Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Polylepis pepei*

Beatriz Mamani Sánchez[1]*, Paola Rocabado Koya[1], Lorena Rey Ortiz[2],
Marina Torrez Ramos[1] y Jorge Quezada Portugal[1]
[1] Investigadores Asociados de la Unidad de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología – UMSA
[2] Docente de la Escuela Militar de Ingeniería (EMI)
* e-mail: beita.mamani@gmail.com

Resumen

El género *Polylepis* representa una alta diversidad en Sudamérica, nueve especies se encuentran en Bolivia y aportan a reducir la erosión, sirven de refugio y fuente de alimentación de muchas especies, son fuente de carbón, están presentes en áreas restringidas, tienen una reproducción natural complicada y están en peligro de extinción. Por tal razón es importante realizar acciones para contribuir a su conservación, por ejemplo, a través del cultivo *in vitro*. El material vegetal (yemas) introducido a condiciones *in vitro*, que generó una mejor supervivencia (73,6%) y un 8,9% de contaminación fúngica, fue el T2 (1,7% NaClO*20 min.). En la fase de multiplicación el T3 (Chu *et al.,* 1975 + 0.5 mg/l de AIB + 1 mg/l de AG3 + 1 mg/l de BAP) incentivó la formación de 3,1 brotes, hecho que generó la mayor altura logrando 12,9 mm y formó 7,8 hojas por brote subcultivado. Además en esta fase se detectó la presencia de una bacteria endógena Gram negativa que se expresa a 32 +/- 2 ºC de difícil control y letal.

Palabras clave: *Polylepis,* micropropagación y conservación.

Abstract

The genus *Polylepis* is highly diverse and is restricted to South American countries, such as Bolivia where nine species have been documented. The contribution to the decrease of soil erosion and its use as food source and refuge for many species have long been recognized. But the harvesting of the plant as a combustible source and its complicated natural reproduction process comprise the survival of different populations. So *in vitro* culture methods, represent an important strategy to obtain vegetal material for reforestation purposes in natural areas. *In vitro* culture of this species using buds as explants was carried out. The best results in terms of survival (73,6%) and low fungal contamination (8,9%) were obtained with T2 (disinfection with 1,7% NaClO*20 min.). During multiplication phase, T3 prompted the development of 3,1 shoots, 7,8 leaves per subcultured shoot and an average height of 12,9 mm. Un expectedly, at this phase the presence of an endogenous gram-negative bacteria at 32+/-2°C was detected and inefficiently controlled.

Keywords*:* *Polylepis*, microprogation and conservation.

Introducción

Los bosques de *Polylepis* representan una parte importante de la biodiversidad de Sudamérica; en Bolivia son considerados como el tipo de hábitat más amenazado. Estimaciones indican que menos del 10% de la extensión original sobrevive actualmente. Hasta el año 1996 en el género *Polylepis* se registraron 20 especies, de las cuales se conocen 10 en el Perú, 9 en Ecuador y 9 en Bolivia, que conforman relictos boscosos en diversos ecosistemas de alta montaña, gracias a su adaptación morfológica y fisiológica.

Los bosques de *Polylepis* cumplen un importante rol ecológico como participar activamente contra los procesos de erosión, además que son refugio y fuente de alimento para muchas especies (Fjeldsa & Kessler, 1996). Actualmente, las poblaciones campesinas continúan en una relación muy estrecha con dichos bosques, ya que dependen fuertemente de ellos para la provisión de leña, carbón y agua; lo que conllevaría la degradación y desaparición de la especie, al igual que la fauna y flora que sobreviven específicamente en estos ecosistemas.

Bajo condiciones naturales su recuperación es complicada, debido a que la semilla presenta bajo poder germinativo, según investigaciones realizadas por Prettell (1985) en Perú, *Polylepis incana* presentó valores de germinación entre 2 a 4%; de acuerdo a experiencias realizadas en Argentina, Guzmán (2006) reportó un 3,1% de germinación en *Polylepis tomentella.* Asimismo, presentan una dispersión pobre de semillas (Aguirre, 1988; Brauer, 1986, citados por Cruz, 1999) y, por otro lado, las plántulas tienden a ser consumidas por el ganado presente en el lugar, lo que hace que su reproducción se efectúe a largo plazo.

