

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



ESTABLECIMIENTO Y PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE
Neowerdermannia chilensis subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza
(CACTACEAE) A PARTIR DEL TEJIDO AREOLAR

TESIS

PRESENTADO POR:

Bach. MARITZA HUANCA PERCCA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

ESTABLECIMIENTO Y PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Neowerdermannia chilensis*
subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza (CACTACEAE) A PARTIR DEL TEJIDO AREOLAR

TESIS

PRESENTADO POR:

Bach. MARITZA HUANCA PERCCA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA



APROBADO POR EL JURADO REVISOR:

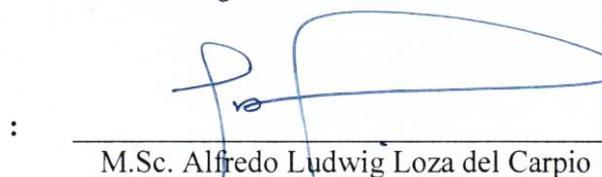
PRESIDENTE

: 
M.Sc. Gilmar Gamaliel Goyzueta Camacho

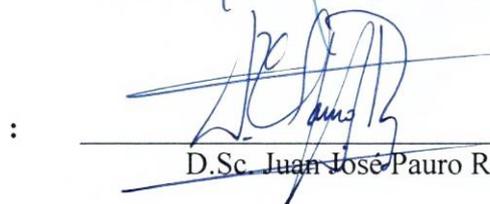
PRIMER MIEMBRO

: 
Mg. Martha Elizabeth Aparicio Saavedra

SEGUNDO MIEMBRO

: 
M.Sc. Alfredo Ludwig Loza del Carpio

DIRECTOR DE TESIS

: 
D.Sc. Juan José Pauro Roque

Fecha de Sustentación: 22 de Julio del 2019

Área : Ciencias Biomédicas

Tema : Biotecnología Vegetal

DEDICATORIA

A Dios quién supo guiarme por el buen camino, por darme las fuerzas para alcanzar este sueño y salud para terminar este trabajo.

Con profundo cariño y amor para la mujer que siempre fomentó en mí deseo de superación, demostrando su inmenso amor, paciencia, apoyo en el transcurso de mi vida y por todo el esfuerzo que hizo para brindarme la educación que recibí, a mi madre Agripina Percca Yampasi

A mi hermano Víctor Jesús Huanca Percca por su compañía que me llena de alegría a pesar de la distancia.

A mi tía Máxima y Guíllermína, a mi prima Roxana, Milagros, Angie y Deysi, por siempre motivarme a seguir adelante a pesar de todo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Altiplano y muy especialmente a la Facultad de Ciencias Biológicas por la formación profesional recibida.

Al Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales por las facilidades para realizar este trabajo.

A todos y cada uno de los profesores, investigadores que trabajan en la Universidad que contribuyeron y fueron parte de mi formación profesional.

A mi asesora, la Bióloga Norma Luz Choquecagua Morales por su amistad, tiempo, paciencia y exhaustiva revisión al manuscrito, por todo lo que me ha brindado en el tiempo de este trabajo de investigación, por las enseñanzas, consejos y apoyo moral en todas las situaciones que se han presentado, un eterno agradecimiento para ella.

A mi director de tesis, Doctor Juan José Pauro Roque, por el apoyo brindado, sus recomendaciones, su amabilidad y tiempo otorgado a mi persona.

A los miembros de jurado M.Sc. Gilmar Gamaliel Goyzueta Camacho, Mg. Martha Elizabeth Aparicio Saavedra y M.Sc. Alfredo Ludwing Loza del Carpio por las correcciones, observaciones y sugerencias hechas para enriquecer el presente trabajo y tiempo dedicado en la revisión.

A los compañeros y amigos del laboratorio Norma, Nora y Alex por la apoyo y paciencia que me brindaron en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales.

A mi madre Agripina Percca por el apoyo incondicional durante el transcurso de mi vida y a mi hermano Victor Jesus.

A mis amigas Ruth G. León, Dina M. Arizaca, Lidia B. Ramos y Marithza Apaza por su apoyo, amistad, compañerismo, comprensión, confianza, alegrías y tristezas compartidas.

A mi tía Máxima Percca por sus consejos, motivación y su apoyo incondicional y a mi tía Guillermina Percca por su apoyo incondicional.

A mi prima Roxana Condemayta por su apoyo incondicional y comprensión, a mis primitas Angie, Milagros y Deysi por los momentos de alegría.

A mi primo José cruz por su motivación a seguir adelante, comprensión y momentos de alegría.

A todo el personal de la Reserva Nacional del Titicaca especialmente a mis amigos David, Pineda, Mario Arivilca, Oscar Mendoza, Ronal Hinojosa, Angel Tinta, Wilson Coila, Frine Morales y al jefe Victor H. Apaza por toda la facilidad que me ofrecieron para la ejecución de la presente investigación mientras realizaba mi voluntariado, por su gran amistad, motivación y momentos únicos compartidos.

Al Doctor Fernando Loayza por su amistad y sus consejos.

Al Doctor Angel Canales por su tiempo dedicado a la revisión de este trabajo de investigación.

Al señor Florentino Calizaya y 3 personas voluntarios de Tarucachi – Tacna, que me apoyaron en la ubicación y recolección de la especie.

Y a todas las personas que no menciono aquí, se los agradezco de corazón.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	12
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS	15
RESUMEN	16
ABSTRACT	17
I. INTRODUCCIÓN	18
II. REVISIÓN DE LITERATURA	20
2.1 ANTECEDENTES	20
2.2 MARCO TEÓRICO	26
2.2.1 Características de las cactáceas.....	26
2.2.2 Importancia de las cactáceas.....	31
2.2.3 Amenaza y conservación de la familia cactaceae	32
2.2.4 Descripción de la especie en estudio, <i>Neowerdermannia chilensis</i> subsp. <i>peruviana</i> (Ritter) Ostolaza.	33
2.2.5 Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos vegetales	35
2.3 MARCO CONCEPTUAL	45
III. MATERIALES Y MÉTODOS	48
3.1 LUGAR DE ESTUDIO	48
3.2 PERIODO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	48
3.3 MATERIAL VEGETAL INICIAL	49
3.4 METODOLOGÍA	50
3.4.1 Evaluación de la respuesta morfológica de las plántulas de <i>Neowerdermannia chilensis</i> subsp. <i>peruviana</i> (Ritter) Ostolaza (Cactaceae) inducido al medio Murashige y Skoog para la propagación <i>in vitro</i>	50

3.4.2 Propagación <i>in vitro</i> tejidos morfológicamente viables de <i>Neowerdermannia chilensis</i> subsp. <i>peruviana</i> (Ritter) Ostolaza (Cactaceae) a concentraciones combinadas de ANA: 0.0 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L y BAP: 1.0 mg/L 2.0 mg/L, 3.0 mg/L.....	56
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
4.1 Respuesta morfológica de las plántulas de <i>Neowerdermannia chilensis</i> subsp. <i>peruviana</i> (Ritter) Ostolaza (Cactaceae) inducido al medio Murashige y Skoog para la propagación <i>in vitro</i>	66
4.2 Propagación <i>in vitro</i> tejidos morfológicamente viables de <i>Neowerdermannia chilensis</i> subsp. <i>peruviana</i> (Ritter) Ostolaza (Cactaceae) a concentraciones combinadas de ANA: 0.0 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L y BAP: 1.0 mg/L 2.0 mg/L, 3.0 mg/L.....	70
V. CONCLUSIONES	86
VI. RECOMENDACIONES	87
VII. REFERENCIAS	88
ANEXOS	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de las cactáceas. Fuente Ostolaza, (2011).....	27
Figura 2. Distribución de <i>Neowerdermannia chilensis</i> subsp. <i>peruviana</i> (Ritter) Ostolaza. Fuente Ostolaza, (2014).	35
Figura 3. Lugar de recolección de la especie <i>Neowerdermannia chilensis</i> subsp. <i>peruviana</i> (Ritter) Ostolaza. Distrito de Tarucachi – Tacna, septiembre 2017. Fuente Google Earth.....	49
Figura 4. Flor (octubre 2017) y semillas de <i>Neowerdermannia chilensis</i> subsp. <i>peruviana</i> (Ritter) Ostolaza en el Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales - Puno, noviembre 2017.	50
Figura 5. Imagen a la izquierda, fruto de <i>Neowerdermannia chilensis</i> subsp. <i>peruviana</i> (Ritter) Ostolaza con semillas agrupadas y la imagen a la derecha las semillas que miden 1 mm aproximadamente. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, febrero 2018.....	51
Figura 6. Las semillas de <i>Neowerdermannia chilensis</i> subsp. <i>peruviana</i> (Ritter) Ostolaza remojadas por 48 horas. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales - Puno, junio 2018.	51
Figura 7. Desinfección de plántulas germinadas. a) enjuague en agua jabonosa, b) lavado de plántulas en agua destilada y c) desinfección con alcohol 70%, hipoclorito de calcio y agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, julio 2018.....	53
Figura 8. Introducción de plántulas al medio de cultivo Murashige y Skoog (MS). a) Plántulas sobre hoja esterilizada, b) Plántulas en medio de cultivo Murashige y Skoog. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, julio 2018.	54
Figura 9. Método de evaluación para medir las plántulas de <i>Neowerdermannia chilensis</i> subsp. <i>peruviana</i> (Ritter) Ostolaza, Huanca (2019).....	56
Figura 10. Distribución de medio de cultivo Murashige y Skoog al matraz Erlenmeyer que contiene diferentes concentraciones de ANA y BAP	

(Reguladores de crecimiento). Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, agosto 2018.	58
Figura 11. Cortes realizados en la plántula de <i>Neowerdermannia chilensis</i> subsp. <i>peruviana</i> (Ritter) Ostolaza (cactaceae) para la obtención de explantes. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, septiembre 2018.....	60
Figura 12. Distribución de medio de cultivo Murashige y Skoog a los matraces Erlenmeyer con diferentes concentraciones de ácido giberélico. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, noviembre 2018.....	61
Figura 13. Plántulas de <i>Neowerdermannia chilensis</i> subsp. <i>peruviana</i> (Ritter) Ostolaza a los 20 días de germinación. a) plántulas germinadas, b) plántulas con raíz y sus primeros tejidos areolares. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos Vegetales - Puno, julio 2018.	66
Figura 14. Altura de las plántulas por días transcurridos. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, julio a septiembre 2018.....	68
Figura 15. Número de areolas por plántula incrementa a medida que los van transcurriendo. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, julio a septiembre 2018.....	69
Figura 16. Número de areolas y altura de plántulas por días transcurridos de <i>Neowerdermannia chilensis</i> subsp. <i>peruviana</i> (Ritter) Ostolaza cultivadas en medio Murashige y Skoog. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, julio a septiembre 2018.	70
Figura 17. Porcentaje de contaminación en los tratamientos a los 18 días del cultivo <i>in vitro</i> . Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, octubre 2018.....	72
Figura 18. Imagen a la izquierda, explante poco oxidado en un medio de cultivo MS adicionado con 1mg/L de BAP y la imagen a la derecha explantes completamente oxidados en un medio de cultivo MS adicionado con 1mg/L de BAP + 0.5 mg/L de ANA. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, noviembre 2018.....	73

Figura 19. Porcentaje de oxidación en los tratamientos a los 18 días del cultivo <i>in vitro</i> . Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, octubre 2018.....	73
Figura 20. GPS, marca GARMIN.....	97
Figura 21. <i>Neowerdermannia chilensis</i> subsp. <i>peruviana</i> (Ritter) Ostolaza en macetas, en el Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, octubre 2017.....	97
Figura 22. Autoclave y balanza analítica, Puno 2017 a 2019. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, 2017 a 2019.....	97
Figura 23. Materiales de desinfección (hipoclorito de calcio), antibiótico y alcohol al 70%. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, 2017 a 2019.	98
Figura 24. Reguladores de crecimiento (ácido naftalenacético, 6-bencilaminopurina) y ácido giberélico. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, 2017 a 2019.	98
Figura 25. Compuestos para el medio de cultivo, como azúcar blanca, agar – agar y Murashige y Skoog con vitaminas. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, 2017 a 2019.	98
Figura 26. Preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog y los respectivos tratamientos en matraz Erlenmeyer, Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno 2018.....	99
Figura 27. Frascos de vidrio desinfectados con alcohol al 70%. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno 2017 a 2019.....	99
Figura 28. Introducción de explantes de <i>Neowerdermannia chilensis</i> subsp. <i>peruviana</i> (Ritter) Ostolaza al medio Murashige y Skoog adicionado a concentraciones combinadas de ANA y BAP, en la cámara de flujo laminar. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno 2018.....	99
Figura 29. Cámara de crecimiento. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno 2017 a 2019.	100

Figura 30. Plántulas en medio de cultivo Murashige y Skoog, alcanzando un buen crecimiento (0.8 a 1.0 cm) a los 76 días. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno 2018.	100
Figura 31. Frascos contaminados por hongos. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno 2018.	100
Figura 32. Inducción de callos con 2 mg/l de BAP + 1 mg/L de ANA. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, 11-21-2018.	101
Figura 33. Inducción de callo con 1 mg/L de BAP + 1 mg/L de ANA. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, 11-21-2018.	101
Figura 34. Inducción de callos con 3 mg/L de BAP. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno 2018, 11-19-2018.	101
Figura 35. Oxidación de explantes en 1 mg/L de BAP + 0.5 mg/L de ANA. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, 10-15-2018.	102
Figura 36. Oxidación de callos en la etapa de formación de brotes. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, 11-12-2018.	102
Figura 37. Formación de brotes en 2 mg/L de ácido giberélico. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, 16-01-2019.	102
Figura 38. Formación de brotes en 6 mg/L de ácido giberélico. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, 16-01-2019.	103
Figura 39. Formación de brote en medio Murashige y Skoog sin ácido giberélico. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, 16-01-2019.	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Usos y propiedades medicinales de <i>Neowerdermannia chilensis</i> subsp. <i>peruviana</i> (Ritter) Ostolaza. Fuente Montesinos, (2011).....	34
Tabla 2. Descripción de los procesos de ejecución del trabajo de investigación.	48
Tabla 3. Combinaciones de diferentes concentraciones de BAP (Bencilaminopurina) y ANA (Ácido naftalenacético) en los tratamientos. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, agosto 2018.....	58
Tabla 4. Medio de cultivo Murashige y Skoog suplementado con diferentes concentraciones de ácido giberélico. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, noviembre 2018.....	61
Tabla 5. Porcentaje de contaminación en los tratamientos. Se considero 1 = Frasco contaminado y 0 = Frasco no contaminado. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, octubre 2018.	71
Tabla 6. Porcentaje de oxidación en los tratamientos. Se consideró 1= a los explantes completamente oxidado y 0.5= a los explantes poco oxidados. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, octubre 2018.....	74
Tabla 7. Respuesta morfogénica de los explantes a concentraciones combinadas de BAP (Bencilaminopurina) y ANA (Ácido naftalenacético). Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, noviembre 2018.....	76
Tabla 8. Número de callos por frascos, en los tratamientos adicionados con reguladores de crecimiento. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, noviembre 2018.....	78
Tabla 9. La prueba de rangos de Kruskal Wallis, determina que si existe diferencia entre tratamientos en la inducción de callo ($p < 0.05$). Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, noviembre 2018	79
Tabla 10. Altura de callo en los tratamientos adicionados con reguladores de crecimiento. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, noviembre 2018.....	80
Tabla 11. Porcentaje de oxidación en los tratamientos a los 56 días del cultivo <i>in vitro</i> . Se consideró 0.5 = poco oxidado (a los callos que aun crecieron o	

formaron brotes) y 1 = los callos completamente oxidados. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, enero 2019.....	81
Tabla 12. Respuesta del tejido calloso al medio de cultivo Murashige y Skoog adicionado con ácido giberélico. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, noviembre, enero 2019.....	82
Tabla 13. Número de brotes por callo en un medio Murashige y Skoog adicionado con ácido giberélico a diferentes concentraciones. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, enero 2019.....	82
Tabla 14. Prueba de rangos de Kruskal Wallis determina que si existe diferencia entre tratamientos en el número de brotes por callo ($p < 0.05$). Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, enero 2019.....	83
Tabla 15. Altura de brotes en los tratamientos adicionados con ácido giberélico. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, enero 2019.....	85
Tabla 16. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).....	104
Tabla 17. Número de areolas por plántula. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, 2018.....	105
Tabla 18. Altura de plántulas. Laboratorio de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales – Puno, 2018.....	105
Tabla 19. Coeficiente de Correlación de Spearman, utilizando el Software Infostat.	106
Tabla 20. Prueba de normalidad para los datos de callos por frasco, aplicando la prueba Shapiro Wilks.....	106
Tabla 21. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para determinar la diferencia entre tratamientos del número de callos por frasco.....	106
Tabla 22. Prueba de normalidad para los datos de altura de callo, aplicando la prueba Shapiro Wilks.....	106
Tabla 23. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para determinar la diferencia entre tratamientos de altura de callo.....	107
Tabla 24. Prueba de normalidad para los datos de brotes por callo, aplicando la prueba Shapiro Wilks.....	107
Tabla 25. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para determinar la diferencia entre tratamientos del número de brotes por callo.	107

Tabla 26. Prueba de normalidad para los datos de altura de brotes, aplicando la prueba Shapiro Wilks.....	108
Tabla 27. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para determinar la diferencia entre tratamientos de altura de brotes.....	108

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

AIA, IAA	: Ácido indolacético
AIB	: Ácido indolbutírico
ABA	: Ácido abscísico
AG3	: Ácido giberélico
ANA	: Ácido naftalenacético
BAP	: 6-Bencilaminopurina o Bencilaminopurina
BA	: Benciladenina.
2,4-D	: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	: 2-isopentil-adenina
CIN, KIN	: Cinetina, Kinetina
CITES	: Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre
TDZ	: Tiazurón [1-fenil-3(1,2,3-tiazol-5-il) urea]
mT	: Meta-topolina
MS	: Murashige y Skoog
NaH ₂ PO ₄	: Dihidrógeno tetraoxofosfato de sodio
HCL	: Ácido clorhídrico
UV	: Luz ultravioleta
UICN	: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
Zeatina	: 6-(4-hidroxi-3-metil-2butenilamino) purina
g	: gramos
cm	: centímetros
mg	: miligramos
μM	: micromol
mM	: milimol
mm	: micrometro
L	: litro
°C	: grados Celsius
v/v	: volumen/volumen (concentración)
p/v	: peso/volumen (concentración)
ppm	: partes por millón

RESUMEN

Neowerdermannia chilensis subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza es un cactus perteneciente a la familia cactaceae, endémica de Tacna y Moquegua. Considerado como planta de uso medicinal y alimenticio para los pobladores del lugar, se encuentra actualmente en peligro de extinción. Dicha investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno, por un periodo de 17 meses. Se plantearon los siguientes objetivos, a) Evaluar la respuesta morfológica de las plántulas de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza (Cactaceae) inducido al medio Murashige y Skoog, b) Propagar *in vitro* tejidos morfológicamente viables de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza (Cactaceae) a concentraciones combinadas de ANA: 0.0 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L y BAP: 1.0 mg/L, 2.0 mg/L, 3.0 mg/L. La metodología consistió en dos etapas, la primera fue la elección de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza como especie a trabajar, luego se recolectó las semillas y se provocó la germinación en placa Petri utilizando como sustrato el algodón humedecido con agua destilada, después de 20 días de germinación fueron cultivadas en medio basal de Murashige y Skoog. Para la etapa de multiplicación, primero se realizó la inducción de callo que se cultivó en medio Murashige y Skoog suplementado a concentraciones combinadas de ANA (Ácido naftalenacético) y BAP (Bencilaminopurina), para la formación de brotes se cultivó en medio Murashige y Skoog adicionado con ácido giberélico (2, 4 y 6 mg/L). Los resultados se sometieron a la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis ($p < 0.05$). Se determinó que el medio Murashige y Skoog adicionado con 2 mg/L de BAP + 1 mg/L de ANA y con 1 mg/L de BAP + 1 mg/L de ANA fueron mejores para la inducción del callo. El mejor tratamiento para la proliferación de brotes fue 2 mg/L de ácido giberélico (7.67 brotes por callo), mientras que en 4 mg/L de ácido giberélico se produjo el mejor desarrollo, pero fue menor respecto al número de brotes por callo (3.33 brotes por callo). En conclusión, fue posible llevar a cabo la propagación *in vitro* de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza lo que puede ser una herramienta importante para su conservación.

Palabras clave: Ácido naftalenacético, bencilaminopurina, *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza, propagación *in vitro*.

ABSTRACT

Neowerdermannia chilensis subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza is a cactus belonging to the family cactaceae, endemic to Tacna and Moquegua. Considered as a plant for medicinal and food use for local residents, it is currently in danger of extinction. This research was carried out in the Laboratory of In vitro Cultivation of Plant Tissues of the Faculty of Agricultural Sciences of the National University of the Altiplano-Puno, for a period of 17 months. The following objectives were raised: a) Evaluate the morphological response of the seedlings of *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza (Cactaceae) induced to the medium Murashige and Skoog, b) Propagate *in vitro* morphologically viable tissues of *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza (Cactaceae) at combined concentrations of ANA: 0.0 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L and BAP: 1.0 mg/L, 2.0 mg/L, 3.0 mg/L. The methodology consisted of two stages, the first was the choice of *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza as a species to work, then the seeds were collected and germination was carried out in Petri dish using as a substrate the cotton moistened with distilled water, after 20 days of germination they were grown in the basal medium of Murashige and Skoog. For the multiplication stage, callus induction was first performed, which was grown in Murashige and Skoog medium supplemented with combined concentrations of ANA (Naphthalenacetic Acid) and BAP (Benzylaminopurine), for sprout formation it was grown in Murashige and Skoog medium added with gibberellic acid (2, 4 and 6 mg/L). The results were submitted to the non-parametric Kruskal Wallis test ($p < 0.05$). It was determined that the Murashige and Skoog medium added with 2 mg/L of BAP + 1 mg/L of ANA and with 1 mg/L of BAP + 1 mg/L of ANA were better for callus induction. The best treatment for the proliferation of outbreaks was 2 mg/L of gibberellic acid (7.67 outbreaks per callus), while in 4 mg/L of gibberellic acid the best development occurred, but it was lower compared to the number of outbreaks per callus (3.33 buds per callus). In conclusion, it was possible to carry out the *in vitro* propagation of *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza what can be an important tool for its conservation.

Keywords: Naphthalenacetic acid, benzylaminopurine, *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza, *in vitro* propagation.

I. INTRODUCCIÓN

La familia cactaceae, endémica del continente americano que se distribuye desde el norte de Canadá hasta el sur de Argentina. Perú tiene una gran diversidad de formas de vida que adopta a lo largo de los desiertos costeros, la cordillera de los andes, valles interandinos y bosques tropicales de la Amazonía, con 262 especies distribuidas en 39 géneros de las cuales el 80 % son endémicas. Diversas especies de cactus han formado parte de los recursos utilizados por los antiguos peruanos desde épocas precolombinas hasta nuestros días, y por el cual las cactáceas presentan valores económicos, social y ambiental.

Los cactus como comúnmente se les conoce son plantas perennes y suculentas (almacenan agua en sus tejidos), que han desarrollado adaptaciones anatómicas y fisiológicas que les permite enfrentar las condiciones climáticas, por el cual presentan muchas formas, tamaños, textura y cambiaron las hojas por espinas. Sin embargo, estas particulares plantas, se han visto amenazadas por el comercio ilegal, destrucción de su hábitat natural y depredación. La especie *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza, es un cactus que se encuentra en las regiones de Tacna y Moquegua se considera endémico, restringido y en peligro de extinción. Antiguamente existían grandes extensiones y actualmente ha disminuido, debido a que los pobladores del lugar utilizaban para fines medicinales (para intestino, hemorragias internas, tónicos, riñones) y alimenticios (sopas, cremas, estofados, mermeladas, postres).

La biotecnología vegetal ha permitido el uso de herramientas como la técnica de cultivo *in vitro*, consiste que a partir de una porción de tejido (explante) pueda originarse una nueva planta bajo condiciones controladas. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* resulta una alternativa más prometedora para la propagación que contribuye a la conservación y promueve el interés ornamental, el uso racional como actividad económica y también para obtener compuestos, colorantes naturales, entre otros, entonces utilizando técnicas de cultivo *in vitro* las cactáceas pueden ser multiplicadas por propagación sexual, mediante semillas o medios vegetativos siendo estos métodos de propagación *in vitro* técnicas valiosas, con la que se han multiplicado muchas especies, con la finalidad de conservar recursos fitogenéticos en extinción, de esta manera abrir nuevas alternativas de comercialización.

La familia cactácea representa una parte importante de la flora peruana, con muchas especies endémicas y en peligro, que son una muestra importante de la diversidad biológica, siendo una de ellas *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza. Por lo tanto, considerando el gran potencial de la biotecnología y la situación en la que se encuentra *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza, este trabajo es una acción preliminar para la conservación de esta especie, a través del cultivo *in vitro*, planteándose los siguientes objetivos:

Objetivo general

Realizar el establecimiento y propagación *in vitro* de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza (Cactaceae) a partir del tejido areolar.

Objetivos específicos

Evaluar la respuesta morfológica de las plántulas de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza (Cactaceae) inducido al medio Murashige y Skoog para la propagación *in vitro*.

Propagar *in vitro* tejidos morfológicamente viables de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza (Cactaceae) a concentraciones combinadas de ANA: 0.0 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L y BAP: 1.0 mg/L, 2.0 mg/L, 3.0 mg/L.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES

La propagación *in vitro* de las cactáceas ha surgido como una herramienta útil, ya que estas plantas son de interés ornamental, alimenticias, por su importancia ecológica, etc (Ostolaza, 2014). Para la propagación *in vitro* de las cactáceas se puede iniciar mediante plantas donadoras y mediante germinación *in vitro* ya que las especies de esta familia son de crecimiento lento, pero la desventaja de las plantas donadoras es que son extraídas de su hábitat natural y tienen contaminantes, por lo que se opta realizarse la germinación directamente *in vitro* para obtener explantes asépticas. En México el cultivo de tejidos vegetales es una de las alternativas más exitosas para recuperar las especies en riesgo o peligro de extinción (Ramirez, 2008), por su parte Ojeda *et al.* (2008) indica que el método de propagación es una herramienta importante en la familia cactácea ya que en condiciones naturales son de lento crecimiento y de baja germinación en su hábitat natural.

