

## CAPITULO I INTRODUCCIÓN

### 1. INTRODUCCIÓN

El orégano (*Origanum vulgare L.*), es una especie herbácea perenne, decidua, que puede alcanzar hasta un metro de altura. Pertenece a la familia de *Labiatae*, produce flores que varían desde su color blanco a púrpura y muestra brácteas en verano, las hojas son verdes a verde grisáceo y pueden ser vellosas o lisas. La planta tiende a ser muy variable cuando se obtiene a partir de semillas (Cameroni G., 2013).

El orégano es una planta de Europa y de Asia Occidental, en Italia crece sobre todo en las colinas y montañas y en España también. Su nombre que deriva del griego significa “esplendor de la montaña”. Se trata de una planta fuertemente olorosa y de gran sabor; en las zonas más cálidas el aroma es de mayor intensidad, el sabor más picante y el perfume más persistente. Se cultiva por su demanda en el sector farmacéutico, de los licores y cosméticos, además de la industria alimentaria, conservera y semillera. Su uso práctico en cocina es el de aromatizante por excelencia de los platos. También herboristería lo consume ampliamente, por sus propiedades tónicas, digestivas, estomacales y antiasmáticas (Infoagro, 2010).

En Bolivia la producción del orégano se potencializa en Tarija, Chuquisaca, Cochabamba y Potosí siendo la demanda de este producto en el mercado a nivel nacional e internacional, ya que Bolivia es el segundo país en producción de orégano a nivel Sud América para cubrir la demanda del mercado es necesario adaptar nuevos suelos para la producción, por lo tanto se requiere de técnicas apropiadas, para una rápida propagación que favorezca la obtención de plantines con buenas características al momento de plantar en suelo firme (Ramos M., Marilu V., 2016).

En Tarija son cuatro las variedades de orégano cultivadas: Maru, Kaliteri, Criolla argentina y la Criolla chilena. El orégano se cosecha hasta tres veces al año, dependiendo del clima y del riego, y permanece en terreno hasta seis años, por eso es considerado como el cultivo “ahorro” para el productor (Los tiempos, 2019).

Chuquisaca, Tarija, Cochabamba y Potosí son los principales departamentos productores de esta especia, aportando a la producción nacional, 80 y 20% respectivamente. Otra zona importante en la producción de esta especie son las provincias Cercado, Avilés, Méndez y Arce del departamento de Tarija (FDTA-valles, 2007).

En Tarija se está produciendo dos variedades de orégano: Maru y Kaliteri. La producción fue apropiada por unas 200 familias agrupadas en la Asociación de Productores de Orégano (APO). Actualmente se cultiva más de 100 hectáreas de en todo el valle central, con perspectivas de ampliar la producción con el objeto de cubrir la demanda. Las variedades de orégano Maru y Kaliteri, de acuerdo a la experiencia desarrollada son las variedades que mejor se adaptan a las condiciones climatológicas y temperatura del valle central de Tarija, la demanda de plantines por cada gestión alcanza a los 2 millones (El Diario, 2014).

El cultivo In Vitro consiste en tomar una porción de una planta (Ej. El ápice, una hoja, o segmento de ella, segmento de tallo, meristemo, embrión, nudo, semilla, antera, etc.), y colocarlo en un medio nutritivo estéril (usualmente gelificado, semisólido) donde se regenerará una o muchas plantas. Durante las últimas décadas, la técnica de cultivo “In Vitro” ha ganado especial interés para el establecimiento de diversas plantas para la producción de compuestos o la obtención de cultivos más sanos y con características genéticas específicas (Intagri, 2017).

## 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con el periódico El País (2014) El orégano se constituye en una alternativa de cultivo rentable en Tarija ya que no necesita una gran inversión económica, pocos lo cultivan y genera considerables réditos económicos.

En todo el país son 2400 familias en los departamentos de Chuquisaca, Cochabamba y Tarija. Actualmente en Tarija se está produciendo dos variedades de orégano: Maru y Kaliteri. En el 2015 la producción fue apropiada por unas 200 familias agrupadas en la Asociación de Productores de Orégano (APO). Actualmente se cultiva más de 170 hectáreas aproximadamente en todo el valle central, con perspectivas de ampliar la producción con el objeto de cubrir la demanda. Las variedades de orégano Maru y Kaliteri, de acuerdo a la experiencia desarrollada son las variedades que mejor se adaptan a las condiciones climatológicas y temperatura del valle central de Tarija, la demanda de platines por cada gestión alcanza a los 2 millones.

La problemática surge como consecuencia de la utilización de los métodos de multiplicación tradicional (división de matas y/o esquejado) obteniendo esquejes de material genético de plantas madres, que fueron establecidas hace 10 años, hasta la fecha estas plantas se encuentran contaminadas por enfermedades sistémicas (virus mosaico de la alfalfa) y plagas (nematodos) que son transmitidos de generación en generación.

En consecuencia, las actuales prácticas de producción de plantas de orégano (*Origanum vulgare L*) por esquejes está dando como resultado plantas infestadas con enfermedades, que a la larga generan problemas fitosanitarios que se traducen en los bajos rendimiento, mala la calidad de la producción y se reduce la vida útil de la plantación, confluyendo en un sistema socio-productivo que no es el esperado con respecto al que se podría obtener con algunas mejoras en la producción.

## 1.2.JUSTIFICACIÓN

El orégano en Bolivia se convirtió en uno de los cultivos de mayor importancia debido a que es una alternativa cuando se presenta problemas en distintos cultivos ya que por distintos factores existen pérdidas afectadas por fenómenos naturales tales como: la sequía, helada, granizo, y otros.

La mayoría de los productores de orégano recurre a este cultivo por ese motivo, sin embargo, al convertirse en un cultivo de importancia y a los grandes espacios de tierra cultivada de orégano, con el pasar del tiempo comenzaron a aparecer problemas fitosanitarios, enfermedades en el orégano, y para ello se necesitan tratamientos para controlarlos, pero a pesar de eso aún es insuficiente

Ante esa situación se comenzó a ver otras posibilidades de controlar estas enfermedades entre las más principales (enfermedades de origen viral) debido a ello se recurrió a tratamientos especiales desde la fase inicial para limpiarlos de este problema bajo condiciones controladas en laboratorio utilizando la técnica de micropropagación de cultivo *in vitro*.