Polylepis pepei es un arbusto o árbol pequeño que puede llegar hasta 4 m, parece una miniatura de *Polylepis sericea*; se distingue por presentar foliolos más pequeños y menos números, con frutos característicos con bordes torcidos con abultamientos (pero sin espinas). Es una especie rara, conocida solo entre los 3.450 a 4.100 msnm en el límite superior de los bosques de Yungas, en la zona de transición desde los bosques a la zona de la puna, y a menudo crece junto con otros árboles pequeños tales como *Escallonia* o *Gynoxys* spp, y prefiere áreas con niebla (Simpson, 1979). De acuerdo con estudios ornitológicos en la región altoandina de Bolivia, más de 110 especies de aves utilizan los bosques de *Polylepis* y cerca de 40 especies dependen exclusivamente de estos como de *P. pepei,* en el cual habita *Nairetes* (ave en peligro de extinción).

Para ayudar a la recuperación de las especies *Polylepis* se ha optado por realizar técnicas de cultivo *in vitro*, que podrían conseguirse en un corto y mediano plazo bajo condiciones de laboratorio, donde se utilizan los componentes y condiciones ambientales más adecuados para la propagación de la especie estudiada, libre de patógenos y enfermedades (Vega, 2004). Sin embargo, uno de los mayores obstáculos para el establecimiento a condiciones *in vitro* es la contaminación, para ello se recomienda desinfectar los explantes previo a la inoculación en el medio de cultivo, ya que los contaminantes pueden afectar en el desarrollo y sobrevivencia de los explantes, al competir con ellos o generar modificaciones en el medio. También es importante mencionar que la mayoría de las especies forestales en condiciones *in vitro* presenta problemas de oxidación fenólica (Darías, 1993), hecho que afecta el establecimiento de los explantes.

En anteriores investigaciones Vega *et al.* (2004) han desarrollado un protocolo adecuado para la multiplicación en *Polylepis racemosa, P. besseri, P. tomemtella* y *P. tarapacana,* donde determinaron que el medio de cultivo de TL (Tremblay & Lalonde, 1984) fue el que se generó mayor cantidad de brotes en las cuatro especies en estudio; de forma similar, este medio cultivo empleado favoreció en una mayor cantidad de brotes en *P. tomentella* ssp nana

(Vega *et al.*, 2007). En ese sentido, el presente trabajo tiene como finalidad estandarizar el proceso de desinfección de las yemas de *Polylepis pepei*, al igual que su establecimiento y posterior multiplicación en condiciones *in vitro*.

Metodología

Fase de campo

La colecta del material vegetal se realizó en los bosques de Lampayani, donde se encuentra una población representativa de *P. pepei* con un área total de bosque de 10 Ha, ubicada alrededor de la comunidad Keara en la provincia Franz Tamayo, dentro del Parque Nacional y Área de Manejo Integral Madidi del departamento de La Paz. El bosque de Lampayani se encuentra a lo largo de la Cordillera Real, estas regiones presentan un relieve de montaña que incluye mesetas de altura y suaves valles con un rango de altitud entre los 3.200 a 3.900 msnm, los ambientes abarcan vegetación de tipo mayormente arbustivo y herbáceo, y algunos grupos arborescentes como *Polylepis* spp. (Keñua).

Inicialmente se realizó la selección de plantas donadoras del material vegetal, viendo que los árboles de *P. pepei* no muestren síntomas de enfermedades y que las ramas de los individuos presenten yemas juveniles, es decir, que no se encuentren en estado de floración. Para evitar sesgos de variabilidad genética se colectó las ramas *P. pepei* de diferentes individuos dentro del bosque de Lampayani.

Luego se procedió al corte de ramas *P. pepei* con un largo que oscilaba entre los 20 a 30 cm y cada rama tenía entre 1 a 3 yemas apicales; seguidamente las ramas se colocaron en bolsas de polietileno con agua dentro de una conservadora con la finalidad de evitar la pérdida de humedad de los tejidos, así como también minimizar los daños mecánicos durante el transporte hasta su llegada al laboratorio.

