineal cúbica:  $1,82 - 0,03P + 0,00026P^2$ . Llegando a obtener un porcentaje de medio MS de 58% que sería el óptimo.

$$1,82 - 0,03P + 0,00026P^2$$

$$0 = -0,03 + 2(0,00026)P$$

$$P = 0,03/0,00052$$

$$P = 58\%$$

## V. CONCLUSIONES

- El ácido giberélico a concentraciones de 250ppm, permitió un 100% de germinación de semillas de chocho, luego de 4 días.
- En la fase de multiplicación *in vitro*, el BAP a concentraciones de 0,1 ppm mostró un incremento promedio de 8,71cm en 49 plantas de chocho, a los 45 días.
- La planta tardía *in vitro* #63 logró los valores más altos de tamaño de raíz con 9,1cm y 21 raíces a los 62 días cuando se usó AIA (3ppm) y ANA (1ppm). En la adaptación dentro de invernadero la misma planta logró valores positivos de 17,2cm en tamaño de planta y 15 brotes, a los 82 días.
- La mayor eficiencia de multiplicación y enraizamiento *in vitro* de 15 plantas, se logró en la segunda generación mostrando los valores de multiplicación más altos en número de brotes y enraizamiento durante 5 filiales. El crecimiento del resto de filiales fue estable.
- En la fase de conservación *in vitro* el cloruro de (2-cloroetil) trimetil amonio (CCC) con 10 ppm, logró el mayor periodo de conservación de brotes axilares de *L. mutabilis*, presentando los valores más bajos para el tamaño de planta (0,78cm) y número de brotes (0,89).
- El porcentaje óptimo de medio Murashige Skoog para conservar embriones somáticos de *L. mutabilis* en semilla artificial fue de 58%, permitiendo conservarla durante, por lo menos dos meses.
- La mejor estabilidad de crecimiento se obtuvo a partir del lote de poblaciones tempranas de chocho.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda utilizar 0,1ppm de BAP para la multiplicación de *L. mutabilis in vitro* ya que se logra los mayores tamaños de planta.
- Utilizar por máximo dos generaciones de replicación de los explantes, ya que en esta filial se logran los mejores valores de eficiencia de multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *L. mutabilis*.
- Se recomienda realizar estudios complementarios para probar la regeneración de *L. mutabilis*, considerando poblaciones tempranas.
- Se recomienda utilizar 10ppm de CCC para la conservación de plantas *in vitro*, ya que presentó los mejores resultados de almacenamiento.

## VII. RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objetivo de desarrollar protocolos *in vitro* para la regeneración y conservación de *Lupinus mutabilis* (chocho andino) mediante la técnica de crecimiento mínimo. En la fase de introducción el ácido giberélico (250ppm), permitió un 100% de germinación de semillas de chocho luego de 4 días. El BAP (0,1ppm) en la fase de multiplicación *in vitro*, mostró un incremento promedio de 8,71cm en 49 plantas de chocho a los 45 días. Para el enraizamiento *in vitro* el uso de AIA (3ppm) y ANA (1ppm) logró los valores más altos en la planta *in vitro* #63 con 9,1cm en el tamaño de raíz y 21 raíces a los 62 días. En la fase de adaptación dentro de invernadero la misma planta logró valores de 17,20cm en tamaño de planta y 15 brotes, a los 82 días. La mayor eficiencia de multiplicación y enraizamiento *in vitro* de 15 plantas en cinco filiales, se logró en la segunda generación mostrando los valores de multiplicación más altos en número de brotes y enraizamiento; el crecimiento del resto de filiales fue estable. La mejor estabilidad de crecimiento se obtuvo a partir del lote de poblaciones tempranas. Para la fase de conservación *in vitro* el cloruro de (2-cloroetil) trimetil amonio (CCC) con 10 ppm, logró el mayor periodo de conservación de brotes axilares de *L. mutabilis*, presentando los valores más bajos para el tamaño de planta (0,78cm) y número de brotes (0,89). En la fase de semilla artificial el porcentaje óptimo de medio Murashige Skoog para conservar embriones somáticos de *L. mutabilis* en semilla artificial fue de 58%, permitiendo conservarla durante, por lo menos dos meses.