El cactus *Coryphantha macromeris* se logró propagar *in vitro*, a través de la proliferación de callos en 44 μ M de BA y 0,5 μ M de 2,4-D, para la multiplicación de brotes los callos de 6 a 8 mm se subcultivaron en un medio sin reguladores del crecimiento y se produjeron 20 brotes después de 6 a 8 semanas (Smith *et al.*, 1991), mientras que Pérez *et al.*, (1998) logró la formación de brotes en el medio MS con 1 – 2 mg/L de 6 - BA + ANA a 0.1 – 1 mg/L para 21 cactáceas mexicanas del género *Astrophytum*, *Cephalocereus*, *Coryphantha*, *Echinocactus*, *Echiaocereus*, *Echinofossulocactus*, *Ferocactus*, *Mammillaria*, *Nyctocereus* y *Stenocactus*, por su parte Malda *et al.* (1999) para la propagación *in vitro* a los 4 meses obtuvieron 11.4/21.7 brotes por explante en medio MS suplementado con 0.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L de ANA para *Obregonia denegrii* y *Coryphantha* mínima.

Santos *et al.* (2001) trabajó con *Astrophytum myriostigma* (cactácea mexicana), demostraron que la germinación y el crecimiento fue mayor en el medio MS, el mayor número de brotes fue en MS suplementado con 2 mg/L de cinetina obteniendo 14 brotes por explante, por otro lado Arias (2002) en *Pelecypora strobiliformis* obtuvo los mejores tratamientos en KIN 6 mg/L y 0.0 mg/L de ANA con 5 brotes por explante y 6 mg/L de 2iP y 0.0 mg/L de ANA con 2.75 brotes por explante, mientras que trabajo realizado por Choreño *et al.* (2002) con

Cephalocereus senilis (cactaceae) la propagación *in vitro* fue por la activación de areolas en 0.3 mg/L ANA + 3.0 mg/L BAP y a los 61 días se subcultivaron para su multiplicación, después de 40 días la mejor respuesta en número de brotes fue con plántulas fraccionadas con una altura de 0.9 cm y 0.6 cm de diámetro, posteriormente los brotes transferidos a medio sin reguladores formaron raíz a los 30 días.

La germinación *in vitro* de *Mammillaria pectinifera* y *Pelecypora aselliformis* en medio MS fue baja 23 - 47% mientras que en *Escobaria mínima* fue de 69%, para la proliferación de brotes se indujo en medio que contienen TDZ (0.23 μ M) y 22.20 μ M de BA y una concentración alta de TDZ (2.27 μ M) conduce a la formación de callos en *Escobaria mínima* y *Mammillaria pectinifera*, y para *Pelecypora aselliformis* en un medio que contiene kinetina (23.2 μ M) (Giusti *et al.*, 2002), por otro lado estudio realizado en Guatemala por Ordoñez (2003) en *Mammillaria voburnensis* obtuvo un 80% de germinación *in vitro*, el medio MS suplementado con 0.1 mg/L de BAP + 0.01 mg/L de ANA indujo un promedio de 11 brotes por explante a los 60 días mientras que Pérez & Dávila (2003) en *Pelecypora aselliformis* produjeron 13.7 brotes por explante con 8.8 mM de BA y para *Pelecypora strobiliformis* se produjeron 12.4 brotes por explante utilizando 8,8 mM de BA,

En *Cephalocereus maxonni* el medio MS suplementado con 1 mg/L de ANA + 2.2 mg/L de BAP se produjeron 4.93 brotes por explante con una altura de 2.89 mm y en el medio MS suplementado con 0.1 mg/L de ANA y 0.5 mg/L de BAP produjo 4.58 brotes por explante con una altura de 2.87 mm (Sandoval, 2005), por otro lado Cuellar *et al.* (2006) obtuvieron la germinación *in vitro* en medio MS adicionado con 2 mg/L de BAP y 1 mg/L de K, *Stenocereus queretaroensis* presentó el 84% de germinación, *Stenocereus gummosus* 60%, *Stenocereus griseus* 15.2 % y *Hylocereus undatus* 12.9 % mientras que De Medeiros *et al.* (2006) en *Notocactus magnificus*, (cactácea de Brasil) la formación de callos fue en medio MS complementado con sacarosa al 2% (p/v), 0.5 μ M de 2,4-D, 4.4 μ M de BAP, 0.4 mg/L de tiamina HCl y 100 mg/L de i-inositol y para el mayor número de brotes se produjo en medio MS complementado con 22.2 μ M de BAP, sacarosa 3% (p/v) y agar 0,6% (p/v).

En *Cephalocereus senilis* el tamaño de explante (1.5 cm) y el grosor de la médula (0.5 cm) son los más adecuados para la disminución de la oxidación y el medio de cultivo MS adicionado con 1.125 mg/L de BA es adecuado para la obtención de brotes *in vitro* y el mayor

crecimiento de los brotes fue 3 mg/L de AG3 (Hernández, 2006), por otro lado Méndez *et al.* (2006) en su trabajo con *Pterocereus gaumeri* la germinación de las semillas protegidas de la depredación fue entre 18.7 y 44.7% mientras que las semillas expuestas a depredación fue 4.7% siendo los principales depredadores las hormigas, mientras que López, (2006) reporta para *Echinocactus grusonii* el 95% germinación *in vitro* en medio MS 50% y las plántulas alcanzaron entre 1.3 a 1.6 cm de longitud, los explantes cultivados en medio MS con BA presentaron la mayor producción de brotes seguido de 2iP y K pero la más adecuada fue 2iP de 3 mg/L con 3.11 brotes por explante.

Rodríguez (2006) para *Copiapoa hypogaeae* y *Mammillaria elongata* (cactáceas de Chile) la mejor respuesta a la formación y elongación de brotes es 0.1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP a través de inducción de callo, en *Opuntia berteri* el mayor número de brotes por explante se logró con 0.1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP y la mayor elongación se logró con 0.1 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP, en *Trichocereus sp* el mayor número de brotes por explante se dio 0.1 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP y la mayor elongación de brotes con 0.1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP, en *Opuntia sp.* obtuvo la formación de callos y brotes con 0.1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP por su parte Mendoza, (2007) en su trabajo con *Astrophytum ornatum* (cactácea de México) a los 30 días presentó 82.2 % de germinación en medio MS 50% con 1.0 a 1.5 cm de altura y en el medio 2.0 mg/L de BA + 0.5 mg/L de ANA presentó la formación de callo a partir de las zonas de corte del explante y en 2.0 mg/L de BA + 0.0 mg/L de ANA se presentó 2.93 brotes por explante, en 2.0 mg/L de KIN + 0.0 mg/L de 2,4-D con 5.95 brotes por explante.

Seemann *et al.* (2007) reporta que las especies *C. hypogaeae*, *M. elongata*, *Opuntia cylindrica*, *O. Berteri*, *R. gaertneri* tienen mejores respuestas para el desarrollo de brotes en un medio MS con 0.1 mg/L de ANA y 1.0 mg/L de BAP y mientras que *C. peruvianus* tiene una lenta formación de brotes, por su parte Cortés *et al.* (2008) en *Peniosereus greggii* se presentó un 38.5% de índice de germinación y el 6% presentaron contaminación por hongos, se generaron brotes con promedio de 3.2 cm y 3.4 cm en 2 mg/L y 4 mg/L con 0.2 mg/L AIB, mientras que en 2-iP con 0.4 mg/L de AIB generaron brotes con un promedio de 1.4 cm mientras que Estrada *et al.* (2008) reporta en *Opuntia lanigera* la proliferación de los brotes por explante se obtuvo de explantes que se cultivaron en forma vertical (4.975) y en forma

horizontal (3.692) y el aumento en el número de brotes por explante fue mayor con BA (8) en comparación con K y DA (2), sin embargo, la longitud de brote fue mayor con DA (14 mm) en comparación con K y BA (4 mm).

Ramirez, (2008), obtuvo un 79% de germinación *in vitro* para *Mammillaria backebergiana* en el medio MS, con una altura de 3.25 mm de las plántulas y para *Mammillaria pringlei* con 85 % en el medio MS adicionado con AG3, con una altura de 6.22 mm de las plántulas y para *Turbincarpus polaskii* en un medio MS adicionado con AG3 fue el mejor con 96% de germinación, se obtuvo 10.29 mm de altura de las plántulas. Ojeda *et al.*, (2008) trabajó con *Astrophytum capricorne*, en la etapa de inducción, después de 2 semanas formaron estructuras nodulares semejantes a callos sobre la superficie del corte, Mauseth (1977) citado por Ojeda *et al.* (2008), indica que esto puede atribuirse a la utilización y combinación de las citocininas y auxinas que estimulan el crecimiento de los callos en cactáceas y en la etapa de multiplicación obtuvo mayor número de brotes (29.50) con BAP 0.2 mg/L y cinetina 0.2 mg/L adicionado con NaH₂PO₄ 170 mg/L.

Quiala *et al.*, (2009) desarrollaron la propagación *in vitro* de *Pilosocereus robinii* (cactus de Cuba), en el medio MS las semillas germinaron en un 92.8% y la proliferación más alta de brotes (8.9) por explante se alcanzó con el empleo 13.32 µM de 6-BAP, mientras que Avalos (2010) trabajó con *Hylocereus undatus*, *Selenicereus validus* y a los 60 días las plántulas alcanzaron a medir entre 1 a 2 cm de longitud en MS con 0.5 mg/L de BA, respecto a la multiplicación en *H. undatus* con 2.0 mg/L de BA en posición vertical dio 9 brotes por explante, 2.0 mg/L de CIN con 4 brotes por explante, 2 mg/L de 2iP en posición vertical con 10 brotes por explante, 1.5 mg/L de mT en posición horizontal con 12 brotes por explante y 2.0 mg/L de TDZ en posición vertical con 1 brote por explante y para *S. validus* con 2.0 mg/L de BA dio 12.33 brotes por explante, 2.0 mg/L de CIN con 12.35 brotes por explante, 1.0 - 1.5 mg/L de 2iP con 19 a 20.5 brotes por explante, 0.5 mg/L de mT en posición vertical con 8.33 brotes por explante y 0.5 mg/L de TDZ en posición vertical 7.875 brotes por explante.

Estudio realizado en México por Ruvalcaba *et al.* (2010) en *Coryphanta retusa* a los 21 días observaron el desarrollo de callos blancos en los tratamientos con ANA y la presencia de callos se detectó en lugares de corte que estuvieron en contacto con el medio de cultivo y para la proliferación de brotes a partir de explantes apicales y laterales se produjo con 6 BAP

a 2.0 mg/L con 7 a 10 brotes por explante a los 70 días de cultivo, mientras que en *Stenocereus stellatus* a los 8 y 12 días dio el 24% de germinación, esto podría explicarse por la acción de algún mecanismo de latencia pues no se había eliminado el mucílago que protege a las semillas y los explantes en medio con 2.2 μ M de BA, 17.6 y 35.2 μ M de 2iP formaron brotes a los 16 y 18 días mientras que con 4.4, 8.8 y 17.6 μ M de BA y 8.8 μ M de 2iP tardaron 11 y 12 días (Martínez *et al.* 2011).

Salas *et al.* (2011) en sus resultados obtuvieron el 63% de germinación con agar + MS seguido del zeolita mediana + MS (58%) en *Astrophytum capricorne*, *Astrophytum myriostigma*, *Echinocereus reichenbachii*, *Escobaria dasyacantha*, *Mammillaria prolifera* y *Sclerocactus scheeri* por su parte Villavicencio *et al.* (2011) trabajaron con *Turbiniacarpus knuthianus*, en el medio MS al 50% añadido con 8.65 mM de AG3 lograron el 75% de germinación *in vitro* y en un medio MS adicionado con 4.40 mM de BA + 4.13 μ M de AIB se obtuvo 10 brotes por explante y la altura de los brotes fue mayor en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento que presento 8.22 mm, mientras que De la Rosa *et al.* (2012) determinan que la germinación de 14 especies género *Turbiniacarpus* fue muy variables siendo a los 12 - 60 días obtuvo el 35 - 85%, después de 6 meses obtuvieron plántulas de 4 - 5 mm de altura, en *Turbiniacarpus hoferi* con la aplicación de 4.44 μ M de BAP presentó 4 brotes por explante y en *T. pseudomacrolele* subsp. *Lausseri* con 26.3 brotes por explante en 3.33 μ M de BAP

En *Mammillaria plumosa* para la inducción de callo y multiplicación de brotes se dio con 18.0 μ M de 2,4 - D y 9.30 μ M de CIN, para *Echinopsis chamaecereus* con BA 13.2 μ M y ANA 5.35 μ M se produjeron 55.6 brotes por explante y *Gymnocalidium mihanovichii* para la inducción y proliferación de callos se produjo con 8.8 μ M de CIN y 4.5 μ M de 2,4-D, la formación de callos se presentó en la superficie del corte y en la base del explante y altas concentración de auxina presentaron mayor cantidad de callo (Téllez, 2012) por su parte Villavicencio *et al.* (2012) trabajaron con *Epithelantha micromeris*, obtuvieron 15 brotes por explante en un medio adicionado con 1.2 mM de KIN + 1.30 μ M de AIB (T13) y 4.6 mM de KIN + 4.133 μ M de AIB (T16), respecto a la altura de brotes, en 0.7 mM de BA + 0.06 μ M de AIB (T2) y 0.7 mM de BA + 0.15 μ M de ANA (T8) obtuvieron 10 brotes por explante con una altura de 6 mm, siendo mayor a la altura de los tratamientos T13 y T16 con 3 mm,

además, con 0.9 mM de BA + 0.81 μ M de AIB son las de mayor altura de brotes 7.3 mm sin embargo el número de brotes es bajo (6 brotes por explante).

En *Ortegocactus macdougallii* con 4.4 μ M de ANA y 13.3, 19.9, 26.6 μ M de BAP produjeron entre 5 y 6 brotes por explante, sin embargo, los brotes obtenidos en el medio 4.4 μ M de ANA y 13.3 μ M de BAP fueron mayores respecto a la altura con 5 mm (Arellano *et al.*, 2013) mientras que Rocha (2013) en la fase de multiplicación y brotación de los explantes de *Aporocactus flagelliformis* la combinación BAP 3 mg/L + ANA 1 mg/L es más apropiado, por otro lado en *Escobaria cubensis* la germinación *in vitro* fue favorable en medio MS 25% con 95.64% y para la multiplicación, con 5.1 brotes por explante fue el medio que contenía 13.3 μ M BAP + 5.4 μ M ANA (Rodríguez *et al.*, 2013) por otro lado Choquecagua (2013) en su trabajo realizado en *Puya raimondii*, las semillas fueron cultivadas en placas de Petri utilizando como sustrato el algodón, a las cuales se les aplicó escarificación mecánica y fisiológica, los resultados demostraron que los tratamientos no tuvieron efecto en la germinación, obteniéndose 75.56 % y 65.69 %.

Amador *et al.* (2013) determinaron que no existe un efecto positivo de los reguladores de crecimiento sobre la germinación y el crecimiento de cactáceas, registrando que el tratamiento control y 125 ppm de AIA a los 9 días promovió el 51 % de germinación en *Ferocactus latispinus* y un 62% para *Ferocactus histrix* en el sexto día con 250 ppm de ANA y el porcentaje más bajo (40 %) fue con 125 y 250 ppm de AG3 en las dos especies, para el cactus *Coryphantha elephantidens* el regulador de crecimiento BAP demostró ser más efectiva para la inducción de brotes múltiples, el mejor resultado fue en los explantes de tallos cortados longitudinalmente que se cultivaron en medio MS suplementado con 6.6 μ M BAP produciendo 12.4 brotes (Bhau & Wakhlu, 2015), en cambio Gonzalez (2015) trabajó con 18 especies de cactáceas, en sus resultados determina que el medio MS 50% + 8.65 μ M de AG3 fue mejor en la mayoría de las especies establecidas, lo que concluye que las semillas de cactáceas requieren de un medio a base de nutrientes con la ayuda de hormonas como es el AG3 para acelerar la germinación.

Para *Hylocereus monacanthus* a los 35 días el porcentaje de germinación *in vitro* fue del 70% y las plántulas llegaron a medir 1.0 cm de longitud, los mejores resultados para la multiplicación fue 1 mg/L de BAP que presentó 14 brotes por explante con una altura de 22

mm (Montiel *et al.* 2016), mientras que Ramírez & Salazar (2016) en *Mammillaria geminispina*, *M. magnimamm*, *M. marcosii*, *M. mercadensi*, *M. petterssonii*, *Coryphanta radians* y *Ferocactus latispinus* las concentraciones altas de AIA 4 mg/L y cinetina 10 mg/L produjeron promedios de 6.0 y 9.2 brotes por explante, sin embargo, en *Ferocactus latispinus* en presencia de AIA (4 mg/L) obtuvo 4.8 brotes por explante por otra parte en *Mammillaria luethyi* los explantes fueron cultivados en medio MS con 3 mg/L de 2,4-D para la inducción del callo y para la multiplicación de brotes por explante (2.16, 1.83 y 1.5) correspondieron al medio de cultivo PCL2 con 1 mg/L, 3 mg/L de BAP y 1 mg/L kinetina (Escobedo *et al.*, 2018).

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Características de las cactáceas

La familia cactaceae conocidos usualmente como cactus, son nativos del continente americano, encontrándose desde Canadá hasta el sur de Argentina (Sánchez *et al.* 2010).

Origen y evolución

La evolución de los cactus se habría formado desde hace 80 millones de años, después de la desunión de África y Sudamérica, razón por la cual no existían en los otros continentes hasta el descubrimiento de América (Ostolaza, 2011), por su parte Pizarro (2014) indica que actualmente las cactáceas se cultivan en todo el mundo pero son originarias del continente americano. Las cactáceas están ordenadas taxonómicamente en la clase Magnoliopsida dentro de la subclase Caryophyllidae y son plantas dicotiledóneas (Durán & Méndez, 2010), ya que todas las cactáceas son perennes clasificadas por sus tallos siempreverdes, además son un ancestro con características avanzadas, debido a que algunas características florales y vegetativas de las cactáceas son consideradas primitivas como la gran cantidad de estambres y las flores actinomorfas; sin embargo, todos los cactus presentan características avanzadas (flores con ovario ínfero, flores bisexuales y algunas presentan flores irregulares), mientras que la presencia de espinas se considera un atributo derivado de plantas con hojas (Pizarro, 2014).

Distribución

Las cactáceas se distribuyen particularmente en el continente americano (Durán *et al.* 2010), los límites de distribución de las cactáceas en el continente americano, inicia desde el norte en Canadá, en los estados de Columbia Británica y Alberta, a 56° de latitud norte y las pocas especies que allí se encuentran, soportan temperaturas bajo 0° pasando inviernos bajo la nieve y el límite sur es desde la Patagonia Argentina a 50° de latitud sur y soportan idénticos rigores que las especies del hemisferio norte, ,mientras que los límites laterales están dados, al oeste, por las islas Galápagos, al oeste de Ecuador y al este el límite lo da una pequeña isla al este de Brasil, llamada Fernando de Noronha (Figura 1) (Ostolaza, 2011).

Una característica común de toda la familia cactaceae es su succulencia, es decir su capacidad de almacenar agua en el tejido parenquimático. Otras características que sirve para identificar es la forma de vida, la forma y tamaño se sus raíces, el metabolismo fotosintético, la forma externa de los tallos, la ubicación y tamaño del polen, la forma del fruto y semillas, el tamaño, forma y numero de espinas y las areolas. Las formas de vida señalan una adaptación especial de la planta al clima y al suelo (Pizarro, 2014). Los cactus han desarrollado numerosas adaptaciones a las condiciones de aridez, como la reducción de las hojas a espinas y realizan la fotosíntesis en dos fases (durante el día y el intercambio gaseoso durante la noche) (Sánchez *et al.*, 2010).

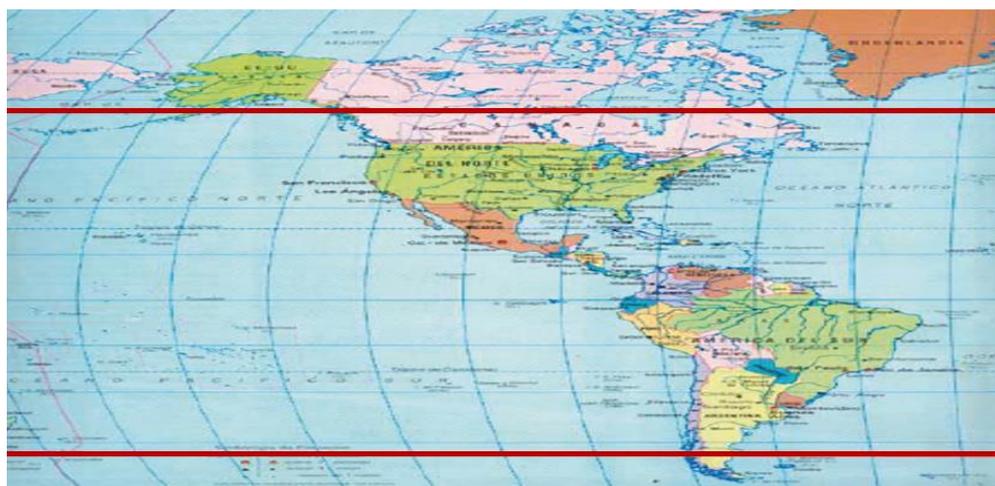


Figura 1. Distribución de las cactáceas. Fuente Ostolaza, (2011)

Morfología

Dentro del territorio americano continental e insular existen variedad de climas, temperaturas y altitudes, donde los cactus se han adaptado para sobrevivir, lo que explica las muchas formas, tamaños y texturas (Ostolaza, 2011), las cactáceas presentan características morfológicas que les permite colonizar en ambientes cálidos y áridos (Durán & Méndez, 2010), desarrollando una epidermis gruesas todo esto con el fin de reducir la evapotranspiración (Sánchez *et al.*, 2010).

Raíz: El sistema radicular es en general bastante superficial (Ceroni & Castro, 2013) y ramificado que se extiende superficialmente adaptadas para aprovechar las lluvias ligeras o la humedad depositada en el suelo (Ostolaza, 2011), también puede estar compuesta por una raíz principal a menudo engrosadas, napiforme y tuberosa (Ceroni & Castro, 2013), la raíz les permite almacenar agua y almidones para la nutrición de la planta y como órgano de sostén (Pizarro 2014; Ostolaza 2011).

Tallos: Los tallos son suculentos (capaces de almacenar y conservar agua) por lo general permanecen siempre verdes, ya que deben encargarse de la fotosíntesis (Durán & Méndez 2010; Ostolaza 2011; Pizarro 2014; Señoret & Acosta 2013), el tallo frecuentemente se lignifica con la edad y se cubre de una gruesa cutícula cerosa, de esta manera reduce la transpiración (Ceroni & Castro, 2013). Los tipos de tallos varía mucho en tamaño y forma, constituido por tallos globosos, columnares y cladodios (Ostolaza 2011; Señoret & Acosta 2013).

Costillas y tubérculos y/o mamila: Las costillas son unas aristas sobresalientes en los tallos (Ostolaza, 2011), tienen una forma longitudinal, islas, tuberculeada (Pizarro, 2014) y que son muy importantes porque les permiten absorber gran cantidad de agua en época de lluvias y aumentar su volumen sin que la epidermis se dañe (Ostolaza, 2011), además las costillas hacen muy resistentes a los cactus a la fuerza de flexión (Señoret & Acosta, 2013).

Areolas: Es el órgano más característico de los cactus, se encuentra en la parte más prominente de las costillas (Ostolaza, 2011), se trata de zonas meristemáticas que se encuentran en la areola dando origen a las espinas, los pelos, cerdas, gloquídios y las flores

y los frutos (Ceroni & Castro, 2013; Ostolaza, 2011; Pizarro, 2014). Tienen forma de pequeñas almohadillas que se ubican a lo largo de las costillas (cactus columnares y algunos globulares) o sobre los tubérculos (especies globulares). Las areolas pueden ser muy pequeñas como en los cactus epífitos y en otras las areolas están divididas en dos partes, una en la punta de los tubérculos para las espinas y la otra en la base o cerca de la base para las flores (Ostolaza, 2011). Las areolas representan una importante modificación evolutiva para estas plantas, dan origen a las espinas que son su principal medio de defensa.

Espinas: Las espinas nacen de las areolas y son muy variables en tamaño con forma acicular, cilíndricas, cónicas, rectas, aplanadas, curvas, en gancho, o cubiertas por una funda que pueden ser frágiles o poderosamente fuertes (Ostolaza 2011; Señoret & Acosta 2013). Se considera que las espinas son hojas modificadas que cumplen un papel muy importantes como: proteger los tallos suculentos de ser comidos por los herbívoros, protegen a los tallos de la intensa radiación solar, crean un microclima alrededor de los tallos para combatir el excesivo calor (Ostolaza, 2011).

Flor: Ostolaza, (2011) describe que son flores hermafroditas, es decir, tienen elementos sexuales masculinos (filamentos y anteras) y femeninos (ovario, estilo, estigma) en una misma flor, la mayor parte de la floración se presenta durante los meses de noviembre a febrero, aunque la mayor parte florecen de acuerdo a factores como la disponibilidad de agua y aumento de la temperatura (Pizarro, 2014).

Frutos: Pizarro (2014); Señoret & Acosta (2013) describen los frutos que generalmente son carnosos, los cactus tienen frutos comestibles y son dehiscentes y raramente secos o indehiscentes. Los frutos de las cactáceas pueden tener en sus superficies espinas, areolas, cerdas o pelos (Ostolaza 2011; Señoret & Acosta 2013).