El trabajo de propagación *in vitro* se desarrolló en instalaciones de la Unidad de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología, dependiente de la Universidad Mayor de San Andrés de la ciudad de La Paz.

Fase de laboratorio

Establecimiento de yemas de P. pepei a condiciones in vitro

Las ramas con yemas de *P. pepei* se colocaron en recipientes con agua para evitar su deshidratación, luego se escogieron y cortaron las yemas apicales juveniles de cada rama, el procedimiento de desinfección utilizando fue el protocolo establecido por Rocabado & Quezada (2004). Seguidamente, dentro de la cámara de flujo laminar se diseccionó la parte externa de las yemas quitando el tejido necrótico hasta obtener la yema con tejido meristemático, posteriormente se eliminó la pubescencia del tallo y cortando el mismo diagonalmente para su posterior siembra en el medio de cultivo (Chu *et al*., 1975), el cual fue suplementado con 0,5 mg/l de AIB, 1 mg/l de AG3, 1 mg/l de BAP, 30 g/l de azúcar, 4,5 g/l de agar y ajustado a un pH de 5,7± 0,1.

Para una segunda introducción durante la desinfección se varió las concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) y tiempos de inmersión en esta solución cuyos tratamientos consistieron en: T1 (1,5% NaClO*25 min.), T2 (1,7% NaClO*20 min.) y T3 (2% NaClO*15 min.). Durante esta fase se evaluaron: porcentaje de contaminación fúngica y bacteriana, porcentaje de sobrevivencia y grado de oxidación.

Multiplicación in vitro

Los explantes provenientes de la anterior fase fueron sembrados en tres medios, para los dos primeros se utilizó el medio basal TL (Tremblay & Lalonde, 1984), en el cual se varió las concentraciones de los reguladores de crecimiento cuyos medios correspondieron en: T1 (TL + 0,23 mg/l BAP + 0,1 mg/l AIB) y T2 (TL + 0,2

mg/l BAP) y el tercer medio estaba constituido por el medio basal (Chu *et al.*, 1975) con 0,5 mg/l de AIB + 1 mg/l de AG3 + 1 mg/l de BAP (T3). Pasado los 30 días de siembra se evaluaron el número y altura de brotes y número de hojas/brote.

Resultados y discusión

Establecimiento in vitro

Efectividad de la desinfección de la primera prueba de introducción

La desinfección de los explantes fue efectiva porque no se presentó contaminación, sin embargo, este tratamiento desinfectante (2% de hipoclorito de sodio por 15 minutos) fue muy agresivo con los explantes ya que redujo la sobrevivencia a 31,5%..

Segunda prueba de introducción:

Contaminación fúngica y bacteriana

El porcentaje de contaminación fúngica varió significativamente en relación a los tratamientos de desinfección ($F=7,00$; $GL_{2, 219}$; $P<0.001$)**.** Ya que se evidenció, que en el tratamiento T3 (2% NaClO*15 min.) se presentó un menor porcentaje de contaminación (0,7%); y el mismo resultó ser diferente a los otros dos tratamientos desinfectantes. Esta solución desinfectante utilizada presentaba mayor concentración de hipoclorito de sodio en comparación con los demás tratamientos, razón por la que el desinfectante actuó de manera más eficiente en la eliminación de los agentes patógenos. Sin embargo, en los tratamientos desinfectantes T1 (1,5% NaClO*25 min.) y T2 (1,7% NaClO*20 min.) se presentó un 14,8% y 8,9% de contaminación fúngica, respectivamente.