## VIII. ABSTRACT

This study was conducted in order to develop protocols for *in vitro* regeneration and conservation of *Lupinus mutabilis* (Andean lupine) by the technique of minimal growth. In the introductory phase the gibberellic acid (250ppm), allowed 100% germination of lupine after 4 days. The BAP (0.1 ppm) in the multiplication phase *in vitro*, showed an average increase of 8.71 cm in 49 lupine plants at 45 days. For rooting *in vitro* using AIA (3 ppm) and NAA (1 ppm) achieved the highest values in the plant *in vitro* # 63 with 9.1cm in size and 21 root root at 62 days. In the adaptation phase in the same plant emissions reached values of 17.20 cm in size and 15 plant shoots at 82 days. The increased efficiency of *in vitro* multiplication and rooting of 15 plants in five branches, was achieved in the second generation showing values higher multiplication in number of shoots and roots, the growth of other subsidiaries was stable. The greater stability of growth was obtained from the batch of early populations. For *in vitro* conservation phase chloride (2-chloroethyl) trimethyl ammonium chloride (CCC) with 10 ppm, achieved the highest shelf of axillary buds of *L. mutabilis*, presenting the lowest values for plant size (0.78 cm) and number of shoots (0.89). In the artificial seed stage optimal percentage to preserve Murashige Skoog, somatic embryos of *L. mutabilis* in artificial seed was 58%, allowing them to keep for at least two months.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

Atkins C. A., Smith P. M. C. 1996. Transformation and regeneration of legumes. In: 2nd European Nitrogen Fixation Conference & NATO Advanced Research Workshop Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture, 8- 13 September 1996, ed. by W6jtowicz A., Stpkowska J., Szlagowska A., Scientific Publishers OWN Polish Academy of Sciences, Poznafi: 255.

Barcello Coll J., 1995, "Fisiología Vegetal" Séptima Edición, Ediciones Pirámide, España - Madrid pp. 354-357.

Barlass M., Skene K.G.M., 1978, "In Vitro propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices", *Vitis* (17), pp. 335 – 340.

Bernal G., 1982, "Evaluación de cepas de *Rhizobium lupini* en el cultivo de chocho", En: Resúmenes de la XI Reunión Latinoamericana de Rhizobium. Lima, Perú.

Bidwell, 1993, "Fisiología Vegetal" Primera Edición, AGT editor S.A. PG Control Hormonal del Desarrollo de Planta, México, pp. 599-608.

Blanco O., 1980, "Genetic variability of tarwi (*Lupinus mutabilis*)". En: I Conferencia Internacional de Lupinus. Lima, Cusco, Perú.

Blanco O., y S. Jiménez, 1982. “Avances en la reducción genética del contenido de alcaloides del tarwi”. En: II Conferencia Internacional del Lupino. Torremolinos, España.

Bonner J., 1933. “The action of the plant growth hormone”, J. Gen. Physiol, 17:63.

Boulter, 1977. Citado en Velásquez J. 1993. En: “Evaluación de 283 especies de lupinos del Banco de Germoplasma del INIAP”, Tesis Ing. Agr. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, pp. 140.

Cartes P., Castellanos H., Ríos D., Sáez K., Spierccolli S., Sánchez M., 2003, “Encapsulado de embriones somáticos y embriones cigóticos para obtención de semillas artificiales de Raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. & Endl.) Oerst.)

Castillo, B., M.A.L. Smith, and U.L. Yadava., 1998, “Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. Plant Cell Rep.”, pp. 17:172-176.

Cerrate y Camarena, 1981. Citado en Velásquez J. 1993. En: “Evaluación de 283 especies de lupinos del Banco de Germoplasma del INIAP”, Tesis Ing. Agr. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, pp. 140.

