

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA DE AGRONOMIA

**Establecimiento *in vitro* de diferentes especies y genotipos del género  
*Rhododendron* mediante el uso de técnicas de micropropagación.**

Tesis presentada como parte  
de los requisitos para optar al  
grado de Licenciado en  
Agronomía.

**Rodrigo Gonzalo Dubos Cárdenas**

VALDIVIA - CHILE

2006

Profesor Patrocinante.

Peter Seemann Fahrenkrog.

---

Ing. Agr., Dr. rer. hort.

Profesores Informantes.

Laura Böhm Stoffel.

---

Ing. Agr.

Fernando Medel Salamanca.

---

Ing. Agr., Dr. Ing. Agr.

**INSTITUTO DE PRODUCCIÓN Y SANIDAD VEGETAL.**

## **Agradecimientos.**

En primer lugar deseo agradecer al Profesor Patrocinante de esta tesis Don Peter Seemann F, no solo por sus excelentes consejos y guías en el desarrollo de esta investigación, sino también por la confianza entregada en todas las etapas de este trabajo.

A los Profesores Informantes Doña Laura Böhm S. y Don Fernando Medel S., por sus correcciones y consejos, los cuales siempre fueron en virtud de mejorar el trabajo realizado.

Gloria, Manuel, Alejandra y Jennifer, muchas gracias por todo el apoyo y la ayuda que me prestaron en la realización de esta tesis.

A mi familia, hubiera sido imposible llegar a la meta final si no hubiera sido por todos ustedes. Muchísimas gracias por estar en las buenas y en las malas. Los quiero muchísimo.

Gladys, en primer lugar, quiero agradecerte por ser la persona que eres y por aceptarme tal como soy. Por último te quiero agradecer por ayudarme y aguantarme en esta etapa de mi vida que llega a su fin. Te amo mucho.

Finalmente, agradezco a mis amigos con los que empecé este sueño de ser profesional y a los que fui haciendo durante toda mi vida, jamás los olvidaré.

**RODRIGO.**

## INDICE DE MATERIAS

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Cultivos de tejidos vegetales <i>in vitro</i>	3
2.2	Micropropagación	4
2.2.1	Ventajas y desventajas de la micropropagación	4
2.2.2	Principales métodos de micropropagación	5
2.2.2.1	Propagación de plantas desde brotes axilares	7
2.2.2.1.1	Cultivo de yemas apicales y axilares	7
2.2.2.1.2	Cultivo de nudos individuales	7
2.2.3	Fases de la micropropagación	8
2.2.3.1	Establecimiento del material en un medio aséptico	8
2.2.4	Factores que influyen en la micropropagación	9
2.2.4.1	Planta donante	9
2.2.4.2	El explante	9
2.2.4.3	Factores físicos	10
2.2.4.4	Medio de cultivo	12
2.2.4.4.1	Macro y micronutrientes	12
2.2.4.4.2	Vitaminas y aminoácidos	12
2.2.4.4.3	Reguladores de crecimiento	13
2.2.4.4.3.1	Auxinas	14
2.2.4.4.3.2	Citoquininas	14
2.2.4.4.3.3	Giberelinas	15
2.2.4.4.4	Carbohidratos	15
2.2.4.4.5	Agentes gelificantes	16
2.2.4.5	pH del medio de cultivo	16
2.2.5	Preparación del medio de cultivo	16

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
2.2.6	Problemas en Micropropagación	17
2.2.7	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Rhododendron</i>	18
3	MATERIAL Y METODO	26
3.1	Ubicación de los ensayos	26
3.2	Materiales utilizados	26
3.2.1	Material vegetal	26
3.2.2	Medio de cultivo	27
3.2.3	Equipamiento de laboratorio	27
3.3	Método	27
3.3.1	Diseño experimental	27
3.3.2	Especies utilizadas de azaleas y rododendros	28
3.3.2.1	Azaleas de hoja perenne	28
3.3.2.2	Azaleas de hoja caduca	28
3.3.2.3	Rhododendros	29
3.3.3	Obtención de explantes	32
3.3.4	Siembra de explantes	34
3.3.5	Incubación	34
3.3.6	Evaluación de los ensayos	34
3.3.7	Análisis de resultados	34
3.3.7.1	Porcentaje de asepsia y contaminación de cultivos	34
3.3.7.2	Porcentaje de brotación	34
3.3.7.3	Porcentaje de sobrevivencia de brotes	35
3.3.7.4	Días a ruptura de yemas	35
4	PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	39
4.1	Porcentaje de asepsia y contaminación de cultivos	39
4.2	Días a ruptura de yemas	45
4.3	Porcentaje de brotación	48
4.4	Porcentaje de sobrevivencia de brotes	51

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
5	CONCLUSIONES	54
6	RESUMEN	56
	SUMMARY	58
7	BIBLIOGRAFIA	60
	ANEXOS	65

**INDICE DE CUADROS**

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Resumen de investigaciones realizadas en rododendros y azaleas	25
2	Características del tipo de explante de azalea y rododendro y condiciones climáticas al momento de la recolección de los explantes	33
3	Resumen de las diferentes características y procedimientos en cuanto a la desinfección de explantes durante las épocas de recolección	33
4	Porcentaje de cultivos asépticos por genotipo y/o especie en las diferentes épocas de ingreso de material	40

## INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Multiplicación de brotes a partir de yemas axilares y apicales	6
2	Desarrollo de brotes adventicios desde formación callosa	7
3	Yemas axilares (izquierda) y explantes nodales (derecha)	26
4	Especies utilizadas en el ensayo	30
5	Especies utilizadas en el ensayo	31
6	Cultivos asépticos de <i>Rhododendron hybridum ponticum</i> x <i>catawbiense</i> 'Purpura' 'Anha Kruschke' (izquierda) y <i>Rhododendron japonicum</i> 'Fucsia' 'Fedora' (derecha)	36
7	Cultivo con presencia de signos de diferentes contaminantes, hongo (izquierda) en <i>Rhododendron hybridum</i> 'Blanco con morado' 'Blue Peter', y bacteria (derecha) en <i>Rhododendron hybridum</i> 'Rojo Sangre' 'Hill's Bright Red'	36
8	Brotes de <i>Rhododendron hybridum</i> 'Rosado' 'Pacific or Coast' (izquierda) y <i>Rhododendron japonicum</i> 'Fucsia' 'Fedora' (derecha)	37
9	Cultivos sobrevivientes de <i>Rhododendron indicum</i> 'Lila' 'Formosa'	37
10	Apertura de yema en un explante nodal de <i>Rhododendron mollis</i> x <i>sinensis</i> de semilla 'Naranja'	38
11	Porcentaje de contaminación por especie y/o genotipo de azalea	42
12	Porcentaje de contaminación por especie y/o genotipo de rododendro	43
13	Número de días a ruptura de yemas por especie y/o genotipo de azalea	46

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
14	Número de días a ruptura de yemas por especie y/o genotipo de rododendro	47
15	Porcentaje de brotación por especie y/o genotipo de azalea	48
16	Porcentaje de brotación por especie y/o genotipo de rododendro	49
17	Porcentaje de sobrevivencia por especie y/o genotipo de azalea	51
18	Porcentaje de sobrevivencia por especie y/o genotipo de rododendro	52

## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo</b>		<b>Página</b>
1	Composición del medio de cultivo Anderson	66
2	Resultados obtenidos del ensayo con <i>Rhododendron japonicum</i> 'Fucsia', (posiblemente 'Fedora')	67
3	Resultados obtenidos del ensayo con <i>Rhododendron japonicum</i> 'Blanco', (posiblemente 'Palestrina' Syn. 'Wilhelmina Vuyk')	68
4	Resultados obtenidos del ensayo con <i>Rhododendron indicum</i> 'Lila', (posiblemente 'Formosa')	69
5	Resultados obtenidos del ensayo con <i>Rhododendron mollis x sinensis</i> (De semilla) 'Naranja'	70
6	Resultados obtenidos del ensayo con <i>Rhododendron mollis x sinensis</i> (De semilla) 'Rojo'	71
7	Resultados obtenidos del ensayo con <i>Rhododendron hybridum</i> 'catawbiense' 'Fucsia con blanco', (posiblemente 'Boursault')	72
8	Resultados obtenidos del ensayo con <i>Rhododendron hybridum</i> 'Rojo Sandía', (posiblemente 'Britannia')	73
9	Resultados obtenidos del ensayo con <i>Rhododendron hybridum</i> 'Blanco con morado', (posiblemente 'Blue Peter')	74
10	Resultados obtenidos del ensayo con <i>Rhododendron hybridum</i> 'Rosado', (posiblemente 'Pacific Coast')	75
11	Resultados obtenidos del ensayo con <i>Rhododendron hybr.</i> 'Blanco', (posiblemente <i>formosum</i> var. <i>formosum</i> )	76
12	Resultados obtenidos del ensayo con <i>Rhododendron hybridum ponticum x catawbiense</i> 'Purpura', posiblemente 'Anna Kruschke'	77

<b>Anexo</b>		<b>Página</b>
13	Resultados obtenidos del ensayo con <i>Rhododendron hybridum</i> 'Rojo Sangre', (posiblemente 'Hill's Bright Red')	78
14	Análisis de comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje promedio de contaminación de azaleas	79
15	Análisis de comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje promedio de contaminación de rododendros	80
16	Análisis de comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje promedio de días a ruptura de yemas de azaleas	81
17	Análisis de comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje promedio de días a ruptura de yemas de rododendros	82
18	Análisis de comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje promedio de brotación de azalea	83
19	Análisis de comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje promedio de brotación de rododendros	84
20	Análisis de comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje promedio de sobrevivencia de azaleas	85
21	Análisis de comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje promedio de sobrevivencia de rododendros	86

## 1 INTRODUCCION

Las técnicas de cultivo de tejido *in vitro* son una alternativa de propagación vegetativa de plantas. Una de las ventajas más significativas que ofrece el método aséptico de propagación, popularmente llamado micropropagación, sobre el método convencional, es su relativa rapidez y el menor espacio que utiliza, además de producir un gran número de plantas a partir de un solo individuo.

Los métodos de micropropagación se encuentran disponibles para incrementar el número de individuos de muchas especies de arbustos leñosos y pequeños árboles. Muchas plantas como azaleas, rododendros y rosas presentan lentitud y otras dificultades al usar métodos de propagación convencional, por lo que el cultivo de tejidos *in vitro* puede facilitar la rápida propagación y distribución de nuevas variedades de estas especies alrededor del mundo, si se usa como herramienta de producción de plantas.

Los rododendros y azaleas se cuentan entre los arbustos de floración más espectaculares e importantes tanto en primavera como en verano e incluso a mediados de invierno y están considerados dentro de los arbustos más decorativos que se cultivan alrededor del mundo. Pertenecen al género *Rhododendron* de la familia Ericáceas. En esta familia, existen al menos 103 géneros y sobre 3350 especies, de las cuales el género *Rhododendron* agrupa, por si solo, aproximadamente 700 a 800 especies.

La clasificación de los *Rhododendron* no es fácil debido a sus constantes revisiones, pero suelen dividirse en dos grandes grupos, las azaleas y los rododendros, cuyas diferencias básicas se podrían determinar, de forma general, de la siguiente manera:

Rododendros: Poseen más de 10 estambres en la flor, hoja perenne, pueden llegar a tener porte arbóreo, tallos fuertes, hojas y flores grandes.

Azaleas: Poseen 5 estambres en la flor, existen especies de hoja caduca, generalmente arbustos pequeños o matas, tallos tiernos, hojas y flores pequeñas.

La propagación tradicional de estas plantas se ha realizado básicamente a través de sistemas vegetativos mediante el enraizamiento de estacas. Sin embargo, esta técnica presenta problemas relacionados con la poca disponibilidad o escaso material inicial para multiplicar y por presentar bajos porcentajes de éxito en el enraizamiento y en consecuencia, la lenta multiplicación que implica el método tradicional.

Por esta razón se han desarrollado otros métodos de multiplicación para estas especies, tales como la micropropagación a partir de yemas apicales, florales o de tejido vegetativo como explantes provenientes de hojas, siendo además una herramienta valiosa para la eliminación de virus.

Con respecto a lo anterior, se plantea como hipótesis, que las respuestas que presentan explantes de azaleas y rododendros en cultivos de tejidos *in vitro*, son distintas, de acuerdo a la época de extracción del explante desde la planta madre.

El objetivo general de esta tesis es establecer una metodología que permita obtener cultivos asépticos a partir de yemas provenientes de diferentes genotipos de plantas pertenecientes al género *Rhododendron*.

Los objetivos específicos son:

Determinar el éxito del establecimiento *in vitro* en doce genotipos usados.

Determinar el efecto de la época del año en el establecimiento *in vitro* en los doce genotipos.

Inducir la brotación *in vitro* a partir de yemas provenientes de diferentes genotipos de plantas pertenecientes al género *Rhododendron*.

## 2 REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Cultivos de tejidos vegetales *in vitro*.

Una de las áreas más interesantes de la biotecnología es el cultivo de tejidos vegetales. El cultivo de tejidos es la habilidad de establecer y mantener órganos y tejidos provenientes de plantas como embriones, brotes, raíces, flores, células y protoplastos en un cultivo aséptico (HARTMANN *et al.* 2002).

El cultivo de tejidos se trata de un proceso simple que se realiza bajo condiciones de laboratorio y que permite la obtención uniforme de plantas en forma masiva (DEL SOLAR, 1985).

Según SEEMANN (1993), el cultivo de tejidos *in vitro* tiene una amplia gama de aplicaciones, de acuerdo al objetivo que se desee lograr, e implica, en forma más amplia, la utilización de células, tejidos u órganos, genéricamente denominados explantes, de las más diversas procedencias dentro de la planta.

La técnica de cultivos de tejidos consiste básicamente en el aislamiento de células o tejidos que, convenientemente desinfectados, son colocados en el medio nutritivo específico bajo condiciones de absoluta asepsia. Mediante el manejo de los niveles hormonales en el medio de cultivo es posible inducir primero la regeneración de brotes y posteriormente de raíces hasta llegar a una planta completa (MUÑOZ, 1987).

Según HARTMANN y KESTER (2002), debido a que la técnica de cultivo de tejidos *in vitro* se desarrolla dentro de un frasco de vidrio o plástico transparente, bajo condiciones de control ambiental y utilizando un medio formulado para el buen desarrollo de los explantes, es que se denomina *in vitro*.

El concepto original de cultivo de tejidos vegetales se ha extendido para abarcar tanto el cultivo aséptico de tejidos como el de células y órganos, dentro de un grupo de

técnicas que se fundamentan en principios como el de la totipotencialidad de la célula vegetal propuesto por Haberlandt (1902) (ROCA y MROGINSKI, 1991).

Las técnicas de cultivos asépticos han contribuido no sólo a un mejor entendimiento de los eventos de la diferenciación celular, sino a un mejor aprovechamiento de tales eventos en la explotación más eficiente de las plantas. En este último aspecto vale la pena mencionar los siguientes usos de las técnicas de cultivo *in vitro*: a) mejoramiento genético; b) obtención de plantas libres de virus y otros patógenos; c) conservación de germoplasma; d) introducción de especies y variedades e) propagación masiva de especies y f) micropropagación (MUÑOZ, 1987; ROCA y MROGINSKI, 1991; SEEMANN, 1993).

## **2.2 Micropropagación.**

Si el cultivo de tejidos consiste en cultivar asépticamente diferentes explantes constituidos por fracciones de un tejido u órgano que se extrae de la planta, la micropropagación es prácticamente una multiplicación masiva bajo condiciones *in vitro* (ROCA y MROGINSKI, 1991).

La micropropagación se relaciona con la multiplicación de un genotipo específico sin que se presente segregación de caracteres genéticos. A menudo incluso se le relaciona con la propagación masal de determinadas plantas a un precio competitivo, como técnica de intensificación de la producción de material vegetal (SEEMANN, 1993).

En la actualidad la micropropagación se está aplicando con gran éxito en una gran gama de cultivos hortícolas, ornamentales, frutales y forestales, sin dejar de lado la aplicación de estas técnicas en cultivos extensivos de los que se ha seleccionado genotipos superiores de los cuales es necesario contar con gran número de plantas idénticas (ROCA y MROGINSKI 1991; SEEMANN, 1993).

**2.2.1 Ventajas y desventajas de la micropropagación.** De acuerdo con GEORGE y SHERRINGTON (1984), ROCA y MROGINSKI (1991) y SEEMANN (1993), la micropropagación es una técnica que ha mostrado importantes ventajas en

comparación con los métodos convencionales de propagación en algunas especies.

Estas se pueden resumir como sigue:

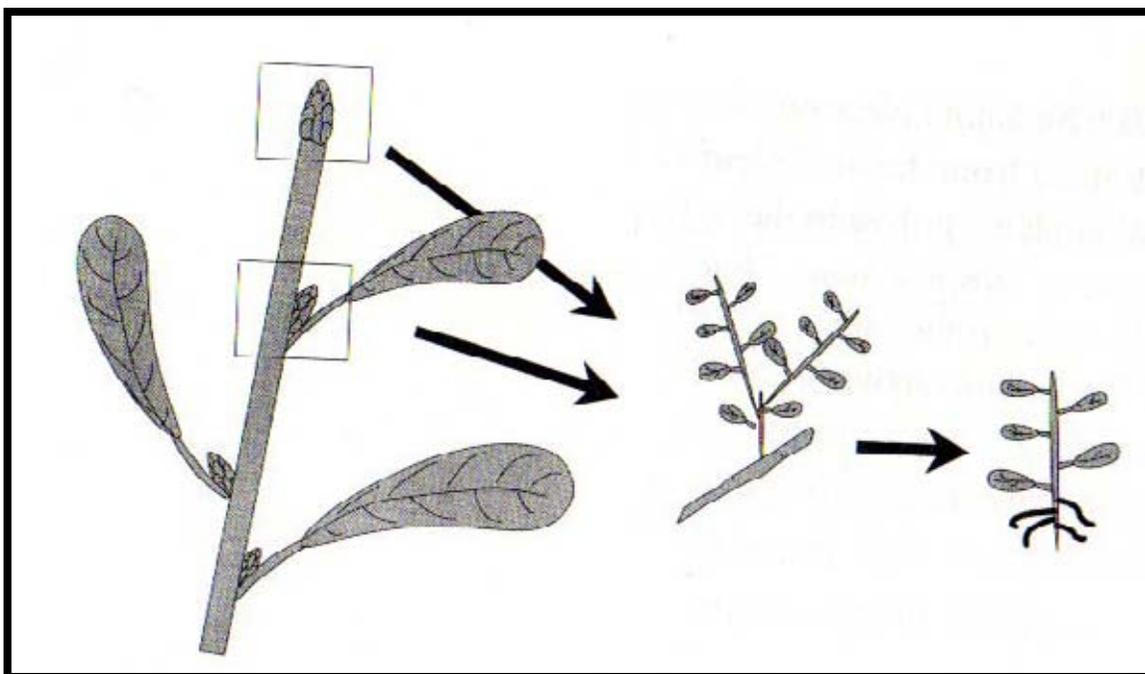
- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente rentables.
- Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga.
- Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro con menos restricciones aduaneras.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos.

Sin embargo, según HARTMANN y KESTER (2002), la micropropagación a escala comercial posee características particulares que podrían crear problemas y por ende limitan su uso. Estas desventajas se pueden resumir como sigue:

- Requerimiento de costoso y sofisticado material de trabajo, entrenamiento del personal y especialización técnica.
- Alto costo inicial de las labores.
- La contaminación puede causar altas pérdidas en corto tiempo.
- Se requiere un volumen alto, más o menos continuo en el sistema de distribución de materiales e insumos.