El T1 los explantes estuvieron inmersos durante un tiempo más prolongado, pero con una menor concentración de hipoclorito de sodio, no obstante este periodo de tiempo no llegó a ser suficiente para tener una eficaz desinfección, por lo tanto, podría obtenerse un mayor grado de contaminación con relación al T2. No obstante, el T2 a pesar de que la concentración de hipoclorito de sodio fue relativamente mayor que T1 y con un tiempo de exposición menor, la contaminación fúngica fue relativamente baja. Este resultado hace suponer que la concentración de hipoclorito de sodio en *P. pepei* probablemente sea un parámetro determinante que el tiempo, ya que los rangos de intervalo de 5 minutos que tenía cada tratamiento al parecer no afectaron.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la contaminación bacteriana de los diferentes tratamientos de desinfección ($F=1,44$; $GL_{2, 219}$; $P>0.001$)**.**

Oxidación

El análisis estadístico mostró diferencias estadísticas en la oxidación ($F=3,63$; $GL_{2, 219}$; $P<0,001$). La figura 1 muestra que T2 presentó mayor número de explantes con un nivel de oxidación 2 (la oxidación es relativamente leve, la cual no ocasiona la muerte de los explantes). La oxidación se produce debido a un daño mecánico al explante que conlleva a la liberación de radicales libres como los fenoles, que se expresan con un empardecimiento del medio de cultivo que se inicia en las zonas cercanas al explante y que puede extenderse por todo el medio como consecuencia del proceso de oxidación, pudiendo llegar a impedir al explante la absorción de nutrientes a tal nivel que cause su muerte (Quezada, 2005, citado en Mamani, 2005).

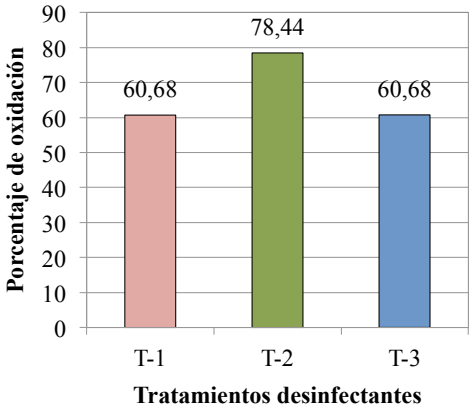

Figura 1. Porcentaje de explantes oxidados en tres tratamientos desinfectantes.

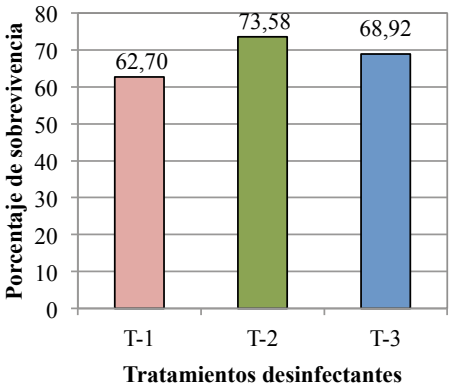

Figura 3. Porcentaje de sobrevivencia por tratamientos de desinfección.

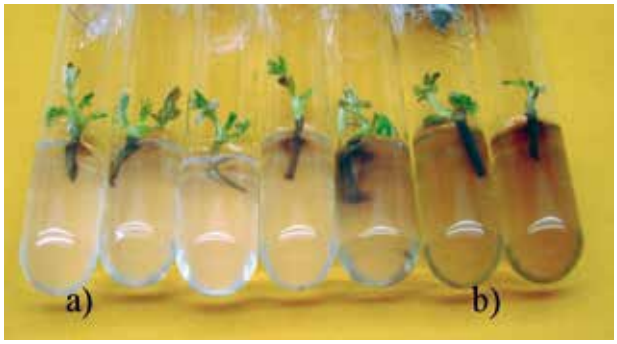

Figura 2. Grados de oxidación a) Relativamente leve y b) Leve (ambos grados no ocasionan muerte de los explantes).

Sobrevivencia

En relación a los porcentajes de sobrevivencia (figura 3), se evidenció que en los tres tratamientos de desinfección no difirieron entre sí ($F=1,40$; $GL_{2, 219}$; $P>0,001$). El T2, T1 y T3 presentaron un 73,6%, 68,9% y 62,7% de sobrevivencia, respectivamente.