Devlin R. M., 1975, “Plant Physiology”, third edition, University of Massachusetts, D. Van Nostrand Company.

Escalettes V., Dosba F., 1993, *In Vitro* adventitious shoot regeneration from leaves of *Prunus* spp. Plant Sci., Lmerick. 90:201-209.

Espinosa A., González O., Silva J., 2003. "Conservación *in vitro* de clones de boniato en condiciones de crecimiento mínimo", Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Universidad de Granma. Apdo 21 CP 85100. Bayamo. Granma. Cuba.

Franco J., 1991, "El tarwi o lupino: su efecto en sistemas de cultivos", Informe final proyecto cooperativo GTZ-CIP.

Fuji, J.A., D.T. Slade, K. Redenbaugh, and K.A. Walker., 1987, "Artificial seeds for plant propagation", pp. 5:335-339.

Gade D.W., 1969, "Vanishing crops of tradicional agriculture: the case of tarwi (*Lupinus mutabilis*) in the Andes", Proc. Ass. An. Geogr. 1:47-51.

Gamborg O., Miller R., Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., 50: 151-158.

García J., 1999. "Microbiología Clínica". Ed. Haurcourt Brace. Barcelona.

García S. M., Piñol Sierra M.T. 1991. "Biotecnología Vegetal". Editorial Síntesis.

Gautheret R., 1983, "Plant Tissue Culture: A history", Bot. Mag., Tokyo, n°96, pp. 393 – 410.

Gómez O., 1986, "Diseño de una trilladora de tarwi", En: Anales, V Congreso Internacional de Sistemas Agropecuarios Andinos. INIPA, CIID, ACDI, Puno, Perú.

González, O., J. Silva, y A. Espinosa., 2004, "Semilla artificial: una solución en la biodiversidad mundial" In E. Galante (ed.) Cuadernos de Biodiversidad N° 15. Centro Iberoamericano de Biodiversidad (CIBIO), Universidad de Alicante, Alicante - España, pp.17-22.

Gross, 1982. Citado en Velásquez J. 1993. En: "Evaluación de 283 especies de lupinos del Banco de Germoplasma del INIAP", Tesis Ing. Agr. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, pp. 140.

Gross R., 1982, "Situación actual de la investigación alimentaria del lupino", Proyecto Lupino, Inf. N° 8:142-167, Instituto Nacional de Nutrición. Lima, Perú.

Gross R., 1982, "El cultivo y la utilización del tarwi", Estudio FAO, Producción y Protección Vegetal, N° 36. Roma, Italia.

Gross R., E. von Baer, F. Koch, R. Marquard, L. Trugo & M. Wink, 1988, "Chemical composition of a new variety of the Andean lupin (*Lupinus*

*mutabilis* cv. Inti) with low alkaloid content". J. Food Comp. Anal. 1, 353-361.

Haq N., 2000, "Lupinus species", Underutilized crops, Pulses and vegetables, J. T. Edith Chapman and Hall, pp. 103 – 130.

Harzie N., GuUloteau A., Huyghe C. 1998. In vitro shoot formation of *Lupinus albus* from cotyledonary node. In: 3rd European conference on grain legumes. Opportunitites for high quality, healthy and added-value crops to meet European demands. Valladolid, Spain, 14 - 19 November 1998.

Hurtado M., Merino M., 1994, Editorial Trillas, Tercera Edición, México, pp. 233. Pg. 136 – 148.

Inciarte M. R.; Villa S., y Miguel G., 2001, Biología: Biotecnología, Bachillerato 2, Editorial Mc Graw Hill, Madrid, pp. 190 – 202.

INIAP, 1997, "Zonificación potencial del cultivo de chocho. Proyecto P-BID-206. Programa Nacional de Leguminosas", INIAP. Fundacyt, Quito. 30 p.

Jacobsen S.E. & A. Mujica. 2004, "Geographical distribution of the Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet)". pp. 931-932 En: Jacobsen, S.-E., C.R. Jensen & J.R. Porter (eds.). Book of Proceedings. VIII ESA Congress: European S. E. Jacobsen & A. Mujica 468.