Los productores de orégano en Tarija requieren plantas, sanas libres de enfermedades, por lo que es necesario recurrir a métodos de limpieza del material genético y que incrementen la multiplicación, para cubrir de alguna manera la demanda de plantas.

Mediante el cultivo *in vitro* de explantes meristemáticos, pretendemos liberar de virus a dos variedades de orégano de alta importancia en nuestro medio, la variedad Maru y la variedad Kaliteri.

De esta manera se pueda dotar a las familias campesinas que se dedican a la producción de orégano, plantas que le garanticen una buena producción, calidad y una larga producción.

### **1.3.HIPÓTESIS**

Las dos variedades de orégano a trabajarse darán los mismos resultados mediante el cultivo in vitro utilizando meristemas.

### **1.4.OBJETIVOS**

#### **1.4.1. Objetivo General**

Limpieza In Vitro de dos variedades de orégano (*Origanum vulgare*) (Maru y Kaliteri) a través de la multiplicación de meristemas.

#### **1.4.2. Objetivos Específicos**

- Identificar la concentración adecuada de tres fitorreguladores en la multiplicación explantes de meristemas de vitroplantas de oregano.
- Evaluar el porcentaje (%) de regeneración in vitro de plantas de orégano a través de explantes de meristemas en diferentes concentraciones de medios de cultivo.

## CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

### 2.1 GENERALIDADES DEL CULTIVO

#### 2.1.1 ORIGEN

El orégano es una especie aromática de Europa originaria de Europa y Asia Central utilizada principalmente como condimento en salsas y comidas. Destaca por su empleo en la preparación de pizza. Además, en los últimos años, gracias a la presencia del timol y el carvacrol entre sus aceites esenciales, se han desarrollado aplicaciones medicinales para esta hierba como sedante, antiespasmódica, carminativa y antioxidante (Chirinos et al, 2009).

Se trata de una planta fuertemente olorosa y de gran sabor; en las zonas más cálidas el aroma es de mayor intensidad, el sabor más picante y el perfume más persistente.

#### 2.1.2 TAXONOMÍA

**Reino:** Vegetal.

**Phylum:** Telemophytae.

**División:** Tracheophytae.

**Subdivisión:** Anthophyta.

**Clase:** Angiospemeae.

**Subclase:** Dicotyledoneae.

**Grado evolutivo:** Metachlamidae.

**Grupo de Ordenes:** Tetracíclicos.

**Orden:** Escrophulariales.

**Familia:** Labiatae.

**Nombre Científico:** *Origanum vulgare* L.

**Nombre Común:** Orégano.

(Acosta I, 2019)

### **2.1.3 MORFOLOGÍA**

#### **2.1.3.1 Tallo**

Tiene tallo recto, que alcanza entre 30 y 80 centímetros y no es redondo sino, curiosamente, cuadrado, ramificado en la parte superior, totalmente cubierto de pelusilla blanca. Posee un rizoma rastrero (Ménédez, 2007).

#### **2.1.3.2 Hojas**

Las hojas brotan de dos en dos en cada nudo, enfrentadas, son enteras, ovaladas, acabadas en punta, también se recubren de pelusilla por ambas caras y su longitud es de hasta 4 centímetros. Poseen peciolo y aparecen cubiertas también de glándulas (Santillán et al, 2011).

#### **2.1.3.3 Raíz**

La planta de orégano se caracteriza por poseer un sistema radicular muy ramificado y rizomas ramificados, rastreros y con pequeñas raicillas (Elicriso, 2014).

#### **2.1.3.4 Flores**

Las flores se disponen en verticilastros que forman espiguillas de hasta 3 centímetros; son muy pequeñas (los pétalos no sobrepasan los 2 o 3 milímetros de longitud), de color violeta rosado, rezuman unas gotitas de un líquido amarillento aromático. Están

protegidas por bractéolas de hasta 5 milímetros, de contorno oval y color verdoso o purpúreo. Florece en verano (Santillán et al, 2011).

#### **2.1.3.5 Fruto**

Su fruto es un tetraquenio, formado por cuatro aquenios marrones o castaños con cada parte ovoidea y lisa, es seco y globoso (Graug, 1985).

#### **2.1.3.6 Semilla**

Las semillas son pequeñas, ovales y de color marrón o pardo oscuro (Santillán et al, 2011).

### **2.1.4 VARIEDADES**

Las principales variedades, entre muchas probadas que se utilizan actualmente en Bolivia son el orégano Maru y el Kaliteri. La más popular entre los agricultores es la variedad Maru por su buen rendimiento.

#### **2.1.4.1 Maru**

Es la más aceptada por su posicionamiento en el mercado de los condimentos y también por su rendimiento, nativo del medio este. Esta variedad del tipo carvacrol.

Esta variedad prende rápidamente y se adapta bien a diferentes climas y suelo. Resiste bien a la sequía y necesita menos agua que la variedad kaliteri. La planta menos sensible a las enfermedades y plagas (FDTA-Valles, 2007).

#### **2.1.4.2 Kaliteri**

Significa el mejor en griego, es la que tiene resultados más promisorios a nivel mundial. Un estudio de su aceite esencial prueba que la cantidad y la calidad pueden variar mucho dependiendo de su localización. La composición del aceite y la proporción de carvacrol y timol varían mucho.

### **2.1.5 REQUERIMIENTOS EDAFOCLIMÁTICOS**

#### **2.1.5.1 Clima**

Como es una planta rústica, el orégano se adapta a una variedad de climas. Se puede encontrar variedades criollas que crecen en condiciones extremas.