Semilla: Por lo general son numerosas, la mayor parte de las semillas de los cactus presentan semillas muy pequeñas y de bajo peso (Pizarro, 2014). La forma, color, textura y el tamaño varía en relación al género y especies, las hay en formas de coma, de sombrero, aladas (Ostolaza, 2011; Señoret & Acosta, 2013). El tamaño de las semillas en promedio va de 1 a 3mm, el color va de castaño a negro y la textura de la superficie es útil para la clasificación (Ostolaza, 2011).

Fisiología

De acuerdo en el medio donde habitan, la familia cactaceae tuvieron que adaptarse para sobrevivir, logrando ciertas modalidades en sus diversos procesos fisiológicos como el intercambio gaseoso y la obtención de energía (Ordoñez, 2003), por otro lado (Ostolaza, 2014) indica que la ausencia de hojas ha obligado a los cactus a realizar la fotosíntesis en los tallos, porque en las hojas se pierden mucha agua. Las cactáceas presentan un metabolismo ácido crasuláceo (CAM) que les permite realizar la fotosíntesis durante la noche, de esta manera evita la apertura de los estomas durante el día y con ello la pérdida de agua por transpiración (Durán & Méndez, 2010). La función que cumplen los estomas es dejar entrar el CO₂ a la planta, el que se almacena como ácido málico al interior de la célula, cuando los estomas se cierran, el ácido málico se convierte nuevamente en CO₂, con lo cual se inicia el ciclo de Calvin en los cloroplastos (Pizarro, 2014).

Crecimiento

Bravo, (1985) citado por (Ordoñez, 2003), indica que el crecimiento de las cactáceas se da por la actividad de los tejidos embrionarios, meristemas, al igual que en otras plantas, en las cactáceas los tejidos meristemáticos se localizan en las areolas que dan origen a brotes, flores, espinas, etc. Además, tiene un crecimiento muy lento que dura cientos de años.

Reproducción

Paniagua, (1980) citado por (Ordoñez, 2003), menciona que la reproducción puede ser asexual por multiplicación vegetativa o pueden reproducirse sexualmente. Se sabe que las flores son hermafroditas, pero generalmente son incapaces de auto fecundarse, por ende requieren el transporte de los granos de polen de la flor de una planta a la flor de otra y es aquí la importancia de los animales llamados polinizadores, ésta forma de polinización zoófila, llamada polinización cruzada es el primer paso de la reproducción de las cactáceas, que consiste en que los cactus tienen que producir flores muy atractivas para los polinizadores y a la vez compensarlos con néctar y/o polen para que sean visitados, los polinizadores en los cactáceas principalmente son los murciélagos, los colibríes o picaflores, mariposas nocturnas e insectos diurnos (abejas, mariposas) (Ostolaza, 2014)

Por otro lado, se encuentran los dispersores de las semillas, donde los cactus producen frutos carnosos (bayas unicelulares) que sirve de alimento a los animales que los ingiere, cuando las semillas pasan por el tracto digestivo del animal reciben un tratamiento ácido que las prepara para la germinación y que son depositadas con las heces ya fertilizadas. Entre los animales encargados de la dispersión de las semillas son los murciélagos (Aragón & Aguirre, 2007), aves llamada percheras, lagartijas, mamíferos como cabras (dispersores primarios), roedores principalmente los ratones y las hormigas (Novoa *et al.*, 2003) como dispersores secundarios (Ostolaza, 2014)

Germinación

La germinación de las cactáceas es un proceso difícil debido en el medio donde se encuentran (Ordoñez, 2003), como la ausencia de lluvias, las altas temperaturas y por los potenciales depredadores (Ostolaza, 2014), así los frutos tengan numerosas semillas solo unas cuantas llegan a germinar y las plántulas que llegan a desarrollarse son las que sobreviven a las adversidades climáticas y biológicas Bravo, (1995) & CONABIO, (1997) citado por (Ordoñez, 2003). Por ende, la germinación de las semillas y la supervivencia de las cactáceas bebés ocurre bajo la protección de arbustos u otros cactus más grandes (planta nodriza) o bajo la protección de piedras (Huisa, 2015; Pisco, 2013; Muro, 2011).

2.2.2 Importancia de las cactáceas

Los cactus fueron aprovechadas desde hace muchos años, Ostolaza, (2014) considera diferentes usos, en las que se encuentran diferentes evidencias muy antiguas del consumo de los cactus en lo que se llamaba el horizonte Pre – agrícola que va desde 10000 a 6000 años de antigüedad, los hallazgos encontrados de Jhon Rick y Ramiro Matos quienes encontraron gran cantidad de semillas de *Opuntia sp* junto con los restos óseos de los camélidos cerca del Lago Junín a 4200 msnm, postulando que estos hallazgos encontrados muestran que fueron parte de la dieta de cazadores y recolectores de la puna, por otro lado se evidencian el consumo de frutos de *Neoraimondia arequipensis* consumidos por camélidos y zorros en una vasija Nazca y *Melocactus peruvianus* para consumo humano.

Los cactus tienen diferentes usos como pueden ser plantas ornamentales, jardines botánicos, en la alimentación (Castillo *et al.*, 2010), en artesanía, el empleo de la madera de cactus de

algunas especies arbóreas y la lana vegetal de algunas especies columnares, en cosmetología, en la medicina, uso utilitario y ceremonial Ostolaza, (2014). Ciertas plantas están clasificadas de acuerdo al criterio de uso como objeto mágico empleado en ceremonias o medicina tradicional. pero también habría plantas clasificadas usando un criterio de percepción: por oposición, por analogía o por correlación (Pizarro, 2014).

2.2.3 Amenaza y conservación de la familia cactaceae

Las causas principales que ponen en peligro a las cactáceas es la destrucción de hábitat (Álvarez *et al.*, 2004) como: tala ilegal que puede deberse a la presión demográfica, expansión urbana, ampliación de áreas de cultivo, explotación minera, construcción de carreteras, por otro lado, se tienen a la depredación o recolección abusiva con fines comerciales (Alanís & Velazco, 2008). La conservación es mantener la abundancia y la diversidad de las especies, junto con todo aquello que permita su supervivencia. En el Perú todavía se considera irrelevante, innecesario la conservación de cactus, sin embargo países como Brasil, Chile, Estados Unidos, México consideran importante la conservación de las cactáceas (Ostolaza, 2014).

Existen varias alternativas para la conservación de cactus fuera de su hábitat como la creación de pequeñas reservas municipales en los hábitats; por ejemplo el Parque Ecológico Regional de Selva Alegre en Arequipa que preserva *Cumulopuntia corotilla* y *Weberbauerocereus weberbaueri*, el rescate y cultivo ex – situ es una solución alternativa como es puesta en práctica por una empresa minera trasplantando a zonas protegidas a la especie *Matucana haynei* subsp *herzogiana* y *Oroya borchersii*, por otra parte el cultivo de tejidos y/o Banco de semillas es una opción más técnica e interesante por ejemplo en México ya se está haciendo el cultivo de tejidos siendo el país con mayor diversidad de cactáceas y muchas de ellas amenazadas y por ultimo tenemos la participación de la comunidad en la conservación siendo la mejor estrategia de conservación, en una gestión a largo plazo para proteger un determinado ecosistema con cactáceas (Ostolaza, 2014).

2.2.4 Descripción de la especie en estudio, *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza.

a) Clasificación taxonómica de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza

<p>Reino: Plantae</p> <p>División: Magnoliophyta</p> <p>Clase: Magnoliopsida</p> <p>Orden: Caryophyllales</p> <p>Familia: Cactaceae</p> <p>Subfamilia: Cactoideae</p> <p>Tribu: Notocactaeae</p> <p>Género: <i>Neowerdermannia</i></p> <p>Especie: <i>Neowerdermannia chilensis</i> subsp. <i>peruviana</i> (Ritter) Ostolaza.</p>	 
--	--

b) Características de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza

El cactus *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza, conocida como Towana o Achacana, es una planta silvestre de pequeño tamaño con forma globosa a romboidal y una coloración verde oscuro. Se desarrolla al ras del suelo, debido a que el tallo es algo aplanado, pero algunas veces el tallo es expuesto fuera del nivel del suelo por la erosión producida en la época lluviosa. El tallo tiene 8 a 14 cm de diámetro, la raíz es napiforme de 10 a 20 cm de longitud. Las costillas son espiraladas y tuberculadas y el número de costillas que presenta es de 15 a 30. Las espinas nacen de areolas, pueden ser largas y ligeramente encorvadas, generalmente son radiales de color blanco a blanco pálido y a veces

rojo claro, estas llegan a medir entre 2 a 3 cm de largo agrupándose de 4 a 6 por cada areola. La reproducción de las flores se da únicamente en el mes de diciembre, tomando un color rosado claro que miden de 20 a 25 mm de longitud, también pueden ser de color amarillos pálido con punta rojiza y por fuera rojo marrón. La fructificación se produce durante el mes de enero y presenta un fruto dehiscente con semillas ovales. (Montesinos, 2011) .

c) Importancia de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza

Estudio realizado por Montesinos (2011) en la Provincia General Sánchez Cerro – Moquegua, el 22% utilizan *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza con fines medicinales y el 77 % con fines alimenticios (Tabla 1), por lo que fue disminuyendo de las grandes extensiones del que se hallaba antiguamente. El estatus actual de conservación de la especie esta categorizado como: en peligro (EN) (UICN, 2001; León *et al.*, 2006) y citada en el Apéndice 2; D del CITES (Ministerio del Ambiente, 2018; UNEP WCMC, 2003) por otra parte Ostolaza (2014); Montesinos (2011); Arakaki *et al.*, (2006) registran esta especie en peligro de extinción, respecto al D.S. N° 043 – 2006 – AG clasificación oficial de especies amenazadas de flora silvestre no registra la especie (El Peruano, 2006) y en la Resolución Ministerial N° 0505 – 2016 – MINAGRI se registra como vulnerable (Ministerio de Agricultura y Riego, 2016), considero falta de actualización y tomé las referencias de UICN, 2001; León *et al.*, 2006 Ministerio del Ambiente, 2018; UNEP WCMC, 2003, Ostolaza 2014; Montesinos, 2011; Arakaki *et al.*, 2006 que consideran esta especie en peligro de extinción.

Tabla 1. Usos y propiedades medicinales de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza. Fuente Montesinos, (2011).

Uso medicinal	Uso alimenticio
Para intestinos, la planta se consume en cremas y sopas	Sopas, segundos
Hemorragias, se consume de manera fresca o en cremas	Consumo directo
Tónico, se consume en infusiones, mates	Mermelada
Riñones, se consume en ensaladas, purés o infusiones.	Postres

d) Distribución de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza

Ésta especie tiene una distribución en Moquegua (Chillihua, Torata, Moquegua y Ticaco) a 400 msnm y en Tacna (Challahuaya y Tarucachi) de 3400 a 3800 msnm (Figura 2) (Ostolaza, 2011), se considera endémico de estas regiones (Arakaki *et al.*, 2006).

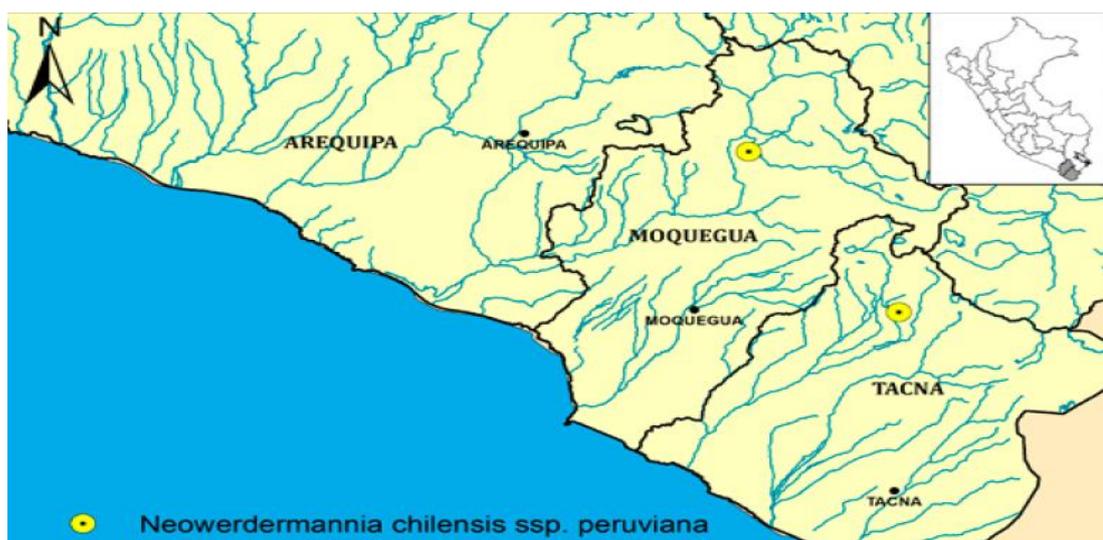


Figura 2. Distribución de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza. Fuente Ostolaza, (2014).

2.2.5 Cultivo *in vitro* de Tejidos vegetales

La biotecnología vegetal comprende diferentes técnicas que están a disposición del hombre; avances tecnológicos que está obligado a utilizar ya sea beneficio directo e indirecto, a forma de preservar y mejorar el ambiente natural (Ordoñez, 2003), es así que la propagación clonal o micropropagación es una aplicación por cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro* (herramienta biotecnológica), considerándose técnicas valiosas para la conservación de recursos fitogenéticos amenazadas (Ruvalcaba *et al.*, 2010)

El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas que permite el crecimiento de células o tejido en un medio nutritivo (Perea & Tirado, 1977), proporcionándole un ambiente favorable para el adecuado desarrollo de la planta (Ordoñez, 2003) y bajo condiciones asépticas, lo que implica la esterilización previa de los tejidos (Mateo & Urbano, 1988). Por su parte Álvarez (2011) define cultivo *in vitro* como un método de propagación de plantas que se ejecuta en laboratorio o en condiciones óptimas, consiste en cultivar un fragmento de

una planta (explante) en tubos o frascos de vidrio con un medio nutritivo teniendo en cuenta la asepsia, este método inicio en 1963 con plantas herbáceas y en la actualidad se utiliza en más de 30% de las plantas ornamentales que se cultivan en Europa. Además, Rodríguez (2011) considera importante el cultivo de tejidos vegetales siendo una técnica nueva y está a disposición del agricultor, pero no se profundiza su uso ya que es poco difundida.

Las técnicas del cultivo de tejidos resultan muy importantes y eficaz para la propagación de especies amenazadas, considerando a las cactáceas como la familia más trabajada con esta técnica para contrarrestar la pérdida de biodiversidad, debido a que las cactáceas tienen una gran destrucción de su hábitat por la acción del hombre. Generalmente se usa las semillas como material vegetal inicial porque son abundantes en el fruto, estos se desinfectan y se establecen fácilmente (Quiala *et al.* 2004).

2.2.5.1 Tipos de crecimiento *in vitro*

Crecimiento organizado: Consiste en la formación de nuevos órganos (brotes, raíz) a partir del explante seleccionado (Perea & Tirado, 1977), es decir, refiere al tipo de cultivo que inicia con una parte organizada de la planta (ápice, hojas, brotes, semillas, etc.) y este órgano sigue creciente *in vitro* manteniendo las características estructurales (Abdelnour & Vincent, 1994).

Crecimiento desorganizado: Se refiere a la inducción de callo y a la posterior formación de órganos (brotes, raíz) (Perea & Tirado, 1977). Por su parte (Abdelnour & Vincent, 1994) define que a partir de fragmentos de tejidos u órganos se producen un tejido sin estructuras específicas que contienen un número limitado de algunos tipos de células especializadas encontradas en una planta intacta. Un tejido desorganizado (callo) puede crecer con subcultivos y así se puede mantener durante varios meses o años, puede ser usado para iniciar suspensión de células y protoplastos.

2.2.5.2 Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales se han estandarizado como alternativa para la propagación vegetal y la ventaja más significativa ofreciendo por los métodos asépticos de propagación clonal (Álvarez, 2011) o conocida como micropropagación es la obtención de

gran número de plantas partiendo de un individuo, sin embargo, el cultivo de tejidos se puede aplicar para diversos fines como la micropropagación, la obtención de plantas libres de virus, mejoramiento genético y conservación de germoplasma (Perea & Tirado, 1977).

La multiplicación *in vitro* no crea procesos nuevos dentro de la planta, el cultivo de tejidos simplemente dirige y asiste el potencial natural de la planta y lo dispone para un nuevo crecimiento y reproducción de alta eficiencia, ya que estas tecnologías pueden ser una importante alternativa de solución a la producción sostenida de alimentos para las futuras generaciones (Rodríguez, 2011). Por su parte Chamba, (2017) indica la mejor opción para regenerar plantas en peligro de extinción es el uso de herramientas biotecnológicas como la micropropagación, misma que se constituye en una alternativa idónea para propagar plantas mediante las técnicas de cultivo *in vitro*.

La micropropagación es una herramienta de gran importancia (Rodríguez, 2011) tanto en la biotecnología experimental (especialmente en la biología de la regeneración y conservación) como en la producción hortícola (Mateo, 1990). Los métodos de micropropagación más popular de la familia cactaceae se basan en la activación de meristemas en areolas y regeneración adventicia de los brotes. En el futuro, la micropropagación de cactus, después del desarrollo de protocolos eficaces para la conversión de embriones somáticos, se puede usar la embriogénesis somática y los biorreactores, que permiten una producción de plantas de alto volumen a bajo costo (Lema & Kulus, 2014).

Etapas de la micropropagación

El proceso de micropropagación o propagación *in vitro* inicia con un explante y finaliza con la obtención de plantas completas, el cual comprende cuatro etapas principales:

Etapas 1. Establecimiento o iniciación, esta etapa tiene la finalidad de establecer cultivos axénicos y viables, teniendo en cuenta los principales procesos a controlar la selección, el aislamiento y la esterilización.

Etapas 2. Multiplicación de Brotes, la finalidad de esta etapa es mantener e incrementar la cantidad de brotes para los siguientes ciclos de multiplicación sucesivos (sub cultivos).

Etapa 3. Enraizamiento, donde se produce la formación de raíces, el enraizamiento puede llevarse en condiciones *in vitro* como *ex vitro*.

Etapa 4. Aclimatación, los explantes que hayan enraizado son llevados a invernadero, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso depende de la adaptación ya la que las plántulas son muy sensibles a los cambios ambientales (Perea & Tirado, 1977; Levitus *et al.*, 2010).

2.2.5.3 Factores que influyen en el cultivo *in vitro*

a) El explante

El cultivo de tejidos básicamente se inicia con el empleo de pequeñas porciones u órganos de cualquier parte de la planta denominados explantes (Perea & Tirado, 1977), sin embargo, la elección del explante idóneo constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos (Ordoñez, 2003), por lo que se recomienda coleccionar explantes primarios a campo durante la temporada primaveral y estival, cuando existe brotación activa de las yemas, ya que las yemas en dormición ocasionan serios problemas de contaminación (Levitus *et al.*, 2010).

b) Métodos asépticos

Generalmente las plantas se encuentran contaminadas por microorganismos, pero en ambientes naturales no son patógenos, sin embargo, cuando el tejido es cultivado *in vitro*, el crecimiento de los microorganismos limita el desarrollo de las células (Ordoñez, 2003). Esto debido a la asociación explante – medio de cultivo – condiciones físicas de incubación, siendo favorable para la proliferación de patógenos (hongos y bacterias), por lo que puede provocar la destrucción del explante porque compiten por los nutrientes del medio de cultivo (Levitus *et al.*, 2010)

Habitualmente para la desinfección del material vegetal consiste en la inmersión de los explantes en etanol 70% por 20 a 60 segundos, seguido de hipoclorito de sodio 1 a 3 % o hipoclorito de calcio 6 a 12 % durante 3 a 30 minutos depende del explante, la efectividad de los agentes desinfectantes puede ser mejorada adicionando bajas cantidades de Tween – 20

0.01 a 0.1 % o unas gotas de Trion, finalmente después de desinfectar es necesario enjuagar con agua destilada estéril por lo menos 3 veces para quitar los restos del producto, esto trabajando en la cámara de flujo laminar (Levitus *et al.*, 2010).

c) Medio de cultivo

Para el éxito del cultivo de tejidos vegetales, depende mucho de la composición química de los medios de cultivo y factores ambientales, las plantas para que puedan crecer y desarrollarse deben de absorber cuantía de macronutrientes y micronutrientes (Rodríguez, 2011). El medio de cultivo son combinaciones de sales inorgánicas, carbohidratos, usualmente la sacarosa (Álvarez, 2011) para reemplazar el carbono que la planta fija normalmente de la atmosfera por medio de la fotosíntesis, además contiene compuestos orgánicos como vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento en cantidades mínimas, el cual es adecuado para un normal crecimiento de las plántulas *in vitro* (Ordoñez, 2003).

Existen una variedad de medios empleados en el cultivo de tejidos vegetales (Perea & Tirado, 1977), sin embargo, el medio Murashige & Skoog (MS) es un medio básico, generalmente referido como aquel que no contiene reguladores de crecimiento y se le denomina así con frecuencia con el apellido de las personas que lo elaboraron por primera vez, además, es el medio ampliamente utilizado en la actualidad (Ordoñez, 2003).

El medio de cultivo básicamente está constituido de los siguientes componentes:

Sales inorgánicas

Para el buen crecimiento de una plántula *in vitro*, son necesarias una cantidad importante de los siguientes elementos:

- **Macronutrientes**, son seis elementos que requiere las células vegetales para lograr un crecimiento adecuado, así como: nitrógeno (N), fosforo (P), Potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S) (Perea & Tirado, 1977).

- Micronutrientes también conocidos como oligoelementos, considerados esenciales para el desarrollo de las plantas, así como: hierro (Fe), zinc (Zn), Boro (B), cobre (Cu), molibdeno (Mo), manganeso (Mn) y cobalto (Co) (Perea & Tirado, 1977).

Compuestos orgánicos

En esta categoría se encuentran sustancias como carbohidratos, hormonas o reguladores de crecimiento, vitaminas y otros compuestos como aminoácidos, amidas, purinas, pirimidinas y ácidos orgánicos.

Carbohidratos

Son las sustancias orgánicas como el azúcar (Rodríguez, 2011), que provee tres elementos esenciales: Hidrógeno (H), Carbono (C) y Oxígeno (O). El azúcar es producto de la fotosíntesis, proceso por medio del cual la planta transforma el dióxido de carbono y agua en carbohidratos con la ayuda de la clorofila y la luz (Abdelnour & Vincent, 1994). Sin embargo, pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, debido a la baja intensidad lumínica y no pueden fabricar todo el azúcar que requieren, por lo que necesitan altas concentraciones de sacarosa, siendo la fuente de carbono la sacarosa y la glucosa la más utilizada, pero se puede emplear otros carbohidratos como fructuosa, lactosa, dextrosa, maltosa y galactosa, pero sus efectos son inferiores (Abdelnour & Vincent, 1994; Ordoñez, 2003).

Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento son sustancias que actúan sobre el desarrollo de las plantas (Mateo, 1990) y generalmente son activas a muy pocas concentraciones, considerando las auxinas y citoquininas que juegan un papel muy importante (Caetano, 2012) y es algo que depende del tipo de explante y de la especie vegetal. La proporción y la cantidad de las citocininas y auxinas son importantes, teniendo la siguiente función: para la formación de brotes se requiere mayor citocinina que auxina ($\text{auxina} < \text{citocinina}$), para la formación de raíces se requiere mayor auxina que citocinina ($\text{auxina} > \text{citocinina}$) y para la diferenciación de callo se requiere concentraciones iguales ($\text{auxina} = \text{citocinina}$) (Baldetti, 2002).

Auxinas

Las auxinas se encuentran universalmente presentes en la planta, son sintetizadas en los ápices meristemáticos y en menor cantidad en las raíces de la planta (Mateo, 1990). El ácido indol acético (AIA) es la principal auxina sintetizada de forma natural por la planta y otras como ácido fenilacético, los cloroindoles. Entre las auxinas más utilizadas en los cultivos de tejidos vegetales se encuentra 2,4-D, ANA, AIB (Rodríguez, 2011) estas auxinas deben ser utilizadas en bajas concentraciones con la finalidad de no causar efectos inhibitorios ni atrofas en células y tejidos. Algunos de los efectos que tiene las auxinas en las plantas son: dominancia apical, promoción de la formación de raíces adventicias en pequeñas cantidades, estimula el alargamiento y división celular, participación en respuestas trópicas (geotropismo y fototropismo), regulación de la formación floral (Perea & Tirado, 1977).

Citoquininas o citocinina

El descubrimiento de estas se debe principalmente a los estudios que se realizaron en cultivos *in vitro*. Las citoquininas en combinación con las auxinas provocan la formación de masas celulares indiferenciados denominados callos, también estimulan el desarrollo de las yemas laterales cuando se aplica exógenamente, rompiendo la dominancia apical (Mateo, 1990). Las citoquininas son hormonas vegetales naturales que derivan de adeninas o purinas, las principales citocininas utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales son: 6-bencilaminopurina (BAP), thiadiazuron phenyl-3, TDZ, kinetina, 6-benciladenina (BA), 2-isopentil, 2-iP. Es considerado el responsable de los procesos de división celular, entre los que se encuentran la formación y crecimiento de brote axilares, la germinación de semillas, la maduración de cloroplastos, la diferenciación celular y también el control de varios procesos vegetales como el retardo de la senescencia, desarrollo de tallos laterales o caulogénesis e inducción de partenocarpia. Cuando la proporción citocinina/auxina es alta favorece la formación de tallos y si es baja favorece el enraizamiento (Perea & Tirado 1977).

Giberelinas

Las giberelinas son terpenos, su síntesis se produce en todos los tejidos de los diferentes órganos. El ácido giberélico (AG3) es el más usado (Mateo 1990), son en parte responsables de la división celular. La función de las giberelinas es el incremento en el crecimiento de

tallos, la inducción de la brotación de yemas, promueve el desarrollo de frutos, rompimiento de dormancia en las semillas de algunas especies, influencia en el periodo juvenil (Perea & Tirado 1977).