Jiménez S. y A. Troncoso, 1981, “Aplicación pesticida de los alcaloides de *Lupinus mutabilis*”. Inf. N° 6. Proyecto Lupino, Instituto Nacional de Nutrición, Lima, Perú.

Jiménez, E., Quijala E., 1998. “Semilla artificial”, Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología, Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. pp. 225-240.

Jordan M. y Casaretto J., 2007, Capítulo XV: “Hormonas y Reguladores del crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocinas”, In: Fisiología Vegetal (Ed. F. Squeo y L. Cardemil), Ediciones Universidad de La Serena.

Junovich A., “Historia del chocho”, Diciembre - 2003.

Kapusta J., Pniewski T., Femiak I. 1995. Regeneration of yellow lupin. In: III Polish Conference "Lupin - Protein - Ecology" ed. by K. Gulewicz, I. Frencl, IChB: 130-137 (in Polish).

Kende H., Nunnemann H., y Lang A., 1963, Inhibition of gibberellic acid biosynthesis by AMO-1618 and CCC in *Fusarium moniliforme*, *Naturwissenschaften* 50:599.

Kitto, S.L., Jules Janick, 1985, “A Citrus embryo assay to screen water - soluble resins as synthetic seed coats”, *HortScience*, 20(1):98-100.

Lang A., 1970, Gibberellins: structure and metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol*, 21:537.

Li H., Wylie S. J., Jones M.G.K. 2000, “Transgenic yellow lupin (*Lupinus luteus*)”, *Plant cell Rep.* 19: 634 – 637.

Lobo, Mario. 2000, “Papel de la variabilidad genética en el desarrollo de los frutales andinos como alternativa productiva”, En memorias: 3 er Seminario de frutales de clima frio. Manizales, Noviembre 15-17 del 2000, pp. 27-35.

Lockhart J.A., 1962, Kinetic studies of certain anti-gibberellins, *Plant Physiol*, 37:759

Luglio C., 1980, “El cultivo del tarwi. Mimeo”, Proyecto Tarwi, Compañía Industrial La Unión, Cusco, Perú.

Mafla, G., Roa, J.C. Guevara, C.L. 2000, “Advances in the *in vitro* growth control of cassava, using silver nitrate”. In : “Cassava Biotechnology”, Carvalho, L., Thro, A.M., Vilarinhos, A. D.(eds.), Empresas Brasileiras de Pesquisa Agropecuaria, Brasilia, Brasil, pp.439-446.

McBride F., 1957, “Flora of Perú”, Field Museum of Natural History, Botany, Vol XII, 459-506.

Mujica A., 1990, “Investigación y producción del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) en el Perú. INIAA-PICA”, Puno, Perú, pp. 49.

Mujica A., 1992, “Granos y leguminosas andinas”, Universidad Nacional del Altiplano Puno, Escuela Postgrado, IBPGR. Puno, pp.129-146 En: Hernández Bermejo, J.E. & J.E.

Mujica A., 1994, “Potencial del tarwi dulce Inti (*Lupinus mutabilis*) en los Andes peruanos”, En: Resúmenes de trabajos presentados en el VIII Congreso Internacional de Sistemas Agropecuarios Andinos. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

Muñoz de Malajovich, M. A., 2006, “Biotecnología”, Editorial Universidad Nacional de Quilmes.

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

Nadolska-Orczyk A. 1992. Somatic embryogenesis of agriculturally important lupin species (*Lupinus angustifolius*, *L. albus*, *L. mutabilis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28: 19-25.

Patten ChL. & Glick BR., 1996, “Bacterial biosynthesis of Indole-3-acetic acid (review)”, *Canadian Journal of Microbiology* 42: 207-220.

Pigeaire A., Abernethy D., Smith P. M., Simpson K., Fletcher N., Lu C., Atkins C. A., Cornish E. 1997. Transformation of grain legume (*Lupinus angustifolius* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to shoot apices. *Molecular Breeding*, 3:341-349.