**2.2.2 Principales métodos de micropropagación.** De acuerdo a GEORGE y SHERRINGTON (1984) y ROCA y MROGINSKI (1991), los métodos que se encuentran disponibles para la propagación de plantas *in vitro* son los siguientes:

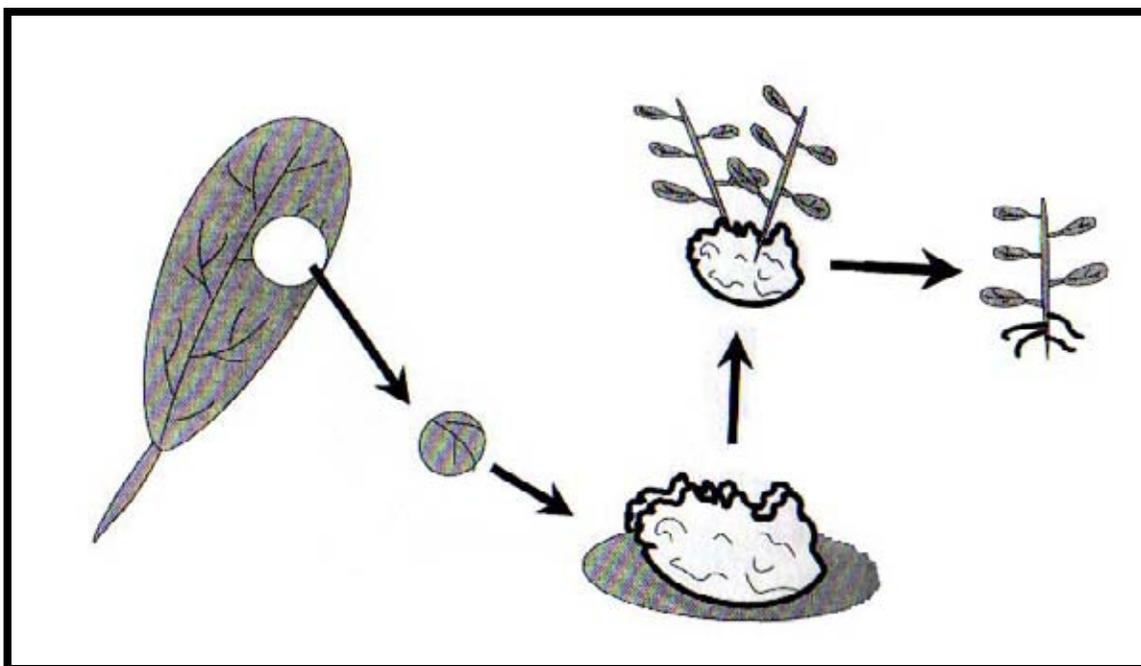
- La organogénesis directa. La multiplicación de brotes provenientes de yemas axilares, terminales o laterales (Figura 1). El tejido usado como inicial es meristemático.



**FIGURA 1** Multiplicación de brotes a partir de yemas axilares y apicales.

**FUENTE:** HARTMANN y KESTER (2002).

- La organogénesis indirecta. En este caso la formación del brote adventicio o de la raíz ocurre en el callo; éste ha derivado inicialmente de un órgano, tejido u otra parte escindida de la planta. El tejido usado como inicial es parenquimático. (Figura 2).
- Embriogénesis somática. Los embriones pueden formarse directamente en el explante primario, o indirectamente de células cultivadas en suspensión o en un medio líquido.



**FIGURA 2** Desarrollo de brotes adventicios desde formación callosa.

**FUENTE:** HARTMANN y KESTER (2002).

2.2.2.1 Propagación de plantas desde brotes axilares. De acuerdo a GEORGE y SHERRINGTON (1984), la producción de plantas desde brotes ha probado ser el método más aplicado y más seguro para propagación *in vitro*. Este tipo de propagación *in vitro* presenta dos metodologías usadas, el cultivo de yemas apicales y axilares y el cultivo de nudos individuales.

2.2.2.1.1 Cultivo de yemas apicales y axilares. Corresponde al método más comúnmente usado para micropropagación comercial *in vitro*. El explante usado para comenzar los cultivos de este tipo son yemas apicales o laterales las cuales pueden medir más de 20 mm. de largo (GEORGE y SHERRINGTON, 1984)

2.2.2.1.2 Cultivo de nudos individuales. Es otra de las técnicas *in vitro* que puede ser usada para propagar plantas desde yemas axilares. Este modelo se utiliza en plantas con brotes que poseen una alta dominancia apical. Brotes largos son cortados con un

nudo individual para posteriormente ser sembrados en forma vertical en el medio. Las yemas axilares de cada nudo elongan y crecen en longitud. Este modelo se repite por nuevos cortes en el segmento y su posterior subcultivo (HARTMANN y KESTER, 2002).

**2.2.3 Fases de la micropropagación.** El proceso de micropropagación se ha separado convencionalmente en cuatro etapas: I, establecimiento del material en un medio aséptico; II, multiplicación del material vegetal; III, enraizamiento y IV, ambientación de las plantas a la condición *ex vitro* (BHOJWANI y RAZDAN, 1983; GEORGE y SHERRINGTON, 1984; ROCA y MROGINSKI, 1991; SEEMANN, 1993).

2.2.3.1 Establecimiento del material en un medio aséptico. La función de esta fase es la de desinfectar y establecer el explante en un cultivo aséptico así como la posterior estabilización de los explantes para el desarrollo de múltiples brotes (GEORGE y SHERRINGTON, 1984; HARTMANN *et al.* 2002).

Una vez seleccionado el explante a utilizar, se requiere desinfectarlo superficialmente, para evitar que en el medio de cultivo puedan crecer microorganismos, principalmente hongos y bacterias, que competirán ventajosamente con el explante. Para esta desinfección se han empleado diferentes compuestos, siendo los más comunes las soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el alcohol a diferentes porcentajes y otros (ROCA y MROGINSKI, 1991).

El material extraído de la planta madre debe ser lavado primero con agua corriente para eliminar polvo y contaminantes y luego con agua destilada agregando algunas gotas de detergente o producto tensoactivo como "Tween" 20 u 80, "Teepol" o bien un detergente líquido de uso doméstico; Esto permite romper la tensión superficial de los tejidos para luego continuar con las demás etapas de la esterilización en ambiente estéril dentro de una cámara de flujo laminar. A menudo en el tejido leñoso se utiliza una solución de etanol al 70% en el cual permanecerá por tiempo variable. A continuación se utiliza el desinfectante propiamente tal como hipoclorito de calcio o de

sodio. Finalmente es necesario remover los productos esterilizantes y esto se lleva a cabo lavando 2 a 3 veces consecutivas, con agua destilada estéril (SEEMANN, 1993).

**2.2.4 Factores que influyen en la micropropagación.** De acuerdo a GEORGE y SHERRINGTON (1984) y ROCA y MROGINSKI (1991), la micropropagación depende, para su buen desarrollo, de varios factores ha considerar como los siguientes:

2.2.4.1 Planta donante. Tanto el estado fisiológico como sanitario de la planta que da el explante (planta madre) influyen significativamente en su capacidad morfogénica. Se ha encontrado, por ejemplo, que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas en diferentes edades fisiológicas (Styer *et al.* 1983; citado por ROCA y MROGINSKI, 1991).

Asimismo, se ha observado que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis. Se sabe que mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro* (Villalobos *et al.* 1982; citado por ROCA y MROGINSKI, 1991).

La posición relativa de las yemas es otro factor importante. Se ha observado, por ejemplo, que las yemas axilares de rosa, obtenidas de la parte media del tallo, se desarrollan más rápidamente que aquellas obtenidas de la base o la porción apical (Bressan *et al.* 1982; citado por ROCA y MROGINSKI, 1991).

2.2.4.2 El explante. La elección del explante apropiado es el primer paso para el éxito en el establecimiento de los cultivos. Dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada (ROCA y MROGINSKI, 1991).

De acuerdo a ROCA y MROGINSKI (1991), las respuestas de los explantes cultivados *in vitro* pueden variar notablemente con el estado de desarrollo y la edad ontogénica de los mismos.

La propagación *in vitro* de la mayoría de las especies leñosas requiere de la utilización de explantes provenientes de material juvenil (Bonga, 1980; Dodds, 1983; citado por ROCA y MROGINSKI, 1991).

El tamaño del explante es otro aspecto que se debe tener en cuenta para el establecimiento de un cultivo. Frecuentemente existe un tamaño óptimo para los explantes usados para iniciar un cultivo de tejidos. Explantes muy pequeños, ya sean brotes o meristemas, fragmentos enteros de tejidos de plantas o piezas de callos, no sobreviven bien en cultivos, y por el contrario el uso de explantes grandes puede traer consigo la dificultad de realizar una desinfección efectiva como también una pérdida en la facilidad en la manipulación de estos (GEORGE y SHERRINTONG, 1984).

Villalobos *et al.* (1982) citado por ROCA y MROGINSKI (1991), sostienen que el tamaño del explante no tiene aparentemente mayor influencia. Solamente en el caso en que se pretendan obtener plantas libres de virus, los meristemas (sin primordios foliares) tienen una alta probabilidad de diferenciar plantas libres de estos patógenos; sin embargo, es más difícil regenerar plantas completas desde ellos.

2.2.4.3 Factores físicos. Aún cuando muchos factores pueden influir en la micropropagación, los factores físicos juegan un papel determinante; la luz y la temperatura han sido los factores más ampliamente estudiados (ROCA y MROGINSKI, 1991).

La incubación de los explantes se hace en una sala *ad hoc* que debe ser de acceso restringido. El área de incubación debe proporcionar condiciones adecuadas en cuanto a temperatura, luz y humedad relativa (SEEMANN, 1993).

BHOJWANI y RAZDAN (1983) y MARGARA (1988), señalan que la micropropagación se puede llevar a cabo entre rangos de temperatura de 22 a 25°C durante el periodo de luz y de 15 a 18°C en el periodo de obscuridad.

Los efectos de la luz proporcionada a los explantes se pueden dividir en términos de intensidad, largo del día y calidad. Las plantas necesitan luz para regular ciertos procesos morfogénicos como formación del tallo, inducción radicular o embriogénesis somática (MARGARA, 1988; HARTMANN y KESTER, 2002).

La intensidad lumínica por lo general fluctúa desde 1.000 a 5.000 lux y va a depender de la cantidad de tubos instalados por repisa y de la calidad de tubos fluorescentes (BHOJWANI y RAZDAN, 1983; SEEMANN, 1993).

Una intensidad de luz de 1.000 lux es la óptima para muchos cultivos de tejidos, pero cuando se trata de preparar plántulas para la transferencia del *in vitro* al *in vivo*, parece preferible aumentar la intensidad de iluminación al orden de 3.000 a 10.000 lux (MARGARA, 1988).

El fotoperíodo es otro aspecto importante en incubación, debe ser regulado con exactitud, evitando influencias del fotoperíodo natural, por lo que la sala de incubación no debe poseer ventanas. Usualmente el fotoperíodo se regula a 12-16 horas (SEEMANN, 1993).

Al respecto es preciso tomar en cuenta que el espectro luminoso fotosintéticamente activo corresponde a los máximos de emisión de 440 nm (luz azul) y 660 nm (luz roja) lo que equivale aproximadamente a luz-día (BHOJWANI y RAZDAN, 1983; SEEMANN, 1993).

Según HARTMANN y KESTER (2002), la calidad de la luz puede afectar la respuesta del crecimiento de brotes *in vitro*. Por ejemplo, cultivos de geranio (*Pelargonium*) expuestos a luz incandescente (roja) mostraron un incremento en la elongación de los brotes, comparados a los expuestos a luz fluorescente (blanca), mientras que los expuestos a luz azul redujeron la elongación de brotes.

De acuerdo a HARTMANN y KESTER (2002), al sellar los recipientes de cultivo con papel de aluminio o parafilm se crea un microambiente con humedad relativa cercana al 100%, por lo que no es necesario prever dispositivos adicionales que permitan controlar la higrometría de la cámara de cultivo.

De acuerdo a SEEMANN (1993), la humedad relativa dentro del cuarto de incubación debería fluctuar entre 70-80%. Valores más bajos, a menudo producen una desecación del medio de cultivo.

2.2.4.4 Medio de cultivo. La micropropagación de especies exige el uso de medios de cultivo más o menos complejos que están compuestos por macro y micronutrientes, aminoácidos y vitaminas, fitohormonas o reguladores de crecimiento, compuestos orgánicos complejos, carbohidratos y eventualmente un gelificante (SEEMANN, 1993).

2.2.4.4.1 Macro y micronutrientes. El carbono, el oxígeno y el hidrógeno forman casi el 95% de la materia seca y son constituyentes fundamentales de los tejidos vegetales. Los macroelementos indispensables son nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio y magnesio, los cuales intervienen en la conservación de los equilibrios iónicos de las plantas (MARGARA, 1988).

Los microelementos son esenciales en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas. Los principales son: hierro, cobre, zinc, manganeso, molibdeno, boro y cloro (ROCA y MROGINSKI, 1991).

La adición de hierro conjuntamente con un agente quelante ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) lo hace disponible en un amplio rango de pH (ROCA y MROGINSKI, 1991).

2.2.4.4.2 Vitaminas y aminoácidos. Si bien los medios de cultivo contienen comúnmente varias vitaminas, es probable que en forma general sólo sea esencial la incorporación de tiamina (ROCA y MROGINSKI, 1991).

Estas sustancias son efectivas en pequeñas cantidades y actúan como factores de la división celular o del crecimiento, ya que ambos cesan cuando algún compuesto escasea en el tejido de la raíz (MARGARA, 1988).

Según SEEMANN (1993), de las vitaminas, la única que ha probado ser un componente esencial de varios medios de cultivo es la tiamina (Vit. B<sub>1</sub>).

Entre las vitaminas que se incluyen normalmente en los medios de cultivo la tiamina, es la más importante (0,1 a 0.4 mg/L), el ácido nicotínico (0.5 mg/L), piridoxina (0.5 mg/L), inositol (100 mg/L), ácido pantoténico (0,1 mg/L) y biotina (0,1 mg/L) (HARTMANN y KESTER, 2002).

Además de vitaminas, se han incorporado aminoácidos a los medios de cultivo, siendo la glicina la que más se usa en la preparación de los medios de cultivo (ROCA y MROGINSKI, 1991).

Se recomienda suministrar al medio algún compuesto antioxidante como por ejemplo el ácido ascórbico (100 mg/L) o ácido cítrico (150 mg/L) especialmente en aquellas especies de difícil establecimiento (HARTMANN y KESTER, 2002).

2.2.4.4.3 Reguladores de crecimiento. Entre las sustancias de marcada influencia sobre las reacciones y el metabolismo vegetal, se cuentan los compuestos internamente sintetizados llamados hormonas. En general, el término “hormonas” se emplea para designar ciertos compuestos orgánicos que ejercen importantes efectos de regulación del metabolismo de un organismo, aún cuando operen en cantidades minúsculas (MEYER, 1976).

Según MARGARA (1988), las fitohormonas no son exactamente homólogas a las hormonas animales. Se agrupan en auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno.

Con respecto a lo anterior MEYER (1976), señala que es común considerar como regulador orgánico a compuestos no nutrientes, exógenos o endógenos que en pequeñas cantidades promueven, inhiben o modifican procesos fisiológicos, reservando el término “hormona” a los reguladores producidos por el vegetal.

El requerimiento de estas sustancias, sin embargo, varía considerablemente con el tejido a usar para micropropagar y depende fundamentalmente del nivel endógeno de fitohormonas naturales (SEEMANN, 1993).

Las hormonas más críticas que permiten mayores variaciones en los medios nutritivos son auxinas y citoquininas (HARTMANN y KESTER, 2002).

De acuerdo a Skoog y Miller (1957) citado por MURASHIGE (1974), la iniciación de raíces y brotes en las plantas, se encuentra regulada básicamente por la interacción entre auxinas y citoquininas.

Aunque ambas hormonas son necesarias para el crecimiento de tejidos *in vitro*, el tipo de organogénesis que se presenta se encuentra relacionada o determinada por la concentración relativa de estas dos sustancias en el medio de cultivo. Así una relación auxina-citoquinina menor a uno favorece la brotación, mientras que si es mayor a uno se induce el enraizamiento de los explantes (MURASHIGE, 1974).

2.2.4.4.3.1 Auxinas. Las auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; sin embargo se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos (ROCA y MROGINSKI, 1991).

Según MARGARA (1988), las auxinas difieren significativamente entre sí en estabilidad, efectividad e influencia. Las propiedades de los distintos compuestos son diferentes. El ácido indol acético (AIA) se utiliza, con frecuencia, en investigaciones de tipo fisiológico, es la auxina que posee el menor efecto inhibitorio en la formación del tallo y presenta la ventaja de ser natural.

Sin embargo MURASHIGE (1974) señala que, aunque el AIA muestra la mayor actividad en la formación de órganos, es la auxina más inestable frente a factores del medio como luz y temperatura.

MARGARA (1988), señala que en los trabajos dirigidos a la multiplicación vegetativa, el AIA se reemplaza con frecuencia por el ácido indol butírico (AIB) y el ácido indol propiónico (AIP). Por otro lado, el ácido naftalén acético (ANA) es una auxina fuerte, muy estable, utilizada especialmente para promover la rizogénesis.

2.2.4.4.3.2 Citoquininas. Las citoquininas, a débil concentración, se utilizan frecuentemente para estimular la proliferación de tejidos en los cultivos. A concentraciones más elevadas favorecen la formación de nuevas yemas sobre callos.

Finalmente, pueden utilizarse a concentraciones muy fuertes para favorecer la proliferación *in vitro* de meristemas axilares en cultivo de ápices y para permitir la obtención de macollos de yemas (MARGARA, 1988).

Entre las citoquininas más usadas se encuentran la benzilaminopurina (BAP), dimetilalilaminopurina (2iP), kinetina (KIN) y zeatina (ZEA) en concentraciones comprendidas entre 0,01- 3 mg/L, según el tipo de desarrollo que se desee inducir (MURASHIGE, 1974).

Según ESCANDON *et al.* (2003), al establecer cultivos asépticos *in vitro* de *Bougainvillea glabra*, obtuvieron los mejores resultados con 5 mg/L de BAP, al agregar al medio de cultivo diferentes concentraciones: 0, 0.1, 1 y 5 (mg/L).

2.2.4.4.3.3 Giberelinas. Son reconocidas como biorreguladores esenciales en la organización de tejidos, reprimiendo los procesos de formación de callos y la iniciación de órganos en algunos casos (MURASHIGE, 1974).

El efecto mejor conocido de las giberelinas, que fue primero observado, es el alargamiento del tallo y de las hojas en un cierto número de especies vegetales superiores (MEYER, 1976).

2.2.4.4.4 Carbohidratos. De acuerdo a MARGARA (1988), los tejidos en cultivo *in vitro* son ampliamente heterotróficos con respecto al carbono, debido a la ausencia o insuficiencia de asimilación clorofílica.

Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono. La sacarosa (2-5%) es el azúcar más utilizado ya que es el más fácilmente metabolizable por las plantas y se puede reemplazar por glucosa y en menor medida por fructosa; en general la maltosa y la galactosa son menos efectivas (ROCA y MROGINSKI, 1991; SEEMANN, 1993).

2.2.4.4.5 Agentes gelificantes. En general las sustancias nutritivas empleadas en cultivo de tejidos *in vitro*, son gelificadas comúnmente con Agar, el cual forma un complejo coloidal con débil poder de retención iónica (MARGARA, 1988).

De acuerdo a SEEMANN (1993), la mayoría de los medios utilizados incluyen un gelificante que impida que el explante se sumerja. Se utiliza agar-agar en concentraciones de 6-8 g/L, Gelrite en concentraciones de 1,5-3 g/L y otros gelificantes alternativos.

2.2.4.5 pH del medio de cultivo. El pH en muchos casos refleja la aprovechabilidad de los nutrientes para las plantas, ya que determina en parte la solubilidad de elementos químicos (del suelo) y a veces indica su abundancia relativa (ARAOS, 1977).

SEEMANN (1993) menciona que antes de adicionar el gelificante al medio debe regularse el pH a valores entre 5 y 6,5, debido a que valores menores o mayores pueden detener el crecimiento.

El pH del medio antes y después del autoclavado es diferente, bajando 0,3 a 0,7 unidades después del proceso de esterilización de los medios. Del mismo modo, durante el crecimiento de los cultivos puede bajar el pH del medio por síntesis de algunos metabolitos, lo cual en algunos casos produce licuación del medio (SEEMANN 1993).

**2.2.5 Preparación del medio de cultivo.** Una vez agregado el medio basal (carbono, nutrientes minerales y vitaminas), los reguladores de crecimiento y otros compuestos, regulado el pH y adicionado el gelificante, se somete a una fuente de calor para disolver este gelificante y poder dispensarlo al matraz o frasco de cultivo, los cuales se cubren con láminas de aluminio, tapones de papel prensado o de algodón hidrófobo o bien *Kaputs* de Magenta. Los frascos o matraces cubiertos se someten a esterilización para eliminar los contaminantes microbianos y fungosos presentes tanto en el medio como en el matraz. El autoclavado se realiza a 1.06 kg/cm<sup>2</sup> a 121°C por un tiempo variable de 15 a 40 minutos (SEEMANN, 1993).

**2.2.6 Problemas en micropropagación.** Según Watad *et al.* (1992) citado por TAPIA (2004), esta técnica presenta varias dificultades. Las mayores dificultades observadas en los explantes al introducirlos al cultivo *in vitro* son:

- a) Contaminación endógena y superficial de los explantes cultivados *in vitro*.
- b) Pardeamiento y ennegrecimiento del medio de cultivo y de los explantes (oxidación), lo que usualmente les causa la muerte. Este fenómeno es conocido en el caso de especies que naturalmente contienen altos niveles de taninos u otros hidroxifenoles. Este pardeamiento se produce por liberación de fenoles al medio de cultivo al producirse heridas en el tejido.
- c) Ausencia de brotación de yemas axilares bajo cultivo *in vitro*.
- d) Hiperhidricidad de los tejidos

Con respecto a la contaminación de explantes, se han realizado diferentes ensayos y métodos de desinfección como por ejemplo: TAPIA (2004) al trabajar en la iniciación *in vitro* de algunas especies Proteáceas de interés comercial en Chile, usó brotes de *Banksia coccinea* los cuales fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 1,5% y al 3% y doble desinfección (1,5+3%), brotes de *Leucospermum* 'High Gold' los que fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 3%, por 10 y 15 minutos, obteniendo en todos los tratamientos, contaminación mayor a 65%, tanto por hongos como por bacteria. Además los explantes que quedaron estériles sufrieron pardeamiento de tejidos y su posterior muerte.