#### **2.1.5.2 Por región geográfica**

La experiencia desarrollada en Bolivia en la producción de orégano, lleva al siguiente análisis para climas de altura, valle húmedo y valle seco.

#### **2.1.5.3 Clima de altura**

Localidades con altitudes que fluctúan entre 1.800-2.400 m.s.n.m. A mayor altura se puede observar que el ciclo vegetativo, es más

largo, de 5 meses para la primera cosecha y de 3-4, meses de intervalo después de la cosecha.

Las hojas del orégano producidas en estas zonas son más gruesas y presentan un mayor peso. Las plantas tienen un tamaño promedio de 40 cm.

#### **2.1.5.4 Clima de valle húmedo**

A menor altura presenta un mayor desarrolló que en altura logrando un tamaño de hasta 60 cm. Una de las características es un mayor espacio entre los nudos que hacen una planta con hojas más delgadas y un tallo grueso. La planta es también de un color más claro.

#### **2.1.5.5 Clima de valle seco**

En estas condiciones la planta alcanza hasta 50 cm con hojas verde claro. El primer corte se realiza de 4-5 meses y de 12-14 semanas de intervalo después de la cosecha (FDTA-Valles, 2007).

#### **2.1.5.6 Temperatura**

El orégano se desarrolla entre los 5 y 28°C, las cuales pueden considerarse sus temperaturas umbrales.

El orégano es resistente al frio; sin embargo, las temperaturas menores a 5°C afectan al cultivo de orégano retrasando el crecimiento y quemándolos bordes de las hojas (Jorge, 2012).

#### **2.1.5.7 Precipitación**

Habita en regiones con una precipitación acumulada promedio anual de 500 a 900 mm, aunque su requerimiento mínimo va de 450 a 500 mmm de lluvia en el año (FAO, 1994 citado por Tárraga 2009)

El orégano requiere poca agua una vez establecidas las plantas (paso de plántula a planta)

### **2.1.5.8 Suelo**

La planta tiene un buen desarrolló en suelos sueltos, permeables y con buen drenaje. No prospera en suelos salinos, además que el orégano es sensible a la asfixia radicular. La textura puede ser franco-limosa, franco-arenosa o suelo pedregoso-franco por su buen drenaje. El suelo necesita atención especial para asegurar una buena ventilación. El suelo apto para el cultivo de orégano requiere de buen drenaje, aireación y ausencia de capas endurecidas que obstaculicen el desarrollo de las raíces y el paso del agua. El orégano necesita un suelo profundo (hasta 50 cm), con pH 6.8. La planta responde bien en suelos ricos en materia orgánica (Santillán et al, 2011).

### **2.1.5.9 pH**

Influye en el desarrollo y reproducción de muchos microorganismos del suelo como hongos y bacterias, así como también en el desarrollo del cultivo.

El orégano se desarrolla en terrenos con pH ligeramente ácido (Martínez, 1996).

## **2.1.6 PRODUCCIÓN Y MERCADO**

El rendimiento de la producción de orégano en el Valle Central de Tarija oscila entre 1.500 a 2.000 kilogramos por hectárea, alcanzando a unas 60 toneladas de producción por año, producción que en la mayor parte es para la exportación, solamente un pequeño saldo queda para el mercado local (El diario, 2014).

Según la Asociación de Productores de Orégano de Tarija (APO) actualmente se tiene más de 70 hectáreas de orégano cultivadas entre la provincia Cercado con aproximadamente 75%, y el 25% entre la provincia Méndez y Avilés, además de un vivero ubicado en predios del proyecto múltiple San Jacinto con más de 150 mil platines para proveer a los productores.

El principal mercado del orégano boliviano es Brasil con un 85%, seguido de Uruguay con el 15%. Solo Brasil consume por encima de las 2.000 toneladas de orégano al año y Bolivia solo puede ofrecerle 100 toneladas al año (Corea del Sur, 2011).

## **2.1.7 PLAGAS Y ENFERMEDADES**

### **2.1.7.1 Enfermedades Causadas por Hongos:**

#### **2.1.7.1.1 Roya**

El hongo *P. rubsaameni*, también conocido como Roya, es un hongo foliar que produce pústulas (costras) en el envés de las hojas, de color marrón o rojizo; y en el haz, manchas cloróticas.

El hongo aparece cuando la planta está madurando; es decir, cuando se inicia la floración. La proliferación del hongo en la planta es de las más viejas a las más jóvenes, o sea, de abajo hacia arriba. Cuando el ataque es intenso, se produce desecamiento de las hojas y la consiguiente caída de las mismas (Kiauer, 2009).

#### **2.1.7.1.2 Oídio**

Causado por *Erysiphe* sp.

##### **- Síntomas**

Principal enfermedad del orégano en la actualidad.

Su síntoma principal es la presencia de un polvillo blanco encima de las hojas, primero son puntos, luego manchas amplias para finalmente amarillear y secar las hojas.

Se presenta en oréganos con deficiente fertilización y riegos irregulares.

Les favorece los días húmedos y temperaturas suaves, difíciles que se presentan en épocas de mundo calor y secas. También favorecen la presencia de malezas portadoras del oídium cerca al orégano.

#### **2.1.7.1.3 Tizón foliar**

Causado por el hongo conocido como *Alternaria alternata*.

##### **- Síntomas**

Se manifiesta desde el ápice hasta la base de las hojas en forma de manchas foliares que se localizan principalmente en hojas superiores.

En ataques severos se produce la muerte de la planta. La predisponen la sucesión de días lluviosos, elevada humedad y temperatura (FDTA-Valles, 2007).

#### **2.1.7.1.4 Alternaria**

- **Nombre Científico.** *Alternaria solani*.

##### **- Síntomas**

En las hojas y en menor grado en los tallos, se forman manchas necróticas, marcadas internamente por series de anillos concéntricos. Las lesiones en las hojas rara vez son circulares porque son restringidas por las nervaduras principales. Usualmente aparecen alrededor de la floración y van aumentando en número a medida que van madurando las plantas. Las lesiones se forman primero en las hojas inferiores. Pueden causar un amarillamiento generalizado, caída de hojas o muerte precoz (Aguilar et al, 2013).