Al presentar un bajo porcentaje de sobrevivencia en *P. pepei* al emplear 2% de hipoclorito de sodio por 15 minutos de desinfección probablemente este resultado se debió a que este tratamiento desinfectante fue estandarizado para yemas apicales de *P. racemosa* (Quezada & Rocabado, 2005), que son de mayor tamaño y con mayor pubescencia, por lo que el tejido se encuentre menos expuesto a la acción agresiva del desinfectante. Mientras que las yemas de *P. pepei,* al ser más pequeñas y menos pubescentes, son más sensibles al desinfectante. En este sentido, se puede señalar que los explantes de *P. pepei* no soportaron altas concentraciones de hipoclorito de sodio, llegando de esta manera a reducir la sobrevivencia.

El T3 (2% NaClO*15 min.) presentó mayor efectividad en la desinfección, sin embargo, también fue en el que se presentó mayor porcentaje de muerte de los explantes (30,4%) y de estos sobrevivieron un 68,9%. En el T1 (1,5% NaClO*25 min.) se perdieron los explantes por contaminación (14,8%) y un 22,5 por necrosis y un 62,7 sobrevivieron. Sin embargo, el T2 (1,7% NaClO*20 min.) fue el más eficiente tratamiento desinfectante en las yemas de *P. pepei* ya se logró establecer un 73,6% de explantes con bajo porcentaje de contaminación (8,9%) y con relativo bajo porcentaje de explantes muertos (17,5%).

Fase de multiplicación in vitro

Número de brotes

El número de formados en los tres medios de cultivo durante el primer subcultivo en *P. pepei* no varió significativamente (F=2,71; $GL_{2, 57}$; P>0,001). Sin embargo, se evidencia que en el medio de cultivo (Chu *et al.*, 1975) con 0,5 mg/l de AIB + 1 mg/l de AG3 + 1 mg/l de BAP (T3) presentó mayor cantidad de brotes que los otros dos medios de cultivo, de los cuales el medio basal de sales fue el medio TL (Tremblay & Lalonde, 1984), ver figuras 4 y 5.

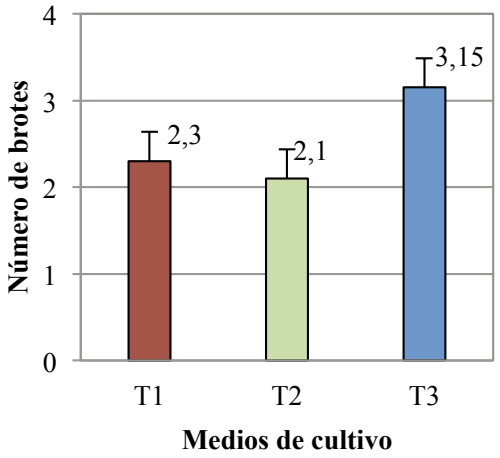

Figura 4. Número de brotes en diferentes medios de cultivo T1 (TL + 0.23 mg/l BAP + 0,1 mg/l AIB), T2 (TL + 0,2 mg/l BAP) y T3 (Chu *et al.* ,1975) + 0,5 mg/l de AIB + 1 mg/l de AG_3 + 1 mg/l de BAP.

Comparando con otra especie del género *Polylepis* que fueron sometidos al mismo medio de cultivo del T1 (TL + 0,23 mg/l BAP + 0,1 mg/l AIB) en *P. tomentela* ssp nana (Vega *et al.*, 2007) formaron 6 brotes. Mientras que en *P. pepei* fue 2 veces menor (2,3 brotes) en relación a *P. tomentela* ssp nana. Estos resultados sugieren que la respuesta en cuanto al número de brotes está influenciado por el genotipo a cultivar y el estado de desarrollo de la planta, tal como afirma Pierik (1990).

No obstante, en un estudio realizado por Jaramillo (2008) en *P. microphylla* en el medio de cultivo T3 (Chu *et al.,* 1975 + 0,5 mg/l de AIB + 1 mg/l de AG3 + 1 mg/l de BAP) obtuvo 2,9 brotes. Se podría señalar que en *P. pepei* se obtuvo un similar resultado ya que en la especie en estudio se obtuvo 3,1 brote. Pero utilizando 1,5 mg/l de BAP + 1,5 mg/l de AG3 0,5 mg/l de AIB en *P. microphylla* se incrementa el número de brotes (4).