En un segundo experimento, brotes de *Banksia coccinea* fueron desinfectados en forma complementaria con tres distintas opciones: 1) Captan 3 g/L, 2) hipoclorito de sodio en doble desinfección (3%+1,5%) y 3) benomilo al 0,01% y brotes de *Leucospermum* 'Succession II', fueron esterilizados con Captan e hipoclorito de sodio, obteniendo de igual manera diferentes resultados de desinfección, en donde el porcentaje de esterilización no superó el 20% y además todos los explantes se necrosaron en el experimento con *Banksia coccinea*. En relación a *Leucospermum* 'Succession II', a los seis días todos los explantes se encontraban contaminados con bacterias y con hongos.

Ramírez *et al.* (1999, 2000), reportaron que al trabajar en el establecimiento de *Psidium guajava* L., los explantes se esterilizaron superficialmente con agua corriente y detergente, seguido por 30 minutos en 2 g/L de benomilo, 1 minuto en alcohol etílico (etanol) al 70% y posteriormente sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 1,5% y 2,6%, obteniendo tasas variables de contaminación, que fluctuaron entre 30 y 76%.

**2.2.7 Cultivo *in vitro* de *Rhododendron*.** ECONOMOU y READ (1984), DAI *et al.* (1987), HARBAGE y STIMART (1987) e IMEL y PREECE (1988), reportaron que los rododendros pueden ser propagados mediante la utilización de brotes vegetativos provenientes de plantas producidas en invernaderos, el uso de ovarios provenientes de yemas de flores en dormancia y mediante brotes adventicios regenerados desde cultivos de callos y hojas.

Con respecto a lo anterior BRIGGS *et al.* (1994) y BOJARCZUK (1994), señalan que se pueden utilizar diferentes explantes para iniciar cultivos *in vitro* de rododendros como por ejemplo brotes vegetativos provenientes de yemas vegetativas, meristemas de brotes terminales o axilares y yemas florales. Sin embargo, de acuerdo a su experiencia, los mismos autores, señalan que los brotes vegetativos provenientes desde yemas son los explantes que dan mejores resultados en cultivo *in vitro*.

BRIGGS *et al.* (1994), señalan que existen tres factores importantes a considerar en el establecimiento *in vitro* de rododendros:

- Usar explantes de tamaño medio, para evitar contaminación al usar explantes muy grandes y evitar necrosis de estos mismos al usar explantes muy pequeños.
- Variar las épocas del año en las cuales se recolectarán los explantes para los experimentos posteriores.

- Tomar los explantes desde plantas de invernadero, que fitosanitariamente debieran encontrarse en mejor estado que las plantas expuestas a las condiciones medioambientales.

En relación al establecimiento del material, ECONOMOU y READ (1984, 1986), reportaron que los brotes de azaleas usados para proliferación *in vitro*, se esterilizaron exitosamente, en algunos casos, mediante el remojo de estos en 1 g/L de una solución de Captan por 10 minutos, seguido de una esterilización superficial de 15 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% que contenía 30 gotas/L de Tween 20, para finalmente enjuagar los explantes 3 veces por 5 minutos en agua desionizada estéril, obteniendo variados resultados de establecimiento de cultivos, que fluctuaron entre 10 - 60%.

Por otra parte, IAPICHINO *et al.* (1991), señalaron que los brotes usados para la producción de brotes adventicios *in vitro* de *Rhododendron hybridum* 'Vireya' se enjuagaron en agua por 20 minutos, luego fueron sumergidos por 2 minutos en una solución de etanol al 70%, seguido de un remojo por 40 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 1,05% que contenía 20 gotas/L de Tween 20, para finalmente enjuagar los explantes 3 veces en agua destilada estéril, logrando porcentajes mayores a 70% de cultivos establecidos.

En lo que concierne a algunos factores físicos involucrados en el establecimiento de estas especies ECONOMOU y READ (1984), reportaron que los brotes de azaleas usados para su proliferación pueden crecer en una sala con ambiente controlado con temperaturas de  $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$  y bajo niveles de luz de  $75 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$  (400-700 nm), en cambio HARBAGE y STIMART (1987), reportaron que los brotes adventicios generados desde cultivos de callos de *Rhododendron* pueden ser cultivados a temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  bajo niveles de luz de  $10 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$  provenientes de fluorescentes "cool-white".

ECONOMOU *et al.* (1981), reportaron que al trabajar con brotes y yemas axilares de azaleas, estas fueron incubadas a un fotoperíodo de 16 horas provenientes de tubos fluorescentes "cool-white" (aproximadamente 1.500 lux), al igual que

FORDHAM *et al.* (1982), quienes incubaron brotes axilares y adventicios de azaleas con un fotoperíodo de 16 horas provenientes de tubos fluorescentes “warm-white” y bajo niveles de luz de 55-60  $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ , obteniendo éxito en el desarrollo de los cultivos.

Referente a los medios de cultivo, se han utilizado exitosamente, muchos en la micropropagación de *Rhododendron* como por ejemplo el medio Woody Plants Medium (WPM) de Mc Cown (1981), para plantas leñosas usado por HANNAPEL *et al.* (1981) para propagar azaleas; el medio Economou y Read (1984) usado por JARA y SEEMANN (2004) y ECONOMOU y READ (1986) para propagar rododendros y azaleas respectivamente; el medio Murashige y Skoog (1962) modificado mediante una reducción de los niveles de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{KNO}_3$ , la adición de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y omitiendo KI, usado por ECONOMOU y READ (1984) para la proliferación de brotes *in vitro* de azaleas; el medio para rododendros y azaleas de Anderson (1978, 1984) usado por JARA y SEEMANN (2004) para propagar *Rhododendron catawbiense* ‘Album’ y por MEYER *et al.* (1982) para propagar *Rhododendron catawbiense* desde yemas florales, por IAPICHINO *et al.* (1991) para la producción de brotes adventicios de *Rhododendron hybridum* ‘Vireya’ y por HSIA y KORBAN (1997) en el establecimiento de azaleas.

ANDERSON (1978,1984), formuló el medio que lleva su nombre desde una derivación del medio de Murashige y Skoog (1962) al cual se le disminuyeron los niveles iónicos dando buenos resultados con rododendros, ya que, al usar el medio MS con su composición original los explantes de rododendros se volvieron de color café con una posterior necrosis.

Respecto a los compuestos orgánicos adheridos a los medios de cultivo en la producción de brotes *in vitro* de rododendros, IAPICHINO *et al.* (1991), al trabajar con el medio de Anderson, agregaron los siguientes compuestos orgánicos: 560  $\mu\text{M}$  de Inositol y 200  $\mu\text{M}$  de Sulfato de Adenina. Por su parte, ECONOMOU y READ (1984), al trabajar con el mismo medio en la producción de brotes *in vitro* de azaleas, agregaron los siguientes compuestos orgánicos: 100 mg/L de Inositol y 0,4 mg/L de Tiamina.

En la utilización de fitohormonas o reguladores de crecimiento, KAVANAGH *et al.* (1986), señalaron que la interacción de 2 a 4 mg/L de ácido indol acético (AIA) más 5 a 15 mg/L de dimetilalilaminopurina (2iP) es necesaria para el buen desarrollo de los explantes de rododendros, con los cuales se iniciará un cultivo *in vitro*, en cambio ANDERSON (1984) señala que 1 mg/L de ácido indol acético (AIA) más 5 mg/L de dimetilalilaminopurina (2iP) son suficientes para lograr éxito con el cultivo.

De acuerdo a lo anterior BOJARCZUK (1994), obtuvo el mejor desarrollo de yemas vegetativas, adicionando 2 mg/L de ácido indol acético (AIA) y 4 mg/L de dimetilalilaminopurina (2iP), al medio de cultivo en micropropagación *in vitro* de diferentes cultivares de rododendros, obteniendo un 87,5% de desarrollo de yemas vegetativas.

DAI *et al.* (1987), al trabajar con brotes provenientes de yemas de ovarios de *Rhododendron prinophyllum*, agregaron 4 mg/L de AIA al medio de cultivo y bajo condiciones de fotoperíodo de 16 horas, obtuvieron de 20 a 50 brotes por ovario, al igual que IAPICHINO *et al.* (1991), quienes al producir brotes adventicios desde un rododendro, también agregaron 4 mg/L de AIA, obteniendo porcentajes mayores a 70% de cultivos establecidos.

ECONOMOU y READ (1984), estudiaron el efecto de las distintas concentraciones de 2iP en la proliferación de brotes de azaleas usando 5,10, y 20 mg/L, observado una mayor producción de brotes con 20 mg/L en comparación a 5 y 10 mg/L, pero no encontraron diferencias en la proliferación entre 5 y 10 mg/L. Es por esta razón, que los mismos autores, usaron en el año 1986, 10 mg/L en la proliferación de brotes de azaleas provenientes de subcultivos secuenciales.

FORDHAM *et al.* (1982), investigaron el efecto de diferentes citoquininas en la proliferación de brotes axilares de azaleas usando BAP, 2iP, ZEA y KIN obteniendo los mejores resultados con BAP y ZEA, resultados menores con 2iP y los peores con KIN.

Para determinar el efecto del GA<sub>3</sub> en la elongación de brotes de *Rhododendron prinophyllum*, DAI *et al.* (1987) agregaron 4 mg/L al medio de cultivo, observando

posteriormente elongación de brotes acompañado de una inhibición en la aparición de hojas.

Respecto al uso de carbohidratos, DAI *et al.* (1987), IMEL y PREECE (1988) y ECONOMOU y READ (1984), usaron sacarosa como fuente de carbohidrato utilizando concentraciones de 30 g/L, 30 g/L y 20 g/L respectivamente, en sus trabajos de proliferación de brotes de azaleas y rododendros.

En relación a agentes gelificantes, IAPICHINO *et al.* (1991), IMEL y PREECE (1988) y HARBAGE *et al.* (1987), usaron agar para solidificar el medio de cultivo para proliferar brotes de rododendros, con concentraciones de 8 g/L, 7 g/L y 6 g/L respectivamente, al igual que FORDHAM *et al.* (1982) y ECONOMOU y READ (1984), quienes en sus trabajos de proliferación de brotes axilares y adventicios de azaleas, usaron concentraciones de 5.5 g/L y 6 g/L respectivamente.

En lo que concierne al pH del medio de cultivo, DAI *et al.* (1987), al trabajar con brotes provenientes de yemas de rododendros en medio Anderson, ajustaron el pH a 4,5 para inducir la brotación, a 5.0 para multiplicación de brotes y a 5.0 para enraizamiento de los mismos, obteniendo buenos resultados en todas las fases, al igual que IAPICHINO *et al.* (1991), que para la producción de brotes adventicios de rododendros ajustaron el medio a pH 5.0. En cambio FORDHAM *et al.* (1982), ajustaron el medio a pH 4,8, logrando tasas entre 50 - 90% de proliferación de brotes axilares y adventicios de azaleas.

Por otra parte, HSIA y KORBAN (1997), ajustaron el pH del medio Anderson a 5.2 para establecer cultivos de azaleas obteniendo altas tasa de proliferación de brotes (mayor a 50%).

ECONOMOU y READ (1984), estudiaron el efecto del pH en el medio de cultivo en la formación y multiplicación de brotes de azaleas, ajustándolo a 4.5, 5.0, 5.5 y 6.0 dando los mejores resultados (más de 8.3 brotes/explante, seguido de 7.3 brotes/explante a pH 4.5) a un pH de 5.0. Por otra parte, JARA y SEEMANN (2004), para establecer yemas de *Rhododendron catawbiense* 'Album' en medio Anderson,

ajustaron el pH del medio a 5.5 obteniendo buenos resultados en cuanto al número y a la longitud de brotes producidos (1,5 brotes/explante de 0,77 cm. de largo).

ECONOMOU y READ (1986), al estudiar la influencia del pH en el desarrollo de cultivos de azaleas, ajustaron el pH desde 3.6 a 7.4, obteniendo los mejores resultados con los pH 4.0, 4.6 y 5.5 (90, 90 y 85%, respectivamente, de desarrollo de cultivos).

En relación a la preparación del medio de cultivo FORDHAM *et al.* (1982), ECONOMOU y READ (1984, 1986), DAI *et al.* (1987) e IAPICHINO *et al.* (1991), en sus trabajos de proliferación de brotes de rododendros y azaleas, sometieron a los medios de cultivo a una esterilización en autoclave bajo los siguientes parámetros: 121° C por 15 min. y a una presión de 1,1 kg/cm<sup>2</sup>, 121° C por 18 min., 121° C por 20 min. y 121° C por 20 min, respectivamente, logrando exitosamente la obtención de medios de cultivo.

Con respecto a los problemas relacionados a la micropropagación *in vitro* de rododendros, para evitar y controlar el pardeamiento, se han utilizado diferentes sustancias como por ejemplo la adición al medio de carbón activado en concentraciones de 600 mg/L y de 1g/L por BRIGGS *et al.* (1994) y MEYER (1981), respectivamente. Sin embargo es más usual el uso de sustancias antioxidantes con las cuales se tratan los explantes como lo hizo BOJARCZUK (1994) al adicionar 50 mg/L de ácido ascórbico y 75 mg/L de ácido cítrico, logrando así controlar el problema de liberación de fenoles por parte del explante.

Referente a la contaminación, ECONOMOU y READ (1984, 86), reportaron que los brotes de azaleas usados para proliferación *in vitro*, se esterilizaron exitosamente, en algunos casos, mediante el remojo de estos en 1 g/L en una solución de Captan por 10 minutos, seguido de una esterilización superficial de 15 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%, obteniendo, en los mejores casos, porcentajes menores a 40% de cultivos contaminados.

BRIGGS *et al.* (1994) señalan que es posible desinfectar los explantes de rododendros mediante el baño de estos en agua con detergente de 5 a 30 minutos

seguido de una inmersión del material en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% por 10 a 25 minutos.

En el Cuadro 1 se presenta un resumen de algunas investigaciones realizadas en rododendros y azaleas en las cuales se han utilizado diferentes condiciones de cultivo para los genotipos y/o especies con los que se ha trabajado durante años en estos estudios.

CUADRO 1 Resumen de investigaciones realizadas en rododendros y azaleas.

Especies y/o genotipos	Medio de cultivo	Explante	Investigador
<i>Rhododendron spp.</i>	Murashige y Skoog	Brotos vegetativos	ECONOMOU y READ (1984)
<i>Rhododendron prinophyllum</i>	Anderson	Ovarios provenientes de yemas	DAI <i>et al.</i> (1987)
<i>Rhododendron x 'Gibraltar' y R. x 'Old Gold'.</i>	Anderson	Brotos adventicios	HARBAGE y STIMART (1987)
<i>Rhododendron hybridum 'P.J.M'</i>	Anderson	Callos y hojas	IMEL y PREECE (1988)
<i>Rhododendron spp.</i>	Anderson y Woody Plants Medium	Brotos vegetativos, meristemas y yemas florales	BRIGGS <i>et al.</i> (1994)
<i>Rhododendron catawbiense 'Album' y R. 'Van der Hoop'</i>	Anderson, Woody Plants Medium y Economou and Read	Yemas vegetativas	BOJARCZUK (1994)
<i>Rhododendron hybridum 'Vireya'</i>	Anderson	Brotos vegetativos	IAPICHINO <i>et al.</i> (1991)
<i>Rhododendron canescens, R. 'Chop Tank y R. prunifolium.</i>	Woody Plants Medium	Brotos vegetativos	HANNAPEL <i>et al.</i> (1981)
<i>Rhododendron catawbiense 'Album'</i>	Economou y Read	Yemas vegetativas	JARA y SEEMANN (2004)
<i>Rhododendron catawbiense 'Album'</i>	Anderson	Yemas vegetativas	JARA y SEEMANN (2004)
<i>Rhododendron catawbiense</i>	Anderson	Yemas florales	MEYER <i>et al.</i> (1982)
<i>Rhododendron spp.</i>	Anderson	Brotos vegetativos	HSIA y KORBAN (1997)
<i>Rhododendron spp.</i>	Anderson	Brotos vegetativos	FORDHAM <i>et al.</i> (1982)
<i>Rhododendron x 'Rose Elf'.</i>	Anderson	Brotos vegetativos	ANDERSON <i>et al.</i> (1984)

### 3 MATERIAL Y METODO

#### 3.1 Ubicación de los ensayos.

Este trabajo de establecimiento *in vitro* de diferentes especies y genotipos de *Rhododendron* se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, perteneciente al Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Austral de Chile, en Valdivia, Décima Región.

#### 3.2 Materiales utilizados.

A continuación se presenta una descripción de materiales que se utilizaron en el estudio.

**3.2.1 Material vegetal.** Se utilizó como material vegetal de propagación inicial yemas axilares y explantes nodales con una yema (Figura 3) de diferentes edades fisiológicas (juveniles y adultos) y tamaños, dependiendo de la época del año en que se extrajo y se sembró el material. Estos explantes fueron obtenidos desde estacas de aproximadamente 8 a 10 cm. de longitud, colectadas de doce genotipos de rododendros y azaleas establecidos en el Jardín Botánico y en otros jardines situados dentro del recinto de la Universidad Austral de Chile.



**FIGURA 3** Yemas axilares (izquierda) y explantes nodales (derecha).

**3.2.2 Medio de cultivo.** Se utilizó el medio de cultivo Anderson (ANDERSON 1978, 1984) más BAP y AIA, el cual estuvo compuesto por un medio basal (carbono, sales minerales y vitaminas), suplementos orgánicos y un gelificante (Anexo 1). A este medio se le ajustó el pH entre 5,2 y 5,5, con hidróxido de potasio (KOH) al 0,5N. Luego de realizar esto, junto con diluir el medio en un horno microondas, se utilizó un dispensador de medios para colocar 7 mL de medio en cada frasco, los cuales después de ser sellados con papel aluminio, se llevaron a un autoclave para ser esterilizados a 1,2 atm de presión y 121° C durante 15 minutos.

**3.2.3 Equipamiento de laboratorio.** Se contó con una cámara de flujo laminar horizontal, agitador orbital, pHímetro, dispensador, balanza (0,1 mg), horno microondas (69 a 90°C), autoclave y destilador de agua, además de usar material como placas Petri, pipetas graduadas, probetas, vasos de precipitado, matraces, frascos de vidrio, laminas de papel aluminio, pinzas, bisturíes y otros.

### **3.3 Método.**

A continuación se presenta la metodología aplicada en el trabajo.

**3.3.1 Diseño experimental.** Se aplicó un diseño experimental completamente al azar, a través de ensayos individuales por especie y/o genotipo en siete épocas diferentes del año, en las cuales se colectó e ingresó un número de 30 explantes (1 explante por frasco), (yemas axilares para rododendros y explantes nodales para azaleas), los cuales se dividieron en 3 repeticiones compuestas cada una de 10 frascos, usando como tratamientos, las diferentes épocas del año en las que se extrajo el material desde las planta madres y se procedió a dar inicio a los cultivos.

El ingreso de material se llevó a cabo en las siguientes fechas aproximadas:

La primera quincena de diciembre (**Epoca 1**).

La primera quincena de enero (**Epoca 2**).

La primera quincena de abril (**Epoca 3**).

La primera quincena de mayo (**Epoca 4**).

La primera quincena de septiembre (**Epoca 5**).

La primera quincena de octubre (**Epoca 6**).

La primera quincena de noviembre (**Epoca 7**).

### **3.3.2 Especies utilizadas de azaleas y rododendros.**

**3.3.2.1 Azaleas de hoja perenne.** Se trabajó con tres azaleas de hoja perenne, las cuales se detallan a continuación.

**C.1:** *Rhododendron japonicum* 'Fucsia', (posiblemente 'Fedora'), de hábito achaparrado, con una altura aproximada de 1 a 1,5 m. Con floración semi tardía (fines de octubre principio de noviembre) (Figura 4a).

**C.2:** *Rhododendron japonicum* 'Blanco', (posiblemente 'Palestrina' Syn. 'Wilhelmina Vuyk'), de hábito achaparrado, con una altura aproximada de 0,8 a 1,3 m. Con floración semi tardía (mediados de septiembre). (Figura 4b).

**C.3:** *Rhododendron indicum* 'Lila', (posiblemente 'Formosa'), de hábito achaparrado, con una altura aproximada de 1 a 1,5 m. Con floración semi tardía (fines de octubre) (Figura 4c).