### 2.1.7.2 Enfermedades de Origen Viral.

Sobre cultivos de orégano ha sido detectado y aislado los virus causantes del mosaico de la alfalfa (AMV) y el del pepino (CMV). Estos virus son transmitidos por vectores como son los pulgones. Los síntomas observados sobre el orégano han sido manchas amarillas y blanquecinas sobre las hojas, una deformación y un marchitamiento de aquellas, retardando y después parando el crecimiento de la planta.

### 2.1.7.3 Enfermedades originadas por Insectos

#### 2.1.7.3.1 Ácaros

La succión de los contenidos celulares por parte de los ácaros provoca la desecación de las plantas induciendo un aspecto manchado en la cara superior de las hojas.

- **Nombre Común:** Arañita o araña roja.

- **Nombre Científico:** *Tetranychus cinnabarinus* y *T. urticae* (arañas de dos puntos). Esta plaga se presenta cuando hay sequía y las plantas están con hojas tiernas. El ataque se caracteriza por que la planta se recubre de una tela muy fina dentro de la cual se encuentran estos ácaros (arañas), limitando la capacidad fotosintética de la planta. A consecuencia de todo ello, las hojas retornan amarillentas y se caen, llegando hasta secar los tallos, provocando pérdidas fuertes si no se controla a tiempo. Los pulgones o afidos incrustan su pico chupador y absorben savia, deformando hojas y brotes. Como consecuencia, aparece un hongo de color negro (fumagina) sobre la maleza que excretan los pulgones (Los Tiempos, 201d1).

## **2.1.8 MULTIPLICACION**

El orégano se multiplica por semilla, por esqueje o por división de la planta. También se ha desarrollado para algunas especies aromáticas, entre ellas el orégano, la multiplicación por cultivos in vitro.

La multiplicación por semilla tiene con si la desventaja que, sucediendo la variabilidad genética, no se tiene la certeza que se tendrán plantas iguales a las plantas madre de orégano, en el caso que se quiera conseguir una determinada planta de orégano o no se ha ciertos de la calidad de la semilla que está utilizando, es hacer bien la multiplicación por esqueje o por división de la planta madre (INFOAGRO 2012).

### **2.1.8.1 Multiplicación por esqueje**

La multiplicación por esqueje del orégano se realiza al principio del verano (en junio). Los esquejes tienen que ser largos 8-10 cm de los botones basales sin flores y tienen que ser retiradas por planta en buena salud y vigorosas. Deben ser plantadas en una mezcla de turba y arena y fincas en invernadero fresco (acerca de 10°C), hasta cuando no hayan arraigado después de qué, en cuanto han arraigado podrán ser trasplantadas (INFOAGRO, 2012).

### **2.1.8.2 PROPAGACIÓN DE PLANTAS POR CULTIVO IN VITRO**

La expresión cultivo in vitro de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales la asepsia (ausencia de gérmenes, etc.), y el control de los factores que afectan el crecimiento. Reproducir en condiciones de laboratorio todos los factores que conforman el ambiente de la planta en la naturaleza es técnicamente muy complejo. Por esa razón se realiza una simplificación de la realidad escogiendo aquellos factores que se puedan mantener controlados (Aguirre G, et al. 2010).

Se utiliza el término explante para indicar la parte del órgano ó tejido vegetal que se cultiva in vitro.

A la dificultad de reproducir las condiciones naturales en condiciones de laboratorio, se debe añadir en este caso la dificultad de suministrar al explante todo aquello que antes obtenía del sistema completo. En resumen, el cultivo in vitro de plantas es una técnica que exige un control específico del ambiente, tanto físico como químico, en el que se sitúa al explante. Conviene, por tanto, conocer cuáles son los principales factores que conforman dicho y que deberán ser controlados (Aguirre G, et al. 2010).

#### **2.1.8.2.1 Multiplicación por segmentos nodales**

Las plantas cultivadas en este tipo de sistema de cultivo se caracterizaron por el mayor crecimiento de los segmentos nodales, coloración verde y hojas más desarrolladas. La utilización de este tipo de sistema de cultivo en la fase de multiplicación in vitro de los segmentos nodales posibilitará incrementar el empleo de la micro propagación para la producción de semilla (<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnología/article/view/9182>).

#### **2.1.8.2.2 Multiplicación por Meristemos**

Es posible generar individuos vegetales a partir de meristemos en un ambiente aséptico. Una vez obtenidos los meristemos se proceden a la siembra en un medio de cultivo, con el cual se busca el crecimiento y regeneración de estos mediante el aporte de nutrientes. La composición general de los medios de cultivo no varía mucho de especie a especie y sus elementos esenciales son macronutrientes (nitrógeno, fosforo, potasio, calcio, magnesio y azufre), micronutrientes (boro, cobalto, manganeso, hierro, zinc, molibdeno y cobre), compuestos orgánicos (vitaminas como tiamina, piridoxina y ácido nicotínico), fuente de carbono (generalmente sacarosa), reguladores de crecimiento y materiales de soporte. El más usado para micropropagación es el de

Murashige & Skoog (1962) cuya composición puede variar de acuerdo con los requerimientos de cada especie (Razdan, 2003).

### **2.1.8.2.3 Medios de cultivo**

Los medios de cultivo constituyen un elemento fundamental para el cultivo in vitro de células, de tejidos, protoplastos, anteras y para lograr el desarrollo de embriones, la organogénesis, la micro propagación, etc. Los medios de cultivo tienen una serie de componentes generales específicos cuya presencia y concentración estará en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización.

Así, los medios de cultivo pueden ser líquidos o tener un soporte sólido, tienen sustancias minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares, fitohormonas, etc.