Proyecto SICA III CENSO NACIONAL AGROPECUARIO 2003.

Quemada L., 2006, Ácido Abscísico, Introducción. Naturaleza química. Metabolismo. Niveles endógenos. Efectos fisiológicos. Mecanismo y modo de acción. Receptores.

Radenbaugh, K., Fujii, J., Viss, P., Slade, D., and Kossler, M., 1986, “Scale-up artificial seeds”, VI international congress of Plant tissue and Cell Culture. Minnesota U.S.A.

Rahim M. A., Caligari P. D. S. 1999. Multiple shoot regeneration in *Lupinus mutabilis* Sweet. In: Towards the 21st century. Proceedings of the 8th international Dupin conference, Asilomar, California, USA.

Rivero G., Ramírez M., León S., 2001, Tipo de explante en el establecimiento in vitro del guanábano (*Annona muricata* L.), Facultad de Agronomía, Universidad de Zulia, Maracaibo – Venezuela.

Salas J., 2008. Producción y almacenamiento de tubérculos *in vitro* de papa *Solanum tuberosum* L. cv. GRANOLA. Argenpapa - Venezuela.

Sarkar, D., Chakrabarti, S.K. and Naik, P.S. 2001, "Slow-growth conservation of potato microplants: efficacy of ancymidol for long-term storage in vitro". *Euphytica* 117:133-142.

Sator C., 1985, "Studies on shoot regeneration of lupinus (*Lupinus* spp.), *Plant Cell Rep.*, 4:126 – 128.

Sator C., 1990, "Lupinus (*Lupinus* spp.)", *Biotechnology in agriculture and forestry*, 10: 288 -311.

Sivori M., Caso O., 1980, "Fisiología Vegetal", Editorial Hemisferio Sur, Argentina, pp. 681.

Sondheimer E., and E. C. Galson, 1966, "Effects of abscisin II on germination of seeds with stratification requirements". *Plant Physiol*, 41:1397.

Sroga G., 1987, Plant regeneration of two *Lupinus* spp. from callus cultures via organogénesis. *Plant Sciences*, 245-249.

Suárez F., 2000. *Química*, 3ra y 4ta Edición. Editorial Romor.

Taiz L., Zeiger E., 2006, "Fisiología Vegetal", Volúmenes 1 y 2, Publicacions de la Universitat Jaume I. Castelló de la Plana.

Talhinhas P., Sreenivasaprasad S., Neves-Martins J. & Oliveira, H. 2002. Caracterización genética y morfológica de *Colletotrichum acutatum* causando antracnosis de los altramuces. *Fitopatología* 92:986-996.

Talhinhas P., Neves-Martins J. & Leitão J., 2003. AFLP, ISSR y marcadores RAPD revelan altos niveles de diversidad genética entre las especies *Lupinus*. *Fitomejoramiento* 122:507-510.

Tapia M., Blanco O., y Rea J., 1994, “Producción agrícola e Investigación en tarwi (*L. mutabilis*) en Bolivia”, En: Informe preliminar sobre el tarwi, Ed. IICA, La Paz – Bolivia, pp. 10 – 15.

Ticona A.C., 1975, “Correlaciones de algunas características con rendimiento en tarwi”, Tesis, UNSAAC. Cusco, Perú.

Torres F., 1976, “*Lupinus mutabilis* Sweet”, A potent food source from the Andean region. *Am. J. Clin. Nutrition* 25:833.

Velásquez J. 1993. “Evaluación de 283 especies de lupinos del Banco de Germoplasma del INIAP”, Tesis Ing. Agr. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, pp. 140.

Zacarías L. y Lafuente M., 2000, “Etileno, ácido abscísico y otros reguladores del desarrollo”, In: Azcón-Bieto y Talón, F. ed. *Fundamentos de fisiología vegetal*. Barcelona, Mc Graw-Hill, pp. 481-490.