**3.3.2.2 Azaleas de hoja caduca.** Se trabajó con dos azaleas de hoja caduca, las cuales se detallan a continuación.

**C.4:** *Rhododendron mollis x sinensis* (De semilla) 'Naranja'. De hábito erecto, con una altura aproximada de 1,5 a 1,9 m. Con floración semi tardía a tardía (primera quincena de noviembre) (Figura 4d).

**C.5:** *Rhododendron mollis x sinensis* (De semilla) 'Rojo'. De hábito achaparrado, con una altura aproximada de 1,6 a 2,5 m. Con floración semi tardía a tardía (a principios de noviembre) (Figura 4e).

**3.3.2.3 Rododendros.** Se trabajó con siete rododendros, los cuales se detallan a continuación.

**C.6:** *Rhododendron hybridum 'catawbiense'* 'Fucsia con blanco', (posiblemente 'Boursault'). De hábito erecto, con una altura aproximada de 3 a 4 m. Con floración semi tardía a tardía (mediados de noviembre) (Figura 4f).

**C.7:** *Rhododendron hybridum 'Rojo Sandía'*, (posiblemente 'Britannia'). De hábito erecto, con una altura aproximada de 2 a 3 m. Con floración semi tardía a tardía (principios de la segunda quincena de noviembre) (Figura 5G).

**C.8:** *Rhododendron hybridum 'Blanco con morado'*, (posiblemente 'Blue Peter'). De hábito erecto, con una altura aproximada de 3 a 4 m. Con floración semi tardía a tardía (principios de noviembre) (Figura 5H).

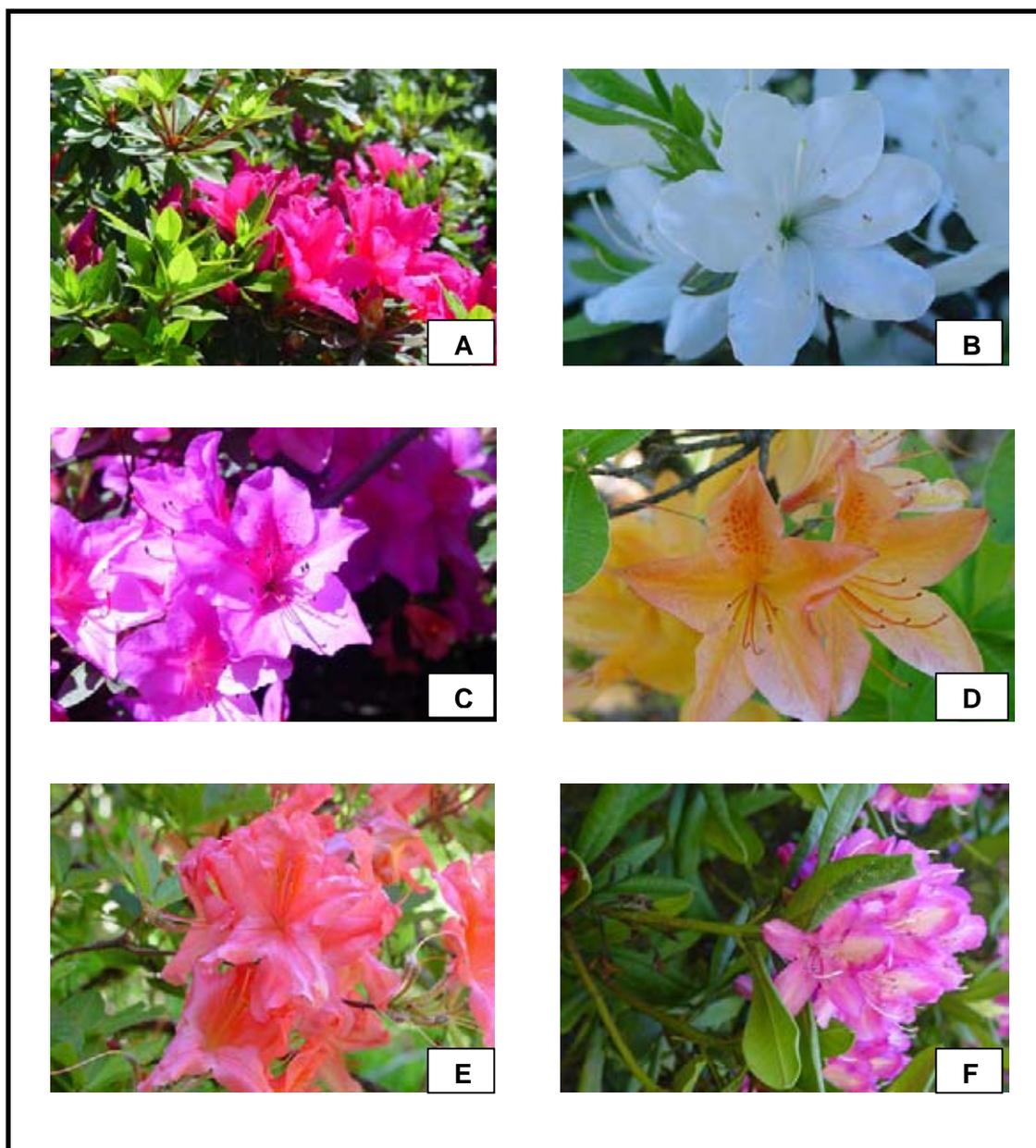
**C.9:** *Rhododendron hybridum 'Rosado'*, (posiblemente 'Pacific Coast'). De hábito erecto, con una altura aproximada de 3 a 4 m. Con floración semi tardía a tardía (fines de octubre) (Figura 5I).

**C.10:** *Rhododendron hybridum 'Blanco'*, (posiblemente *formosum* var. *formosum*). De hábito erecto, con una altura aproximada de 2,5 a 3,2 m. Con floración semi tardía (mediados de octubre) (Figura 5J).

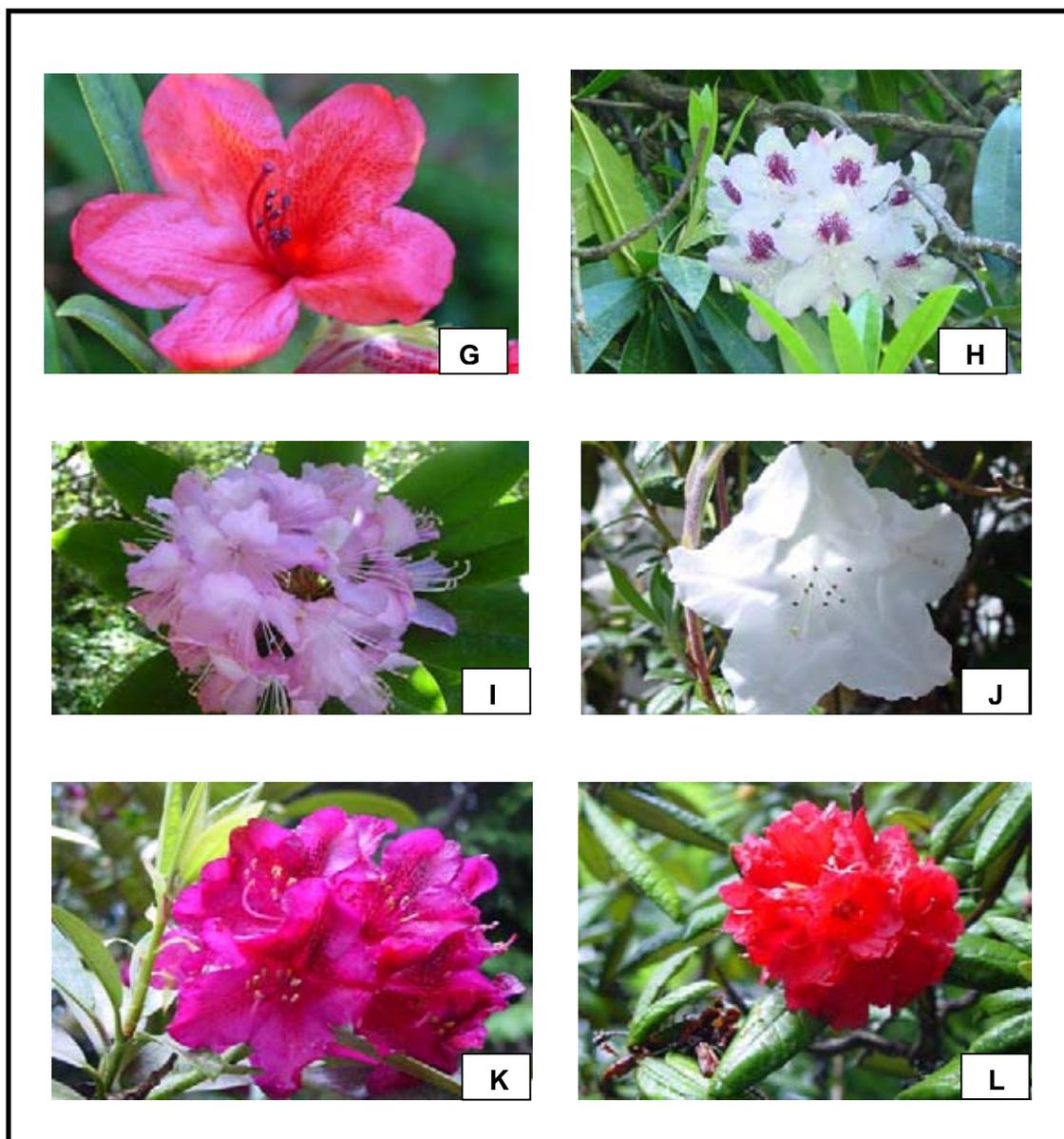
**C.11:** *Rhododendron hybridum ponticum x catawbiense 'Purpura'*, (posiblemente 'Anna Kruschke'). De hábito erecto, con una altura aproximada de 3 a 4 m. Con floración semi tardía a tardía (mediados de Noviembre) (Figura 5K).

**C.12:** *Rhododendron hybridum 'Rojo Sangre'*, (posiblemente 'Hill's Bright Red'). De hábito erecto, con una altura aproximada de 3 a 4 m. Con floración tardía (fines de noviembre) (Figura 5L).

NOTA: Dado que las plantas madres del jardín botánico y demás jardines de la U.A.C.H. no se encuentran identificadas varietalmente, se buscó en Internet (AMERICAN RHODODENDRON SOCIETY) cultivares que fueran idénticos o similares y cuyos nombres figuran entre paréntesis.



**FIGURA 4** Especies utilizadas en el ensayo. (A) *Rhododendron japonicum* 'Fucsia', posiblemente 'Fedora', (B) *Rhododendron japonicum* 'Blanco', posiblemente 'Palestrina' Syn. 'Wilhelmina Vuyk', (C) *Rhododendron indicum* 'Lila' posiblemente 'Formosa', (D) *Rhododendron mollis* x *sinensis* de semilla 'Naranja', (E) *Rhododendron mollis* x *sinensis* de semilla 'Rojo' y (F) *Rhododendron hybridum catawbiense* 'Fucsia con blanco', posiblemente 'Boursault'.



**FIGURA 5** Especies utilizadas en el ensayo. (G) *Rhododendron hybridum* 'Rojo Sandía', posiblemente 'Britannia', (H) *Rhododendron hybridum* 'Blanco con morado', posiblemente 'Blue Peter', (I) *Rhododendron hybridum* 'Rosado', posiblemente 'Pacific Coast', (J) *Rhododendron hybridum* 'Blanco', posiblemente *formosum* var. *Formosum*, (K) *Rhododendron hybridum ponticum* x *catawbiense* 'Purpura', posiblemente 'Anna Kruschke' y (L) *Rhododendron hybridum* 'Rojo Sangre', posiblemente 'Hill's Bright Red'.

**3.3.3 Obtención de explantes.** Los explantes, se recolectaron desde las estacas temprano en la mañana, en todas las épocas de ingreso de material. Para la desinfección de ellos se usó un método estándar consistente en un lavado y una desinfección superficial de las estacas con agua corriente con un detergente comercial (Quix M.R.), luego con agua destilada, solución fungicida-bactericida (Captan 2,7 g/L y Agrept 0,5 g/L) por aproximadamente 2 horas. Finalmente se desinfectaron con etanol (70%), por 5 segundos y luego una solución de hipoclorito de sodio al 1% (50 mL de cloro comercial, 200 mL de agua destilada estéril más 2 gotas de detergente Quix M.R.) por 10 minutos, para finalmente realizar tres enjuagues con agua destilada estéril.

Este método estándar sufrió algunos cambios en el transcurso de los ensayos (Cuadro 2), debido a las diferentes reacciones observadas en los explantes por ello se variaron los tiempos de desinfección, cambios en la concentración de los productos (NaOCl) y por último la incorporación de otros productos desinfectantes (Benomilo 1g/L) y de sustancias antioxidantes (ácido cítrico 0,2 g/L y de ácido ascórbico 0,2 g/L).

En el Cuadro 2 y 3 se observa un resumen de las diferentes características de la obtención de los explantes y de los diferentes procedimientos usados en todas las épocas del año en las que se procedió a ingresar material:

**CUADRO 2** Características del tipo de explante de azalea y rododendro y condiciones climáticas al momento de la recolección de los explantes.

<b>Tratamiento</b>	<b>Edad explante</b>	<b>Clima</b>
diciembre	Adulto	Sol, baja humedad y alta temperatura
enero	Adulto	Sol, baja humedad y alta temperatura
abril	Adulto	Lluvioso, alta humedad y baja temperatura
mayo	Adulto	Lluvioso, alta humedad y baja temperatura
septiembre	Juvenil	Lluvioso, alta humedad y temperatura templada e
octubre	Juvenil	Sol, baja humedad y temperatura templada
noviembre	Juvenil	Sol, baja humedad y alta temperatura

**CUADRO 3** Resumen de las diferentes características y procedimientos en cuanto a la desinfección de explantes durante las épocas de recolección.

<b>Tratamiento</b>	<b>Captan y Agrept (tiempo)</b>	<b>NaOCl (concentración)</b>	<b>Benomilo (tiempo)</b>	<b>Antioxidante (tiempo)</b>
diciembre	120 minutos.	1%	No	No
enero	90 minutos.	1%	No	No
abril	90 minutos.	1%	No	No
mayo	90 minutos.	1%	No	No
septiembre	90 minutos.	1%	No	No
octubre	60 minutos.	1%	60 minutos	60 minutos
noviembre	30 minutos.	2%	30 minutos	60 minutos

**3.3.4 Siembra de explantes.** Luego de realizado el lavado y la desinfección se procedió a sembrar los explantes nodales y a cortar las yemas axilares desde las estacas, para sembrarlas individualmente en los frascos con 7 mL del medio de cultivo, dentro de la cámara de flujo laminar.

**3.3.5 Incubación.** Realizados los pasos anteriores, los explantes fueron llevados a una sala de incubación del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, regulada a 23°C y fotoperíodo de 16 horas de luz (3000 lux aproximadamente que equivalen a 60  $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ).

**3.3.6 Evaluación de los ensayos.** En todas las épocas de recolección, como evaluación principal se observó si los cultivos se mantuvieron asépticos para una posterior inducción de brotación, a partir de las yemas obtenidas desde las estacas y desde los explantes nodales de *Rhododendron*.

En cada período de tiempo, se determinaron las siguientes variables:

- Porcentaje de asepsia y contaminación de cultivos.
- Días a ruptura de yemas de cada genotipo.
- Porcentaje de brotación.
- Porcentaje de sobrevivencia de brotes.

**3.3.7 Análisis de resultados.** La forma de evaluación de los resultados de las variables antes mencionadas, fue la siguiente.

3.3.7.1 Porcentaje de asepsia y contaminación de cultivos. Se obtuvo a partir de la presencia o ausencia de diferentes signos contaminantes (hongos y bacterias) (Figuras 6 y 7).

3.3.7.2 Porcentaje de brotación. Este porcentaje se obtuvo a partir del brote desarrollado desde la yema o explante nodal sembrado dentro de cada frasco (Figura 8).

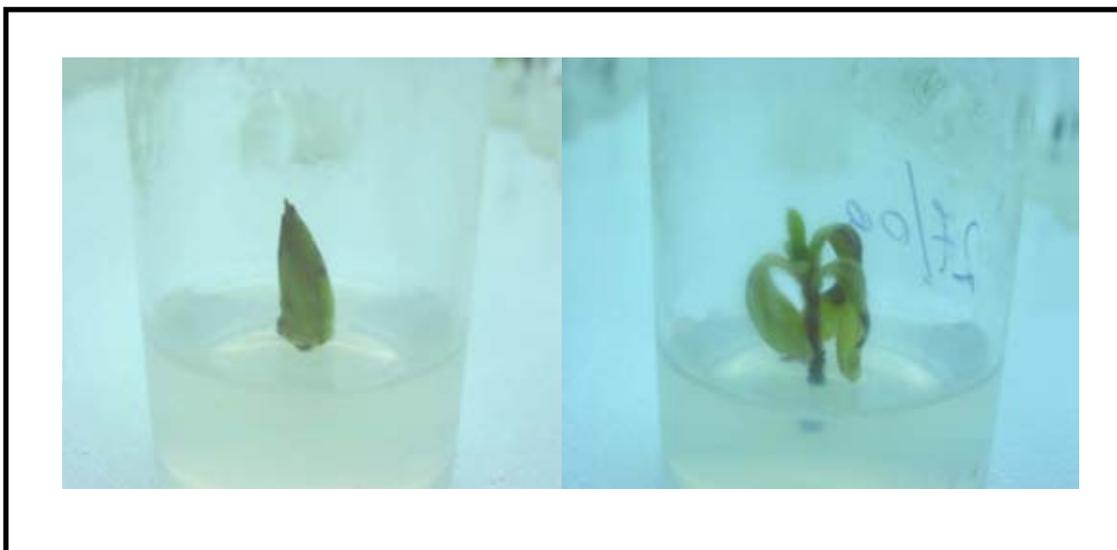
3.3.7.3 Porcentaje de sobrevivencia de brotes. Se calculó registrando aquellos brotes desarrollados en los explantes, sin contaminantes y otros brotes contaminados, que se recuperaron por medio de desinfecciones (Figura 9).

Los datos porcentuales correspondientes al porcentaje de contaminación, brotación y sobrevivencia, se analizaron estadísticamente mediante un test de homogeneidad de varianza, un análisis de varianza (ANDEVA) de Fisher y a un test de comparación múltiple Tukey (DHS) al 5%, para lo cual los datos fueron transformados previo a su análisis.

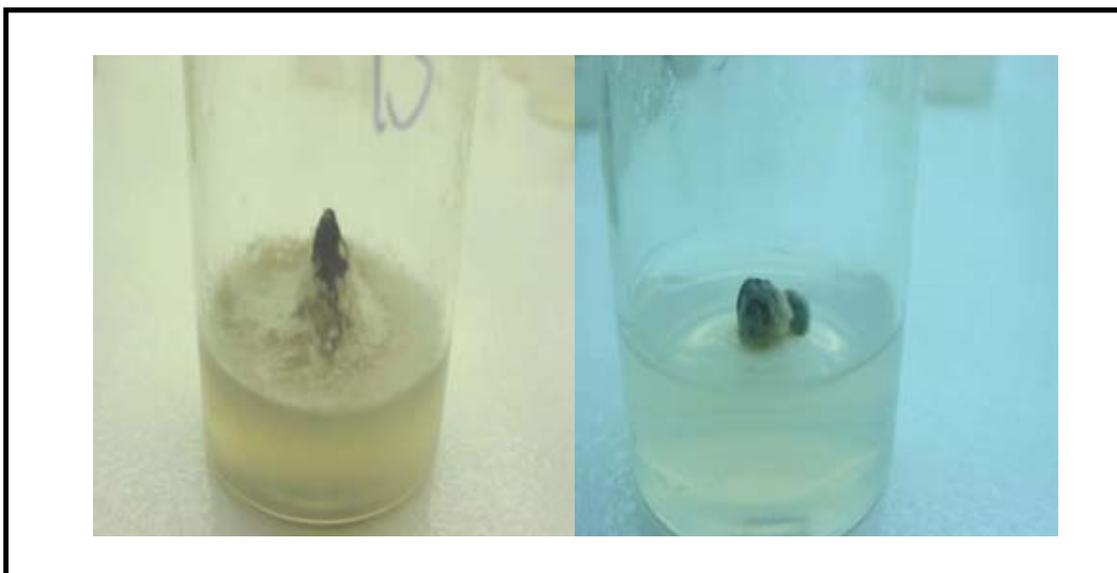
A estos datos se aplicó una transformación angular de arcoseno o de Bliss =  $\arcsen \sqrt{\%}$ .

3.3.7.4 Días a ruptura de yemas. Estos datos se obtuvieron a partir de inspecciones semanales en las cuales se registraron los días que transcurrieron entre la siembra de los explantes y la abertura de las yemas (Figura 10).