Los medios de cultivo pueden ser sólidos o líquidos, los cuales están constituidos básicamente de:

- **Sales inorgánicas**

Los nutrientes inorgánicos o minerales usados en el cultivo in vitro son los mismos requeridos normalmente por las plantas. Entre estos tenemos los macro nutrientes (N, P, K, S, Ca, Mg) y los micro nutrientes (Fe, B, Mo, Co, Zn, Cu, I). •  
Compuestos orgánicos.

Constituidos por tres tipos de compuestos:

- Las vitaminas y aminoácidos.
- Los carbohidratos.
- Sustancias de crecimiento (fitohormonas).
- Agua.

El agua es el elemento donde se disuelve todos los componentes del medio de cultivo. Se debe prestar gran atención a la calidad de agua, ya que constituye el 95% del medio nutritivo, se debe utilizar agua destilada.

- **Sustancias gelificantes**

El agar –agar solidifica el medio y forma un complejo coloidal con débil poder de retención iónica.

El agar presenta algunos inconvenientes; el principal consiste en ofrecer una aireación insuficiente que puede afectar el crecimiento de algunos tejidos. Por otra parte, la composición del agar es variable, y a veces mal definida y podría aportar oligoelementos que actúan favorablemente sobre el crecimiento.

La concentración óptima de agar es variable con el origen comercial del agar utilizado y el objetivo del cultivo. Las concentraciones más utilizadas varían entre 6-10 g/l. (dispositivo de Héller), necesarias para los medios sólidos, para dar a las plántulas un soporte mecánico utilizándose generalmente el agar-agar que es derivado de un alga marina muy purificado, por lo que se constituye en un soporte inerte que da una consistencia de gel al medio (Martínez, 2003).

- **Carbón activado**

El carbón activado presenta cargas residuales que son capaces de absorber las sustancias fenólicas excretadas por el explante, normalmente el carbón activo es prelavado antes de ser incorporado al medio de cultivo y las concentraciones varían de 0,5 a 5%.

- **Compuestos Orgánicos**

Los compuestos orgánicos de los medios de cultivo son: azúcares, vitaminas, aminoácidos, productos orgánicos estimulantes y reguladores de crecimiento.

- **Aminoácidos**

El aporte de aminoácidos favorece la proliferación de callos, aunque cuando más se acude a los mismos es en las experiencias sobre la organogénesis y en la multiplicación vegetativa in vitro. Las mezclas de aminoácidos parecen también presentar efectos sinérgicos estimulando fuertemente la proliferación de callos y la organogénesis.

Los efectos obtenidos mediante el aporte de aminoácidos parecen muy variables según la especie y el tipo de morfogénesis estudiada. Hasta el momento no es posible obtener una regla general.

La mayor parte de las plantas sintetizan sus propios elementos orgánicos como las vitaminas y aminoácidos, etc. Para alcanzar un mejor crecimiento de las plantas in vitro esencial suplementar al medio una más vitaminas y aminoácidos como : Tiamina(vitamina B1), Piridoxina (vitamina B6), Acido Nicotínico(Vitamina B3), y Pantotenato de calcio(vitamina B5), además de Myo- Inositol ; son también conocidos como reguladores de desarrollo, algunos autores señalan la adición de numerosas sustancias orgánicas como : la caseína hidrolizada, leche de coco, extracto de malta, extracto de levadura entre otros, son empleados para el desarrollo de ciertos cultivos de callos y órganos.

- **Vitaminas**

Las vitaminas son usadas como catalizadores en varios procesos metabólicos y son añadidas al medio de cultivo para estimular procesos de crecimiento específicos en los

tejidos, y no se excluye que la falta de alguna de ellas pueda ser un factor limitante de los fenómenos de organogénesis.

Para Murashige las vitaminas esenciales para el crecimiento de células en plantas superiores son:

**Tiamina:** es considerada la vitamina imprescindible en el cultivo in vitro para un buen crecimiento del cultivo.

**Myo – Inositol:** estimula el crecimiento y división celular en muchas especies vegetales con fines de micropropagación. La concentración más utilizada es de 100 mg / l. (Aguirre et al 2010).

#### - **Azúcares**

Los tejidos y células cultivadas in vitro son ampliamente heterótrofos con respecto al carbono debido a la ausencia o insuficiencia de asimilación clorofílica. Luego resulta indispensable añadir azúcares a los medios de cultivo, siendo los dos más utilizados la sacarosa y la glucosa.

La concentración óptima de azúcar en los medios de cultivo varía entre 20-80g /l, en dependencia del tipo de cultivo, material vegetal, etc. Los azúcares presentan una acción metabólica y energética.

El carbohidrato más utilizado es la sacarosa, siendo la fuente de energía más usada en el cultivo in vitro, pero en ocasiones se emplean otros carbohidratos como la glucosa, fructuosa, galactosa y maltosa, pero estos compuestos son inferiores a la sacarosa, que puede ser sustituida por azúcar comercial, llegándose a obtener óptimos resultados. Las concentraciones óptimas son de 2 a 3 %, sin embargo, en ciertas especies se utilizan concentraciones muy elevadas de 5 a 12% (Aguirre et al 2010).

- **Reguladores de crecimiento y sus efectos**

- **Auxinas**

Se añaden frecuentemente a los medios de cultivo en concentraciones de 0.01 – 10 mg/l. Las auxinas generalmente promueven el crecimiento vegetal por alargamiento celular, induciendo a la formación del callo y estimula la iniciación radicular y el crecimiento de las raíces.

Las auxinas son compuestos que tienen un núcleo indólico, este sintetiza a partir del aminoácido triptófano que se sintetiza por la vía shikímica, la principal auxina es el ácido 3-indolacético (AIA), pero también se pueden emplear el ácido 3 – indolpropiónico (AIP), y el ácido 3 – indolbutírico (AIB), aunque son auxinas relativamente débiles (ácido fenilacético) o fuertes: ácido naftalenacético (ANA), el ácido 3 naftoxiacético (NOA), etc. El 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) es una auxina muy fuerte.

El ácido picolínico (picloran), aunque con una estructura química diferente, produce en ocasiones efectos oleráricos comparables a los del 2,4-D; se emplea a concentraciones muy bajas.