Vitaminas

Son necesarios para llevar serie de reacciones en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades. Las plántulas sintetizan sus propias vitaminas, pero no son suficientes para su desarrollo (Mateo, 1990), por lo que es importante agregar en un medio de cultivo, así como la tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, mio-inositol. En algunos casos el ácido ascórbico y ácido cítrico son añadidos en el medio de cultivo, pero no como vitamina sino como un agente antioxidante para evitar la formación de sustancias similares a la melanina (pigmento oscuro), que inhibe el crecimiento (Rodríguez, 2011)

Agentes solidificantes

El medio de cultivo generalmente contiene agentes gelificantes (ya sea sólidos o semisólidos) sin embargo, en determinados casos el empleo de compuestos gelificantes es importante para brindar soporte a la planta. Los más conocidos son agar -agar y Phytigel o gelrite. (Perea & Tirado 1997; Ordoñez, 2003; Rodríguez, 2011).

Agua

En los medios de cultivo se utiliza agua destilada o bidestilada, siendo muy importante la calidad del agua empleada para realizar los medios de cultivo (Ordoñez, 2003).

d) Condiciones ambientales para la incubación.

Es importante llevar a condiciones controladas la incubación de los cultivos vegetales, principalmente la temperatura, calidad e intensidad de luz, fotoperiodo y humedad atmosférica. Generalmente los cultivos son incubados a 25 – 28 °C de temperatura, con 16/8 horas luz/oscuridad, la luz es provista por lámparas fluorescentes del tipo “luz día” con una irradiancia de entre 50 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y la humedad relativa de entre 80 – 90 % (Levitus *et al.*, 2010).

2.2.5.4 Problemas del cultivo *in vitro*

Existen dos problemas cruciales para el gran éxito del cultivo *in vitro*, siendo estos la contaminación y la oxidación u oscurecimiento de los tejidos vegetales.

Contaminación

Godínez, (2017) indica que los microorganismos endófitos pasan toda su vida o parte de ella dentro de la raíz, el tallo, las hojas o las semillas de las plantas sin causarles daño o enfermedad, al contrario, ayuda a soportar el estrés causado por la falta de agua, la alta salinidad, el bajo contenido de nutrientes, la presencia de metales pesados, también promueven el crecimiento de las plantas, controlan los patógenos. Las plantas que fueron estudiadas *Atriplex canescens*, *Bouteloua eripoda*, *Cereus jamacaru*, *Mammillaria fraileana*, *Melocactus Zehntneri* y *Pachycereus pringlei*, en las cuales se identificaron algunas bacterias y hongos endófitos como *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Aspergillus* y *Penicillium*. Estos endófitos presentan ácidos orgánicos que degradan las rocas y la degradación de estas rocas contribuye a la formación del suelo y liberación de minerales que necesitan las plantas para establecer y crecer. Además, otros endófitos fueron capaces de fijar nitrógeno atmosférico un nutriente esencial para el crecimiento de las plantas siendo poco disponible en el suelo.

Sin embargo, en el cultivo *in vitro* estos microorganismos compiten por los nutrientes con el explante del medio de cultivo, por ende, un problema muy común es la contaminación por microorganismos, ya que hace ineficiente muchos procesos en el cultivo de tejidos vegetales y generalmente estos microorganismos son hongos filamentosos, bacterias y levaduras. Los métodos de desinfección utilizados no siempre eliminan microorganismos asociados a los tejidos de las plantas *in vitro*, ya que muchos son capaces de permanecer latentes en el interior de las células o en espacios intercelulares, lo otro es la ineficiente desinfección de los explantes primarios (laboratorio) en la fase de establecimiento o fallos de la cabina de flujo laminar. El alcohol es utilizado como un pretratamiento para la desinfección con hipoclorito por que se ha demostrado que facilita su penetración en las plantas. Entre los antibióticos y fungicidas más empleadas son cefotaxima (claforan), rifampicina, gentamicina, anfotericin B, benomil, carbendazim, etc. (Alvarado, 2000).

Por su parte Levitus *et al.*, (2010) indica que existen dos fuentes de contaminación, una que los microorganismos estén presentes en el interior o en la superficie de los explantes y otro por las fallas en los procedimientos de cultivo en laboratorio, entonces para evitar la contaminación de los cultivos es necesario conocer el material vegetal y proceder a la desinfección superficial de los explantes utilizando compuestos químicos para eliminar los microorganismos, pero a la vez que no dañe los explantes.

Oxidación

La oxidación es el proceso mediante el cual traspasan electrones (fenoles) a otras moléculas o sustancias químicas (aminoácidos, carbohidratos, proteínas) causando su oxidación (Perea & Tirado, 1977). Asimismo en la etapa de establecimiento *in vitro*, una vez cortada los explantes inician un oscurecimiento (Azofeifa, 2009) o generalmente los explantes se tornan de color marrón o negruzco, lo que inhibe el crecimiento y el tejido generalmente muere (Rodríguez, 2011) Pero este problema puede prevenirse utilizando antioxidantes, los antioxidantes son compuestos sintéticos o naturales cuya función principal es estabilizar o reducir las reacciones de oxidación. Los antioxidantes utilizados son carbón activado, L-cisteína, fluoroglucinol, ácido cítrico, ácido ascórbico y polivinil pirrolidona (pvp).

Una revisión bibliográfica realizada por Azofeifa, (2009) relacionado al oscurecimiento de los explantes cultivados *in vitro*, siendo uno de los problemas más serios y frecuentes donde reporta que existe diferentes estrategias para evitar o disminuir los problemas oxidativos que ocurren en los explantes así como el uso de explantes en estado juvenil o en crecimiento activo, crecimiento del explante a baja luminosidad o en oscuridad y baja temperatura, subcultivos frecuentes, cultivo en medio líquido, uso de absorbentes, uso de antioxidantes, elección del medio de cultivo, elección de los reguladores de crecimiento, cambio del potencial osmótico del medio de cultivo, pH del medio de cultivo bajo.

Trabajo realizado en Cuba por Concepción *et al.*, (2005) donde estudiaron el efecto de tres agentes antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*Psidium guayava* L.), obtuvieron los niveles más bajos de fenolización con uso de PVPP (0.5%) pero mostró valores altos de contaminación, mientras que la mezcla de ácido ascórbico (150 mg/L) +

ácido cítrico (200 mg/L) en los que la fenolización es bastante alta a pesar de tener niveles de contaminación baja, no indica el motivo del porque se contaminó.

2.2.5.5 Ventajas y desventajas del cultivo *in vitro*

Ventajas que ofrece el cultivo *in vitro*

- Es uno de los métodos más utilizados para erradicar patógenos, es decir, permite obtener plantas libres de enfermedades (hongos, bacterias, micoplasmas, virus).
- La micropropagación vegetal permite propagar masivamente de plantas libres de enfermedades en corto tiempo y en cualquier época del año, conservando su potencial genético y calidad sanitaria.
- Facilita el cultivo de un gran número de plantas en una superficie pequeña.
- Puede conservar material biológico por periodo de tiempo prolongados.
- Reduce el riesgo de pérdidas genéticas al evitar la mezcla del material por cruzamiento.

Desventajas del cultivo *in vitro*

- Requiere de personal especializado
- Requiere de infraestructura y equipamiento
- Los productos químicos son de elevado costo.

2.3 MARCO CONCEPTUAL

Asepsia: Libre de cualquier microorganismo (hongos, bacterias, levaduras, virus, micoplasma, etc.).

Biotecnología: La palabra biotecnología proviene de tres vocablos griegos: bio (vida), tecno (arte) y logo (tratado) (Ramirez, 2008). Es una ciencia aplicada a la aplicación de procesos biológicos desarrollados por células animales, vegetales o microbianas a la ingeniería para la obtención de bienes y servicios (Herrera, 2010).

Biotecnología vegetal: permite la transferencia de una mayor variedad de información genética de una manera más precisa y controlada. Tiene la finalidad de mejorar distintas plantas para obtener variedades con características deseadas.

Cultivo *in vitro*: es un método que se realiza en laboratorio y consiste en tomar un trozo de hoja, embrión, tallo o cualquier otra parte de la planta y ponerla en un medio nutritivo.

Cultivo de tejidos: Cultivo de protoplastos, células, tejidos, órganos, embriones o semillas *in vitro*.

Callo: El callo se produce a consecuencia de una herida, es un tejido cicatricial generalmente homogéneo, formando células que se dividen activamente. En el cultivo *in vitro*, el callo es el tejido de neoformación producido por el explante inicial o, como consecuencia, de trasplantes sucesivos. A veces, su formación resulta de la interrupción de la inhibición consecuencia a la separación del explante y de la acción estimuladora de sustancias tróficas (medio mineral, azúcares, etc.) y de los reguladores de crecimiento (auxinas, citoquininas, etc.) del medio de cultivo. Tejido no organizado, formados por células diferenciadas y no diferenciadas, que se dividen de forma activa y que generalmente se originan en zonas dañadas por heridas, o en cultivo de tejidos.

Desinfección: Muerte de microorganismos.

Estéril: Medio u objeto que no contiene microorganismos perceptibles o viables. Son necesarias pruebas de esterilidad para comprobación.

Esterilización: Procedimiento para la eliminación de microorganismos.

Esterilizar: Eliminación de microorganismos, como, por ejemplo, por medio de sustancias químicas, calor, erradicación o filtración.

Explante: Fragmento de un tejido vivo separado de su órgano propio y transferido a un medio artificial en crecimiento.

In vitro: Se aplica al cultivo estéril de organismos, órganos, tejidos y células en recipientes, en laboratorio, así como a las preparaciones de extractos celulares (organitos, preparaciones enzimáticas, etc.). literalmente en vidrio, en un tubo de ensayo, matraz, etc.

Totipotencia celular: Cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa, es decir, la capacidad que tiene una célula para regenerar una planta completa, es decir, la potencialidad de las células o tejidos para formar todo tipo de células y/o regenerar una planta.

Planta madre: Es del cual se obtiene esquejes o yemas para producir clones o plantas hijas.

Propagación *in vitro* o micropropagación: Es un conjunto de técnicas y métodos del cultivo *in vitro*, utilizado para multiplicar plantas asexualmente, es decir, que a partir de un fragmento (explante) de una parte de la planta madre se produzcan plantas genéticamente idénticas en condiciones de asepsia, de forma rápida y en grandes cantidades.

Morfogénesis: Es el proceso de morfogénesis es la fase más importante de los sistemas *in vitro*, se fundamenta en la capacidad de las células vegetales para dar origen a la diferenciación celular, así como a la capacidad de dediferenciación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE ESTUDIO

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno, cuya ubicación geográfica y política es la siguiente:

Altitud : 3824 m.s.n.m.

Latitud sur : 15° 49´

Longitud oeste : 70° 01´

Distrito : Puno

Provincia : Puno

Región : Puno

Zona agroecológica : Circunlacustre

3.2 PERIODO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

El tiempo de ejecución de este trabajo de investigación fue de 1 año con 5 meses equivalente a 17 meses (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción de los procesos de ejecución del trabajo de investigación.

Descripción	Tiempo
Recolección de la especie en campo	8 de septiembre del 2017
Pruebas de establecimiento y propagación <i>in vitro</i>	Octubre del 2017 a mayo 2018
Establecimiento de <i>Neowerdermannia chilensis</i> subsp. <i>peruviana</i> (Ritter) Ostolaza	Junio 2018 a septiembre 2018
Propagación <i>in vitro</i> de <i>Neowerdermannia chilensis subsp peruviana</i> (Ritter) Ostolaza	Septiembre 2018 a enero 2019

3.3 MATERIAL VEGETAL INICIAL

El material biológico inicial estuvo constituido por 6 ejemplares de la especie *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza, los cuales fueron recolectados el 8 de septiembre del 2017 en el Departamento de Tacna de la Provincia de Tarata, del Distrito de Tarucachi, con coordenadas 17°31'35" S 70°01'44" O.

Los ejemplares se recolectaron del cerro llamado Tiquisani ubicado a 3200 metros aproximadamente de distancia del pueblo de Tarucachi. Para lo cual se tuvo el apoyo del sr. Florentino Calizaya y 3 personas voluntarios, que nos trasladaron en una camioneta al lugar donde se podía encontrar esta especie. Para la extracción de los ejemplares de la especie se utilizó una barreta (1.50 m de altura) y un pico, luego fueron colocadas en un balde con material rocoso y tierra del lugar, con un GPS marca Garmin 64S se registró las coordenadas del lugar: UTM de 0393730 – 8061244 a 3429 msnm (Figura 3).

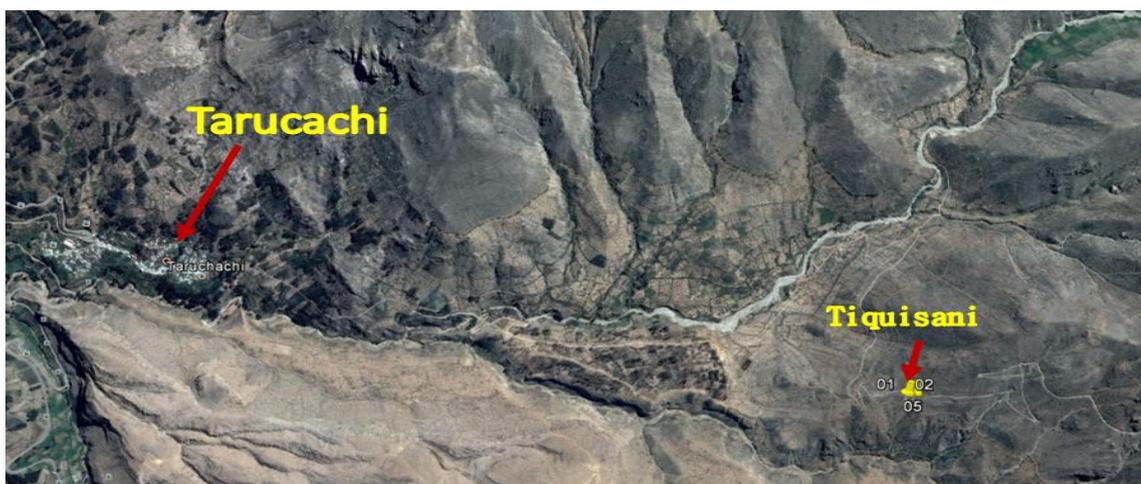


Figura 3. Lugar de recolección de la especie *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza. Distrito de Tarucachi – Tacna, septiembre 2017. Fuente Google Earth.

Una vez extraída los 6 ejemplares, estas fueron trasladadas al Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno, donde se les cultivo en balde y algunas botellas que sirvieron como macetero, utilizando como sustrato la tierra y pequeñas rocas proveniente del lugar de donde se extrajo la planta.

Los explantes usados para este trabajo de investigación fueron obtenidos a partir de semillas germinadas. La colecta de las semillas fue de noviembre 2017 a febrero 2018 de las plantas que llegaron a florecer en el Laboratorio de cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales (Figura 4).



Figura 4. Flor (octubre 2017) y semillas de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales - Puno, noviembre 2017.

3.4 METODOLOGÍA

3.4.1 Evaluación de la respuesta morfológica de las plántulas de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza (Cactaceae) inducido al medio Murashige y Skoog para la propagación *in vitro*.

Etapa 1: Establecimiento o iniciación:

3.4.1.1 Frecuencia y muestreo

Las evaluaciones o muestreos de los experimentos para el establecimiento de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza se realizaron una vez a la semana por un periodo de 4 meses.

3.4.1.2 Descripción detallada del uso los equipos, materiales e insumos

Colecta de semillas

Las semillas fueron recolectadas entre los meses de noviembre 2017 a febrero 2018 de las plantas que llegaron a florecer en laboratorio. Estas semillas fueron guardadas hasta la fecha de su uso, envolviéndose con papel (Figura 5).



Figura 5. Imagen a la izquierda, fruto de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza con semillas agrupadas y la imagen a la derecha las semillas que miden 1 mm aproximadamente. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, febrero 2018.

Cultivo de semillas

Las semillas obtenidas fueron remojadas por 48 horas en un recipiente de plástico conteniendo agua destilada, las semillas consideradas como viables fueron aquellas que estaban asentadas en el fondo del recipiente y las semillas flotantes no fueron consideradas para el experimento por la apariencia de ausencia del embrión (Figura 6). Se provocó la germinación en placas Petri utilizando como sustrato el algodón humedecido con agua destilada.



Figura 6. Las semillas de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza remojadas por 48 horas. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales - Puno, junio 2018.

Preparación de medio de cultivo para la iniciación

El medio de cultivo base para la experimentación fue el Murashige y Skoog (MS). Se preparó 200 ml de medio de cultivo para esta etapa.

En un Beaker con 100 ml de agua destilada se agregó 0.882 g de Murashige y Skoog (MS) y agitar suavemente en forma circular luego se le agregó 6 g de azúcar blanca y agitar, por último, se adicionó 1.4 g de agar - agar (gelificante) agregándole 100 ml de agua destilada. Se Disolvió todo este procedimiento en la coccinilla eléctrica, provocando un hervor hasta que el gelificante se disuelva y no forme grumos. Se mide el pH ajustando a 5.7 utilizando un peachimetro. Luego repartir el medio en frascos con 25 ml de medio de cultivo cubriendo la boca de los frascos con papel aluminio, enseguida se autoclavó a 121°C y 15 libras de presión durante 20 minutos. Finalmente retirar los frascos y guardarlos en la refrigeradora a 4°C hasta su utilización. Para pesar los insumos requeridos se utilizó en una balanza analítica.

Cultivo *in vitro* de plántulas

Después de 20 días de germinación de las semillas las plántulas se transfirieron al medio de cultivo Murashige & Skoog. Antes de realizar este trabajo se desinfectó superficialmente la cámara de flujo laminar para mantener condiciones asépticas, utilizando alcohol al 70% e hipoclorito de calcio, luego encender los rayos UV por 15 minutos y enseguida esterilizar los materiales como: pinzas y bisturís a fuego con mechero hasta alcanzar un rojo vivo luego dejarlas enfriar para su uso.

a) Desinfección de plántulas:

Se enjuagó con agua jabonosa, luego con abundante agua de caño. Enseguida lavar con agua destilada por 3 minutos, después inmersión en alcohol 70% por 1 minuto y enjuagar con agua destilada estéril finalmente, la inmersión en hipoclorito de calcio por 8 minutos y enjuagar con agua destilada estéril por 3 veces (Figura 7).

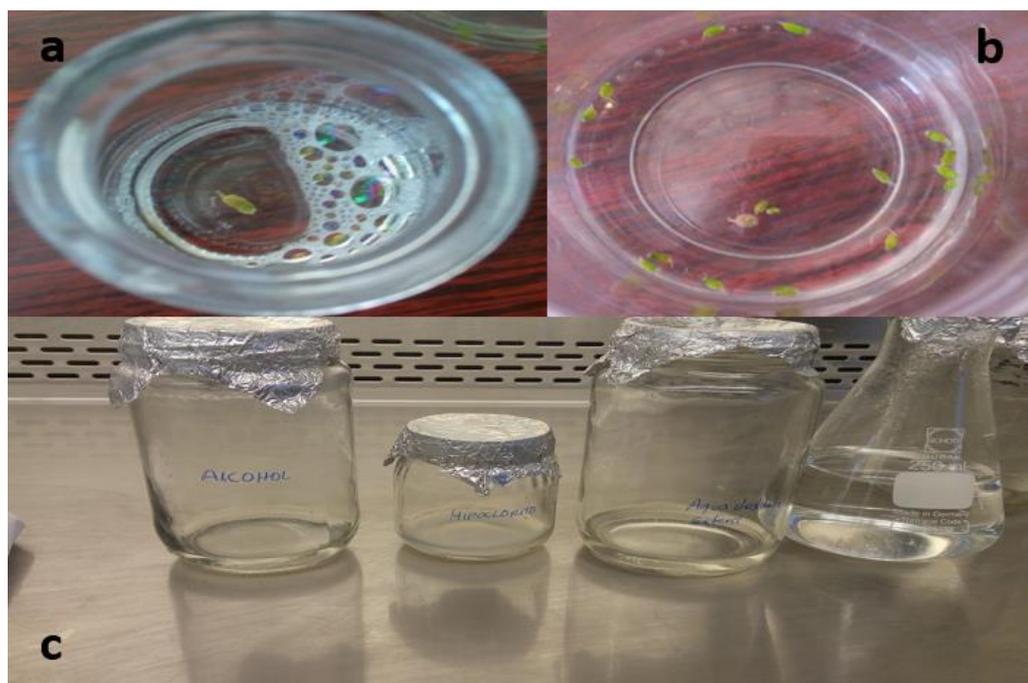


Figura 7. Desinfección de plántulas germinadas. a) enjuague en agua jabonosa, b) lavado de plántulas en agua destilada y c) desinfección con alcohol 70%, hipoclorito de calcio y agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, julio 2018.

b) Cultivo de plántulas

Este proceso se trabajó en la cámara de flujo laminar previamente desinfectada externamente con alcohol al 70% e Hipoclorito de calcio. Las plántulas ya desinfectadas fueron colocadas sobre unas hojas esterilizadas dentro de una placa de petri (Figura 8 a), para luego cultivarlas. Antes de cultivarlas se adicionó una pequeña cantidad de cefotaxima (antibiótico) a todos los frascos con medio de cultivo. Las plántulas se cultivaron en tres frascos cada frasco con 25 ml de medio de cultivo Murashige y Skoog (MS). En cada frasco con un número de 5 a 7 plántulas. Los frascos se sellaron con plastic wrap utilizando las ligas y finalmente con Parafilm sellando por todo el borde de la boca del frasco y luego se identificaron con nombre de la especie y la fecha de siembra (Figura 8 b).

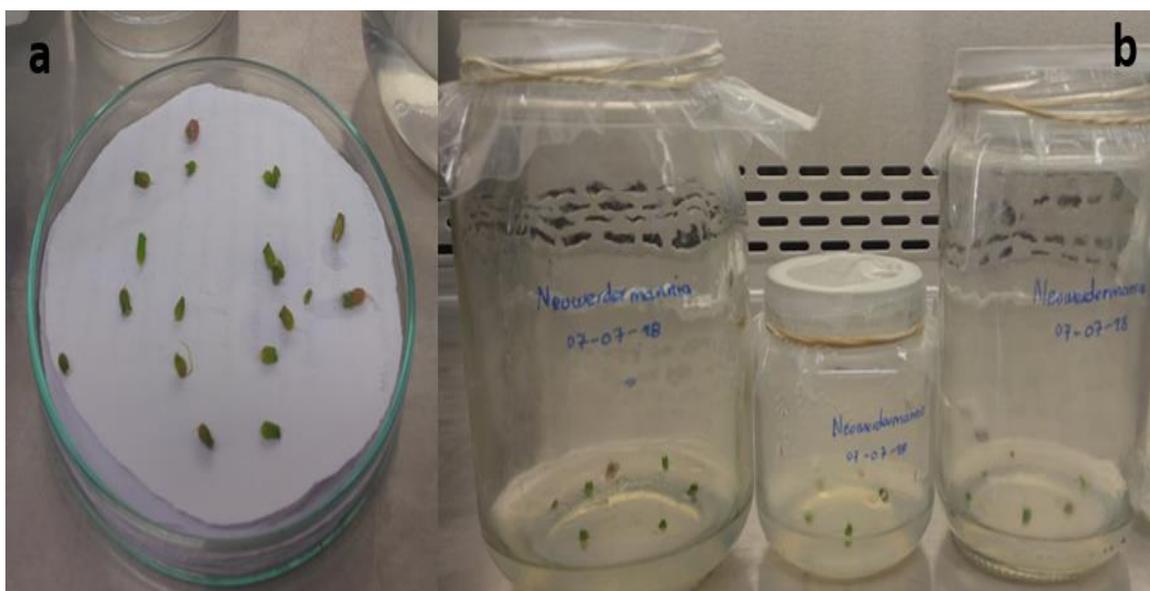


Figura 8. Introducción de plántulas al medio de cultivo Murashige y Skoog (MS). a) Plántulas sobre hoja esterilizada, b) Plántulas en medio de cultivo Murashige y Skoog. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, julio 2018.

No se logró realizar una muestra testigo, es decir las plántulas obtenidas en la germinación no fueron cultivadas en tierra, debido a la poca disponibilidad de semillas y de las plántulas germinadas, por lo que solo se utilizaron para el cultivo *in vitro*, entonces no se ha logrado hacer una diferencia entre el cultivo *in vitro* y el cultivo en condiciones naturales. Pero la familia cactácea en general tiene un crecimiento lento debido en las condiciones en las que se encuentran como indica Ojeda *et al.*, (2008) el método de propagación *in vitro* es una herramienta importante en la familia cactácea ya que en condiciones naturales son de lento crecimiento y de baja germinación en su hábitat natural.

Condiciones de incubación

Una vez realizada la introducción, los frascos se llevaron a la cámara de crecimiento o cuarto de crecimiento, bajo condiciones ambientales controladas. Con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, a una intensidad lumínica 2500 Lm (focos Philips TL RS made in USA de 40 W/54-765), a una temperatura de 25 – 30 °C.

3.4.1.3 Variables a evaluar

- Porcentaje de germinación: Se obtuvo a través de la siguiente fórmula:

$$PG = \frac{SG}{TS} * 100$$

Donde:

PG = Porcentaje de germinación

SG = Número de semillas germinadas

TS = Número total de semillas

- Porcentaje de contaminación: Se considero contaminado a aquellos frascos en las que se observó hongos o bacterias, determinándose con la siguiente fórmula:

$$PC = \frac{FC}{TF} * 100$$

Donde:

PC = Porcentaje de contaminación

FC = Número de frascos contaminados

TF = Número total de frascos

- Altura de las plántulas: Para medir la altura de las plántulas se utilizó una regla, y se midió de la siguiente manera; la regla fue apegada a la pared del frasco externamente y se marcó 0 cm al nivel del medio de cultivo (Figura 9). Se realizó de esta manera para evitar la contaminación al extraer del medio, ya que las mediciones se realizaron por 2 meses con 15 días, entonces se optó por realizar las mediciones externamente sin perjudicar el crecimiento de las plántulas.
- Número de areolas por plántula: De igual manera se contabilizaron el número de areolas por plántula externamente.
- Tiempo de desarrollo de las plántulas: Cada semana o 1 una vez a la semana se tomaron las evaluaciones de la altura de las plántulas y para que llegarán a medir 0.8 en promedio se requirió 76 días equivalente a 2 meses con 15 días.