Los datos fueron analizados estadísticamente mediante un test de homogeneidad de varianza, un análisis de varianza (ANDEVA) de Fisher y un test de comparación múltiple Tukey (DHS) al 5%.



**FIGURA 6** Cultivos asépticos de *Rhododendron hybridum ponticum x catawbiense* 'Purpura' 'Anha Kruschke' (izquierda) y *Rhododendron japonicum* 'Fucsia' 'Fedora' (derecha).



**FIGURA 7** Cultivo con presencia de signos de diferentes contaminantes, hongo (izquierda) en *Rhododendron hybridum* 'Blanco con morado' 'Blue Peter', y bacteria (derecha) en *Rhododendron hybridum* 'Rojo Sangre' 'Hill's Bright Red'.



FIGURA 8 Brotes de *Rhododendron hybridum* 'Rosado' 'Pacific or Coast' (izquierda) y *Rhododendron japonicum* 'Fucsia' 'Fedora' (derecha).

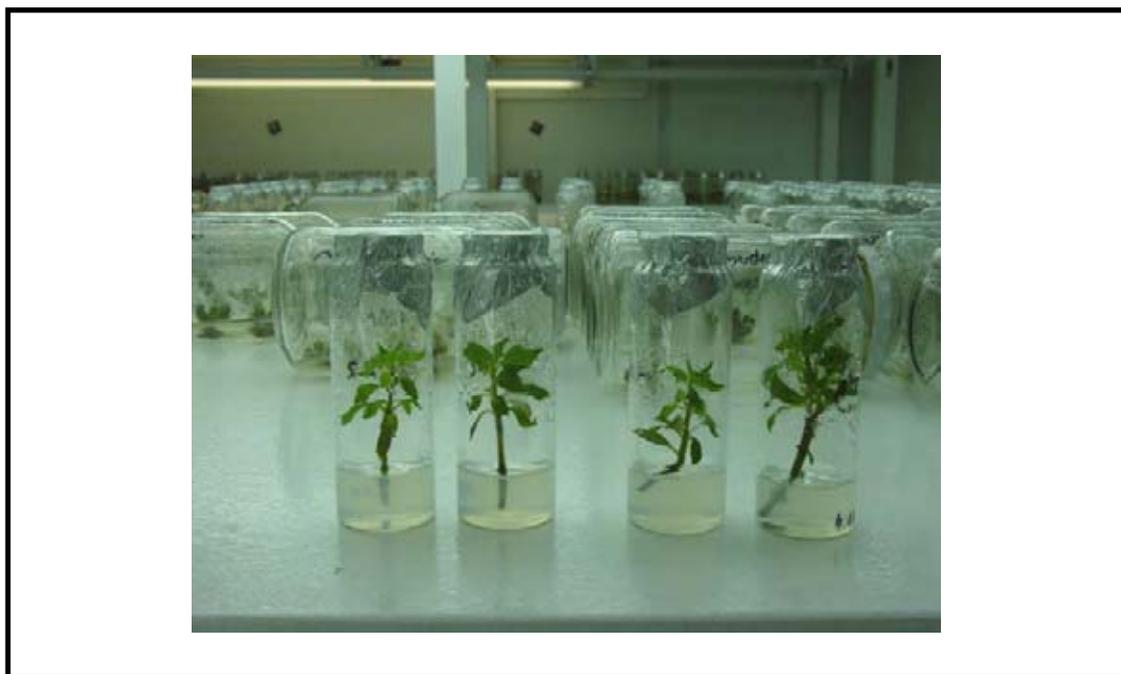
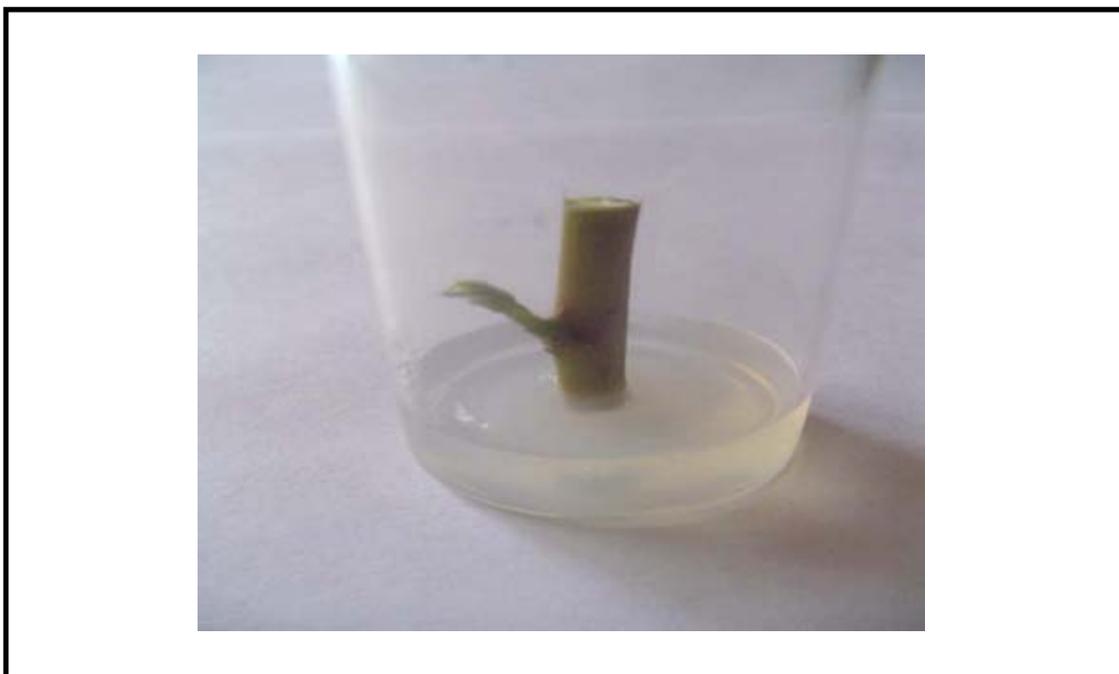


FIGURA 9 Cultivos sobrevivientes de *Rhododendron indicum* 'Lila' 'Formosa'.



**FIGURA 10** Apertura de yema en un explante nodal de *Rhododendron mollis* x *sinensis* de semilla 'Naranja'.

## 4 PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

### 4.1 Porcentaje de asepsia y contaminación de cultivos.

El proceso de la obtención de cultivos asépticos se realizó de acuerdo a lo descrito en el material y métodos.

Los cultivos asépticos para una posterior inducción de brotación se obtuvieron desde explantes de rododendros y azaleas, que no presentaron signos de diferentes contaminantes (hongos y bacterias).

En la Figura 6 se observan cultivos asépticos de *Rhododendron hybridum ponticum x catawbiense* 'Purpura' (C.11) (izquierda) y *Rhododendron japonicum* 'Fucsia' (C.1) (derecha), los cuales continuaron su desarrollando en posteriores etapas de micropropagación.

El Cuadro 4, muestra que los resultados del desarrollo de cultivos asépticos de los diferentes genotipos y/o especies, tienden a coincidir tanto en los porcentajes de desarrollo de cultivos como en las épocas de ingreso en las cuales hubo éxito en este desarrollo, mostrando la tendencia por producir los porcentajes más altos, en los meses de diciembre, enero, octubre y noviembre (épocas 1, 2, 6 y 7), cuando hubo condiciones favorables para el buen desarrollo y crecimiento de los explantes y no así en las otras épocas.

**Cuadro 4** Porcentaje de cultivos asépticos por genotipo y/o especie en las diferentes épocas de ingreso de material.

Cultivar	Especie/Genotipo	Epoca						
		1	2	3	4	5	6	7
C.1	<i>R. japonicum</i> 'Fucsia'	53,3	83,3	6,6	10,0	6,6	80,0	90,0
C.2	<i>R. japonicum</i> 'Blanco'	63,3	66,6	10,0	0,0	3,3	90,0	80,0
C.3	<i>R. indicum</i> 'Lila'	86,6	86,6	0,0	16,6	13,3	80,0	90,0
C.4	<i>R. mollis x sinensis</i> 'Naranja'	30,0	80,0	0,0	0,0	20,0	90,0	80,0
C.5	<i>R. mollis x sinensis</i> 'Rojo'	63,3	70,0	13,3	0,0	33,3	90,0	90,0
C.6	<i>R. h. catawb.</i> 'Fucsia-Blanco'	30,0	33,3	0,0	3,3	26,6	30,0	43,3
C.7	<i>R. h.</i> 'Rojo sandía'	70,0	66,6	0,0	0,0	23,3	0,0	0,0
C.8	<i>R. h.</i> 'Blanco y Morado'	13,3	10,0	6,6	0,0	16,6	40,0	40,0
C.9	<i>R. h.</i> 'Rosado'	30,0	23,3	0,0	0,0	0,0	20,0	60,0
C.10	<i>R. h.</i> 'Blanco'	70,0	63,3	13,3	10,0	33,3	20,0	50,0
C.11	<i>R. h. pont. x catawb.</i> 'Purpura'	76,6	60,0	0,0	0,0	20,0	20,0	40,0
C.12	<i>R. h.</i> 'Rojo sangre'	80,0	70,0	0,0	13,3	33,3	300	0,0

Se registraron altos porcentajes de cultivos asépticos, en los meses de octubre y noviembre (épocas 6 y 7), sobretodo en las azaleas *Rhododendron japonicum* 'Fucsia' (C.1), *Rhododendron japonicum* 'Blanco' (C.2), *Rhododendron indicum* 'Lila' (C.3), *Rhododendron mollis x sinensis* 'Naranja' (C.4) y *Rhododendron mollis x sinensis* 'Rojo' (C.5), llegando a obtener porcentajes de hasta un 90%, demostrando así, la mayor capacidad de adaptación de las azaleas en comparación a los rododendros, que en las mismas fechas, mostraron porcentajes menores de éxito (entre 0 y 60%)

En las restantes épocas de ingreso, se presentó un bajo desarrollo de cultivos asépticos por problemas de contaminación, inadecuado estado fisiológico de los explantes y necrosis de estos últimos.

Los resultados del porcentaje de obtención de cultivos asépticos, son similares a los obtenidos por ECONOMOU y READ (1984, 1986), que al trabajar en la proliferación *in vitro* de brotes de azaleas, obtuvieron variados resultados de establecimiento de cultivos asépticos, que fluctuaron entre 10 - 60%, en cambio IAPICHINO *et al.* (1991), lograron porcentajes mayores a 70% de establecimiento de cultivos asépticos de *Rhododendron hybridum* 'Vireya', concordando de cierta manera, con los resultados obtenidos en este ensayo.

Por su parte, BOJARCZUK (1994), al trabajar con yemas vegetativas de diferentes cultivares de rododendros, obtuvo resultados similares a los de este ensayo, reportando porcentajes que fluctuaron entre 25 y 87,5% de cultivos asépticos.

El mismo autor, señala que los porcentajes más altos de obtención de cultivos asépticos se produjeron desde fines de mayo y principios de junio hasta el comienzo de septiembre en Polonia (noviembre y principios de diciembre hasta el comienzo de marzo en el hemisferio sur), obteniendo así los mejores resultados en los meses de verano, coincidiendo en parte, con este ensayo.

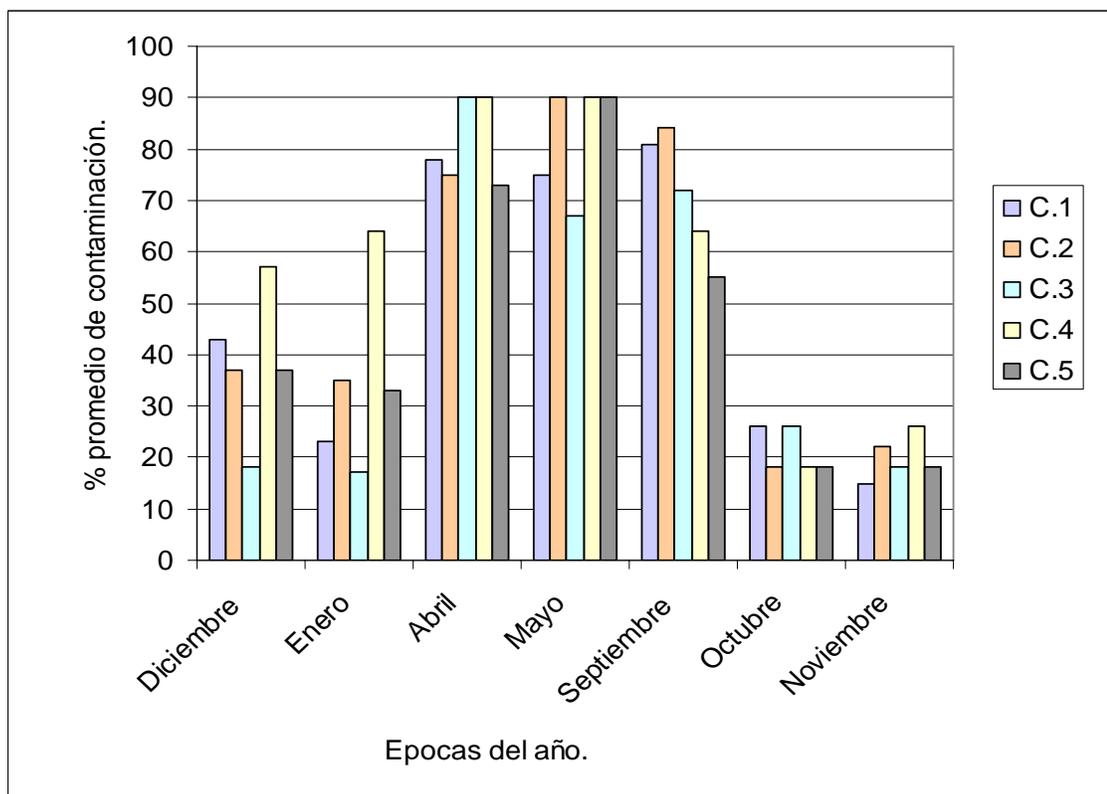
Con respecto a lo anterior, KNUTTEL y ADDISON (1984), señalan que los mejores meses para la obtención de explantes y el inicio de cultivos asépticos, es desde a principios del mes de abril en Connecticut (octubre en el hemisferio sur), debido a que antes de esa fecha las plantas se encuentran en estado de dormancia y sería inútil el intentar obtener algún tipo de cultivo.

De lo anterior, ROCA y MROGINSKI (1991) señalan que la respuesta de los explantes cultivados *in vitro* puede variar notablemente con el estado de desarrollo de los mismos, siendo preferible la utilización de material juvenil, debido a su mejor adaptación y respuesta a las condiciones dadas que el material adulto.

El tejido joven en los explantes se logra obtener desde el mes de septiembre (hemisferio sur) en adelante, debido a la nueva brotación causada por un aumento en la concentración de giberelina y una baja en el ácido abscísico, el cual provoca el

estado de dormancia de las plantas, coincidiendo esto, con los mejores resultados obtenidos en este trabajo (MEYER, 1976).

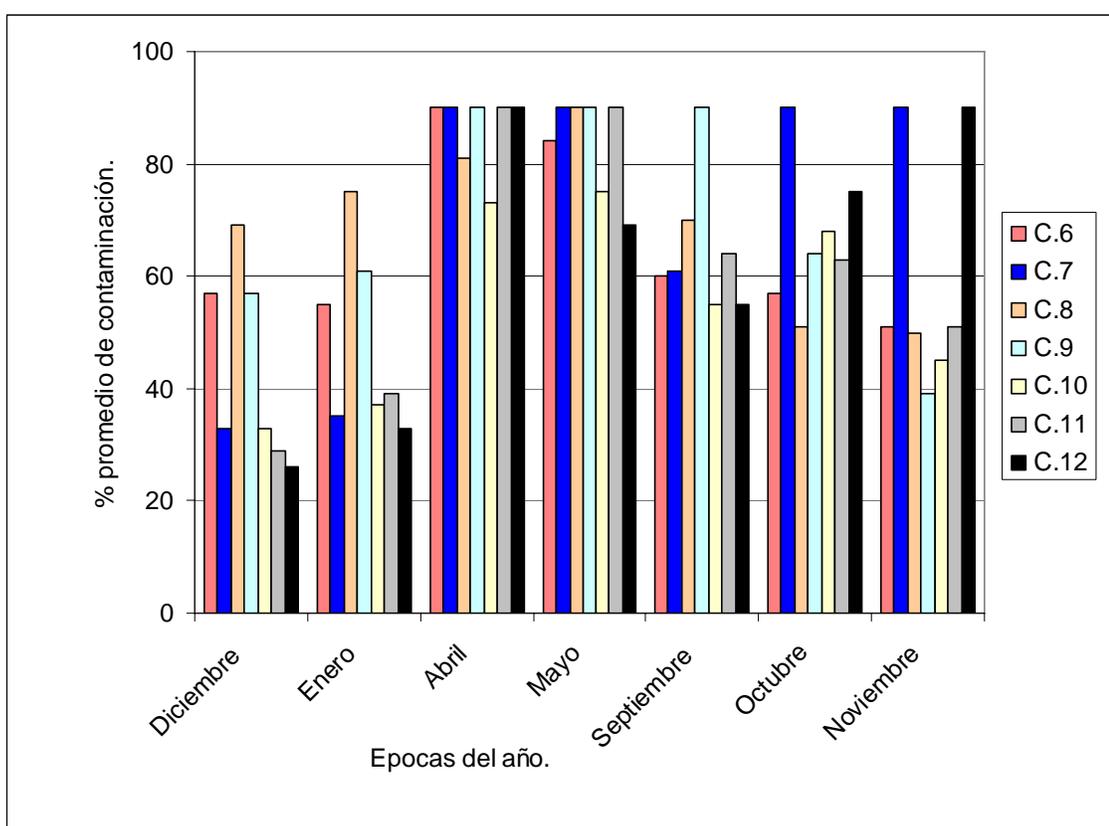
En relación a la contaminación, los porcentajes más altos se obtuvieron en los meses de abril, mayo y septiembre (épocas 3, 4 y 5), llegando a obtener porcentajes más altos de 90% en algunos casos como por ejemplo *Rhododendron japonicum* 'Blanco' (C.2), *Rhododendron indicum* 'Lila' (C.3), *Rhododendron mollis x sinensis* 'Naranja' (C.4), *Rhododendron mollis x sinensis* 'Rojo' (C.5), *Rhododendron hybridum catawb.* 'Fucsia-Blanco' (C.6), *Rhododendron hybridum* 'Rojo sandía' (C.7), *Rhododendron hybridum* 'Blanco y Morado' (C.8), *Rhododendron hybridum* 'Rosado' (C.9), *Rhododendron hybridum pont. x catawb.* 'Purpura' (C.11) y *Rhododendron hybridum* 'Rojo sangre' (C.12) (Figuras 11 y 12).



**FIGURA 11** Porcentaje de contaminación por especie y/o genotipo de azalea.

La Figura 11 muestra la clara tendencia de los cultivos de azaleas, por presentar mayores porcentajes de contaminación en los meses de otoño hasta el mes de septiembre (épocas 3, 4 y 5), que son los meses en que existen las mejores condiciones para la proliferación ambiental de contaminantes, bajando considerablemente este porcentaje en los otros meses.

En la Figura 12 se observan los valores graficados del porcentaje de contaminación en las diferentes épocas del año de las diferentes especies y/o genotipos de rododendros usados en este ensayo.



**FIGURA 12 Porcentaje de contaminación por especie y/o genotipo de rododendro.**

La Figura 12 muestra que los meses donde se observó mayor contaminación fueron abril y mayo (épocas 3 y 4) hasta el mes de septiembre (época 5), existiendo algunas excepciones como (*Rhododendron hybridum* 'Rojo Sandía' (C.7) y

*Rhododendron hybridum* 'Rojo Sangre' (C.12)) que además mostraron altos niveles en los meses de octubre y noviembre (épocas 6 y 7), demostrando su poca capacidad de adaptarse a las condiciones dadas en relación a los otros genotipos y/o especies.

Estos resultados difieren por genotipos y/o especies, ya que cada uno de ellos presentó diferentes tasas de contaminación como por ejemplo: *Rhododendron hybridum* 'Rojo Sangre' (C.12), presentó valores altos (90%) en el mes de noviembre (época 7), en cambio, *Rhododendron hybridum* 'Rosado' (C.9), presentó valores más bajos a 40% en la misma época, demostrando las diferentes capacidades y respuestas de cada cultivar (Figura 12)

En la mayoría de los casos, los cultivares mostraron bajos niveles de contaminación cuando se usó material juvenil que es mucho más fácil de desinfectar que el material adulto. Por otra parte, el clima reinante en el ambiente al momento de extraer las muestras era de días soleados con baja humedad ambiental y alta temperatura. Al extraer muestras de edad fisiológicamente adultas en días lluviosos con alta humedad ambiental y una baja temperatura en los meses de abril y mayo (épocas 3 y 4), se tiende a poseer estos altos niveles de contaminación por ser más difícil de desinfectar el material y por haber una alta carga de contaminantes en el ambiente los que proliferan con la humedad.