El AIA es la auxina natural más difundida en las plantas, es ampliamente utilizada en los medios de cultivo, pero es sensible a la degradación enzimática (AIA - oxidasa) y a la fotooxidación, a veces en asociación con el AIB.

El 2,4-D es una auxina muy fuerte, tóxica a concentraciones elevadas, que es un fuerte activador de la actividad meristémica; su empleo es amplio, muchas veces ligado a citoquininas, en trabajos de cultivos celulares, cultivos de tejidos, embriogénesis somática.

- **Citoquininas**

Son un grupo más reducido de hormonas que deben su nombre a su función (citoquinesis). En conjunto con las auxinas estimulan la división celular.

Derivan de adeninas y las más frecuentes son:

- **Naturales**

La zeatina N<sup>6</sup> 8N<sup>6</sup>-4 Hidroxi, 3 metil, 2 buteril), posee un doble enlace en el centro de la cadena y tiene isómeros cis y trans que parecen ser formas naturales.

- **Sintéticas**

La quinetina (KIN), N<sup>6</sup> Bencilaminopurina (BAP), N<sup>6</sup>benciladenina (BA) N<sup>6</sup> dimetil alil aminopurina (2ip). (Mejía, 1994).

- **Efectos medios naturales:**

La zeatina N<sup>6</sup> 8N<sup>6</sup>-4 Hidroxi, 3 metil, 2 buteril), posee un doble enlace en el centro de la cadena y tiene isómeros cis y trans que parecen ser formas naturales.

- **Crecimiento.**

En conjunto con las auxinas, las citoquininas estimulan la proliferación de células meristematicas, y también estimulan la expansión de los cotiledones tras el primer haz de luz que reciben. (George, 1993).

- **Dominancia lateral**

estimulan el crecimiento de yemas laterales inhibiendo la apical (contrario a las auxinas, por lo deben estar en equilibrio).

Diferenciación y morfogénesis: Provocan cambios en la morfología según el tipo de crecimiento, junto a las auxinas estimulan la formación de raíces y tallos.

- **Senescencia:** Son anti-senescentes (García et al, 2006).

### 2.1.8.2.3.1 Preparación de soluciones madre

Un número importante de sustancias y algunas veces una mezcla de las mismas son adicionadas al medio de cultivo. Las concentraciones de sustancias particulares pueden ser dadas en diferentes medidas(Pierik,1987).

Si cualquier solución precipita no poseerá el equilibrio químico correcto porque algunos elementos se quedan en el precipitado.

Ninguna solución precipitada puede ser usada de una manera efectiva por las plantas. Para evitar la formación de precipitado cuando se preparan solución es existen dos alternativas que pueden seguirse: 1) combinar solo componentes que no forman precipitado a altas concentraciones o, 2) preparar solo soluciones bastante débiles que no formen precipitado.

Por otro lado, se podrían pesar las cantidades necesarias de todos y cada uno de los componentes del medio. Ello, no obstante, sería una operación larga y tediosa, además de imprecisa puesto que obligaría a pesar algunas cantidades muy pequeñas. Por todas esas razones, es una práctica habitual en todos los laboratorios preparar soluciones stock concentrados de los distintos componentes, agrupados de forma que no se

produzcan fenómenos de precipitación. Proceder de esa forma simplifica la preparación del medio: un medio como el MS, que contiene un total de 20 sustancias diferentes, requeriría otras tantas pesadas, mientras que a partir de soluciones stock pueden mantenerse durante un cierto tiempo en la nevera o en el congelador.

Para una correcta preparación de las soluciones stock se debe:

- Pesar los componentes en una balanza de precisión.
- Asegurarse que el material que entrara en contacto con los componentes de las soluciones se encuentra perfectamente limpio. En caso de duda, lavarlo y hacer un último enjuague con agua destilada para retirar los restos de las sales minerales del agua corriente.
- Mezclar los componentes con la ayuda de un agitador magnético.
- Una vez obtenida una solución stock, etiquetar el recipiente que la contendrá indicando que tipo de solución es, su concentración, la fecha en que se preparó y la persona que la hizo.
- 

#### **2.1.8.2.4 Desinfección de explantes**

La principal dificultad en la etapa de establecimiento reside en poder obtener un tejido descontaminado sin conducirlo a la muerte después de aislado. Los pretratamientos aplicados a la planta madre son determinantes para el éxito de esta etapa del trabajo, principalmente en lo que se refiere a los microorganismos endógenos. Varias sustancias con acción germicida pueden ser utilizadas para la desinfección de explantes. Los más comunes y menos nocivos, son los compuestos en base a cloro como el hipoclorito de sodio o de calcio. Algunas gotas de detergente son comúnmente adicionadas estas soluciones para mejorar el contacto de éstas con los tejidos.

La desinfección de los explantes se realizará dentro la cámara de flujo laminar de acuerdo a los siguientes pasos:

- Inmersión de 30 segundos en alcohol 70 %.
- luego 10 minutos en Hipoclorito de Sodio al 2.5 % de solución comercial,
- y posteriormente 3 lavados en agua destilada estéril, cada uno de 3 minutos (Aguirre G.et al. 2010).

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

El presente trabajo de investigación se desarrolló en las instalaciones del laboratorio de fitopatología y cultivo in Vitro de la facultad de ciencias agrícolas y forestales de la Universidad Autónoma “Juan Misael Saracho” ubicada geográficamente entre los paralelos 21° y 15' de latitud sur y los meridianos 64°21' y 65°05' de longitud Oeste, con una altura promedio de 1850 m.s.n.m.

*Figura 1*



## **3.2 MATERIAL VEGETAL**

El material vegetal que se utilizó para el siguiente trabajo de investigación es de dos variedades del cultivo del Orégano (*Origanum vulgare* L.), la variedad Kaliteri y la variedad Maru, que se usaron en las diferentes etapas del cultivo *in vitro*.

### **3.2.1 Variedad Kaliteri:**

Altura de la planta: 50 a 60 cm.