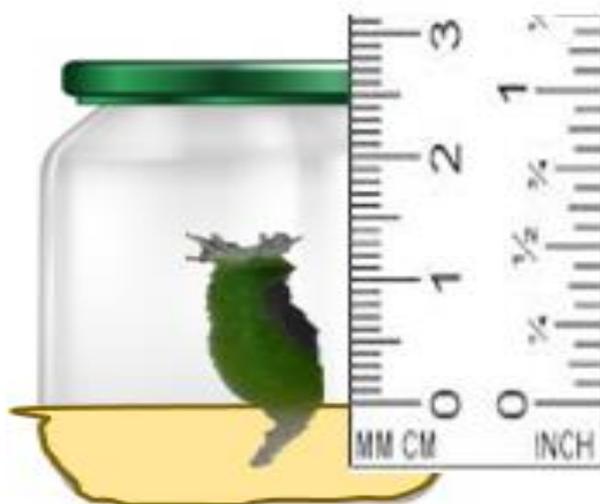


Figura 9. Método de evaluación para medir las plántulas de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza, Huanca (2019).

3.4.1.4 Aplicación estadística

Para este objetivo el estadístico utilizado fue la Correlación de Spearman, para medir el grado de asociación entre el número de areolas y la altura de las plántulas cultivadas en el medio de cultivo MS, con el programa estadístico software INFOSTAT.

3.4.2 Propagación *in vitro* tejidos morfológicamente viables de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza (Cactaceae) a concentraciones combinadas de ANA: 0.0 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L y BAP: 1.0 mg/L 2.0 mg/L, 3.0 mg/L.

Etapas 2. Multiplicación de brotes.

3.4.2.1 Frecuencia y muestreo

Las evaluaciones o muestreos de los experimentos para la propagación *in vitro* de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza se realizaron una vez a la semana por un periodo de 4 meses.

3.4.2.2 Descripción detallada del uso de los equipos, materiales e insumos

Para la etapa de multiplicación de brotes, primeramente, se obtuvo la inducción de tejido calloso luego la formación de brotes, que se detalla en lo siguiente:

a) Inducción de callos

Preparación de medio de cultivo Murashige & Skoog suplementado con ANA y BAP

El medio de cultivo base para la experimentación fue el Murashige y Skoog al cual se le adicionó diferentes concentraciones de ANA y BAP (Reguladores de crecimiento) (Tabla 3). Se preparó 1000 ml de medio de cultivo.

En un Beaker con 500 ml de agua destilada se agregó 4.43 g de MS y agitar suavemente en forma circular luego se le agregó 30 g de azúcar blanca y agitar, después se adicionó 7 g de agar - agar (gelificante) y 500ml de agua destilada. Finalmente se disolvió todo este procedimiento en la cocinilla eléctrica provocando un hervor hasta que el gelificante se disuelva y no forme grumos. Se mide el pH ajustando a 5.7 utilizando un peachimetro.

Se pesó los reguladores de crecimiento (ANA y BAP) para cada tratamiento en la que se utilizó 10 matraz Erlenmeyer de 250 ml. Repartir el medio de cultivo Murashige y Skoog en los 10 matraz Erlenmeyer, cada uno a 100 ml (Figura 10). Una vez distribuida el medio de cultivo en cada matraz Erlenmeyer agitar suavemente en forma circular para que se disuelva los reguladores de crecimiento, enseguida se repartió a los frascos de vidrio luego la boca de los frascos fue cubierta con papel aluminio. Los frascos fueron previamente desinfectados interna y externamente con alcohol al 70% antes de su uso. Finalmente, autoclavar a 121°C y 15 libras de presión durante 20 minutos luego retirar los frascos y guardarlos en la refrigeradora a 4°C hasta su utilización. Para pesar todos los insumos se utilizó una balanza analítica.

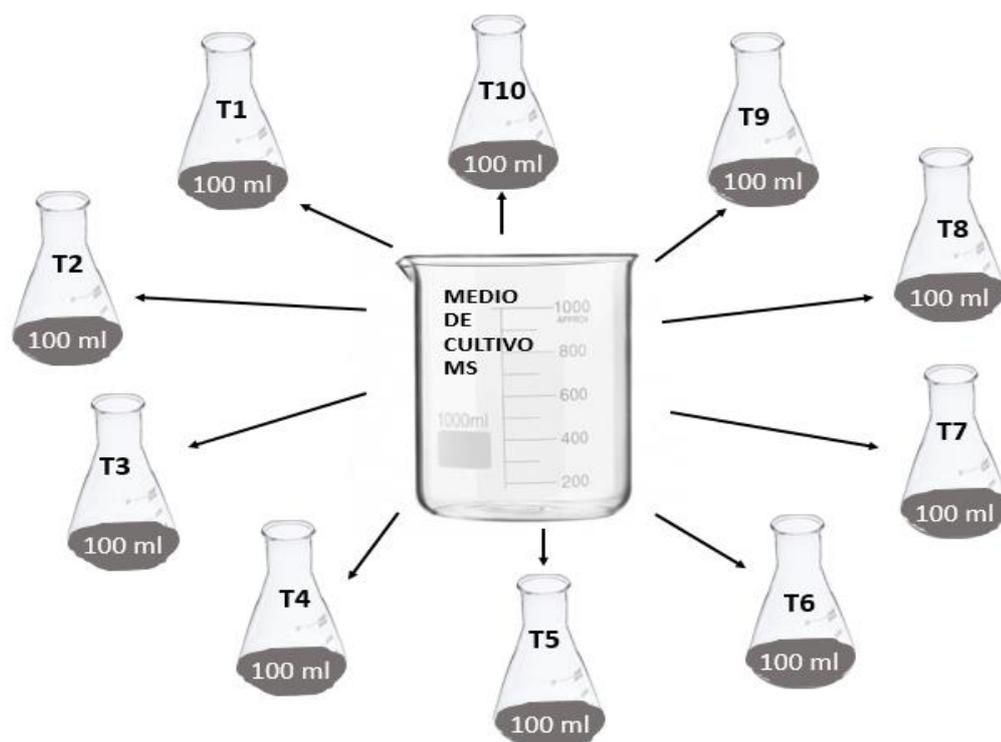


Figura 10. Distribución de medio de cultivo Murashige y Skoog al matraz Erlenmeyer que contiene diferentes concentraciones de ANA y BAP (Reguladores de crecimiento). Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, agosto 2018.

Tabla 3. Combinaciones de diferentes concentraciones de BAP (Bencilaminopurina) y ANA (Ácido naftalenacético) en los tratamientos. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, agosto 2018

Tratamiento	Reguladores de crecimiento	
	BAP mg/L	ANA mg/L
1	0.0	0.0
2	1.0	0.0
3	1.0	0.5
4	1.0	1.0
5	2.0	0.0
6	2.0	0.5
7	2.0	1.0
8	3.0	0.0
9	3.0	0.5
10	3.0	1.0

Debido a la poca disponibilidad del material vegetal (18 Plántulas), cada tratamiento tuvo 3 repeticiones, obteniéndose en total 30 frascos, entonces con las plántulas viables (mayor longitud o altura y número de areolas) si fue posible trabajar con los 30 frascos.

Introducción de explantes al medio de cultivo adicionados con ANA y BAP

Las plántulas cultivadas *in vitro* que llegaron a medir 0.8 en promedio y las de mayor número de areolas fueron las utilizadas como explante para la inducción de callos. Los explantes estuvieron constituidos por 2 a 4 tejidos areolares aproximadamente. Las plántulas se presentaban verdes, los tejidos areolares con espinas y raíz, el cual se consideró viable para su propagación *in vitro*.

Desinfectar la cámara de flujo laminar con alcohol al 70% e hipoclorito de calcio. Encender los rayos UV por 15 minutos. Esterilizar los materiales como: pinzas y bisturís a fuego con mechero, hasta alcanzar un rojo vivo de los materiales y luego dejarlas enfriarlas. Antes de realizar el cultivo *in vitro* se adicionó una pequeña cantidad de cefotaxima (antibiótico) a todos los frascos con medio de cultivo adicionados con reguladores de crecimiento. A las plántulas se les hizo dos cortes horizontales dividiendo la parte apical, medio y basal de aproximadamente 0.2 - 0.3 cm y un corte vertical obteniendo segmentos laterales (Figura 11), todo esto se trabajó sobre una placa de petri con hojas esterilizadas en la cámara de flujo de laminar. Los explantes fueron introducidos en los frascos con medio de cultivo adicionados con reguladores de crecimiento. En cada frasco se introdujo 2 explantes y los frascos se sellaron con plastic wrap utilizando las ligas y finalmente con Parafilm por todo el borde de la boca del frasco y se identificaron con nombre de la especie, fecha de cultivo, tratamiento y repetición.

Una vez realizada la introducción de los explantes, estas fueron llevadas a la cámara de crecimiento a condiciones ambientales controladas. Con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad a una intensidad lumínica de 2500 Lm con temperatura de 25 – 30 °C.

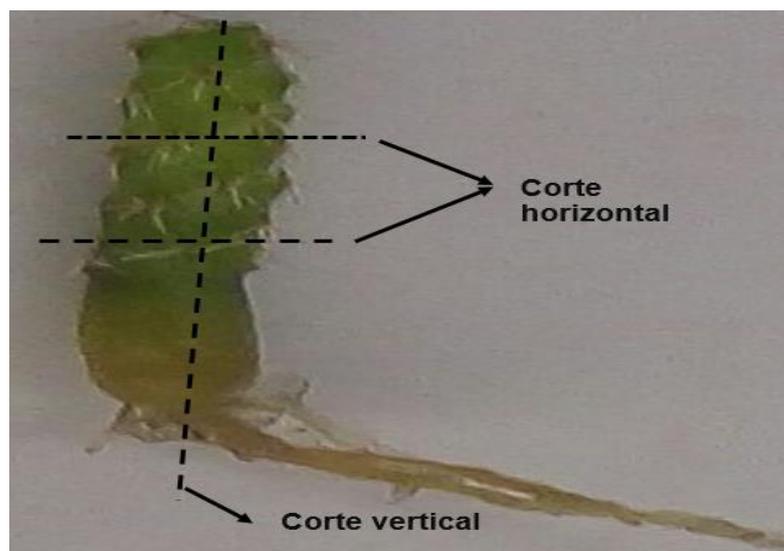


Figura 11. Cortes realizados en la plántula de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza (cactaceae) para la obtención de explantes. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, septiembre 2018.

Los cortes que se realizaron fueron debido a la poca cantidad de plántulas obtenidas, ya que cada tratamiento consta con tres repeticiones, por lo que se optó por realizar dos cortes horizontales y una vertical. En cada frasco se cultivó 2 explantes, por lo que se utilizó 10 plántulas con buen tamaño y número de areolas.

b) Formación de brotes

Para la obtención de brotes se utilizó los tejidos callosos obtenidos en los tratamientos en medio de cultivo Murashige y Skoog adicionados con bencilaminopurina y ácido naftalenacético.

Preparación de medio de cultivo Murashige & Skoog adicionado con ácido giberélico

El medio de cultivo base para la experimentación fue el Murashige y Skoog al cual se le adicionó diferentes concentraciones de ácido giberélico (AG3) (Tabla 4). Se preparó 1000 ml de medio de cultivo.

En un Beaker con 200 ml de agua destilada se agregó 1.772 g de Murashige y Skoog (MS) y agitar suavemente en forma circular luego se le agregó 12 g de azúcar blanca y agitar después se adicionó 2.8 g de agar – agar (gelificante) y agregar 200ml de agua destilada. Se disolvió

todo este procedimiento en la cocinilla eléctrica, provocando un hervor hasta que el gelificante se disuelva y no forme grumos. Se mide el pH.

Se pesó el ácido giberélico (AG3) para cada tratamiento en la que se utilizó 4 matraz Erlenmeyer de 250 ml. Repartir el medio de cultivo Murashige y Skoog en 4 matraz Erlenmeyer cada uno a 100 ml (Figura 12). Una vez distribuida el medio de cultivo en cada matraz Erlenmeyer agitar suavemente en forma circular para que se disuelva el ácido giberélico, enseguida repartir a los frascos de vidrio. Los frascos fueron previamente desinfectados interna y externamente con alcohol al 70% antes de su uso. Autoclavar a 121°C y 15 libras de presión durante 20 minutos y retirar los frascos con medio de cultivo y guardarlos en la refrigeradora a 4°C hasta su utilización. Para pesar todos los insumos se utilizó una balanza analítica.

Tabla 4. Medio de cultivo Murashige y Skoog suplementado con diferentes concentraciones de ácido giberélico. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, noviembre 2018.

Tratamiento	Concentración de Ácido giberélico (mg/L)
1	0
2	2
3	4
4	6

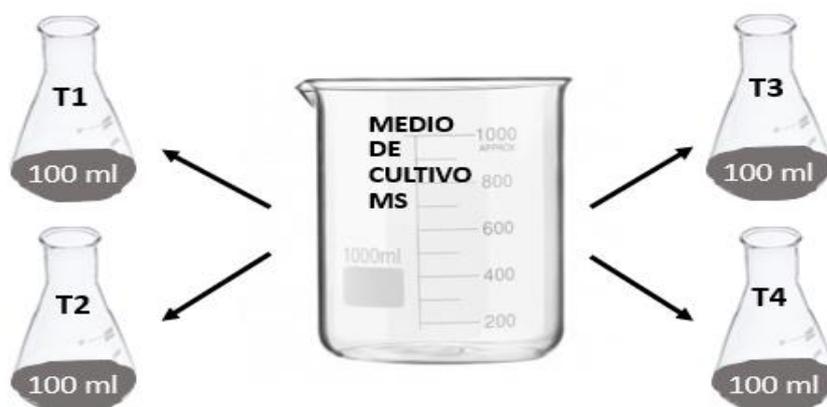


Figura 12. Distribución de medio de cultivo Murashige y Skoog a los matraces Erlenmeyer con diferentes concentraciones de ácido giberélico. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, noviembre 2018.

Introducción de tejido calloso en medio de cultivo Murashige & Skoog adicionado con ácido giberélico

Para la obtención de brotes se utilizó los tejidos callosos obtenidos en los tratamientos en medio de cultivo Murashige y Skoog adicionados con bencilaminopurina y ácido naftalenacético.

Antes de la introducción del tejido calloso se desinfectó la cámara de flujo laminar con alcohol al 70% e hipoclorito de calcio. Encender los rayos UV por 15 minutos. Esterilizar los materiales como: pinzas y bisturís a fuego con mechero, hasta alcanzar un rojo vivo de los materiales y luego dejarlas enfriar hasta su uso.

Antes de realizar el cultivo *in vitro* se adicionó una pequeña cantidad de cefotaxima (antibiótico) a todos los frascos con medio de cultivo adicionados con reguladores de crecimiento. Se utilizó la pinza para extraer pequeños callos del explante calloso, estos trozos fueron introducidos en los frascos con medio de cultivo adicionados con ácido giberélico. Los frascos se sellaron con plastic wrap utilizando las ligas y finalmente con Parafilm por todo el borde de la boca del frasco y se identificaron con nombre de la especie, fecha de cultivo, tratamiento y repetición.

Una vez realizada la introducción de los callos, estas fueron llevadas a la cámara de crecimiento a condiciones ambientales controladas. Con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad a una intensidad lumínica de 2500 Lm con temperatura de 25 – 30 °C.

3.4.2.3 Variables a evaluar

Variables a evaluar para la inducción de callo

- Porcentaje de contaminación: Se considero contaminado a aquellos frascos en las que se observó hongos o bacterias, determinándose con la siguiente fórmula:

$$PC = \frac{FC}{TF} * 100$$

Donde:

PC = Porcentaje de contaminación

FC = Número de frascos contaminados

TF = Número total de frascos

- Porcentaje de oxidación: Se considero oxidado a los explantes que presentaron oscurecimiento

$$PO = \frac{EO}{TE} * 100$$

Donde:

PO = Porcentaje de oxidación

EO = Número de explantes oxidados

TE = Número total de explantes

- Respuesta morfogénica de los explantes: Se registró como respondió a los tratamientos, la formación de brotes, callo.
- Callos por frasco: Se contabilizó el número de callos por frasco y por tratamiento.
- Altura de los callos: similar al primero objetivo las medidas se realizaron externamente sin afectar a los explantes o callos.

Variables a evaluar para la formación de brotes

- Porcentaje de contaminación: Se considero contaminado a aquellos frascos en las que se observó hongos o bacterias, determinándose con la siguiente fórmula:

$$PC = \frac{FC}{TF} * 100$$

Donde:

PC = Porcentaje de contaminación

FC = Número de frascos contaminados

TF = Número total de frascos

- Porcentaje de oxidación: Se considero oxidado a los explantes que presentaron oscurecimiento

$$PO = \frac{EO}{TE} * 100$$

Donde:

PO = Porcentaje de oxidación

EO = Número de explantes oxidados

TE = Número total de explantes

- Respuesta de los callos: Se registró como respondió a los tratamientos, así como la formación de brotes, callo.
- Número de brotes por callo
- Atura de los brotes por callo.

3.4.2.4 Aplicación estadística

Modelo estadístico

Diseño completamente al azar

Se evaluaron 10 y 4 tratamientos, cada uno con tres repeticiones (por la disponibilidad del material vegetal).

Modelo estadístico

$$Y_{ij} = u + t_i + e_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = número de callos por frasco, número de brotes por callo

U = media general

T_i = efecto del i-ésimo tratamiento

E_{ij} = error experimental asociado a la ij-ésima unidad experimental.

Para las variables evaluadas en el número de callos por frasco, altura de callo, número de brotes por callo y altura de brotes, por naturaleza de los datos que se obtuvieron no se pudo aplicar ANDEVA como se tenía planificado para determinar el efecto de los tratamientos en *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza, ya que al aplicar la prueba de normalidad de Shapiro Wilk los datos resultaron anormales, entonces se les aplicó una transformación de datos con $\sqrt{x+0.5}$, resultando aun anormales, por lo tanto, se recurrió a la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis utilizando el programa Software INFOSTAT.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Respuesta morfológica de las plántulas de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza (Cactaceae) inducido al medio Murashige y Skoog para la propagación *in vitro*.

Etapas 1. Establecimiento o iniciación

Porcentaje de germinación

La germinación de las semillas de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza se logró en un sustrato de algodón humedecido con agua destilada y se consideró germinado cuando ya presentaban sus dos cotiledones, la primera inició a los 12 días y el último en germinar fue a los 20 días, y se obtuvo un 36% (18 de 50) de germinación (Figura 13).



Figura 13. Plántulas de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza a los 20 días de germinación. a) plántulas germinadas, b) plántulas con raíz y sus primeros tejidos areolares. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de tejidos Vegetales - Puno, julio 2018.

Respecto a otras especies germinadas *in vitro*, es variable como se reporta en los siguientes, en un medio MS 50% la germinación de *Echinocactus grusonii* es 95% (López, 2006) y para *Astrophytum ornatum* a los 30 días presentó 82.2% (Mendoza, 2007), mientras que en un medio MS adicionado con AG3 se obtiene el 85 a 95 % en *Mammillaria pringlei*, *Turbiniacarpus polaskii* (Ramírez, 2008) y un 75% en *Turbiniacarpus knuthianus* (Villavicencio *et al.*, 2011), por otro lado en un medio MS se presenta el 92.8% para

Pilosocereus robinii (Quiala *et al.*, 2009), para especies del género *Turbinicarpus* el 80% (De la Rosa *et al.*, 2012) de igual manera Ordoñez (2003) obtuvo un 80% de germinación *in vitro* en *Mammillaria voburnensis*, para *Hylocereus monacanthus* el 70% a los 35 días (Montiel *et al.* 2016) y para *Astrophytum capricorne*, *Astrophytum myriostigma*, *Echinocereus reichenbachii*, *Escobaria dasyacantha*, *Mammillaria prolifera* y *Sclerocactus scheeri* 63 % (Salas *et al.*, 2011).

Por otro lado Cuellar *et al.* (2006), reporta que en un medio MS con 2 mg/L de BAP y 1 mg/L de K la germinación de *Stenocereus queretaroensis* presento un 84%, *Stenocereus gummosus* 60%, *Stenocereus griseus* 15.2 % y *Hylocereus undatus* 12.9% en la que considera que los reguladores de crecimiento parece acelerar la germinación en *Stenocereus queretaroensis* y *Stenocereus gummosus*, en cambio Amador *et al.* (2013), considera que no existe un efecto positivo de los reguladores de crecimiento en *Ferocactus histrix* y *Ferocactus latispinus*.

También se reportan bajos porcentajes de germinación *in vitro* como en *Peniosereus greggii* con 38.5% (Cortés *et al.*, (2008), para *Stenocereus stellatus* se obtuvo el 24 % entre 8 y 12 días después de la siembra (Martínez *et al.* 2011) y para *Mammillaria pectinifera* y *Pelecypora aselliformis* el 23 y 47% (Giusti *et al.*, 2002). El bajo porcentaje de germinación según Martínez *et al.* (2011) se puede deber a la acción de algún mecanismo de latencia ya que no se eliminaron el mucílago que protege a la semilla, similar al presente trabajo de investigación no se eliminaron el mucílago de las semillas y esta podría ser una causa del bajo porcentaje de germinación, por su parte Cuellar *et al.* (2006) considera el bajo porcentaje de germinación debido a la concentración y tipo de citocininas presentes en el medio siendo los reguladores de crecimiento responsables de inhibir o inducir.

Porcentaje de contaminación

No se ha registrado contaminación en las plántulas cultivadas en medio basal Murashige & Skoog, lo cual es eficiente la desinfección que se realizó y es más factible o eficiente a comparación de la obtención de explantes de la planta silvestre o desarrolladas en invernadero, como indica Cuellar *et al.* (2006) la germinación a partir de semillas es una técnica factible para la obtención de explantes asépticos.

Altura de las plántulas

Las plántulas de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza a los 76 días de su cultivo en el medio Murashige y Skoog tuvo un crecimiento de 0.8 cm de altura en promedio (Figura 14).

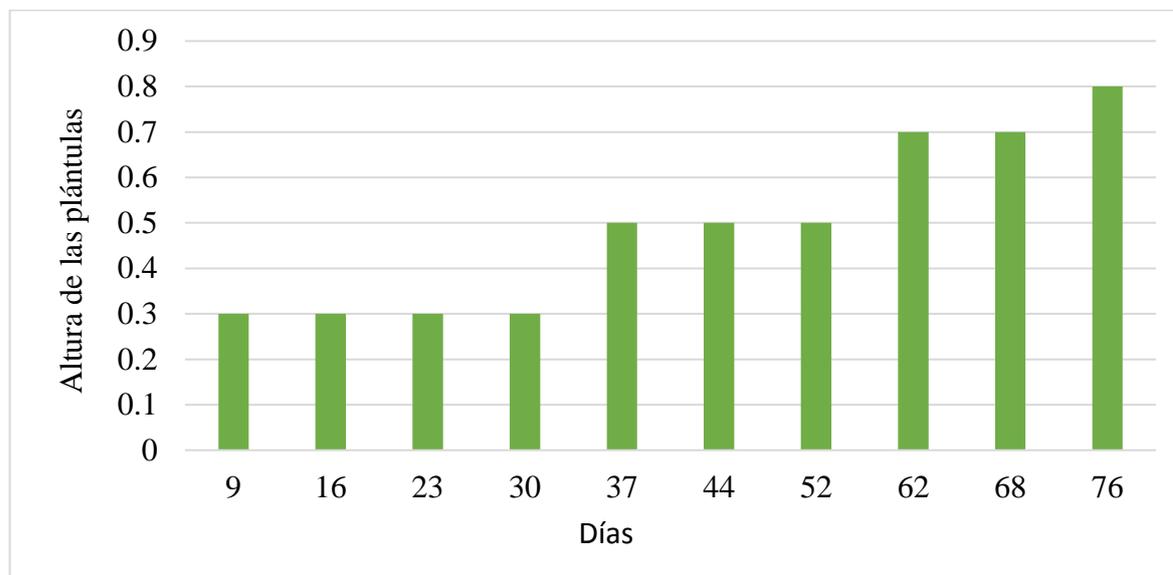


Figura 14. Altura de las plántulas por días transcurridos. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, julio a septiembre 2018.

En otras especies de cactáceas el crecimiento es variables, en un medio basal Murashige y Skoog se reporta lo siguiente: (Ordoñez, 2003) a los 180 días las plántulas de *Mammillaria voburnensis* llegaron a medir aproximadamente 1 cm de altura, por su parte De la Rosa *et al.* (2012), las plántulas de especies del género *Turbinicarpus* requirieron 90 a 180 días a partir de la germinación para obtener 4 a 5 mm de altura y (Arias, 2002) a los 120 días las plántulas de *Pelecypora strobiliformis* medían aproximadamente 1 cm, mientras que en un medio MS adicionado con AG3 las plántulas de *Mammillaria pringlei*, *Turbinicarpus polaskii* llegaron a medir 6.22 mm – 10.29 mm (Ramirez, 2008), por otro lado, en un medio MS 50% las plántulas de *Echinocactus grusonii* llegaron a medir 1.3 a 1.6 cm (López, 2006) similar a lo obtenido en *Astrophytum ornatum* con 1.0 a 1.5 cm de altura de las plántulas (Mendoza, (2007) y en un medio MS suplementado con 0.5 mg/L de BA las plántulas de *Hylocereus undatus* y *Selenicereus validus* a los 60 días llegaron a medir entre 1 a 2 cm de longitud (Avalos 2010).

Número de areolas por plántula

A los 76 días de su cultivo en el medio Murashige y Skoog las plántulas de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza tuvo 16 tejidos areolares en promedio (Figura 15).