En el mes de septiembre (época 5) existieron las mismas condiciones climáticas que en abril y mayo además de una alta temperatura, ayudando esto a una mayor proliferación de los contaminantes en el medio ambiente.

Estos resultados son similares a los presentados por ECONOMOU y READ (1984, 86), los cuales al trabajar con brotes de azaleas usados para proliferación *in vitro*, obtuvieron, en los mejores casos, porcentajes menores a 40% de cultivos contaminados, coincidiendo en parte, con los altos porcentajes de contaminación observados en este ensayo.

Por su parte, BOJARCZUK (1994), presentó resultados similares a los de este ensayo, ya que obtuvo diferentes niveles de contaminación (entre 11,1 y 72,1%) al

trabajar con *Rhododendron catawbiense* 'Album', demostrado que los niveles de contaminación son más altos en el mes de marzo en Polonia (septiembre en el hemisferio sur), que es cuando las condiciones ambientales permiten una mayor proliferación de contaminantes ambientales.

Por otra parte, en la mayoría de los casos, la tendencia demostró que los porcentajes más bajos de contaminación se presentaron en los meses de octubre y noviembre (épocas 6 y 7), en donde se utilizó los tiempos más cortos de desinfección, se introdujo otro producto desinfectante (Benomilo) y se elevó la concentración de NaOCl de 1% a 2%.

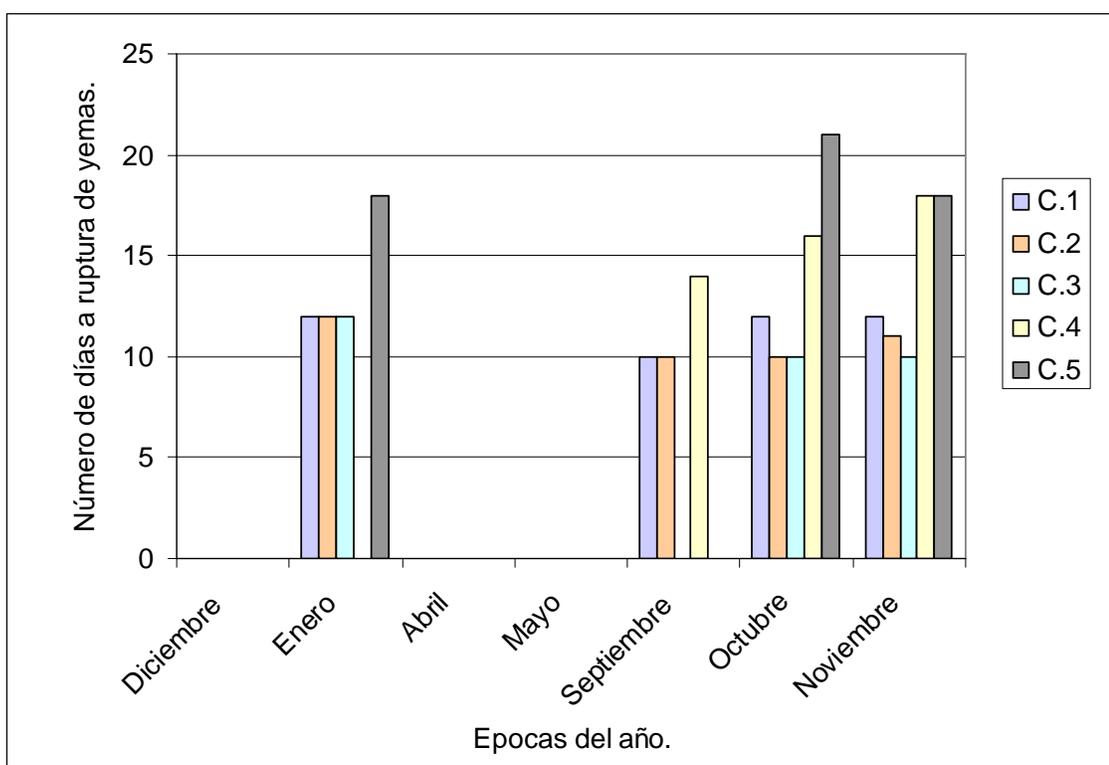
Con respecto a lo anterior, RAMIREZ *et al.* (1999), al evaluar el efecto de diferentes desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum*, obtuvieron las tasas más bajas de contaminación de hongos y bacterias (menores a 30%), al introducir en el ensayo Benomilo, remojando los segmentos nodales durante 30 minutos en 2 g/L en este producto.

Por otra parte, los mismos autores en el año 2002, obtuvieron resultados similares a este ensayo, en el establecimiento *in vitro* de explantes de *Annona muricata* L. tratados con NaOCl a diferentes concentraciones obteniendo los porcentajes más bajos de contaminación (menor a 20%) al usar una concentración de 2% de NaOCl.

**4.2 Días a ruptura de yemas.** Los resultados obtenidos, demuestran que en todos los genotipos y/o especies, la ruptura de yemas se dió con mayor frecuencia en los meses en donde existieron las mejores condiciones para el desarrollo de los cultivos, tanto por el material utilizado (juvenil) como por el manejo dado a estos, coincidiendo en muchos casos con los meses en donde se realizaron cambios en el manejo de los explantes al interior del laboratorio.

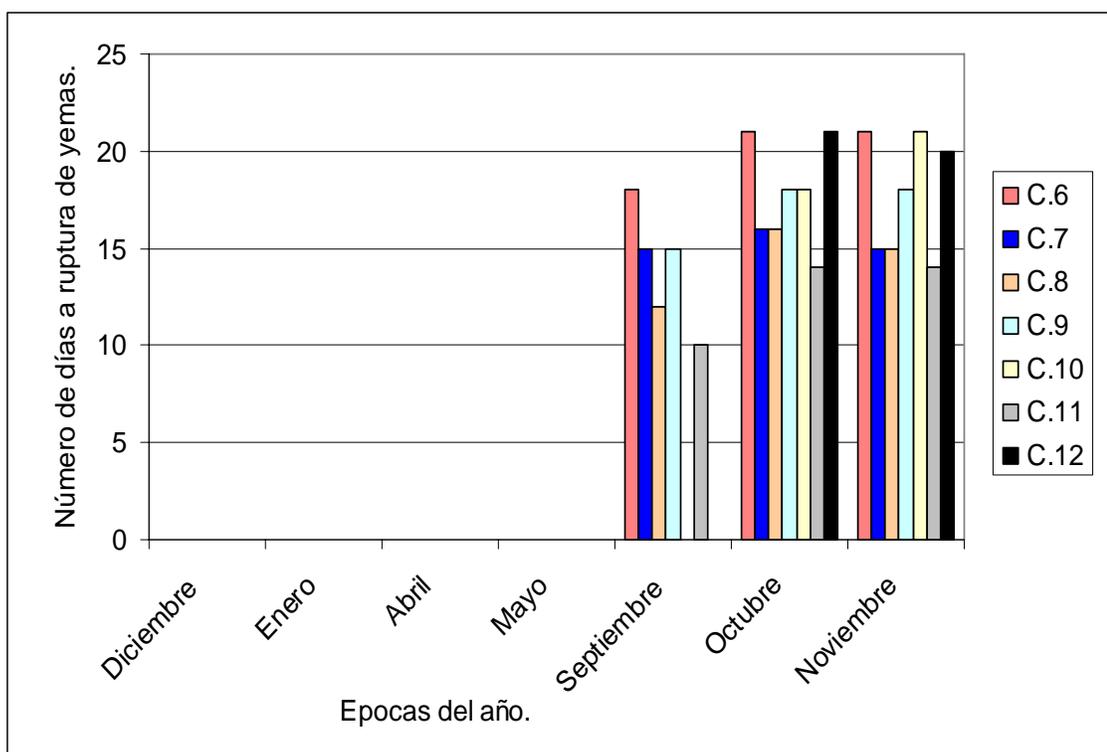
Los meses en los cuales hubo ruptura de yemas en la mayoría de los genotipos y/o especies de azaleas y rododendros, fueron septiembre, octubre, noviembre

(épocas 5, 6 y 7) y en el mes de enero (época 2) en algunas azaleas como por ejemplo *Rhododendron japonicum* 'Fucsia' (C.1), *Rhododendron japonicum* 'Blanco' (C.2), *Rhododendron indicum* 'Lila' (C.3), *Rhododendron* y *Rhododendron mollis x sinensis* 'Rojo' (C.5) (Figura 13).



**FIGURA 13** Número de días a ruptura de yemas por especie y/o genotipo de azalea.

La Figura 13 muestra que los días a ruptura de yemas en los genotipos y/o especies son muy similares entre sí, fluctuando entre 10 y 14 días aproximadamente, exceptuando *Rhododendron mollis x sinensis* 'Naranja' (C.4) y *Rhododendron mollis x sinensis* 'Rojo' (C.5), que muestran un leve aumento en los días a ruptura (18 a 21 días aproximadamente) en comparación al resto, lo que podría sugerir que estos cultivares poseen un crecimiento más tardío que el resto.



**FIGURA 14** Número de días a ruptura de yemas por especie y/o genotipo de rododendro.

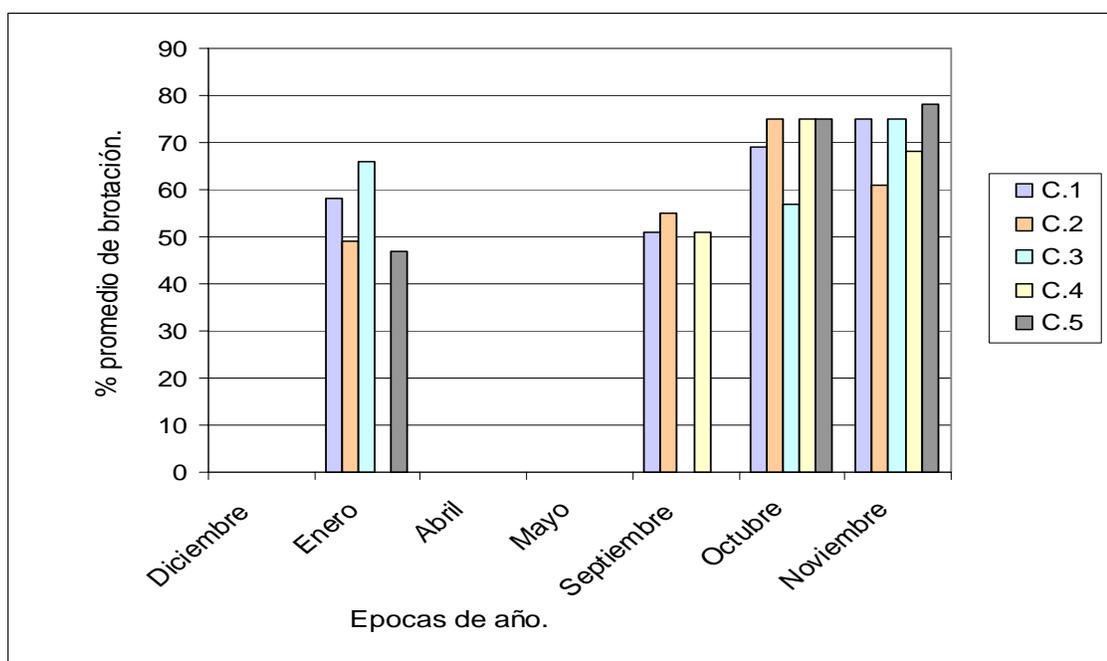
La Figura 14 muestra que los meses en los cuales hubo ruptura de yemas en la mayoría de los cultivares fueron: septiembre, octubre, noviembre (épocas 5, 6 y 7) y además, el número de días a ruptura de yemas es muy similar entre los genotipos y/o especies (entre 10 y 15 días), ello con la excepción de *Rhododendron hybridum catawbiense* 'Fucsia con blanco' (C.6), *Rhododendron hybridum*. 'Blanco' (C.10) y *Rhododendron hybridum*. 'Rojo Sangre' (C.12), en donde se observa un leve aumento en los días a ruptura de yemas (21 días aproximadamente) en comparación al resto de los otros genotipos y/o especies, lo que podría sugerir que estos cultivares poseen un crecimiento un poco más tardío que el resto, de aproximadamente siete días más.

Estos resultados son similares a los reportados por IAPICHINO *et al.* (1991) y por HSIA y KORBAN (1997), quienes al trabajar con *Rhododendron hybridum* 'Vireya' y un genotipo de azalea de color fucsia, respectivamente, señalaron que los días a

ruptura de yema empezaron a contabilizarse a los 28 días de la siembra de los cultivos, momento que coincide con las primeras apariciones de este fenómeno en ambas especies, siendo similar a los días observados en este ensayo, fluctuando estos, entre 10 y 21 días en romperse las yemas en los diferentes genotipos y/o especies.

**4.3 Porcentaje de brotación.** De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo, se aprecia que el porcentaje de brotación depende de la época del año en la cual se ingresó el material y se procedió a realizar la siembra de los explantes.

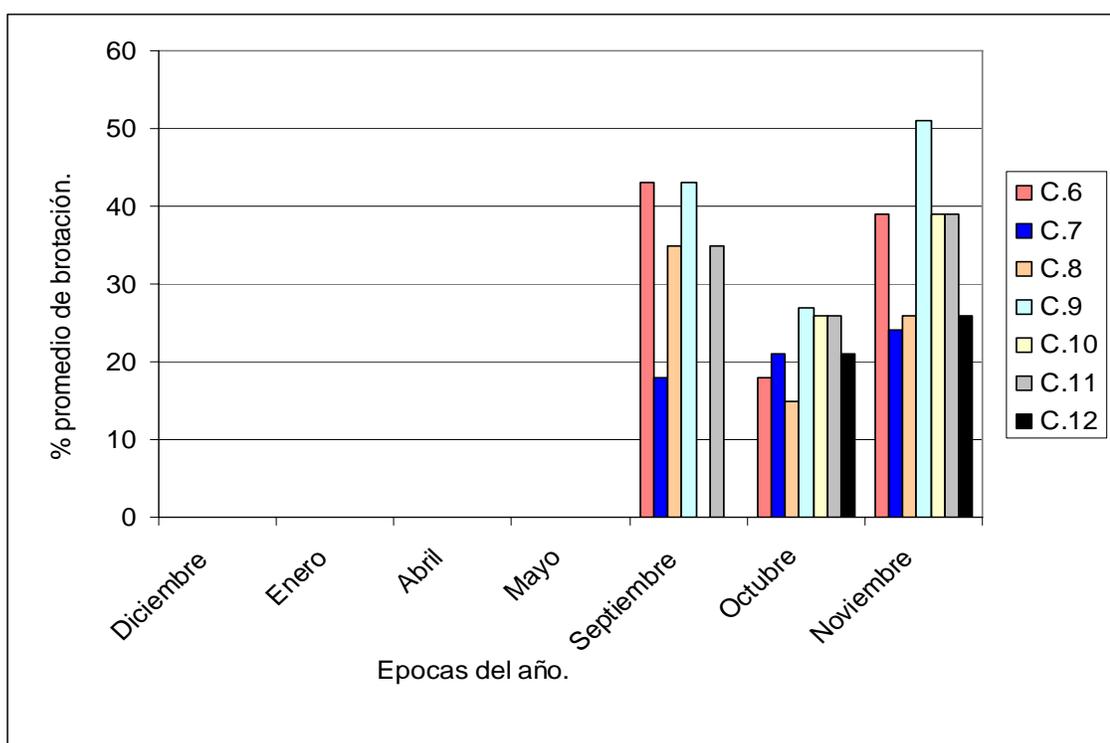
Con respecto a lo anterior, los resultados demuestran que en todos los cultivares utilizados de azaleas (excepto *Rhododendron mollis x sinensis* 'Naranja' (C.4) en enero (época 2) y *Rhododendron indicum* 'Lila' (C.3) y *Rhododendron mollis x sinensis* 'Rojo' (C.5) en septiembre (época 5), que no brotaron), los porcentajes más altos de brotación se presentaron en los meses de octubre y noviembre (épocas 6 y 7) (entre 55 y 75%), seguido de los meses de septiembre y enero (épocas 5 y 2) (entre 45 y 65%) (Figura 15).



**FIGURA 15** Porcentaje de brotación por especie y/o genotipo de azalea.

En los restantes meses, diciembre, abril y mayo (épocas 1, 3 y 4), no hubo brotación por problemas de necrosis y de contaminación de explantes en todos los cultivares (Figura 15).

Los porcentajes de brotación de los cultivares de rododendro utilizados en este ensayo, demuestran que difieren tanto por especie y/o genotipo usado, como por la época del año en la que se sembró del material, registrándolos sólo en los meses de septiembre, octubre y noviembre (épocas 5, 6 y 7) (entre 15 y 50% aproximadamente) (Figura 16).



**FIGURA 16** Porcentaje de brotación por especie y/o genotipo de rododendro.

Estos resultados difieren por genotipo y/o especie, ya que cada uno de ellos respondió de manera diferente a las condiciones dadas en este ensayo, mostrando algunos cultivares como por ejemplo *Rhododendron hybridum* 'Rosado' (C.9), las tasas más altas de brotación (mayor a 50%) y por el contrario, otros cultivares mostraron un

bajo porcentaje como *Rhododendron hybridum* 'Rojo sandía' (C.7) y *Rhododendron hybridum* 'Blanco y Morado' (C.8) (menor a 20%). Esto se debe en gran parte a las diferentes necesidades de cada cultivar, las cuales no fueron satisfechas en algunos genotipos y/o especies demostrándose en los malos resultados obtenidos en algunos de ellos (Figura 16).

En diciembre, enero, abril y mayo (épocas 1, 2, 3 y 4), no hubo brotación por problemas de necrosis y de contaminación en todos los cultivares de rododendro (Figura 16).

Los resultados con respecto a la diferencia en el éxito de brotación por genotipo y/o especie, son similares a los obtenidos por ECONOMOU y READ (1986), quienes al trabajar con tres especies de azaleas obtuvieron bajos diferentes resultados de brotación (60, 40 y 15%) al someterlas a las mismas condiciones de cultivo. En cambio IAPICHINO *et al.* (1991), obtuvieron altos porcentajes de brotación (70%) al usar explantes de un rododendro, demostrando que las capacidades de regeneración *in vitro* son diferentes para cada cultivar y dependen de la reacción o de la respuesta que presenten a las condiciones que sean expuestas.

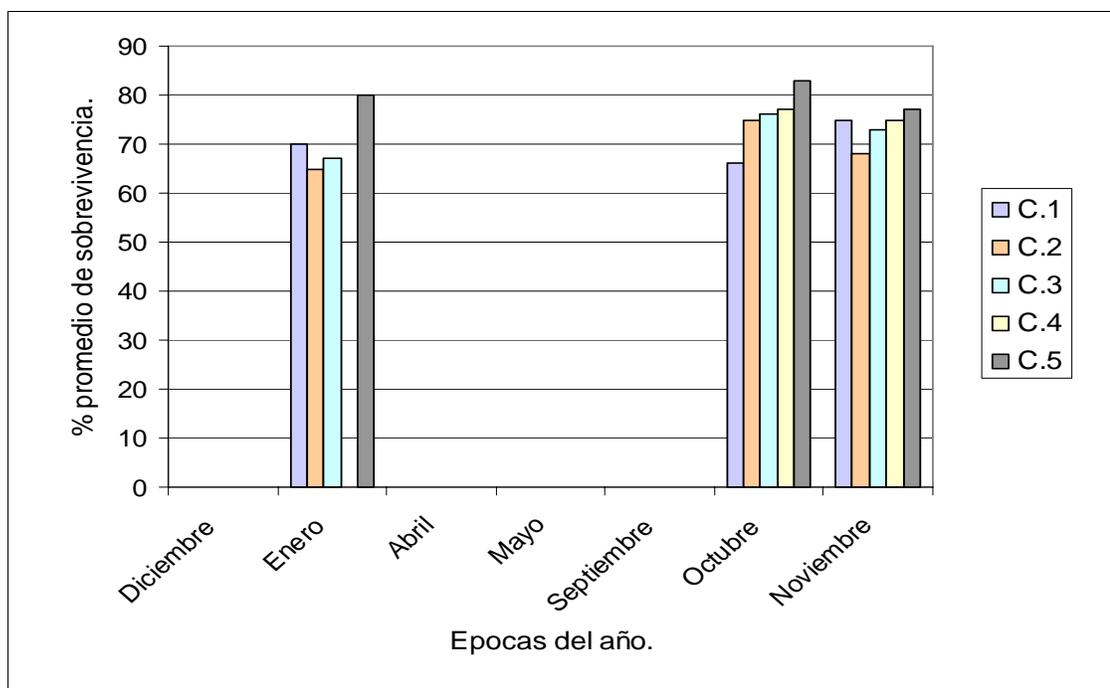
Por otra parte, el porcentaje de brotación de los meses de primavera (épocas 5, 6 y 7) difieren significativamente de los meses de otoño y verano (épocas 1, 2, 3 y 4) (Figura 16), debido posiblemente al material utilizado, ya que en las épocas de éxito de los cultivos, se usó material juvenil no dormante, en cambio en las otras épocas, se utilizó material adulto y en dormancia (otoño) (épocas 3 y 4) (Figura 16).