Hojas: Simple.

Color: verde plumizo, más gruesa y pubescente que Maru.

Tallo: erecto, poca ramificación, pubescente.

Raíz: superficial ramificada.

### **3.2.2 Variedad Maru:**

Altura de la planta: 35 a 80 cm.

Hojas: Simple.

Color: verde oscuro con vellosidades.

Portada: alterna.

Tallo: erecto con poca ramificación.

Raíz: superficial, menos de 30 cm.

La procedencia de material vegetal que se empleo es de variedades que se están produciendo en nuestro medio, obtenidas del vivero de San Jacinto, ubicado en la comunidad del Portillo, provincia Cercado, departamento de Tarija.

### **3.3 EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS DE LABORATORIO**

#### **3.3.1 Área de Preparación**

##### **Equipo**

- Balanza de precisión.
- Potenciómetro.
- Microondas.
- Refrigerador.
- Agitador magnético.

##### **Materiales**

- Frascos o tubos de ensayos.
- Pipetas.
- Matraces.
- Vasos de precipitado.
- Probetas.
- Varillas.
- Gradillas.

##### **Material de escritorio**

- Computadora.
- Cámara fotográfica.
- Libreta de registro.

## Reactivos

- Nitrato de amonio.
- Nitrato de potasio.
- Cloruro de calcio dihidratado.
- Sulfato de magnesio hepta hidratado.
- Ortofosfato diacido de potasio.
- Sulfato de manganeso tetrahidratado.
- Sulfato de zinc heptahidratado.
- Ácido bórico.
- Ioduro de potasio.
- Molibdato de sodio dihidratado.
- Sulfato de cobre pentahidratado.
- Cloruro de cobalto hexahidratado.
- EDTA de sodio.
- Sulfato de hierro.
- Ácido nicotínico.
- Piridoxina.
- Glicina.
- Myo-inositol.
- Hipoclorito de sodio.
- Alcohol.

## Material de escritorio

- Computadora.
- Cámara fotográfica.
- Libreta de registro.

## **Fitorreguladores**

- BAP (Bencil aminopurina).
- AG3 (Ácido Giberelico).
- ANA (Ácido Naftalenacetico).

### **3.3.2 Área de esterilización**

#### **Equipo**

- Autoclave.
- Estufa de esterilización para el material In Vitro.

#### **Área de siembra**

#### **Equipo**

- Camara de flujo laminar.

#### **Materiales**

- Mechero.
- Pinzas.
- Agujas.
- Bisturís.
- Tijeras.
- Reglas.
- Cajas Petri.

### 3.3.3 Área de Crecimiento

- Luz fluorescente.
- Termómetros de máxima y mínima.
- Temporizador (regula fotoperiodo de 16 horas luz).

## 3.4 METODOLOGÍA

Se trabajó con el método de cultivo *in vitro*, abarcando la fase de Establecimiento In Vitro por Segmentos Nodales y por meristemas de las vitroplantas, en la primera etapa de establecimiento se usaron como explantes segmentos nodales y en la siguiente etapa se extrajeron meristemas de las vitroplantas.

El diseño que se tomó en cuenta para siguiente trabajo investigación fue un diseño completamente al azar con un arreglo bi-factorial de 2x3 con tres repeticiones.

### **Etapa 1, Establecimiento In Vitro de Segmentos Nodales**

#### **Preparación de Medios de Cultivo**

La secuencia seguida de manera general para el cultivo *in vitro*, comenzó con la preparación de las Soluciones madres o stock, agrupándose los macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y quelatos. En base a estas soluciones madre se procedió a la preparación de los medios de cultivo, regulando el pH a 5.7, posteriormente se esterilizo el material de laboratorio el cual se utilizó para la introducción estos materiales fueron envueltos con papel periódico y esterilizados por 3 horas en un horno a 120°C.

Figura 2



### Aplicación de fitorreguladores

Al medio base de Murashigue & Skoog, se le adiciono en la fase establecimiento BAP (Bencil amino purina), en concentr aciones de 0.1, 0.25, 0.5, mg/l, y 0.200 mg/l ANA (Ácido Naftalenacetico).

Cuadro N° 1

#### Composición del medio base de Murashigue y Skoog (1962)

<b>Macroelementos MS</b>	<b>mg/l</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650.00
KNO <sub>3</sub>	1,900.00
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440.00
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00
<b>Microelementos MS</b>	<b>mg/l</b>

MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16.90
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.60
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20
KI	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025
<b>Fe EDTA MS</b>	<b>mg/l</b>
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.80
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	37.30
<b>Compuestos orgánicos MS</b>	<b>mg/l</b>
Ácido nicotínico	0.50
Piridoxine HCl	0.50
Thiamine HCl	0.10
Glycina	2.00
Myo-inositol	100.00
<b>Agente gelificante</b>	<b>g/l</b>
Agar	6.50
<b>Sacarosa</b>	3 %
<b>pH del medio</b>	5.7

### Tratamientos

**T1** = V1M1 (Variedad Maru + medio sin hormonas).

**T2** = V1M2 (Variedad Maru + medio con 0,1 mg de BAP).

**T3** = V1M3 (Variedad Maru + medio con 0,25 mg de BAP).

**T4** = V1M4 (Variedad Maru + medio con 0,5 mg de BAP).

**T5** = V1M2 (Variedad Maru + medio con 0,2 mg de GA<sub>3</sub> + 0,2 mg de ANA).

**T6** = V2M1 (Variedad Kaliteri + medio sin hormonas).

**T7** = V2M2 (Variedad Kaliteri + medio con 0,1 mg de BAP).

**T8** = V2M3 (Variedad Kaliteri + medio con 0,25 mg de BAP).

**T9** = V2M4 (Variedad Kaliteri + medio con 0,5 mg de BAP).

**T10** = V2M2 (Variedad Kaliteri + medio con 0,2 mg de GA<sub>3</sub> + 0,2 mg de ANA).

### 3.4.1 Procedimiento a desarrollar

- **Preparación**

Las plantas madres se recolectaron de la institución, proyecto múltiple SAN JACINTO, la cual se identificará la planta madre para la preparación.