Altura de los brotes

La longitud de los brotes de *P. pepei* difirieron significativamente en los tres medios de cultivo utilizados (F=4,59; $GL_{2, 57}$; P<0,001). Siendo el T3 (Chu *et al.* + 0,5 mg/l de AIB + 1 mg/l de AG3 + 1 mg/l de BAP) el que presentó brotes con mayor altura (12,9 mm) y este tratamiento fue estadísticamente diferente del T1; pero el T3 tuvo un comportamiento similar que T2. Es así que el T2 (TL + 0,2 mg/l BAP) generó brotes que alcanzaron una altura promedio de 10,2 mm, mientras que en el T1 (TL + 0,23 mg/l BAP + 0,1 mg/l AIB) se observó una menor longitud de los brotes de 10,9 mm (figura 6).

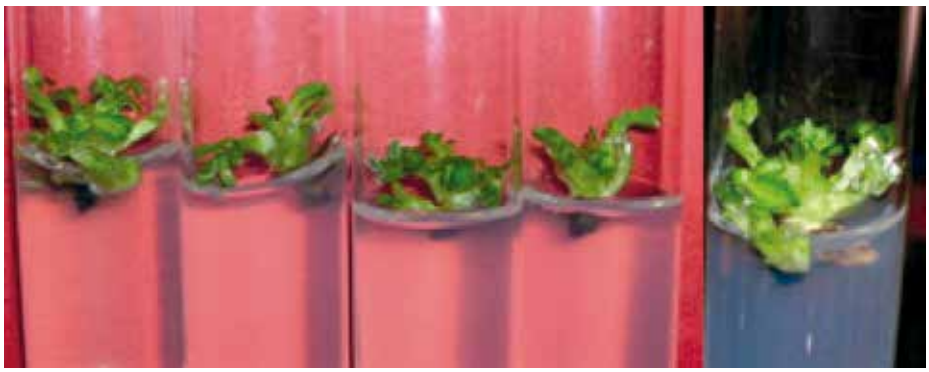

Figura 5. Brotes que se desarrollaron en el medio de cultivo (Chu *et al*., 1975)

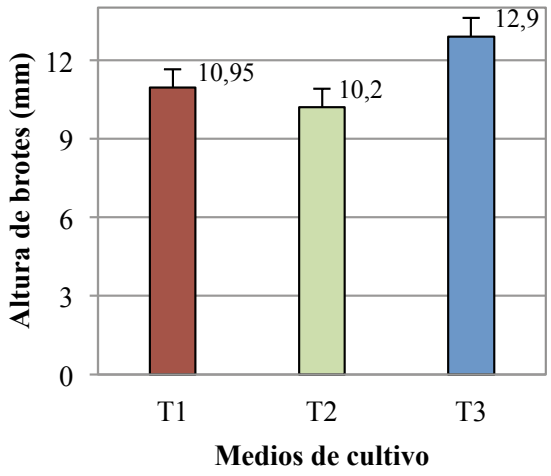

Figura 6. Longitud de brotes en diferentes medios de cultivo. T1 (TL + 0,23 mg/l BAP + 0,1 mg/l AIB), T2 (TL + 0,2 mg/l BAP) y T3 (Chu *et al.* ,1975 + 0,5 mg/l de AIB + 1 mg/l de AG_3 + 1 mg/l de BAP).