Esto lo explica, KNUTTEL y ADDISON (1984) y ROCA y MROGINSKI (1991), señalando que la mejor época para el inicio de cultivos asépticos, es desde principios de primavera, debido a que antes de esa fecha las plantas se encuentran en estado de dormancia y que es preferible la utilización de material juvenil en propagación *in vitro*, debido a su mejor adaptación y respuesta por encontrarse menos lignificado que el material adulto

Cabe destacar, la brotación en el mes de enero sólo en algunas azaleas, no así en rododendros, debido posiblemente, a que el material utilizado para todos los cultivares fue tejido adulto, pero este tejido en las azaleas es menos leñoso que el de los rododendros, respondiendo de una mejor manera a las condiciones de cultivo dadas, pudiéndose obtener ruptura de yema y posterior brotación con las azaleas.

Por otra parte, es importante destacar el tipo de explante usado ya que al usar explantes nodales en azaleas, cabe la posibilidad que exista mayor concentración de hormonas endógenas que las yemas individuales usadas en rododendros, respondiendo así de mejor forma.

**4.4 Porcentaje de sobrevivencia de brotes.** Los resultados obtenidos en este ensayo, demuestran que en todos los cultivares de azaleas utilizados, el mayor porcentaje de sobrevivencia se presentó en los meses de octubre y noviembre y ocasionalmente en el mes de enero (épocas 6, 7 y 2) (Figura 17).

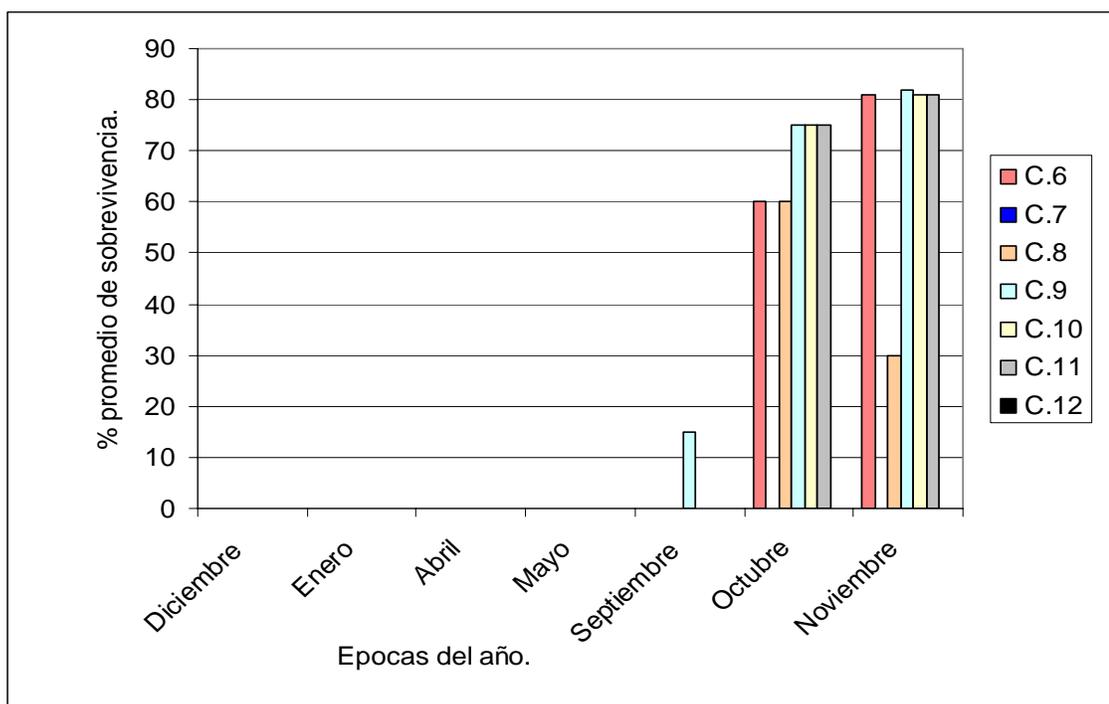


**FIGURA 17** Porcentaje de sobrevivencia por especie y/o genotipo de azalea.

Existe una clara tendencia de todos los cultivares de azaleas utilizados en este ensayo, de presentar altos porcentajes de sobrevivencia (entre 65 y 85% aproximadamente), en los meses de primavera y verano (épocas 2, 6 y 7), excepto *Rhododendron mollis x sinensis* 'Naranja' (C.4), en enero, donde no mostró respuesta positiva a las condiciones de cultivo dadas (Figura 17).

Por otra parte, no hubo sobrevivencia de explantes en los meses de abril, mayo y septiembre (épocas 3, 4 y 5) por las altas tasas de contaminación y en diciembre (época 1), además de las altas tasas de contaminación, también hubo alto porcentajes de necrosis de explantes (Figura 17).

En la Figura 18 se observan los valores graficados del porcentaje de sobrevivencia en las diferentes épocas del año, por especie y/ o genotipo de rododendro.



**FIGURA 18** Porcentaje de sobrevivencia por especie y/o genotipo de rododendro.

La Figura 18 muestra la clara tendencia de los genotipos y/o especies, por presentar sobrevivencia en los meses de primavera (entre 15 y 80% aproximadamente) (épocas 5, 6 y 7), al igual que las azaleas, (excepto *Rhododendron hybridum* 'Rojo Sandía' (C.7) y *Rhododendron hybridum* 'Rojo Sangre' (C.12), que no sobrevivieron).

Cabe destacar, que no se obtuvo buenos resultados en los meses de diciembre y enero (épocas 1 y 2) debido a una posible sobreexposición de los explantes a los desinfectantes, arrojando como resultado una alta tasa de necrosis y en los meses de abril, mayo y septiembre por las altas tasas de contaminación (épocas 3, 4 y 5) (Figura 18).

Los resultados correspondientes al porcentaje de sobrevivencia de explantes, demuestran que son diferentes en relación a la época del año en la que se sembró el material, reportando así, altos y bajos porcentajes en un mismo genotipo y/o especie como por ejemplo *Rhododendron hybridum* 'Rosado' (C.9) que en el mes de noviembre (época 7) presentó más de un 80% de sobrevivencia y por el contrario, en los meses de diciembre, abril y mayo (épocas 1, 3 y 4) presentó 0% de sobrevivencia (Figura 18).

Estos resultados demuestran que la capacidad de sobrevivencia de los explantes fue mayor en las épocas en donde hubo menos problemas tanto de contaminación como de necrosis de explantes, lo cual trajo consigo el logro de cultivos asépticos.

Los resultados con respecto a la diferencia en la sobrevivencia en el establecimiento *in vitro* de un mismo genotipo y/o especie, son similares a los reportados por JARA y SEEMANN (2004), quienes al trabajar con diferentes tratamientos en relación a las diversas condiciones dadas a los explantes de *Rhododendron catawbiense* 'Album' obtuvieron diferentes porcentajes de sobrevivencia que fluctuaron entre un 50 hasta el 100% de sobrevivencia.

Por otra parte, IAPICHINO *et al.* (1991), señalaron que los brotes adventicios *in vitro* de *Rhododendron hybridum* 'Vireya' sobrevivieron en un 100%.

## 5 CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones de los ensayos realizados para cada una de las especies y/o genotipos y a los resultados obtenidos del mismo, se puede concluir:

La respuesta de los diferentes genotipos y/o especies de *Rhododendron* a las condiciones de cultivo dadas, fueron diferentes e individuales para cada uno de ellos, mostrando mejores resultados las azaleas que los rododendros.

La eficiencia de estas técnicas de micropropagación, medidas por el porcentaje de cultivos asépticos, fue afectada por la época, siendo mayor en primavera y verano.

Los explantes *in vitro*, mostraron altos porcentajes de contaminación de hongos y bacterias, ligados a los meses de otoño hasta principios de primavera en donde existen las condiciones menos apropiadas para desarrollar cultivos de este tipo.

En relación al número de días a ruptura de yemas, esto sucedió en los meses en los cuales hubo éxito en el desarrollo de los cultivares. Además estos promedios mostraron ser muy similares entre sí, entre los genotipos y/o especies, encontrándose entre un rango de 14 a 20 días aproximadamente, para la apertura de las yemas.

En relación al porcentaje de brotación de los genotipos y/o especies, éste depende o está ligado a la época del año en la cual se ingresó el material siendo más alto en los meses de septiembre, octubre, noviembre y enero.

Los porcentajes más altos de sobrevivencia de brotes se manifestaron en los meses en los cuales existieron los porcentajes más altos de cultivos asépticos, en primavera y verano.

Es posible el establecimiento *in vitro* de diferentes genotipos y/o especies de rododendros y azaleas, en ciertas épocas del año, mediante el uso de técnicas de micropropagación, con lo cual se confirma la hipótesis de trabajo.

## 6 RESUMEN

Los rododendros y las azaleas se multiplican a través de propagación vegetativa por medio de estacas, siendo necesario desarrollar sistemas de multiplicación intensiva que permitan aumentar las tasas de propagación. Por esta razón se han desarrollado otros métodos como la micropropagación, pudiendo ser una herramienta valiosa de multiplicación.

Por ello, se plantea como hipótesis que las respuestas que presentan explantes de azaleas y rododendros en cultivos de tejidos *in vitro*, son distintas, de acuerdo a la época de extracción del explante desde la planta madre. Como objetivo general se pretendió establecer una metodología para obtener cultivos asépticos a partir de yemas provenientes de diferentes genotipos de plantas pertenecientes al género *Rhododendron*.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, perteneciente al Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Austral de Chile, en Valdivia, Décima Región.

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar, a través de ensayos individuales por cada una de las 12 especies y/o genotipos, de los cuales se ingresó 30 explantes, (yemas axilares para rododendros y explantes nodales para azaleas), divididos en 3 repeticiones de diez frascos, usando como tratamientos, las diferentes épocas del año en las que se extrajo el material desde las planta madres para dar inicio a los cultivos.

En cada período de tiempo, se determinó el porcentaje de asepsia, el porcentaje de contaminación de cultivos, los días a ruptura de yemas, el porcentaje de sobrevivencia de explantes y el porcentaje de brotación.

La respuesta de los diferentes cultivares utilizados a las condiciones de cultivo dadas, fueron diferentes para cada uno de ellos, mostrando mejores resultados las azaleas que los rododendros.

Se pudo observar que las azaleas (todos los genotipos usados) y los rododendros (excepto *Rhododendron hybridum* 'Rojo Sandía', y *Rhododendron hybridum* 'Rojo Sangre'), presentaron los porcentajes más altos de cultivos asépticos en los meses de Octubre, Noviembre y Enero coincidiendo estas épocas con los momentos en los cuales empiezan a existir las mejores condiciones para el desarrollo de los cultivos al aire libre.

Por lo tanto, se demostró que la eficiencia de este método de propagación usado en los genotipos y/o especies de *Rhododendron*, depende de la época del año en la cual se realizó el establecimiento *in vitro*.

## SUMMARY

Rhododendrons and azaleas are multiplied through vegetative propagation by means of cuttings, but other methods of intensive propagation must be developed, such as the micropropagation, which might become a valuable tool of multiplication.

Thus, the hypothesis of this work is that the responses of explants of azaleas and rhododendrons *in vitro* culture, are different, in accordance with the epoch of extraction of the explant from the mother plants. As a general objective it was aimed to develop a methodology that allows the establishment of aseptic cultures from buds of different species and genotypes belonging to the genus *Rhododendron*.

This work was carried out in the Tissue Culture Laboratory of the Institute of Plant Production and Health, Faculty of Agricultural Sciences, Universidad Austral de Chile, in Valdivia, Tenth Region, Chile.

A completely randomized experimental design was applied, through individual experiments for each one of the 12 selected species or genotypes, from which 30 explants (axillary buds of rhododendrons and nodal explants of azaleas), were divided in 3 replications of ten flasks each, where the treatments were different times of the year in which the plant material was extracted from mother plants to begin the cultures.

In every period of time, the asepsis rate, the contamination rate, the days to opening of buds, the survival rate of explants and the shoot formation rate were determined.

The response of the different species/genotypes to culture conditions, were different for each of them, showing azaleas better results than rhododendrons.

It was observed that azaleas (all genotypes) and Rhododendrons (except *Rhododendron hybridum* 'Red Watermelon' and *Rhododendron hybridum* 'Red Blood'), presented the highest rates of aseptic cultures during the months of October, November and January, coinciding these times with the moments at which the best outdoor conditions for the development of the cultures may be observed.

Therefore it could be demonstrated that the efficiency of this propagation method used with the selected *Rhododendron* genotypes and/or species, depends on the time of the year in which *in vitro* cultures were started.

## 7 BIBLIOGRAFIA

- AMERICAN RHODODENDRON SOCIETY. 2006. Plant Data. <<http://www.rhododendron.org>> (21 mar. 2006).
- ANDERSON, W.C. 1978. Rooting of tissue culture of *Rhododendrons*. Proceedings International Plant Propagator's Society. 28: 135-139.
- ANDERSON, W.C. 1984. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. Journal American Society of Horticultural Science. 109(3): 343-347.
- ARAOS, J. 1977. Manual de uso de fertilizantes. Santiago, Chile. Mantor. 149p.
- BHOJWANI, S y RAZDAN, M. 1983. Plant tissue culture: Theory and practice. Elsevier, Amsterdam. Developments in Crop Science 5, 502p.
- BOJARCZUK, K. 1994. *In vitro* Rapid Propagation of *Rhododendron* from Callus and Bud Cultures. Fifth International *Rhododendron* Conference. Acta Horticulturae. 364: 35-40.
- BRIGGS, B; McCULLOCH, S y CATON, L. 1994. *In vitro* Propagation of *Rhododendron*. Fifth International *Rhododendron* Conference. Acta Horticulturae. 364: 21-26.
- CECCHINI, T. 1978. Enciclopedia Práctica de Floricultura y Jardinería. Barcelona, España. De Vecchi. pp: 487.
- DAI, C; LAMBETH, V; TAVEN, R y MERTZ, D. 1987. Micropropagation of *Rhododendron prinophyllum* by Ovary Culture. HortScience. 22(3): 491-493.

- DEL SOLAR, C. 1985. Usando técnicas de cultivo de tejidos. Micropropagación de plantas. *Próxima Década*. 38:24-26.
- DOLE, J y WILKINS, H. 1999. Floriculture. Principles and Species. New Jersey, Estados Unidos. Prentice Hall. pp: 487-492.
- ECONOMOU, A, READ, P y PELLET, H. 1981. Micropropagation of Hardy Deciduous Azaleas. *HortScience*. 16(3): 88
- \_\_\_\_\_. 1984. In vitro Shoot Proliferation of Minnesota Deciduous Azaleas. *HortScience*. 19(1): 60-61.
- \_\_\_\_\_. 1986. Microcutting Production From Sequential Reculturing of Hardy Deciduous Azaleas Shoot Tips. *HortScience*. 21(1): 136-139.
- \_\_\_\_\_. 1986. Influence of pH and medium composition on rooting of Hardy Deciduous Azaleas microcuttings. *Journal American Society of Horticultural Science*. 111(2): 181-184.
- ESCANDON, A; FERRARI, P; FACCIUTO, G; SOTO, S; HAGIWARA, J y ACEVEDO, A. 2003. Combinación de técnicas *in vitro* y *ex vitro* para la micropropagación de Santa Rita (hibr.), una arbustiva de relevancia ornamental. Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agrícola (INTA). 32(1):111-122.
- FORDHAM, I; STIMART, D y ZIMMERMAN, R. 1982. Axillary and Adventitious Shoot Proliferation of Exbury Azaleas *in vitro*. *HortScience*. 17(5): 738-739.
- GEORGE, E y SHERRINGTON, P. 1984. Plant propagation by tissue culture. Eversley, Inglaterra. Exegetics. 709p.
- HANNAPEL, D; DIRR, M y SOMMER, H. 1981. Micropropagation of Native *Rhododendron* Species. *HortScience*. 16(3): 88.

- HARBAGE, J y STIMART, D. 1987. Adventitious Shoot Regeneration from *in vitro* Subcultured Callus of *Rhododendron* Exbury Hybrids. Hort Science. 22(6): 1324-1325.
- HARTMAN, H; KESTER, D; DAVIES, F y GENEVE, R . 2002. Plant Propagation. Principles and Practices. New Jersey, Estados Unidos. Prentice Hall. 880p.
- HSIA, C y KORBAN, S. 1997. The influence of cytokinins and ionic strength of Anderson's medium on shoot establishment and proliferation of evergreen azaleas. Euphytica. 93(1):11-17.
- IAPICHINO, G; CHENT, T y FUCHIGAMI, L. 1991. Adventitious Shoot Production from *Vireya* Hybrid of *Rhododendron*. HortScience. 26(5): 594-596.
- IMEL, M. y PREECE, J. 1988. Adventitious shoot formation from recultured leaves of *Rhododendron*. HortScience. 23(3): 760.
- JARA, G y SEEMANN, P. 2004. Establecimiento y micropropagación de *Rhododendron catawbiense* "Album". In: Seemann, P.; Castro, I. y Andrade, N. (eds). Resúmenes, 55° Congreso Agronómico de Chile, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. N° 238.
- KAVANAGH, J.M., HUNTER, S.S and CROSSAN, P.J. 1986. Micropropagation of Catawba hybrid *Rhododendrons* "Nova Zembla", " Cynthia" and " Pink Peral". Proceedings International Plant Propagator's Society. 36:264-272.
- KNUTTEL, A.J. y ADDISON, C. 1984. Deciduous azalea propagation: An overview of old and new techniques. Proceedings International Plant Propagator's Society. 34: 517-519.
- MARGARA, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemas y la organogénesis. Madrid, España. Mundi Prensa. 232p.

- McCOWN, B y LLOYD. G. 1981. Woody plant medium (WPM): A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant. species. HortScience. 16:453.
- MEYER, B; ANDERSON, D y BOHNING, R. 1976. Introducción a la fisiología vegetal. Buenos Aires, Argentina. Universitaria. 579p.
- MEYER, M. 1981. *In vitro* Propagation of *Rhododendron* from Flower Buds. HortScience. 16(3): 88.
- \_\_\_\_\_. 1982. *In vitro* Propagation of *Rhododendron catawbiense* from Flower Buds. HortScience. 17(6): 891-892.
- MUÑOZ, C. 1987. Biotecnología. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, La Plata. Revista de Investigación y Progreso Agropecuario. Nº 30. pp:11-12.
- MURASHIGE, T y SKOOG. F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- \_\_\_\_\_. 1974. Plant propagation through tissue culture. Annual Review of Plant Physiology 25: 135-166.
- PERRY, F; ELSLEY, J y BOYD, L. 1978. Guía Práctica Ilustrada para El Jardín. Tomo 2. Barcelona, España. BLUME. pp:212-213.
- RAMIREZ, M; LEON DE SIERRALTA, S y URDANETA, A. 1999. Evaluación de desinfectantes en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guayava* L. y *Psidium friedrichsthalianum*. Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía. 16: 243-255
- \_\_\_\_\_. 2002. Establecimiento *in vitro* de explantes de guanábano (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio. Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía. 19: 48-55

- \_\_\_\_\_; SANTOS, R e ISEA, F. 2000. Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guayava* L. Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela Revista de la Facultad de Agronomía. 16: 243-255
- ROCA, W.M. y MROGINSKI L.A. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical. 969p.
- SEEMANN, P. 1993. Utilización de técnicas de micropropagación. In: Barriga, P. y Neira, M. (eds). Avances en Producción y Sanidad Vegetal. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile, Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. pp: 87-109.
- SNEDECOR, G y COCHRAN, W. 1980. Statistical Methods. 7<sup>ed</sup>. Iowa, Estados Unidos. The Iowa State University. pp: 493-495.
- TAPIA, C. 2004. Iniciación *in vitro* de algunas especies Proteáceas de interés comercial en Chile e Iniciación *in vitro* de *Herbertia lahue* una Iridácea chilena de interés ornamental. Tesis Lic. Agr. Santiago. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Departamento de Ciencias Vegetales. 43 p.