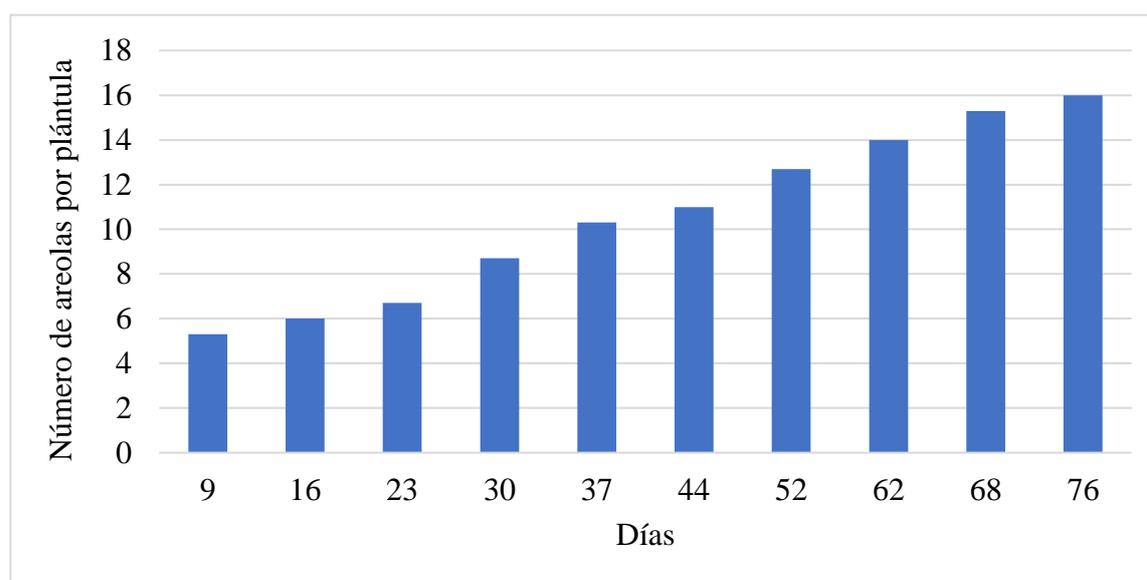


Figura 15. Número de areolas por plántula incrementa a medida que los van transcurriendo. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, julio a septiembre 2018.

Respecto a otras investigaciones no se reportan haber realizado este tipo de conteo en otras investigaciones.

Para determinar si existe correlación o asociación entre el número de areolas y la altura de la plántula se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman y se determinó que existe un elevado grado de asociación lineal entre las dos variables, siendo $r = 0.95$, entonces a mayor número de areolas mayor es el crecimiento de plántula o viceversa (Figura 16).

Tiempo de desarrollo de las plántulas

El crecimiento de cada plántula fue heterogéneo, a medida que pasaban los días las plántulas crecían, a los 9 días se registró 0.3 cm de altura con 5 tejidos areolares en promedio y a los 76 días se registró 0.8 cm de altura con 16 tejidos areolares (Figura 16), considerando viable

a las plántulas para su propagación *in vitro*, las que fueron utilizadas como explante, ya que presentaban gran número de areolas con sus espinas y una altura considerable para pasar a la siguiente etapa. Estas plántulas se mantuvieron verdes no se veía algún cambio, la raíz de las plántulas también se observó que llegó a crecer, pero no se tomaron datos al respecto

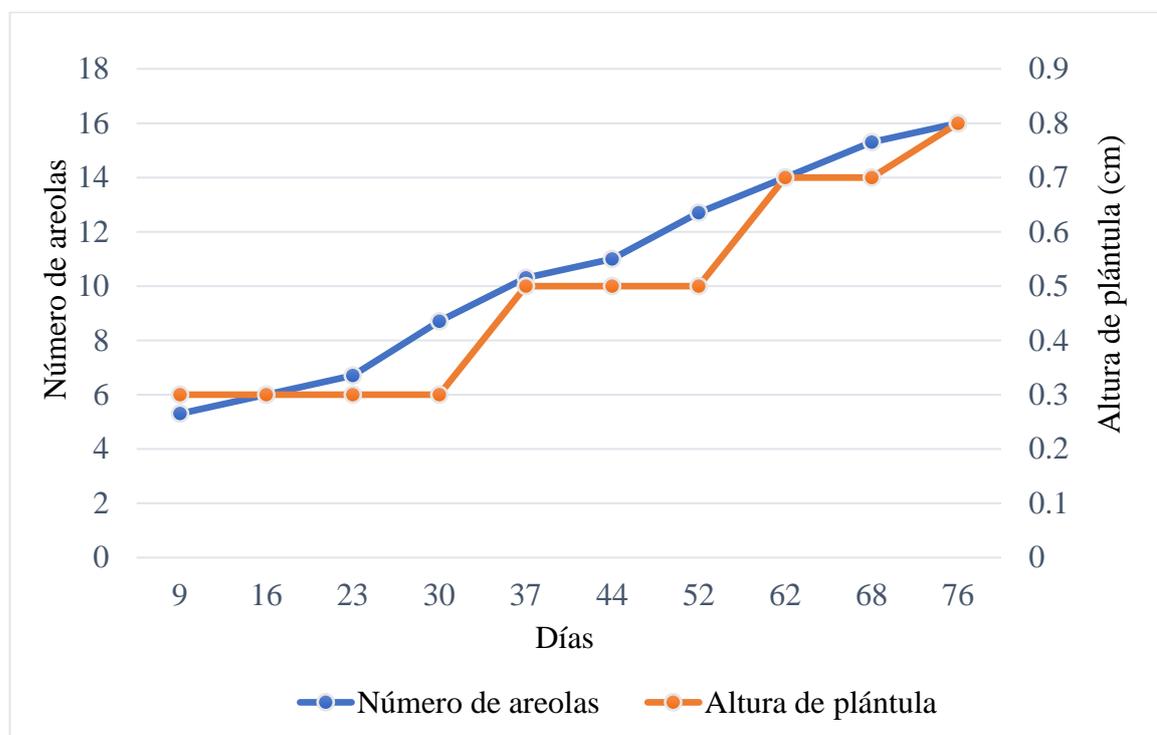


Figura 16. Número de areolas y altura de plántulas por días transcurridos de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza cultivadas en medio Murashige y Skoog. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, julio a septiembre 2018.

4.2 Propagación *in vitro* tejidos morfológicamente viables de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza (Cactaceae) a concentraciones combinadas de ANA: 0.0 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L y BAP: 1.0 mg/L 2.0 mg/L, 3.0 mg/L.

Etapas 2. Multiplicación de brotes

a) Inducción de brotes

Los explantes de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza consistieron en segmentos verticales y horizontales que poseían areolas, los cuales fueron cultivadas en medio MS suplementado con BAP y ANA a concentraciones combinadas.

Porcentaje de contaminación

A los 18 días del cultivo *in vitro* se registró contaminación por hongos en un 20 % en promedio, el porcentaje de contaminación en el tratamiento 10 tuvieron mayor contaminación 66.7% y los tratamientos 5, 6, 8 y 9 presentaron un 33.3% (Figura 17, Tabla 5) este factor impide el desarrollo del explante ya que los microorganismos compiten por los nutrientes (Alvarado, 2000), además al ser el frasco contaminado ha sido desechado o descartado, a pesar de que el explante no haya sido afectado, mientras se formaba el callo. Este tipo de contaminación se puede deber a la manipulación en cuanto se cultivó los explantes en el medio de cultivo MS en la cámara de flujo laminar, así como la mala desinfección de las pinzas, bisturís una vez utilizada.

Tabla 5. Porcentaje de contaminación en los tratamientos. Se considero 1 = Frasco contaminado y 0 = Frasco no contaminado. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, octubre 2018.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento		Repeticiones			Porcentaje de contaminación (%)	
	N°	BAP mg/L	ANA mg/L	R1	R2		R3
1		0.0	0.0	0	0	0	0
2		1.0	0.0	0	0	0	0
3		1.0	0.5	0	0	0	0
4		1.0	1.0	0	0	0	0
5		2.0	0.0	1	0	0	33.3
6		2.0	0.5	1	0	0	33.3
7		2.0	1.0	0	0	0	0
8		3.0	0.0	0	0	1	33.3
9		3.0	0.5	1	0	0	33.3
10		3.0	1.0	1	1	0	66.7

Cada tratamiento estuvo representado por 3 repeticiones, en la que cada frasco representaba una repetición y cada frasco con 2 explantes de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza. En los tratamientos que no se contaminaron, a comparación de las demás se considera que se hizo un buen manejo de los explantes, pero estas fueron afectadas por la

oxidación, este es otro factor que inhibe el crecimiento del explante o a que no se desarrolle el explante.

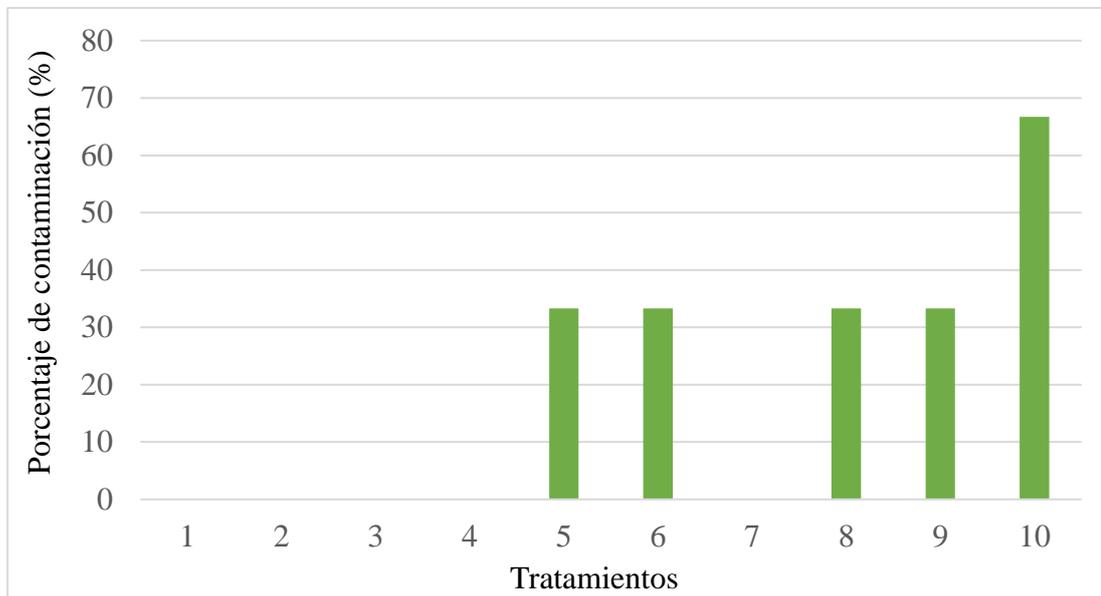


Figura 17. Porcentaje de contaminación en los tratamientos a los 18 días del cultivo *in vitro*. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, octubre 2018.

Para determinar en qué tratamiento se obtuvo mayor contaminación se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y determinó que no existe diferencia al ser $p = 0.4373$.

Rocha (2013) obtuvo el 86.6 % de contaminación (desinfección con alcohol 70%, hipoclorito de sodio al 1%) y el menor con 16.7% de contaminación (desinfección con alcohol 70% y dicloruro de mercurio al 0.15%), los explantes obtenidos fue de la planta proveniente de invernadero por lo obtuvo mayores porcentajes de contaminación y respecto a la oxidación obtuvo el 82.2 % en ácido cítrico seguido de polivinilpirrolidona (PVP) con 62.2 % y con menor porcentaje fue carbón activado 20% en *Aporocactus flagelliformis*.

Porcentaje de oxidación

A los 18 días se registró el 55.8 % de oxidación en promedio, considerándose así porque los explantes con formación de callo se tornaron de color marrón (Figura 18), que impide el desarrollo del callo y causando la necrosis. Los explantes poco oxidados se consideró 0.5, porque el explante continuó desarrollándose a pesar de estar oxidado y los explantes completamente oxidados se consideraron un valor de 1 (Tabla 6).



Figura 18. Imagen a la izquierda, explante poco oxidado en un medio de cultivo MS adicionado con 1mg/L de BAP y la imagen a la derecha explantes completamente oxidados en un medio de cultivo MS adicionado con 1mg/L de BAP + 0.5 mg/L de ANA. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, noviembre 2018.

El tratamiento con mayor porcentaje de oxidación fue el tratamiento 3 con 91.6%, seguido del tratamiento 1 y 2 con 83.3 %, continuando con el tratamiento 4 con 66.6%, en tratamiento 7 y 8 con 58% y los de menor oxidación fue el tratamiento 5 con 50% y 9 con 33.3% (Tabla 6, Figura 19), el tratamiento 10 fue afectado por contaminación, por lo que no se registró el porcentaje de oxidación.

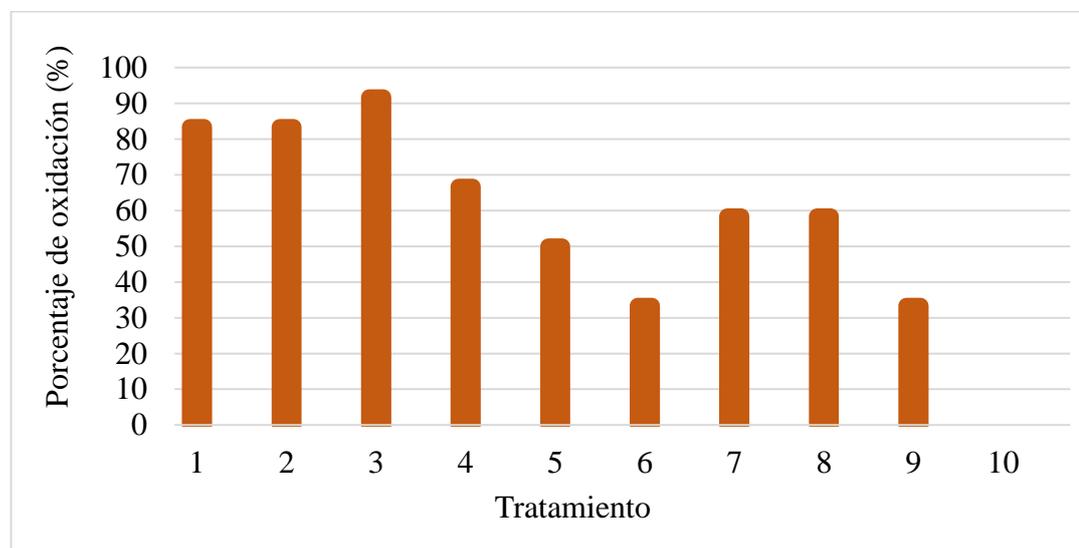


Figura 19. Porcentaje de oxidación en los tratamientos a los 18 días del cultivo *in vitro*. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, octubre 2018.

Tabla 6. Porcentaje de oxidación en los tratamientos. Se consideró 1= a los explantes completamente oxidado y 0.5= a los explantes poco oxidados. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, octubre 2018.

Tratamiento	Número de explantes	Repeticiones			Porcentaje de oxidación (%)
		R1	R2	R3	
1	1	0.5	0.5	1	83.3
	2	1	1	1	
2	1	0.5	1	0.5	83.3
	2	1	1	1	
3	1	1	1	1	91.6
	2	1	1	0.5	
4	1	0.5	0.5	0.5	66.6
	2	0.5	1	1	
5	1		0.5	0.5	50
	2		1	1	
6	1		1		33.3
	2		1		
7	1	0.5	0.5	0.5	58.3
	2	0.5	1	0.5	
8	1	0.5	1		58.3
	2	1	1		
9	1		1		33.3
	2		1		
10	1				0
	2				

Las casillas en blanco son los frascos que fueron contaminados por hongos y el 10% no fue afectado por contaminación ni oxidación, sino los explantes tuvieron una coloración blanca transparentes, esto sucedió en el tratamiento 10, 9 y 6, las cuales también fueron descartadas.

Para determinar en qué tratamiento se obtuvo mayor oxidación se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y determinó que no existe diferencia al ser $p=0.4373$.

El alto porcentaje de oxidación se puede deber los cortes realizados en la plántula para obtener mayor cantidad de explantes, como indica Azofeifa, (2009) luego de ser cortados muchos explantes pierden el color verde iniciando un oscurecimiento que llega a causar la muerte en el explante como es el caso de *Eucalyptus tereticornis* y *Spondias purpurea* el problema es tan severo que en pocas horas el explante se oscurece y muere (Das y Mitra 1990, Azofeifa 2007, citado por Azofeifa 2009), otro factor causante podría ser los reguladores de crecimiento como menciona Azofeifa, (2009) las auxinas como 2,4-D y las citocinina como BAP son los reguladores que cuentan con mayor número de referencias con el problema de oscurecimiento, algunos ejemplos son el *Arachis hypogaea* en cuanto aumenta los niveles de auxinas (2,4-D) incrementan el porcentaje de oxidación, similar en *Nardoschys jatamansi* la formación de callo en un medio MS con concentraciones altas de ANA mostraron oxidación y muerte de tejidos (Mathur 1993; Baker y Wetzstein 1994, citado por Azofeifa, 2009).

Respecto a las citocinas, en *Phyllostachis nigra* el BAP causo oscurecimiento de tejidos similar en *Ailanthus altissima*, *Chrysosplenium americanum* contrario a *Aconitum heterophyllum* los callos cultivados en un medio con 0.5 mg/L de K liberaron sustancias fenólicas y cuando se transfirieron a un medio con 1 mg/L de BAP el problema no se presentó (Ogita 2005; Jambor-Benesur *et al.* 1997; Brisson *et al.* Giri *et al.* 1993, citado por Azofeifa, 2009).

Respuesta morfogenética

La respuesta morfogenética de los explantes a los 61 días luego de la inoculación de los explantes en el medio Murashige y Skoog con las diferentes combinaciones de los reguladores de crecimiento bencilaminopurina y ácido naftalenacético, se obtuvo la formación de callos (Tabla 7) y en ningún tratamiento se observó la formación de brotes.

Tabla 7. Respuesta morfogénica de los explantes a concentraciones combinadas de BAP (Bencilaminopurina) y ANA (Ácido naftalenacético). Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, noviembre 2018.

N°	Tratamiento		Respuesta morfogénica	
	BAP mg/L	ANA mg/L	Callo	Brote
1	0	0	+	-
2	1.0	0.0	+	-
3	1.0	0.5	+	-
4	1.0	1.0	+	-
5	2.0	0.0	+	-
6	2.0	0.5		-
7	2.0	1.0	+	-
8	3.0	0.0	+	-
9	3.0	0.5		-
10	3.0	1.0		-

Las casillas en blanco son las que fueron afectadas por contaminación que proliferaron en el medio de cultivo y oxidación, el tratamiento 6 y 9 fue afectado por contaminación, oxidación y tejidos blancos transparentes, mientras que el tratamiento 10 tuvo mayor contaminación y también se presenciaron tejidos blancos transparentes. El alto nivel de formación de callos se puede deber a los cortes realizados, como indica Mendoza (2007) & Ruvalcaba *et al.* (2010) se presenta la formación de callos a partir de zonas de corte del explante que estuvieron en contacto con el medio de cultivo y también (Mauseth 1977, citado por Ojeda *et al.*, 2008) puede atribuirse a la utilización y combinación de las citocininas y auxinas que estimulan el crecimiento de los callos en cactáceas.

La concentración alta de TDZ conduce a la formación de callos mientras que con BA los brotes mostraron un buen crecimiento con poca o ninguna inducción de callo en *Mammillaria pectinifera*, *Pelecypora aselliformis* y *Escobaria mínima* (Giusti *et al.*, 2002), mientras que Ordoñez (2003) reporta que los explantes cultivados en medio MS con diferentes combinaciones de BAP y ANA no formaron callos en *Mammillaria voburnensis* Scheer (cactaceae), contrario a lo que se reporta en *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana*

(Ritter) Ostolaza,, ya que en la mayoría de los explantes cultivados en medio MS con diferentes concentraciones de BAP y ANA se obtuvo la formación de callos, por su parte De Medeiros *et al.* (2006) reporta la formación de callos en explantes cultivados en medio MS complementados con sacarosa al 2% (p/v), 0.5 μM de 2,4-D, 4.4 μM de BAP, 0.4 mg/L de tiamina HCl y 100 mg/L de i-inositol en *Notocactus magnificus*.

En *Opuntia sp.* se reporta la formación de callos con 0.1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP (Rodríguez, 2006), similar a lo obtenido en el tratamiento 2 (1 mg/L de BAP + 0.0 mg/L de ANA), en la que se obtuvieron la formación callos en *Neowerdermannia chilensis* subsp *peruviana* (Ritter) Ostolaza, por otro lado Mendoza (2007), en *Astrophytum ornatum* presentó la forma de callos en un medio 2.0 mg/L de BA + 0.5 mg/L de ANA, de la misma forma se obtuvo la formación de callos en el tratamiento 6 (2.0 mg/L de BAP + 0.5 mg/L de ANA) en el presente estudio. Además Ruvalcaba *et al.* (2010) para *Coryphanta retusa* a los 21 días observaron el desarrollo de callos en los tratamientos con ANA que los tratamientos sin ANA y (Téllez, 2012) reporta la inducción de callo en un medio con 18.0 μM de 2,4 – D y 9.30 μM de CIN para *Mammillaria plumosa* y en *Gymnocalycium mihanovichii* se produjo callos con 8.8 μM de CIN y 4.5 μM de 2,4-D.

Callos por frasco

Se cultivo 2 explantes por frasco en medio de cultivo Murashige y Skoog adicionado con ANA y BAP, cada frasco representó una repetición lo cual se tubo 3 repeticiones por cada tratamiento. Los explantes cultivados formaron callos, fueron muy pocos explantes que desarrollaron callo ya que fue afectado por contaminación y oxidación como se ha descrito anteriormente.

En el tratamiento 7 (2.0 mg/L de BAP + 1.0 mg/L ANA) se obtuvo mayor número de callos por frasco (1.7 callos por frasco), seguido del tratamiento 4 (1 mg/L de BAP + 1 mg/L) con 1.3 callos por frasco, mientras que los tratamientos 1 (control), 2 (1.0 mg/L de BAP + 0.0 mg/L ANA) y 5 (2.0 mg/L de BAP + 0.0 mg/L ANA) se obtuvo 0.7 callos por frasco, las de baja cantidad se presencia en el tratamiento 3 (1.0 mg/L de BAP + 0.5 mg/L ANA) y el tratamiento 8 (3.0 mg/L de BAP + 0.0 mg/L ANA) se obtuvo 0.3 callos por frasco (Tabla 8).

Tabla 8. Número de callos por frascos, en los tratamientos adicionados con reguladores de crecimiento. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, noviembre 2018

N°	Tratamiento		Repeticiones			Promedio de callo por frasco
	BAP mg/L	ANA mg/L	R1	R2	R3	
1	0	0	1	1	0	0.7
2	1.0	0.0	1	0	1	0.7
3	1.0	0.5	0	0	1	0.3
4	1.0	1.0	2	1	1	1.3
5	2.0	0.0	0	1	1	0.7
6	2.0	0.5	0	0	0	0.0
7	2.0	1.0	2	1	2	1.7
8	3.0	0.0	1	0	0	0.3
9	3.0	0.5	0	0	0	0.0
10	3.0	1.0	0	0	0	0.0

Para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos se hizo la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y determinó estadísticamente que sí existe diferencia significativa entre los tratamientos evaluados, al ser $p = 0.0337$ con lo cual se concluye, que al menos uno de los medios utilizados ANA y BAP como reguladores de crecimiento induce la mayor formación de callos por frascos en *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza.

Para determinar entre qué tratamiento hay diferencias se comparó las diferencias con la prueba de rangos de Kruskal Wallis, en cuanto a la mayor inducción de callos (Tabla 9).

Tabla 9. La prueba de rangos de Kruskal Wallis, determina que si existe diferencia entre tratamientos en la inducción de callo ($p < 0.05$). Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, noviembre 2018

<u>Tratamiento</u>	<u>Ranks</u>		
6	8.50	A	
9	8.50	A	
10	8.50	A	
8	13.00	A	B
3	13.00	A	B
2	17.50	A	B
1	17.50	A	B
5	17.50	A	B
4	24.33		B
7	26.67		B

Se determina que el tratamiento 7 (2 mg/L de BAP + 1.0 mg/L de ANA) y 4 (1 mg/L de BAP + 1 mg/L de ANA) es diferente a los demás tratamientos, lo que se concluye que se obtuvo mayor número de callos en estas concentraciones para *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza contrario a lo reportado por Pérez *et al.* (1998) que logró la formación de brote en las mismas concentraciones en 21 especies de cactáceas, por su parte (Téllez, 2012) en *Gymnocalycium mihanovichii* para la inducción y proliferación de callos se produjo con 8.8 μM de CIN y 4.5 μM de 2,4-D, mientras que Rocha (2013), la combinación de 3 mg/L de BAP + 1 mg/L de ANA es más apropiado para la propagación en la etapa de multiplicación en *Aporocactus flagelliformis*, contrario a lo obtenido en el presente trabajo, ya que se presenciaron los explantes transparentes y afectadas por contaminación por hongos.

Altura de callos

A los 61 días los callos llegaron a medir 0.3 cm hasta 1.7 cm de altura en promedio. La mayor altura del callo se obtuvo en el tratamiento 4 (1.0 mg/L BAP + 1.0 mg/L ANA) con 1.7 cm, seguido del tratamiento 7 (2.0 mg/L BAP + 1.0 mg/L ANA) con 1.4 cm, mientras que el tratamiento 2 (1.0 mg/L BAP + 0.0 mg/L ANA) con 1.2 cm y el tratamiento 8 (3.0 mg/L

BAP+0.0 mg/L ANA) y los tratamientos con menor tamaño fueron el tratamiento 5 (2.0 mg/L BAP + 0.0 mg/L ANA) con 0.8 cm seguido del tratamiento 1 (control) con 0.4 y el tratamiento 3 (1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L ANA) con 0.3 cm (Tabla 10).

Tabla 10. Altura de callo en los tratamientos adicionados con reguladores de crecimiento. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, noviembre 2018.