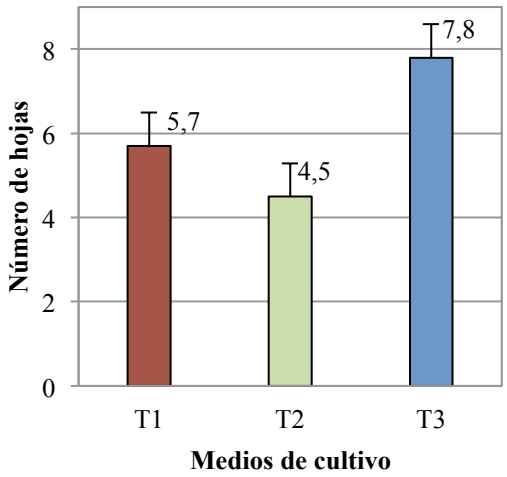

Figura 7. Número de hojas por brote subcultivado en diferentes medios de cultivo. T1 (TL + 0,23 mg/l BAP + 0,1 mg/l AIB), T2 (TL + 0,2 mg/l BAP) y T3 (Chu *et al*., 1975 + 0,5 mg/l de AIB + 1 mg/l de AG_3 + 1 mg/l de BAP).

La mayor longitud registrada en el medio de cultivo del T3 (Chu *et al.*, 1975 + 0,5 mg/l de AIB + 1 mg/l de AG3 + 1 mg/l de BAP) probablemente se deba a que este medio de cultivo se tiene 9 veces de AIB que el T1 y además tiene suplementado 1 mg/l de AG3 a diferencia de los otros dos medios de cultivo del (T1 y T2). La razón por la cual se observó mayor longitud de los brotes en el T3 se debe a que el AIB y AG_3 promueven el alargamiento celular (Gómez, 1999).

Número de hojas

El número de hojas formadas en los distintos medios de cultivo durante la multiplicación *in vitro* en *P. pepei* fue significativamente diferente (F=4,50; $GL_{2, 57}$; P<0,001). Ya que los brotes que estaban en el medio de cultivo (Chu *et al.*, 1975 + 0,5 mg/l de AIB + 1 mg/l de AG3 + 1 mg/l de BAP) del T3 presentaron mayor número de hojas (7,8) siendo este medio de cultivo estadísticamente diferente del T1 (TL + 0,23 mg/l BAP + 0,1 mg/l AIB); pero el T2 (TL + 0,2 mg/l BAP) fue estadísticamente similar que el T1 y T3. Llegándose a formar en el T2 y T1 4,5 y 5,7 hojas por brote subcultivado, respectivamente (figura 7).

Durante esta fase, en el segundo y tercer subcultivo se evidenció en los brotes de *P. pepei* la presencia de bacterias, que aparecieron inicialmente en la base de los brotes en un 90% de los mismos; se piensa que este tipo de contaminación pudo deberse a causa de una bacteria endógena, ya que durante la fase de introducción y en el primer subcultivo no se presentó dicha bacteria, probablemente esta expresión se debió al incremento de la temperatura en la cámara de crecimiento (aproximadamente de 32 +/- 2 ºC). Para mitigar este efecto, un grupo de brotes fue inmerso en una solución de gentamicina y los demás fueron desinfectados con hipoclorito al 0,2% durante un minuto, para nuevamente pasarlos a medio fresco. A pesar de la aplicación de estos tratamientos desinfectantes, la bacteria volvía a expresarse, debido a esto se hizo un antibiograma, prueba que determinó el antibiótico preciso para eliminar este problema; además se determinó que era una bacteria Gram negativa resistente a la gentamicina, la cual se desarrollaba mejor en altas temperaturas (25-37 °C); a consecuencia de ello se perdió todo el material vegetal. Al respecto, Digonzelli (2007) menciona que las bacterias son los contaminantes más comunes y ocasionan serios problemas porque pueden ser sistémicas y son di-

fíciles de detectar. Algunas son endógenas, o sea viven con el explante, y son muy difíciles de eliminar. A menudo no se observan en los primeros subcultivos, manifestándose en la fase de multiplicación.

Estos microorganismos escapan a los efectos de desinfección superficial y pueden ser inter o intracelulares, entre los últimos se encuentran muchos géneros bacterianos como: *Agrobacterium, Bacillus, Corynebacterium* y *Pseudomonas*. Se descartó la idea de trabajar con antibióticos, ya que podrían afectar la multiplicación y desarrollo de las vitroplantas, de esa forma también a la tasa de crecimiento de los tejidos cultivados (George & Sherrington, 1984).