## **ANEXOS**

**ANEXO 1 Composición del medio de cultivo Anderson.**

KNO <sub>3</sub>	480 mg/L
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400 mg/L
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	180,7 mg/L
CaCl <sub>2</sub>	332,2 mg/L
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	330,6 mg/L
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	16,9 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8,6 mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 mg/L
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,025 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,25 mg/L
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,025 mg/L
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	55,7 mg/L
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	74,5 mg/L
KI	0,3 mg/L
Tiamina	0,4 mg/L
Bencil amino purina (BAP)	5 mg/L
Acido indol acético (AIA)	2 mg/L
Sacarosa	20 g/L
Agar	8 g/L

**FUENTE: ANDERSON (1978, 84).**

## ANEXO 2 Resultados obtenidos del ensayo.

<i>Rhododendron japonicum</i> 'Fucsia', posiblemente 'Fedora'.							
Tratam.	Nº Total Frascos	Nº Frascos X repetición	Nº Frascos Contaminados	Nº Frascos Brotados	Nº Frascos Sobrevivientes	Días ruptura de yemas	Nº Frascos Necrosados
Epoca 1		10	3	0	0	0	7
	30	10	4	0	0	0	6
		10	7	0	0	0	3
Epoca 2		10	3	7	6	10	0
	30	10	1	5	3	12	4
		10	1	9	9	14	0
Epoca 3		10	10	0	0	0	0
	30	10	9	0	0	0	1
		10	9	0	0	0	1
Epoca 4		10	10	0	0	0	0
	30	10	9	0	0	0	1
		10	8	0	0	0	2
Epoca 5		10	10	6	0	12	0
	30	10	10	4	0	10	0
		10	8	8	0	14	2
Epoca 6		10	2	10	8	14	0
	30	10	3	9	8	12	1
		10	1	5	4	10	4
Epoca 7		10	1	10	10	14	0
	30	10	2	8	6	10	2
		10	0	9	8	12	1

## ANEXO 3 Resultados obtenidos del ensayo.

<i>Rhododendron japonicum</i> 'Blanco', posiblemente 'Palestrina' Syn. 'Wilhelmina Vuyk'.							
Tratam.	Nº Total Frascos	Nº Frascos X repetición	Nº Frascos Contaminados	Nº Frascos Brotados	Nº Frascos Sobrevivientes	Dias ruptura de yemas	Nº Frascos Necrosados
Epoca 1	30	10	2	0	0	0	8
		10	5	0	0	0	5
		10	4	0	0	0	6
Epoca 2	30	10	2	7	6	10	1
		10	3	5	4	12	2
		10	5	5	4	14	0
Epoca 3	30	10	10	0	0	0	0
		10	9	0	0	0	1
		10	8	0	0	0	2
Epoca 4	30	10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
Epoca 5	30	10	10	6	0	7	0
		10	10	6	0	10	0
		10	9	8	0	14	1
Epoca 6	30	10	1	10	8	14	0
		10	1	8	8	7	1
		10	1	9	8	10	0
Epoca 7	30	10	0	10	10	14	0
		10	4	6	4	7	0
		10	2	5	4	12	3

## ANEXO 4 Resultados obtenidos del ensayo.

<i>Rhododendron indicum</i> 'lila', posiblemente 'Formosa'.							
Tratam.	Nº Total Frascos	Nº Frascos X repetición	Nº Frascos Contaminados	Nº Frascos Brotados	Nº Frascos Sobrevivientes	Días ruptura de yemas	Nº Frascos Necrosados
Epoca 1	30	10	2	0	0	0	8
		10	2	0	0	0	8
		10	0	0	0	0	10
Epoca 2	30	10	0	8	7	10	2
		10	3	9	7	12	1
		10	1	8	7	14	1
Epoca 3	30	10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
Epoca 4	30	10	7	0	0	0	3
		10	9	0	0	0	1
		10	9	0	0	0	1
Epoca 5	30	10	10	0	0	0	0
		10	8	0	0	0	2
		10	8	0	0	0	2
Epoca 6	30	10	3	7	6	14	0
		10	2	6	6	7	2
		10	1	8	7	10	1
Epoca 7	30	10	1	10	10	14	0
		10	1	9	8	7	0
		10	1	8	6	10	1

## ANEXO 5 Resultados obtenidos del ensayo.

<i>Rhododendron mollis x sinensis</i> (De semilla naranjo) 'Naranjo'.							
Tratam.	Nº Total	Nº Frascos	Nº Frascos	Nº Frascos	Nº Frascos	Días ruptura	Nº Frascos
	Frascos	X repetición	Contaminados	Brotados	Sobrevivientes	de yemas	Necrosados
Epoca 1	30	10	6	0	0	0	4
		10	7	0	0	0	3
		10	8	0	0	0	2
Epoca 2	30	10	9	0	0	0	1
		10	7	0	0	0	3
		10	8	0	0	0	2
Epoca 3	30	10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
Epoca 4	30	10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
Epoca 5	30	10	7	6	0	7	0
		10	8	5	0	14	0
		10	9	7	0	21	0
Epoca 6	30	10	1	10	9	12	0
		10	1	8	8	21	1
		10	1	9	8	14	0
Epoca 7	30	10	3	10	10	14	0
		10	2	8	7	18	0
		10	1	6	5	21	3

## ANEXO 6 Resultados obtenidos del ensayo.

<i>Rhododendron mollis x sinensis (De semilla rojo) 'Rojo'.</i>							
Tratam.	Nº Total	Nº Frascos	Nº Frascos	Nº Frascos	Nº Frascos	Días ruptura	Nº Frascos
	Frascos	X repetición	Contaminados	Brotados	Sobrevivientes	de yemas	Necrosados
Epoca 1		10	3	0	0	0	7
	30	10	4	0	0	0	6
		10	4	0	0	0	6
Epoca 2		10	3	7	7	21	0
	30	10	4	5	5	18	1
		10	2	4	3	14	4
Epoca 3		10	10	0	0	0	0
	30	10	9	0	0	0	1
		10	7	0	0	0	3
Epoca 4		10	10	0	0	0	0
	30	10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
Epoca 5		10	5	0	0	0	5
	30	10	7	0	0	0	3
		10	8	0	0	0	2
Epoca 6		10	1	10	10	14	0
	30	10	1	8	8	21	1
		10	1	9	8	28	0
Epoca 7		10	1	10	10	14	0
	30	10	1	9	8	18	0
		10	1	9	8	21	0

## ANEXO 7 Resultados obtenidos del ensayo.

<i>Rhododendron hybr. catawbiense</i> 'Fucsia con blanco', posiblemente 'Boursault'.							
Tratam.	Nº Total Frascos	Nº Frascos X repetición	Nº Frascos Contaminados	Nº Frascos Brotados	Nº Frascos Sobrevivientes	Días ruptura de yemas	Nº Frascos Necrosados
Epoca 1	30	10	6	0	0	0	3
		10	7	0	0	0	3
		10	8	0	0	0	3
Epoca 2	30	10	7	0	0	0	3
		10	6	0	0	0	4
		10	7	0	0	0	3
Epoca 3	30	10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
Epoca 4	30	10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
		10	9	0	0	0	1
Epoca 5	30	10	7	4	0	14	0
		10	7	4	0	18	0
		10	8	6	0	21	0
Epoca 6	30	10	6	1	1	14	3
		10	7	1	0	21	2
		10	8	1	1	28	1
Epoca 7	30	10	5	3	3	14	2
		10	6	5	4	21	0
		10	7	4	4	28	0

**ANEXO 8 Resultados obtenidos del ensayo.**

<i>Rhododendron hybr.</i> 'Rojo Sandía', posiblemente 'Britannia'.							
Tratam.	Nº Total	Nº Frascos	Nº Frascos	Nº Frascos	Nº Frascos	Días ruptura	Nº Frascos
	Frascos	X repetición	Contaminados	Brotados	Sobrevivientes	de yemas	Necrosados
Epoca 1		10	4	0	0	0	6
	30	10	2	0	0	0	8
		10	3	0	0	0	7
Epoca 2		10	4	0	0	0	6
	30	10	2	0	0	0	8
		10	4	0	0	0	6
Epoca 3		10	10	0	0	0	0
	30	10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
Epoca 4		10	10	0	0	0	0
	30	10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
Epoca 5		10	7	1	0	0	3
	30	10	8	1	0	0	2
		10	8	1	0	0	2
Epoca 6		10	10	1	0	14	0
	30	10	10	2	0	21	0
		10	10	1	0	12	0
Epoca 7		10	10	1	0	14	0
	30	10	10	1	0	10	0
		10	10	1	0	21	0

## ANEXO 9 Resultados obtenidos del ensayo.

<i>Rhododendron hybr.</i> 'Blanco con morado', posiblemente 'Blue Peter'.							
Tratam.	Nº Total	Nº Frascos	Nº Frascos	Nº Frascos	Nº Frascos	Días ruptura	Nº Frascos
	Frascos	X repetición	Contaminados	Brotados	Sobrevivientes	de yemas	Necrosados
Epoca 1		10	8	0	0	0	2
	30	10	9	0	0	0	1
		10	9	0	0	0	1
Epoca 2		10	8	0	0	0	2
	30	10	10	0	0	0	0
		10	9	0	0	0	1
Epoca 3		10	10	0	0	0	0
	30	10	10	0	0	0	0
		10	8	0	0	0	2
Epoca 4		10	10	0	0	0	0
	30	10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
Epoca 5		10	7	3	0	10	3
	30	10	8	4	0	12	2
		10	10	3	0	14	0
Epoca 6		10	6	1	1	18	3
	30	10	4	2	2	21	4
		10	8	0	0	10	2
Epoca 7		10	6	3	3	14	1
	30	10	5	1	0	10	4
		10	7	2	0	21	1

## ANEXO 10 Resultados obtenidos del ensayo.

<i>Rhododendron hybr.</i> 'Rosado', posiblemente 'Pacific or Coast'.							
Tratam.	Nº Total Frascos	Nº Frascos X repetición	Nº Frascos Contaminados	Nº Frascos Brotados	Nº Frascos Sobrevivientes	Días ruptura de yemas	Nº Frascos Necrosados
Epoca 1	30	10	8	0	0	0	2
		10	7	0	0	0	3
		10	6	0	0	0	4
Epoca 2	30	10	8	0	0	0	2
		10	7	0	0	0	3
		10	8	0	0	0	2
Epoca 3	30	10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
Epoca 4	30	10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
Epoca 5	30	10	10	4	0	10	0
		10	10	4	2	14	0
		10	10	6	0	21	0
Epoca 6	30	10	7	2	1	18	1
		10	9	2	2	21	0
		10	8	2	2	14	0
Epoca 7	30	10	3	5	5	14	3
		10	5	7	7	18	0
		10	4	6	5	21	0

## ANEXO 11 Resultados obtenidos del ensayo.

<i>Rhododendron hybr. 'Blanco', posiblemente formosum var. Formosum.</i>							
Tratam.	Nº Total Fascos	Nº Fascos X repetición	Nº Fascos Contaminados	Nº Fascos Brotados	Nº Fascos Sobrevivientes	Días ruptura de yemas	Nº Fascos Necrosados
Epoca 1		10	4	0	0	0	6
	30	10	3	0	0	0	7
		10	2	0	0	0	8
Epoca 2		10	3	0	0	0	7
	30	10	4	0	0	0	6
		10	4	0	0	0	6
Epoca 3		10	10	0	0	0	0
	30	10	9	0	0	0	1
		10	7	0	0	0	3
Epoca 4		10	10	0	0	0	0
	30	10	9	0	0	0	1
		10	8	0	0	0	2
Epoca 5		10	7	0	0	0	3
	30	10	6	0	0	0	4
		10	7	0	0	0	3
Epoca 6		10	10	2	1	18	0
	30	10	6	3	3	21	1
		10	8	1	1	14	1
Epoca 7		10	6	5	4	14	0
	30	10	5	4	3	28	1
		10	4	3	4	21	3

## ANEXO 12 Resultados obtenidos del ensayo.

<i>Rhododendron hybr. ponticum x catawbiense 'Purpura', posiblemente 'Anha Kruschke'.</i>							
Tratam.	Nº Total Frascos	Nº Frascos X repetición	Nº Frascos Contaminados	Nº Frascos Brotados	Nº Frascos Sobrevivientes	Días ruptura de yemas	Nº Frascos Necrosados
Epoca 1	30	10	2	0	0	0	8
		10	3	0	0	0	7
		10	2	0	0	0	7
Epoca 2	30	10	3	0	0	0	7
		10	4	0	0	0	6
		10	5	0	0	0	5
Epoca 3	30	10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
Epoca 4	30	10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
Epoca 5	30	10	7	4	0	7	3
		10	9	3	0	10	1
		10	8	3	0	14	2
Epoca 6	30	10	8	2	1	7	0
		10	8	3	3	21	0
		10	8	1	1	14	1
Epoca 7	30	10	6	5	4	14	0
		10	5	4	3	7	1
		10	7	3	4	21	0

## ANEXO 13 Resultados obtenidos del ensayo.

<i>Rhododendron hybr.</i> 'Rojo Sangre', posiblemente 'Hill's Bright Red'.							
Tratam.	Nº Total	Nº Frascos	Nº Frascos	Nº Frascos	Nº Frascos	Días ruptura	Nº Frascos
	Frascos	X repetición	Contaminados	Brotados	Sobrevivientes	de yemas	Necrosados
Epoca 1		10	2	0	0	0	8
	30	10	3	0	0	0	7
		10	1	0	0	0	9
Epoca 2		10	3	0	0	0	7
	30	10	4	0	0	0	6
		10	2	0	0	0	8
Epoca 3		10	10	0	0	0	0
	30	10	10	0	0	0	0
		10	10	0	0	0	0
Epoca 4		10	8	0	0	0	2
	30	10	9	0	0	0	1
		10	9	0	0	0	1
Epoca 5		10	7	0	0	0	3
	30	10	7	0	0	0	3
		10	6	0	0	0	4
Epoca 6		10	10	2	0	14	0
	30	10	8	1	0	21	2
		10	9	1	0	28	1
Epoca 7		10	10	1	0	14	0
	30	10	10	2	0	18	0
		10	10	3	0	28	0

**ANEXO 14 Análisis de comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje promedio de contaminación de azaleas.**

Porcentaje promedio de contaminación.										
Tratamientos	C.1		C.2		C.3		C.4		C.5	
<b>Epoca 1</b>	43,0	a b	36,9	a	17,7	a	57,0	b	37,2	a b
<b>Epoca 2</b>	23,3	a	34,9	a	17,2	a	63,9	b	33,0	a
<b>Epoca 3</b>	77,7	c	75,0	b	90,0	b	90,0	c	72,7	c d
<b>Epoca 4</b>	75,0	b c	90,0	b	66,6	b	90,0	c	90,0	d
<b>Epoca 5</b>	81,1	c	83,8	b	72,2	b	63,9	b	55,0	b c
<b>Epoca 6</b>	26,0	a	18,4	a	26,0	a	18,4	a	18,4	a
<b>Epoca 7</b>	15,0	a	21,9	a	18,4	a	26,0	a	18,4	a

**ANEXO 15 Análisis de comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje promedio de contaminación de rododendros.**

Porcentaje promedio de contaminación.							
Tratamientos	C.6	C.7	C.8	C.9	C.10	C.11	C.12
<b>Epoca 1</b>	57,0 a	33,0 a	68,5 a b	57,0 b	33,0 a	28,7 a	26,0 a
<b>Epoca 2</b>	54,7 a	35,0 a	75,0 a b	61,2 b	37,2 a b	39,1 a b	33,0 a
<b>Epoca 3</b>	90,0 b	90,0 c	81,1 a b	90,0 c	72,7 c	90,0 d	90,0 d
<b>Epoca 4</b>	83,8 b	90,0 c	90,0 c	90,0 c	75,0 c	90,0 d	68,8 b c
<b>Epoca 5</b>	59,0 a	61,2 b	70,0 a b	90,0 c	54,7 a b c	63,9 c	54,7 b
<b>Epoca 6</b>	57,0 a	90,0 c	50,1 a	63,9 b	68,0 b c	63,4 c	75,0 c d
<b>Epoca 7</b>	50,8 a	90,0 c	50,8 a	39,1 a	45,0 a b c	50,8 b	90,0 d

**ANEXO 16 Análisis de comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje promedio de días a ruptura de yemas de azaleas.**

Porcentaje promedio de días a ruptura de yemas.										
Tratamientos	C.1		C.2		C.3		C.4		C.5	
<b>Epoca 1</b>	0,0	a								
<b>Epoca 2</b>	12,0	b	12,0	b	12,0	b	0,0	a	17,6	b
<b>Epoca 3</b>	0,0	a								
<b>Epoca 4</b>	0,0	a								
<b>Epoca 5</b>	10,3	b	10,3	b	0,0	a	14,0	b	0,0	a
<b>Epoca 6</b>	12,0	b	10,3	b	10,3	b	15,6	b	21,0	b
<b>Epoca 7</b>	12,0	b	11,0	b	10,3	b	17,6	b	17,6	b

**ANEXO 17 Análisis de comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje promedio de días a ruptura de yemas de rododendros.**

Porcentaje promedio de días a ruptura de yemas.														
Tratamientos	C.6		C.7		C.8		C.9		C.10		C.11		C.12	
<b>Epoca 1</b>	0,0	a	0,0	a										
<b>Epoca 2</b>	0,0	a	0,0	a										
<b>Epoca 3</b>	0,0	a	0,0	a										
<b>Epoca 4</b>	0,0	a	0,0	a										
<b>Epoca 5</b>	17,6	b	15,0	b	12,0	b	15,0	b	0,0	a	10,3	a b	0,0	a
<b>Epoca 6</b>	21,0	b	15,6	b	16,3	b	17,6	b	17,6	b	14,0	b	21,0	b
<b>Epoca 7</b>	21,0	b	15,0	b	15,0	b	17,6	b	21,0	b	14,0	b	20,0	b

**ANEXO 18 Análisis de comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje promedio de brotación de azaleas.**

Porcentaje promedio de brotación.										
Tratamientos	C.1		C.2		C.3		C.4		C.5	
<b>Epoca 1</b>	0,0	a	0,0	a	0,0	a	0,0	a	0,0	a
<b>Epoca 2</b>	57,7	b	48,9	b	66,1	b c	0,0	a	47,0	b
<b>Epoca 3</b>	0,0	a	0,0	a	0,0	a	0,0	a	0,0	a
<b>Epoca 4</b>	0,0	a	0,0	a	0,0	a	0,0	a	0,0	a
<b>Epoca 5</b>	51,1	b	54,9	b	0,0	a	50,8	b	0,0	a
<b>Epoca 6</b>	68,8	b	75,0	b	57,0	b	75,0	b	75,0	c
<b>Epoca 7</b>	75,0	b	61,9	b	75,0	c	68,0	b	77,7	c

**ANEXO 19 Análisis de comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje promedio de brotación de rododendros.**

Porcentaje promedio de brotación.							
Tratamientos	C.6	C.7	C.8	C.9	C.10	C.11	C.12
<b>Epoca 1</b>	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
<b>Epoca 2</b>	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
<b>Epoca 3</b>	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
<b>Epoca 4</b>	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
<b>Epoca 5</b>	43,0 c	18,4 b	35,2 c	43,0 c	0,0 a	35,2 b c	0,0 a
<b>Epoca 6</b>	18,4 b	21,1 b	15,0 a b	26,5 b	26,0 b	26,0 b	21,1 b
<b>Epoca 7</b>	39,1 c	23,5 b	26,0 b c	50,8 c	39,1 c	39,1 c	26,0 b

**ANEXO 20 Análisis de comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje promedio de sobrevivencia de azaleas.**

Porcentaje promedio de sobrevivencia.										
Tratamientos	C.1		C.2		C.3		C.4		C.5	
<b>Epoca 1</b>	0,0	a								
<b>Epoca 2</b>	69,5	b	64,8	b	66,8	b	0,0	a	80,0	b
<b>Epoca 3</b>	0,0	a								
<b>Epoca 4</b>	0,0	a								
<b>Epoca 5</b>	0,0	a								
<b>Epoca 6</b>	65,7	b	74,6	b	75,6	b	77,3	b	83,4	b
<b>Epoca 7</b>	74,8	b	68,0	b	73,4	b	75,0	b	76,9	b

**ANEXO 21 Análisis de comparaciones múltiples Tukey para el porcentaje promedio de sobrevivencia de rododendros.**

Porcentaje promedio de sobrevivencia.												
Tratamientos	C.6		C.7	C.8		C.9		C.10		C.11		C.12
<b>Epoca 1</b>	0,0	a	-	0,0	a	0,0	a	0,0	a	0,0	a	-
<b>Epoca 2</b>	0,0	a	-	0,0	a	0,0	a	0,0	a	0,0	a	-
<b>Epoca 3</b>	0,0	a	-	0,0	a	0,0	a	0,0	a	0,0	a	-
<b>Epoca 4</b>	0,0	a	-	0,0	a	0,0	a	0,0	a	0,0	a	-
<b>Epoca 5</b>	0,0	a	-	0,0	a	15,0	a	0,0	a	0,0	a	-
<b>Epoca 6</b>	60,0	b	-	60,0	a	75,0	b	75,0	b	75,0	b	-
<b>Epoca 7</b>	81,1	b	-	30,0	a	81,8	b	81,1	b	81,1	b	-

- = Sin sobrevivencia.