N°	Tratamiento		Repeticiones			Promedio de la altura de callo (cm)
	BAP mg/L	ANA mg/L	R1	R2	R3	
1	0	0	0.8	0.5	0	0.4
2	1.0	0.0	1.6	0	1.9	1.2
3	1.0	0.5	0	0	1	0.3
4	1.0	1.0	2.3	1.3	1.4	1.7
5	2.0	0.0	0	1	1.5	0.8
6	2.0	0.5	0	0	0	0.0
7	2.0	1.0	1.9	1.3	0.9	1.4
8	3.0	0.0	3	0	0	1.0
9	3.0	0.5	0	0	0	0.0
10	3.0	1.0	0	0	0	0.0

Para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos se hizo la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y determinó estadísticamente que no existe diferencia significativa entre los tratamientos evaluados, al ser $p = 0.0780$.

b) Formación de brotes

Para la formación de brotes se subcultivo los tejidos callosos en medio Murashige y Skoog adicionado con ácido giberélico a diferentes concentraciones. El subcultivo de la fracción o trozos de callo fue heterogéneo en cada frasco, debido a que no se utilizó bisturí esto para evitar cortes que causa la oxidación, el cual se utilizó una pinza extrayendo pequeños trozos de un callo.

Porcentaje de contaminación

No se presentó contaminación por hongos y bacterias, por lo que no se tiene datos.

Porcentaje de oxidación

Los tratamientos 1 (control) presentó el 66.6% de oxidación y los tratamientos 2, 3,4 presentaron el 50% de oxidación (Tabla 11). La oxidación aún persiste al realizar el sub cultivo esto puede deberse a que con una pinza se realizó pequeños fracturas o trozos de un callo, en la que se causó pequeñas heridas en el callo, además los trozos fueron heterogéneos (de diferentes tamaños), y en cada frasco se subcultivo callo de diferentes tamaños. Entonces, aquellos callos de pequeño tamaño se oxidaron rápidamente mientras que los de gran tamaño fueron resistente y llegaron a formar brotes (tratamiento 1,2 y 4) o el callo seguía creciendo (tratamiento 3).

Tabla 11. Porcentaje de oxidación en los tratamientos a los 56 días del cultivo *in vitro*. Se consideró 0.5 = poco oxidado (a los callos que aun crecieron o formaron brotes) y 1 = los callos completamente oxidados. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, enero 2019.

Tratamiento	Repeticiones			Porcentaje de oxidación (%)
	R1	R2	R3	
1	0.5	0.5	1	66.6
2	0.5	0.5	0.5	50
3	0.5	0.5	0.5	50
4	0.5	0.5	0.5	50

Respuesta del callo (aparición de brotes, callo)

En el tratamiento 2 (2 mg/L de ácido giberélico) y 4 (6 mg/L de ácido giberélico) se obtuvo brotes mientras que en el tratamiento 3 (4 mg/L de ácido giberélico) se obtuvo el crecimiento de callo, no se generó brotes y el tratamiento 1 sin la adición de ácido giberélico se presentó brote y también callo. (Tabla 12).

Tabla 12. Respuesta del tejido calloso al medio de cultivo Murashige y Skoog adicionado con ácido giberélico. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, noviembre, enero 2019.

N°	Tratamiento		Respuesta	
	Ácido giberélico (mg/L)	Brote	Callo	
1	0	+	+	
2	2	+		
3	4		+	
4	6	+		

Número de brotes por callo

A los 56 días el tratamiento 2 (2 mg/L de ácido giberélico) presento 7.67 brotes por callo siendo el mejor, mientras que el tratamiento 4 (6 mg/L de ácido giberélico) presento un 3.33 brotes por callo y con menor número de brotes fue el tratamiento 1 (control) con 0.33 brotes por callo (Tabla 13).

Tabla 13. Número de brotes por callo en un medio Murashige y Skoog adicionado con ácido giberélico a diferentes concentraciones. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, enero 2019.

N°	Tratamiento		Repeticiones			Promedio de brotes
	Ácido giberélico (mg/L)	R1	R2	R3		
1	0	1	0	0	0.33	
2	2	10	10	3	7.67	
3	4	0	0	0	0	
4	6	6	2	2	3.33	

Para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos se hizo la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y determinó estadísticamente que sí existe diferencia significativa entre los tratamientos evaluados, al ser $p = 0.0203$, con lo cual se concluye que al menos uno de los medios adicionados con ácido giberélico induce el mayor número de brotes por callos en *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza.

Para determinar entre qué tratamiento hay diferencias, se comparó las diferencias con la prueba de rangos de Kruskal Wallis, en cuanto al mayor número de brotes por callo (Tabla 14).

Tabla 14. Prueba de rangos de Kruskal Wallis determina que si existe diferencia entre tratamientos en el número de brotes por callo ($p < 0.05$). Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, enero 2019

Tratamiento	Ranks
3.00	3.00 A
1.00	4.00 A
4.00	8.33 A B
2.00	10.67 B

Se determina que el tratamiento 2 (2 mg/L de AG3) es diferente a los tratamientos 3 (4 mg/L de AG3) y 1 (control), considerándose que el tratamiento 2 es eficiente para la multiplicación de brotes, por su parte Ordoñez (2003) en medio MS suplementado con 0.1 mg/L de BAP + 0.01 mg/L de ANA indujo un promedio de 11 brotes por explante a los 60 días en *Mammillaria voburnensis*, siendo un valor alto a comparación en *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza con 7.67 brotes por callo.

Por su parte Villavicencio *et al.* (2011) para *Turbinicarpus knuthianus* en medio de cultivo con 4.40 mM de BA + 4.13 μ M de AIB logró 10 brotes por explante y De la Rosa *et al.*, (2012) obtuvo 4 brotes por explante con la aplicación de 4.44 μ M de BAP en *Turbinicarpus hoferi* y 26.3 brotes por explante en *T. pseudomacrochele* subsp. *Lausseri* con la aplicación de 3.33 μ M de BAP, mientras que Avalos (2010) para *Hylocereus undatus* en 1.5 mg/L de mT, en posición horizontal del explante obtuvo 12 brotes por explante y para *Selenicereus validus* con 1.0 - 1.5 mg/L de 2iP con 19 a 20.5 brotes por explante y Santos *et al.* (2001) para *Astrophytum myriostigma* con 2 mg/L de cinetina, presencia 14 brotes por explante. Estos datos fueron mayores respecto al número de brotes por callo en *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza.

Arias (2002) obtuvo para *Pelecypora strobiliformis* en KIN 6 mg/L y 0.0 mg/L de ANA 5 brotes por explante mientras que Ojeda *et al.*, (2008) para *Astrophytum capricorne* en la etapa

de multiplicación obtuvo 29.50 brotes con BAP 0.2 mg/L y cinetina 0.2 mg/L adicionado con NaH_2PO_4 170 mg/L. Por otro lado Rodríguez (2006) para *Opuntia berteri* el mayor número de brotes por explante se logró con 0.1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP y para *Trichocereus sp* el mayor número de brotes por explante se dio 0.1 mg/L de ANA y 2 mg/L de BAP por organogénesis indirecta (callo). Para *Mammillaria plumosa* el mejor tratamiento para la etapa de multiplicación de brotes es 18.0 μM de 2,4-D y 9.30 μM de CIN y para *Echinopsis chamaecereus* con el medio BA 13.2 μM y ANA 5.35 μM se produjeron 55.6 brotes por explante (Téllez, 2012).

(Giusti et al., 2002) determinan que para la proliferación de brotes en 22.20 μM de BA es viable para *Escobaria mínima* y *Mammillaria pectinifera*, y Mendoza, (2007) reporta para *Astrophytum ornatum* en 2.0 mg/L de BA + 0.0 mg/L de ANA se presentó 2.93 brotes por explante, contrario a lo obtenido, siendo que a las mismas concentraciones se presencié callo. En (Sandoval, 2005) *Cephalocereus maxonni* con 1 mg/L de ANA + 2.2 mg/L de BAP presentando 4.93 brotes por explante con un peso de 280 mg, para (Montiel et al. 2016) *Hylocereus monacanthus* en 1 mg/L de BAP se presentó aproximadamente 14 brotes por explante, de la misma manera, en esta investigación a estas concentraciones se obtuvo callo, entonces las diferentes especies reaccionan de manera distinta a los reguladores de crecimiento, además influye mucho el tipo de corte, ya que los tejidos callosos.

En *Echinocactus grusonii* con 2ip de 3 mg/L presentó 3.11 brotes por explante (López, 2006), similar a lo obtenido en *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza con 6 mg/L AG3 se obtuvo 3.3 brotes por callo, mientras que en (Rodríguez et al. 2013) *Escobaria cubensis* 5.1 brotes por explante con 13.3 μM BAP + 5.4 μM ANA. Asimismo, Pérez & Dávila (2003) reporta para *P. aselliformis*, se produjeron 13.7 brotes por explante con 8,8 mM de BA y para *P. strobiliformis*, se produjeron 12.4 brotes por explante utilizando 8,8 mM BA, similar en (Quiala et al., 2009) *Pilosocereus robinii* la proliferación más alta 8.9 brotes por explante se alcanzó con el empleo 13.32 μM de 6-BAP y (Bhau & Wakhlu, 2015) para *Coryphantha elephantidens* en 6.6 μM BAP se produjo 12.4 brotes. También Seemann et al. (2007) reporta las mejores respuestas para el desarrollo de brotes usando un medio MS suplementado con 0.1 mg/L de ANA y 1.0 mg/L de BAP y Ruvalcaba et al. (2010) reportan que la proliferación de brotes a partir de explantes apicales y laterales

se produjo con 6-BAP a 2.0 mg/L sin ANA, obteniendo una producción promedio de 7 a 10 brotes por explante a los 70 días de cultivo en *Coryphanta retusa*.

Altura de los brotes por callo.

El tratamiento con mayor altura de brote fue el tratamiento 4 (6 mg/L de ácido giberélico) con 1.35 cm seguido del tratamiento 2 (2 mg/L de ácido giberélico) con 0.63 cm y el tratamiento 1 (control) presento la altura más baja con 0.33 cm (Tabla 15).

Tabla 15. Altura de brotes en los tratamientos adicionados con ácido giberélico. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, enero 2019.

N°	Tratamiento Ácido giberélico (mg/L)	Repeticiones			Promedio de altura de brotes (cm)
		R1	R2	R4	
1	0	1	0	0	0.33
2	2	0.8	0.48	0.6	0.63
3	4	0	0	0	0
4	6	1.85	1.5	0.7	1.35

Para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos se hizo la prueba no paramétrica de Kruskal wallis y determinó estadísticamente que no existe diferencia significativa entre los tratamientos evaluados, al ser $p = 0.0659$.

Por su parte Cortés *et al.* (2008) generaron brotes con promedio de 3.2 cm y 3.4 cm en 2 mg/L y 4 mg/L con 0.2 mg/L AIB para *Peniosereus greggii*, mientras que Villavicencio *et al.* (2012) para *Epithelantha micromeris*, reporta la mayor multiplicación con 1.2 mM de KIN + 1.30 μ M de AIB, pero la altura fue mayor en 0.7 mM de BA + 0.06 μ M de AIB (6 mm), similar a lo obtenido para *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza en medio MS adicionado con 2 mg/L de AG3 se obtuvo 7.67 brotes por callo, pero la altura fue mayor en medio MS adicionado con 6 mg/L de AG3 obteniendo 1.35 cm.

Por otro lado en (Sandoval, 2005) *Cephalocereus maxonni* con 1 mg/L de ANA + 2.2 mg/L de BAP presentando una altura de 2.89 mm y (Montiel *et al.* 2016) *Hylocereus monacanthus* en 1 mg/L de BAP que presentó una altura de 22 mm, y (Hernández, 2006) para *Cephalocereus senilis* con 3 mg/L de AG3 se tuvo un incremento de 2.8 cm en altura

V. CONCLUSIONES

La respuesta morfológica de las plántulas de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza en medio Murashige y Skoog (MS), se logró establecer *in vitro* a partir de las plántulas germinadas en placa de petri humedecida con agua destilada, a los 20 días se obtuvo un 36% de germinación, luego estas plántulas fueron desinfectadas e inducidos en un medio Murashige y Skoog (MS), sin reguladores de crecimiento. No se obtuvo contaminación por hongos y bacterias, lo cual fue eficiente el método de desinfección de las plántulas. A los 76 días las plántulas llegaron a medir 0.8 cm de altura con 16 tejidos areolares, las plántulas presentaron un buen desarrollo, ya que se veían verdes con muchos tejidos areolares y espinas, lo cual fue ideal para la propagación *in vitro*.

La propagación *in vitro* de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza se logró por medio del cultivo de tejidos vegetales. Las plántulas con buen desarrollo fueron las utilizadas como explante presentando tejidos areolares. La inducción de callos se obtuvo mejor en un medio MS adicionado con 2 mg/L de BAP + 1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP y 1 mg/L de ANA, luego estas fueron sub cultivadas en medio de cultivo Murashige y Skoog adicionado con ácido giberélico para la formación de brotes en el cual el mejor resultado se obtuvo en un medio MS adicionado con 2 mg/L de AG3 respecto a la proliferación o multiplicación de brotes, pero el mejor desarrollo se presentó en un medio MS adicionado con 6 mg/L de AG3, ya que los brotes con 2 mg/L de AG3 fueron delgadas mientras que los brotes en un medio MS adicionado con 6 mg/L de AG3 fueron gruesas y con bastantes tejidos areolares y espinas. Entonces se considera que con la adición de 2 mg/L de AG3 es eficiente para la proliferación o multiplicación de brotes con la que se puede realizar más estudios o seguir propagándolos y con 6 mg/L de AG3 para llevar a la siguiente etapa del enraizado y la aclimatación. Concluyendo que se logró obtener la multiplicación de brotes de *in vitro* de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza el cual puede ser una herramienta importante para su conservación.

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar el control de la oxidación, ya que en este trabajo de investigación fue el que más problemas tuvo evitando el desarrollo del explante, además se sugiere realizar los más mínimos cortes en los explantes, siendo esta uno de los factores de la oxidación.

Continuar con la etapa de crecimiento *in vitro* de los brotes y probar diferentes concentraciones de otros reguladores de crecimiento.

Desarrollar las dos etapas faltantes como son enraizamiento y aclimatación, en la que se sugiere primero propagar *in vitro* para tener una cantidad considerable y suficiente.

Realizar una comparación entre el cultivo *in vitro* y cultivo en condiciones naturales (puede ser un invernadero), ya que en este trabajo no se logró por la poca disponibilidad del material vegetal.

También realizar estudios acerca de las propiedades curativas o componentes que presenta esta cactácea ya que es de uso medicinal y alimenticio.

VII. REFERENCIAS

- Abdelnour, A., & Vincent, J. (1994). Conceptos Básicos Cultivo de Tejidos Vegetales. Retrieved from http://bibliotecadigital.uda.edu.ar/objetos_digitales/208/conceptos-basicos-del-derecho.pdf
- Álvarez, M. (2011). Multiplicación de plantas. 1ra Edición. Editorial Albatros SACI, Argentina. 96 p.
- Alanís, G., & Velazco, C. (2008). Importancia de las Cactaceas como Recurso Natural en el Noreste de México. *Ciencia y Sociedad*, XI, 5–11.
- Alvarado, Y. (2000). Control y prevención de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 31(2), 87–91.
- Álvarez, R., Godínez, H., Guzmán, U., & Dávila, P. (2004). Aspectos ecológicos de dos cactáceas Mexicanas amenazadas: implicaciones para su conservación. *Boletín de La Sociedad Botánica de México*, (75), 7–16.
- Amador, K., Díaz, J., Loza, S., & Bivián, E. (2013). Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de Ferocactus (cactaceae). *Polibotánica*, 35, 109–131.
- Aragón, G., & Aguirre, M. (2007). Conservación , distribución y densidad poblacional de *Platalina genovensium* (Thomas , 1928) en las Lomas del Morro Sama , distrito de Sama , Provincia de Tacna. *Zonas Aridas*, 11(1), 219–232.
- Arakaki, M., Ostolaza, C., Cáceres, F., & Roque, J. (2006). Cactaceae Endémicas del Perú. El Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Perú. UNMSM. *Revista Peruana de Biología*, 13(2), 193–219.
- Arellano, A., López, M., Chablé, F., & Estrada, A. (2013). Effect of Growth Regulators on the Organogenesis and Multiplication of *Ortegocactus macdougallii* Alexander. *Propagation of Ornamental Plants*, 13(4), 160–167.

- Arias, A. (2002). Micropropagación de *Pelecyphora strobiliformis* (Werdermann) Fric et scheelle (cactácea) especie mexicana en peligro de extinción. Universidad de Guadalajara. Tesis de grado Retrieved from <http://148.202.105.18/websecgral/sites/archivos/acuerdo/2007acuerdorg01.pdf>
- Avalos, R. (2010). Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas de los géneros *Hylocereus* Y *Selenicereus*. Universidad Autonoma de Aguascalientes. México. Tesis de Maestría.
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153–175.
- Baldetti, L. (2002). Efecto del ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP) sobre la regeneración de plántulas de tres clones de camote (*Ipomoea batata* L.), partiendo del cultivo de meristemas. *ウイルス*, 52(1), 1–5.
- Bhau, B. S., & Wakhlu, A. K. (2015). A highly efficient *in vitro* propagation protocol for elephant tusk cactus: *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(2), 215–219. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.07.003>
- Caetano, D. (2012). Estandarización de un protocolo de regeneración en pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran). Universidad Nacional de Colombia.
- Castillo, A., López, A., & Ocampo, I. (2010). Conocimiento y uso de cactaceas por familias campesinas en Coxcatlán, Puebla. *Revista Ra Ximhai*, 6(3), 347–353.
- Ceroni, A., & Castro, V. (2013). Manual de cactus, identificación y origen. *Ministerio Del Ambiente*, 1–29. Retrieved from <http://www.minam.gob.pe/diversidadbiologica/wp-content/uploads/sites/21/2014/02/manual+de+cactus.compressed.pdf>
- Chamba, L. (2017). Procesos biotecnológicos para el brotamiento y enraizamiento de *Cinchona officinalis* L., a partir de vitroplantas, en la argelia - Loja. *Universidad Nacional de Loja. Ecuador*.

- Choquechua, N. (2013). Germinación de semillas de *Puya raimondii* HARMS en condiciones de laboratorio. Universidad Nacional del Altiplano. Tesis de grado. <https://doi.org/10.1364/IPRSN.2015.JM3A.29>
- Choreño, M., González, H., Terrazas, T., & Hernández, A. (2002). Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer a partir de areolas. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 8(2), 183–189.
- Concepción, O., Nápoles, L., Pérez, A. T., Hernández, M., Peralta, N., & Trujillo, R. (2005). Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*psidium guajava* L.) y el contenido de compuestos fenólicos. *Cultivos Tropicales*, 26(1), 33–39.
- Conservation System UICN, 2001. UICN Red List Categ. Crit. v. 3.1 ii, 1-30. UICN, Gland. <http://www.tropicos.org/Name/50180408?langid=66>. (visitado 30/07/2019)
- Cortés, C., Sánchez, J., Alvarado, M., Almanza, L., & Fraire, S. (2008). Establecimiento de un sistema de micropropagación de *Peniosereus greggii* (Engelml.) Britton & Rose, especie cactácea en peligro de extinción. *Revista Investigación Científica*, 4(2), 1–7.
- Cuellar, L., Morales, E., & Trevino, J. (2006). La germinación *in vitro* una alternativa para obtener explantes en Cactáceas. *Zonas Áridas*, 10, 129–133.
- De la Rosa, L., Domínguez, M., Pérez, M., & Pérez, E. (2012). Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas del género *Turbincarpus*. *Interciencia*, 37(2), 114–120.
- De Medeiros, L. A., Salvador, R., Gallo, L. A., De Oliveira, E. T., & Payão, M. E. (2006). *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84(2), 165–169. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9014-x>
- Durán García, R., & Méndez Gonzalez, M. E. (2010). Cactáceas. *Biodiversidad y Desarrollo Humano En Yucatán.*, 191–192.
- El Peruano. (2006). Normas Legales. Categorización de especies amenazadas de flora silvestre. *El Peruano*, 92. Retrieved from <http://sial.segat.gob.pe/normas/aprueban-categorizacion-especies-amenazadas-flora-silvestre>

- Escobedo, L., García, H., Rojas, R., & Ramírez, F. (2018). Propagación *in vitro* *Mammillaria luethyi* G.S. Hinton. Retrieved from www.uaaan.mx/DirInv/Resul_PI-04/MEMORIA_2004/.../LEscobedoBocado.doc%0A
- Estrada, A., Martínez, J., Torres, M., & Chablé, F. (2008). *In vitro* micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm – Dyck and effects of sprayed GA 3 after transplantation to ex vitro conditions. *Scientia Horticulturae*, *117*, 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.05.042>
- Giusti, P., Vitti, D., Fiocchetti, F., Colla, G., Saccardo, F., & Tucci, M. (2002). *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae*, *95*(4), 319–332. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00031-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00031-6)
- Godínez, H. (2017). Las plantas y los endófitos: cómo sobrevivir en las regiones áridas y semiáridas. *Elementos*, *105*, 39–43.
- Gonzalez, A. (2015). Germinación *in vitro* de dieciocho especies de cactáceas endémicas del desierto chihuahuense. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. México.
- Hernández, A. (2006). Propagación *in vitro* del viejito (*Cephalocereus senilis*). Instituto Politécnico Nacional.
- Herrera, A. (2010). Suelos: con énfasis del altiplano. 1ra Edición. Puno - Perú. 468 p.
- Huisa, D. (2015). Asociación Nodrizza-Protegida, Diámetro y Altura de Cactáceas en Relación a la Altitud, en la Quebrada Huaje de la Ciudad de Puno, Perú. *Revista de Investigación Altoandina*, *17*, 387–394.
- Lema, J., & Kulus, D. (2014). Micropropagation of Cacti — a Review. *Haseltonia*, *19*, 46–63.
- León, B., Pitman, N., & Roque, J. (2006). Introducción a las Plantas Endémicas del Perú. EL libro rojo de las plantas endémicas del Perú. *Revista Peruana de Biología*, *13*(2), 9–22. <https://doi.org/10.15381/rpb.v13i2.1782>

- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal II*.
- López, A. (2006). Propagación *in vitro* de *Echinocactus grussonii* HILD., (Cactaceae), especie en peligro de extincion. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Retrieved from [http://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/11085/Propagaci%F3n in Vitro de Echinocactus grusonii hild., %28cact%El%20ceca%29, especie en peligro de extinci%F3n.pdf?sequence=1](http://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/11085/Propagaci%F3n%20in%20Vitro%20de%20Echinocactus%20grusonii%20hild.,%20cact%20El%20ceca%20especie%20en%20peligro%20de%20extinci%F3n.pdf?sequence=1)
- Malda, G., Suzán, H., & Backhaus, R. (1999). *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae*, 81(1), 71–87. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(98\)00250-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(98)00250-7)
- Martínez, Y., Andrade, M., Villegas, Á., Alia, I., Villegas, O., & López, V. (2011). Cultivo *in vitro* de pitayo (*Stenocereus stellatus* [Pfeiffer] Riccobono). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 17(3), 95–105.
- Mateo, J.M. & Urbano P. (1998). Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Ediciones Mundi- Prensa, Madrid, España.
- Mateo, L.A. (1990). Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ediciones Mundi- Prensa, Madrid, España
- Méndez, M., Dorantes, A., Dzib, G., Argáez, J., & Durán, R. (2006). Germinación y establecimiento de plántulas de *Pterocereus gaumeri*, una cactácea columnar, rara y endémica de Yucatán, Mexico. *Boletín de La Sociedad Botánica de México*, 79, 33–41.
- Mendoza, G. (2007). Popagación *in vitro* de *Astrophytum ornatum* (De canolle) Weber (Cactaceae), especie amenazada de extincion. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Ministerio de Agricultura y Riego. (2016). Lista de clasificación oficial de especies amenazadas de flora silvestre.