Conclusiones

El mejor tratamiento desinfectante para yemas de *P. pepei* fue el T2 (1,7% NaClO*20 min.). El medio que presentó mejores resultados para la fase de multiplicación *in vitro* en *Polylepis pepei* fue el medio Chu *et al.* (1975) + 0,5 mg/l de AIB + 1 mg/l de AG_3 + 1 mg/l de BAP.

Recomendaciones

Repicar los explantes cada 20 días durante los primeros subcultivos, de manera que se vaya quitando el tejido muerto de la base del explante. Realizar estudios de la bacteria presentada durante la etapa de multiplicación, que esclarezcan el origen de la misma (endógeno) y, por otro lado, el factor que induzca su expresión bajo condiciones *in vitro.*

Realizar pruebas de enraizamiento utilizando como medio basal el medio Chu *et al*. Llevar a cabo pruebas de enraizamiento *ex vitro* de vitroplantas de *Polylepis pepei* en vivero.

Referencias citadas

Cruz, A.S. 1999. Efecto de sustratos orgánicos en la reproducción vegetativa de la queñua (*P. incana*, H.B.K.) Rosoideae. Tesis de Grado. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. 92 pp.

Darias, R. 1993. Recopilación de temas sobre técnicas de cultivo *in vitro*. Oruro, Bolivia. UTO. Universidad Camilo Cienfuegos de Matanzas. Cuba. 169 p.

Digonzell P., Díaz L., Carrizo S., Latife J. & Sosa S. 2007. Diferentes dosis de ppm para controlar la contaminación bacteriana y sus efectos sobre el crecimiento *in vitro* de caña de azúcar en la etapa de multiplicación consultado 15 de agosto 2007, disponible en línea http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/01/posterpdf/01-083/=Texto=.PDF.

Fjeldsa J. & Kessler, M. 1996. Ecología en Bolivia. Revista del Instituto de Ecología, Nº 9. Edición Instituto de Ecología (UMSA). La Paz, Bolivia. pp. 1-13

George, E y Sherrington D. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1. Handbook and Directory of Comercial Laboratories, England. 679 pp.

Gómez, R. 1999. Aplicaciones de la Biotecnología en la Mejora Genética de Plantas y la Producción de semillas. Modulo 1: Cultivo *in vitro*. Ed. rev. Santa Clara, Cuba. s.e. pp. 32-47.

Jaramillo, P. 2008. Establecimiento del cultivo in vitro de *Polylepis microphylla* como futura estrategia de conservación de la especie en la provincia del Chimborazo. Tesis de licenciatura en la Escuela Politécnica del Ejército – Departamento de Ciencias de la vida Ingeniería en Biotecnología. 117 pp.

Mamani, B. 2005. Comportamiento *in vitro* de dos variedades de frutilla (*Fragaria ananassa Duch*.) para su micropropagación en diferentes medios de cultivo. Tesis de Lic. en Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia. 100 p.

Quezada, J. y P. Rocabado. 2005. Inducción del enraizamiento *in vitro* de brotes caulinares de *Polylepis racemosa* a través del manejo de la concentración de ácido indolacetico (AIA) y sacarosa. En Revista BIOFARBO, Órgano Oficial del Colegio de Bioquímica y Farmacia de Bolivia. La Paz, Bolivia. 83-86 pp.

Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ed. Rev. Editorial Mundi-prensa. Madrid España. 327 pp.

Vega, C. 2002. Introducción y micropropagación *in vitro* de cuatro especies de Keñua (*Polylepis* sp.) del departamento de La Paz. Tesis de Grado. Universidad Loyola. Carrera de Agronomía. La Paz, Bolivia. 112 pp.

Vega, C. 2007. Propagación masiva de *Polylepis tomentela* Weddell ssp. nana mediante técnicas de cultivo in vitro. Revista Ecología en Bolivia Vol. 42(2) 102-120 pp.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento de la Asociación Armonía, dentro del marco del proyecto Conservación de Aves Amenazadas de los Bosques de Polylepis en Bolivia, bajo la coordinación de la Lic. Isabel Gómez.