- Ministerio del Ambiente. (2018). Listado De Especies De Flora Silvestre Cites - Perú. Ministerio del Ambiente (1ra ed.).
- Montesinos, D. (2011). Ecología y usos populares de ‘Towana’: *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza (Cactaceae) en la Provincia General Sánchez Cerro, Moquegua. *Quepo* 25, 78–86.
- Montiel, L., Enríquez, J., & Cisneros, A. (2016). Propagación *in vitro* de *Hylocereus monacanthus* (Lem.) Britton y Rose. *Biotecnología Vegetal*, 16(2), 113–123.
- Muro, G. (2011). Asociaciones nodriza-protégida y germinación de cactáceas en Durango y Tamaulipas. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Novoa, S., Castro, V., Ceroni, A., & Redolfi, I. (2003). Relación entre la hormiga *camponotus sp.* (hymenoptera: formicidae) y una comunidad de cactus (cactaceae) en el valle del río Chillón. *Ecología Aplicada*, 2(2), 169–186. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=64720207>
- Ojeda, M., Rodríguez, H., & Gutiérrez, A. (2008). Micropropagación de cactáceas. VII *Simposium-Taller “Producción y Aprovechamiento Del Nopal En El Noreste de México.”*
- Ordoñez, M. (2003). Propagación *in vitro* de *Mammillaria voburnensis* Scheer. (Cactaceae), 1–70.
- Ostolaza, C. (2011). 101 Cactus del Perú. 1ra Edición. Edición Ministerio del Ambiente. Lima - Perú.
- Ostolaza, C. (2014). Todos los cactus del Perú. 1ra Edición. Editorial Franco EIRL Lima - Perú.
- Pérez, E., & Dávila, C. (2003). *In vitro* propagation of *Pelecypora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38(1), 73–78. <https://doi.org/10.1079/ivp2001248>

- Pérez, E., Pérez, M., Villalobos, E., Meza, E., Morones, L., & Lizalde, H. (1998). Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *Society for In Vitro Biology*, 34, 131–135.
- Perea, M., Tirado, A. (1977). Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. 1ra. Edición. Editorial Universidad Nacional de Colombia, Bogotá
- Pisco, A. (2013). Asociacion cactacea-roca en el cerro umarcata, valle del río Chillón, Lima. Universidad Nacional Agraria La Molina - Lima. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2006.11.006>
- Pizarro N. J. (2014). Cactáceas de Tacna. 1ra Edición. Tacna -Perú. 86 pag.
- Quiala, E., Matos, J., Montalvo, G., de Feria, M., Chavez, M., Capote, A., ... Kowalski, B. (2009). *In Vitro* propagation of *Pilosocereus robinii* (Lemaire) Byles et Rowley, endemic and endangered cactus. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 11, 18–25.
- Quiala, E., Montalvo, G., & Matos, J. (2004). Empleo de la Biotecnología Vegetal para la Propagación de Cactáceas Amenazadas. *Biotecnología Vegetal*, 4(4), 195–199.
- Ramírez, E. (2008). Germinación *in vitro* de dos especies de cactáceas de los genero *Mammillaria* y *Turbiniacarpus*, en estatus de riesgo. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. México.
- Ramírez, R., & Salazar, E. (2016). Propagación y conservación *in vitro* de siete especies de cactáceas del noreste del estado de Guanajuato. *La Región Noreste Del Estado de Guanajuato*, 26, 78–82. <https://doi.org/10.15174/au.2016.1540>
- Rocha, M. (2013). Micropropagación in vitro de cactus cola de rata *Aporocactus flagelliformis* (L). *Universidad de Tolima*, 58.
- Rodríguez, C. (2006). *Morfogénesis in vitro de nueve especies de interés botánico y ornamental pertenecientes a la familia Cactaceae*. Universidad Austral de Chile. Retrieved from <http://www.sidalc.net/cgi->

bin/wxis.exe/?IsisScript=BIBACL.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=034070

- Rodríguez, L., Daquinta, M., Fonet, E., Cantillo, R., & Vásquez, J. (2013). Propagación *in vitro* de *Escobaria cubensis* (Britton & Rose) Hunts. *Ciencia y Sociedad*, 38(2), 345–375.
- Rodríguez, M. (2011). Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales. Puno - Perú.
- Ruvalcaba, D., Rojas, D., & Valencia, A. (2010). Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12, 139–141.
- Salas, L., Foroughbackch, R., Díaz, M., Ávila, M., & Flores, A. (2011). Germinación *in vitro* de cactáceas, utilizando zeolita como sustrato alternativo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3, 565–575. <https://doi.org/10.2118/138467-MS>
- Sánchez, J., Espinosa, A., & González, M. (2010). La Sociedad de Cactáceas y Suculentas de Nuevo León, A.C. *Ciencia UANL*, 13(3), 226–229.
- Sandoval, J. (2005). Propagación *in vitro* del cactus cabeza de viejo (*cephalocereus maxoniirose*) en el laboratorio de biotecnología del icta de barcena, Villa Nueva, Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Santos, M., Campos, J., Arredondo, A., & Santos, M. (2001). Efecto del Medio de cultivo, cinetina y agentes osmóticos sobre la respuesta morfogénica de *Astrophytum myriostigma* (Cactacea) *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 24(2), 133–138.
- Seemann, P., Rodríguez, C., & Jara, G. (2007). Cultivo *in vitro* de cactáceas con fines de conservación ex situ. *Agro Sur*, 35(2), 24–26.
- Señoret, F., & Acosta, J. P. (2013). Cactáceas Nativas de Chile, Guia de Campo. Corporación Chilena de la Madera (Vol. 34). <https://doi.org/10.1021/ic00124a002>
- Smith, R. H., Burdick, P. J., Anthony, J., & Reilley, A. A. (1991). *In Vitro* Propagation of

Coryphantha macromeris. *HortScience*, 26(3), 315.
<https://doi.org/10.21273/hortsci.26.3.315>

Téllez, J. (2012). Morfogénesis *in vitro* de cactáceas. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas.

UNEP WCMC, 2003. Checkl. CITES Sp. 1-339. UNEP World Conservation Monitoring Centre, Cambridge. <http://www.tropicos.org/Name/50180408?langid=66>. (visitado 30/07/2019)

Villavicencio, E., González, A., Arredondo, A., Iracheta, L., Comparan, S., & Casique, R. (2011). Micropropagation of *Turbinicarpus knuthianus* (boed.) john & riha, ornamental cactus of the chihuahuan desert, at risk status. *Revista Mexicana de Ciencias*, 2(6), 37–54.

Villavicencio, E., González, A., Carranza, M., & Arredondo, A. (2012). Micropropagación y producción de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britt. & Rose cactácea ornamental del desierto Chihuahuense.
<https://doi.org/10.1016/j.automatica.2006.11.024>

ANEXOS

ANEXO A. Panel fotográfico



Figura 20. GPS, marca GARMIN.



Figura 21. *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza en macetas, en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, octubre 2017.



Figura 22. Autoclave y balanza analítica, Puno 2017 a 2019. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, 2017 a 2019.



Figura 23. Materiales de desinfección (hipoclorito de calcio), antibiótico y alcohol al 70%. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, 2017 a 2019.

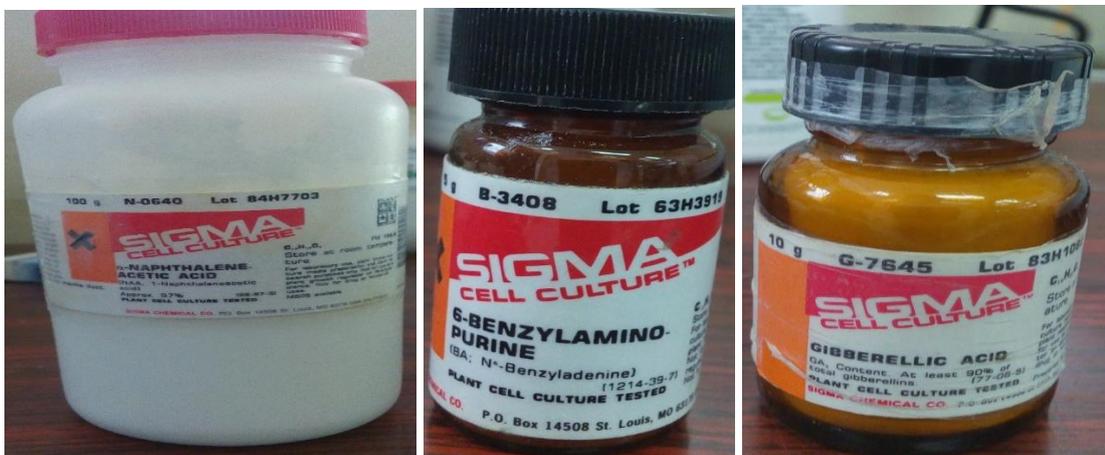


Figura 24. Reguladores de crecimiento (ácido naftalenacético, 6- bencilaminopurina) y ácido giberélico. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, 2017 a 2019.

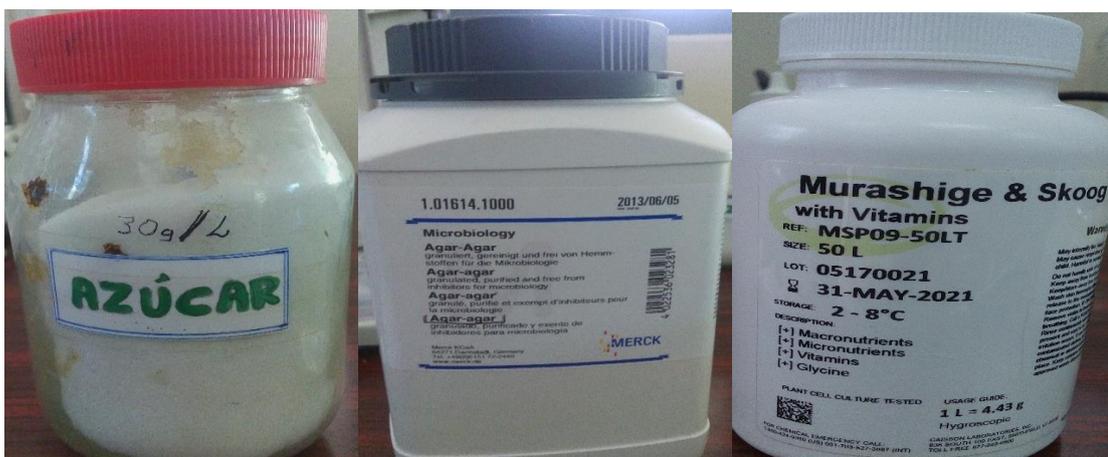


Figura 25. Compuestos para el medio de cultivo, como azúcar blanca, agar – agar y Murashige y Skoog con vitaminas. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, 2017 a 2019.



Figura 26. Preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog y los respectivos tratamientos en matraz Erlenmeyer, Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno 2018.



Figura 27. Frascos de vidrio desinfectados con alcohol al 70%. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno 2017 a 2019.



Figura 28. Introducción de explantes de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza al medio Murashige y Skoog adicionado a concentraciones combinadas de ANA y BAP, en la cámara de flujo laminar. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno 2018.

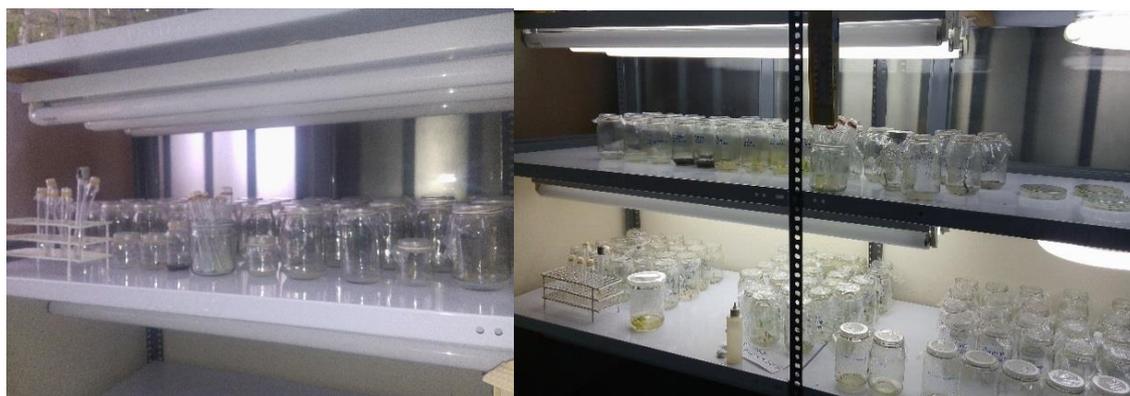


Figura 29. Cámara de crecimiento. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno 2017 a 2019.



Figura 30. Plántulas en medio de cultivo Murashige y Skoog, alcanzando un buen crecimiento (0.8 a 1.0 cm) a los 76 días. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno 2018.



Figura 31. Frascos contaminados por hongos. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno 2018.

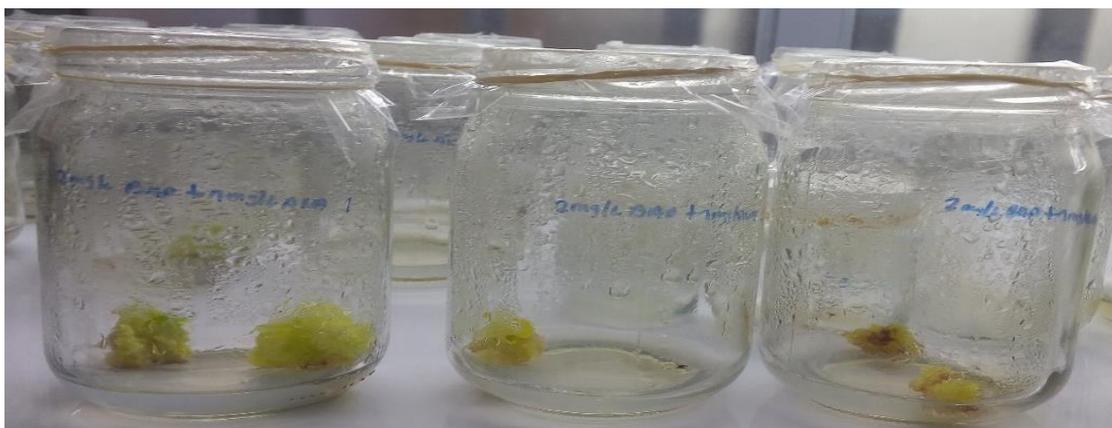


Figura 32. Inducción de callos con 2 mg/l de BAP + 1 mg/L de ANA. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, 11-21-2018.



Figura 33. Inducción de callo con 1 mg/L de BAP + 1 mg/L de ANA. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, 11-21-2018.

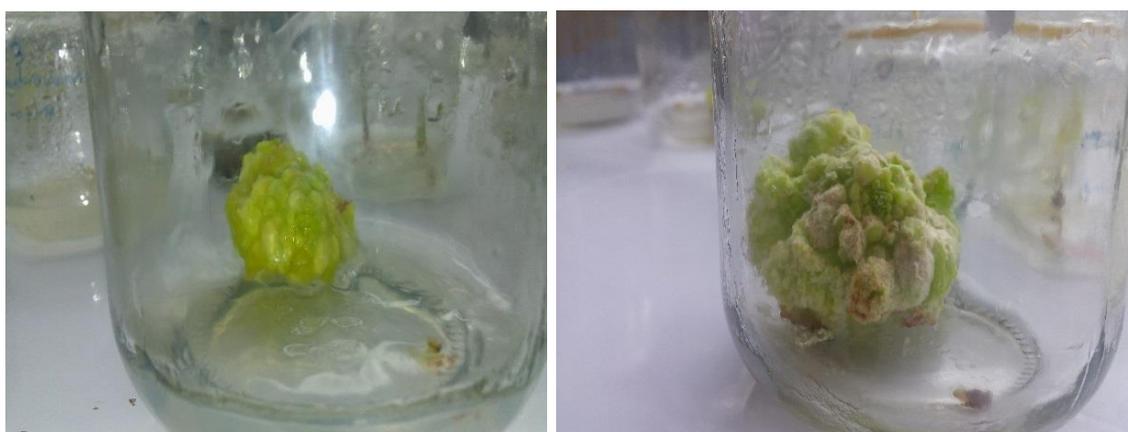


Figura 34. Inducción de callos con 3 mg/L de BAP. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno 2018, 11-19-2018.

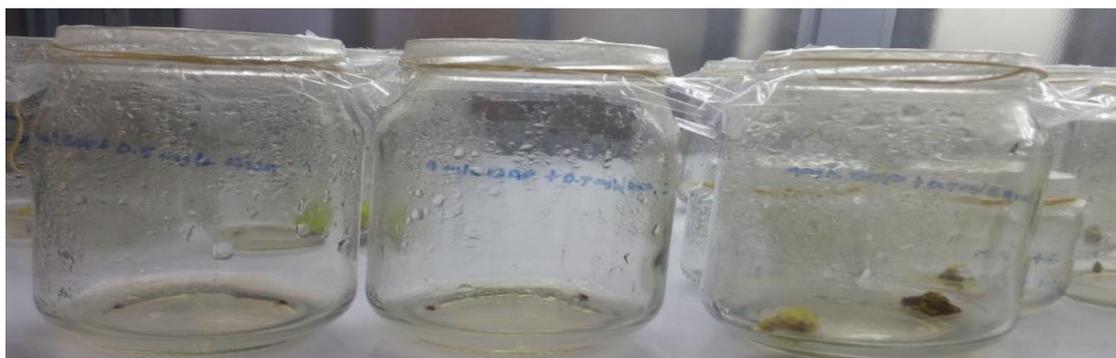


Figura 35. Oxidación de explantes en 1 mg/L de BAP + 0.5 mg/L de ANA. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, 10-15-2018.

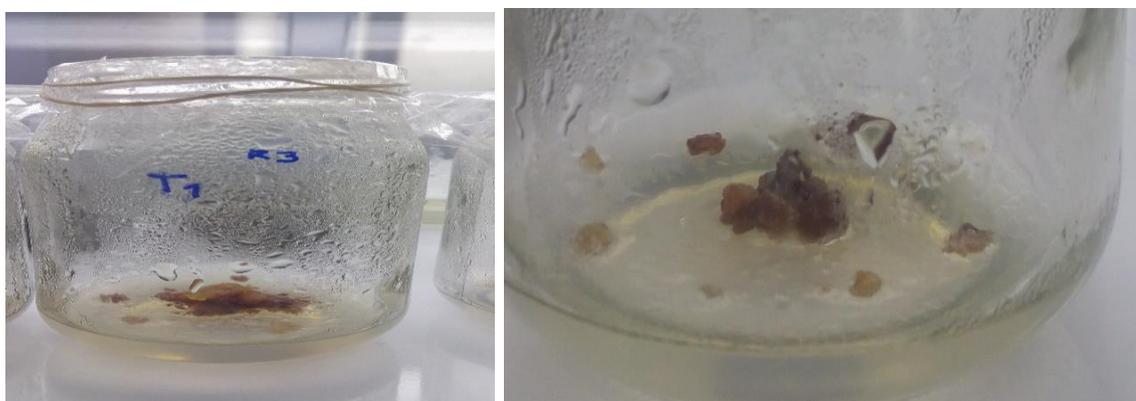


Figura 36. Oxidación de callos en la etapa de formación de brotes. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, 11-12-2018.



Figura 37. Formación de brotes en 2 mg/L de ácido giberélico. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, 16-01-2019.



Figura 38. Formación de brotes en 6 mg/L de ácido giberélico. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, 16-01-2019.

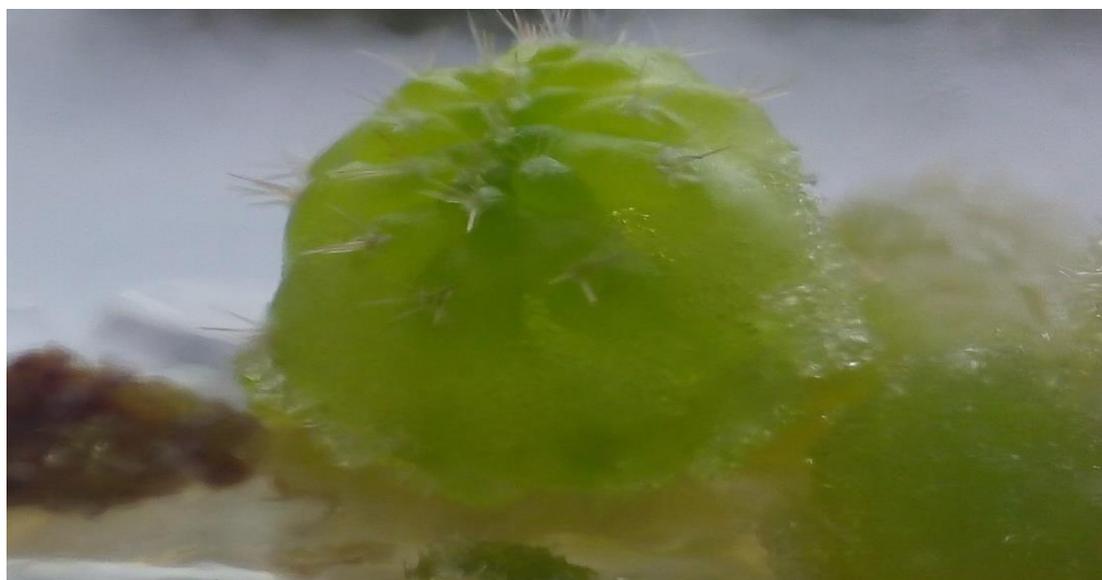


Figura 39. Formación de brote en medio Murashige y Skoog sin ácido giberélico. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, 16-01-2019.

ANEXO B. Tablas

Tabla 16. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS)

Sales y vitaminas	Concentración (mg/L)
Sulfato de magnesio $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
Cloruro de calcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	440
Nitrato de potasio (KNO_3)	1,900
Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	1,650
Fosfato de potasio (KH_2PO_4)	170
Sulfato ferroso ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	27.8
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37.2
Sulfato de manganeso ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	22.3
Sulfato de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	8.6
Sulfato cúprico ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.025
Yoduro de potasio (KI)	0.83
Ácido bórico (H_3BO_3)	6.2
Molibdato de sodio ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.25
Cloruro de cobalto ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.025
Tiamina $\cdot HCl$	0.1
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina	0.5
Glicina	2
Inositol	100

Fuente: Perea & Tirado (1977).

Tabla 17. Número de areolas por plántula. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, 2018.

Día	NÚMERO DE AREOLAS POR PLANTULA			PROMEDIO DE AREOLAS	D.E.	C.V.
	FRASCO 1	FRASCO 2	FRASCO 3			
9	5	5	6	5.3	0.577	0.108
16	6	5	7	6.0	1.000	0.167
23	7	6	7	6.7	0.577	0.087
30	10	7	9	8.7	1.528	0.176
37	12	9	10	10.3	1.528	0.148
44	13	10	10	11.0	1.732	0.157
52	16	11	11	12.7	2.887	0.228
62	17	12	13	14.0	2.646	0.189
68	19	13	14	15.3	3.215	0.210
76	20	14	14	16.0	3.464	0.217

D.E=Desviación estándar, CV=Coficiente de Varianza

Tabla 18. Altura de plántulas. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales – Puno, 2018.

Día	ALTURA DE PLANTULA (cm)			PROMEDIO DE ALTURA	D.E.	C.V.
	FRASCO 1	FRASCO 2	FRASCO 3			
9	0.3	0.3	0.3	0.3	0.00	0.00
16	0.3	0.3	0.3	0.3	0.00	0.00
23	0.4	0.3	0.3	0.3	0.058	0.173
30	0.4	0.3	0.3	0.3	0.058	0.173
37	0.5	0.4	0.5	0.5	0.058	0.124
44	0.5	0.4	0.5	0.5	0.058	0.124
52	0.6	0.5	0.5	0.5	0.058	0.108
62	0.8	0.6	0.6	0.7	0.115	0.173
68	0.8	0.6	0.6	0.7	0.115	0.173
76	0.9	0.8	0.7	0.8	0.100	0.125

D.E=Desviación estándar, CV=Coficiente de Varianza

Tabla 19. Coeficiente de Correlación de Spearman, utilizando el Software Infostat.

	Número de areolas	Altura de plántula
Número de areolas	1.00	1.9E-05
Altura de plántula	0.95	1.00

Tabla 20. Prueba de normalidad para los datos de callos por frasco, aplicando la prueba Shapiro Wilks.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Columna2	30	0.57	0.68	0.71	<0.0001

Tabla 21. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para determinar la diferencia entre tratamientos del número de callos por frasco.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Columna2	1.00	3	0.67	0.58	1.00	14.49	0.0337
Columna2	2.00	3	0.67	0.58	1.00		
Columna2	3.00	3	0.33	0.58	0.00		
Columna2	4.00	3	1.33	0.58	1.00		
Columna2	5.00	3	0.67	0.58	1.00		
Columna2	6.00	3	0.00	0.00	0.00		
Columna2	7.00	3	1.67	0.58	2.00		
Columna2	8.00	3	0.33	0.58	0.00		
Columna2	9.00	3	0.00	0.00	0.00		
Columna2	10.00	3	0.00	0.00	0.00		

Tabla 22. Prueba de normalidad para los datos de altura de callo, aplicando la prueba Shapiro Wilks.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Columna2	30	0.68	0.86	0.77	<0.0001

Tabla 23. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para determinar la diferencia entre tratamientos de altura de callo.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Columna2	1.00	3	0.43	0.40	0.50	13.15	0.0780
Columna2	2.00	3	1.17	1.02	1.60		
Columna2	3.00	3	0.33	0.58	0.00		
Columna2	4.00	3	1.67	0.55	1.40		
Columna2	5.00	3	0.83	0.76	1.00		
Columna2	6.00	3	0.00	0.00	0.00		
Columna2	7.00	3	1.37	0.50	1.30		
Columna2	8.00	3	1.00	1.73	0.00		
Columna2	9.00	3	0.00	0.00	0.00		
Columna2	10.00	3	0.00	0.00	0.00		

Tabla 24. Prueba de normalidad para los datos de brotes por callo, aplicando la prueba Shapiro Wilks.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Columna2	12	2.83	3.79	0.73	0.0008

Tabla 25. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para determinar la diferencia entre tratamientos del número de brotes por callo.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Columna2	1.00	3	0.33	0.58	0.00	9.05	0.0203
Columna2	2.00	3	7.67	4.04	10.00		
Columna2	3.00	3	0.00	0.00	0.00		
Columna2	4.00	3	3.33	2.31	2.00		

Tabla 26. Prueba de normalidad para los datos de altura de brotes, aplicando la prueba Shapiro Wilks.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Columna2	12	0.58	0.63	0.83	0.0343

Tabla 27. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para determinar la diferencia entre tratamientos de altura de brotes.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Columna2	1.00	3	0.33	0.58	0.00	6.69	0.0659
Columna2	2.00	3	0.63	0.16	0.60		
Columna2	3.00	3	0.00	0.00	0.00		
Columna2	4.00	3	1.35	0.59	1.50		

CERTIFICADO DE VALIDACIÓN DE ESPECIE

Arequipa, 25 de Agosto del 2019

Yo, Daniel Bernardo Montesinos Tubée, PhD., certifico que la Bach. Maritza Huanca Percca como parte de su tesis de investigación titulada "Establecimiento y propagación *in vitro* de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza a partir del tejido areolar", ha identificado e investigado correctamente la taxonomía de la especie *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza perteneciente a la familia Cactaceae con distribución en el departamento de Moquegua.

Atentamente,



Daniel Bernardo Montesinos Tubée, Ing, M.Sc., PhD.



Universidad Nacional del Altiplano Puno
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Av. Floral 1153, C.U. Telf. (051) 366080 IP. 20102 Casilla 291 e-mail: fca-una@eudoramail.com



CONSTANCIA

LA QUE SUSCRIBE, DECANA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO.

HACE CONSTAR:

Que, la Srta. MARITZA HUANCA PERCCA, estudiante de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA-Puno, ha culminado con la ejecución del trabajo de investigación “ESTABLECIMIENTO Y PROPAGACIÓN *in vitro* de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza (Cactaceae) A PARTIR DEL TEJIDO AREOLAR”, elaborado en el Laboratorio de Cultivo In Vitro de Tejidos Vegetales de la Escuela Profesional de Ingeniería Agronómica de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNA-Puno, a partir de setiembre del 2017 hasta enero del año 2019; cumpliendo satisfactoriamente con la investigación, demostrando iniciativa y capacidad de trabajo en las labores encomendadas.

Se expide la presente constancia, para los fines que viere por conveniente.

Puno, C.U., 05 de setiembre del 2019.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FAC. CS. AGRARIAS
Ing. Rosario Y. Bravo Portocarrero M.Sc.
DECANA

C.c.:
Archivo
RYBP/iyg.