*Figura 3*



**SELECCIÓN VARIEDAD KALITERI**

*Figura 4*



**SELECCIÓN VARIEDAD MARU**

- **Esterilización de material de laboratorio**

Se esterilizo el material de laboratorio el cual se utilizo para la introducción estos materiales fueron envueltos con papel periódico y esterilizados por 3 horas en un horno a 120°C.

*Figura 5*



- **Preparación de medios de cultivo**

La secuencia seguida de manera general para el cultivo in vitro, comenzo con la preparación de las Soluciones madres o stock, agrupándose los macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y quelatos. En base a estas soluciones madre se procedió a la preparación de los medios de cultivo, regulando el pH a 5.7.

*Figura 6*



Cuadro N° 2

Composición de medios de cultivo faces de inicio *in vitro*

DETALLE	M1	M2	M3	M4	M5
<b>Murashige &amp; Skoog</b>	100%	100%	100%	100%	100%
<b>Mioinositol</b>	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg
<b>Bencil Amino Purina</b>		0,1 mg/l	0,25mg/l	0,5 mg/l	
<b>Ácido Naftalen Acético</b>					0,200ml
<b>Giberelinas</b>					0,200ml
<b>Sacarosa</b>	30%	30%	30%	30%	30%
<b>Ph</b>	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7
<b>Agar</b>	6,5%	6,5%	6,5%	6,5%	6,5%

- **Extracción y desinfección de explantes**

Se procedió a la extracción de los explantes del material seleccionado y se inició con los ensayos de los métodos de desinfección, de los explantes antes de realizada la siembra con hipoclorito de sodio, alcohol, detergente.

- **Siembra de los explantes**

Una vez desinfectados los explantes se recortaron a 1 cm. de longitud tratando de eliminar el tejido quemado en la desinfección, luego se siembran los explantes (esquejes) en tubos de ensayo.

Inmediatamente después los tubos conteniendo los explantes fueron colocados en la sala de crecimiento, donde se reguló las condiciones ambientales, un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura de 18 a 23 ° C.

Los datos obtenidos del trabajo de investigación se plasmarán en la conclusión de la investigación.

*Figura 7*



*Figura 8*



### **3.4.2 VARIABLES A EVALUAR**

- Porcentaje de regeneración.
- Tamaño de brote.
- Numero de yemas por brote.

#### **3.4.2.1 Variables respuestas**

Las variables de respuesta determinadas para el presente trabajo de investigación fueron:

##### **3.4.2.1.1 Porcentaje de regeneración in vitro%**

En esta variable se toma en cuenta todos los esquejes que se vuelven a regenerar y produce nuevos brotes y se mide en %.

#### **3.4.2.1.2 Largo de los brotes de la planta mm**

El control de largo de brotes es fundamental en para el proceso de multiplicación de vitroplantas ya que es una variable indispensable para observar el desarrollo y vigor de la planta.

#### **3.4.2.1.3 Número de yemas por planta**

El número de yemas es una variable muy importante para el proceso de multiplicación ya que las mismas son regeneradas y serán el número para las vitroplantas.

**Cuadro N°3**  
**Distribución de los tratamientos en el laboratorio**

V1T1	V1T1	V1T1
V1T2	V1T2	V1T2
V1T3	V1T3	V1T3
V1T4	V1T4	V1T4
V1T5	V1T5	V1T5
V2T1	V2T1	V2T1
V2T2	V2T2	V2T2
V2T3	V2T3	V2T3
V2T4	V2T4	V2T4
V2T5	V2T5	V2T5

## Etapa II, Multiplicación a partir de meristemas

Se utilizaron las mismas variedades, pero las concentraciones no fueron las mismas, sin embargo, todo fue realizado bajo la misma secuencia de pasos realizados en la primera fase, y los principios de cada elemento de los medios de cultivo fueron los mismos de igual manera que en la primera fase.

*Figura 9*



*Figura 10*



### - Variedades

- V1. Maru.
- V2. Kaliteri.

### - Concentraciones

- C1. MS + BAP (0,1mg/L).
- C2. MS + BAP (0,3mg/L).
- C3. MS + KIN (0,1mg/L).
- C4. MS + KIN (0,3mg/L)
-

**Tratamientos.**

**T1** = V1M1 (Variedad Maru + MS - BAP (0,1mg/L).

**T2** = V1M2 (Variedad Maru + MS - BAP (0,3mg/L).

**T3** = V1M3 (Variedad Maru + MS - KIN (0,1mg/L).

**T4** = V1M4 (Variedad Maru + KIN - (0,3mg/L).

**T5** = V1M2 (Variedad Kaliteri + MS - BAP (0,1mg/L).

**T6** = V2M1 (Variedad Kaliteri + MS - BAP (0,3mg/L).

**T7** = V2M2 (Variedad Kaliteri + MS - KIN (0,1mg/L).

**T8** = V2M3 (Variedad Kaliteri + MS - KIN - (0,3mg/L).

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Todo el proceso de trabajo se dividió en dos fases: fase de establecimiento utilizando segmentos nodales extraídos de una planta madre y la fase de multiplicación a partir de meristemas extraídos de las vitroplantas obtenidos en la fase anterior.

#### **4.1 ETAPA I (ESTABLECIMIENTO IN VITRO POR SEGMENTOS NODALES)**

En esta fase se tomaron en cuenta las variables de: regeneración y largo de brote y número de yemas tomando en cuenta que el número de yemas sería determinante para la fase posterior (multiplicación por segmentos nodales).

*Figura 11*



#### **4.1.1 REGENERACIÓN**

##### **4.1.1.1 Regeneración de plantas In Vitro a los 7 días de la introducción (%)**

Estos datos representan el registro general de la variable porcentaje de regeneración in vitro para el ensayo, a partir del cual se resume.

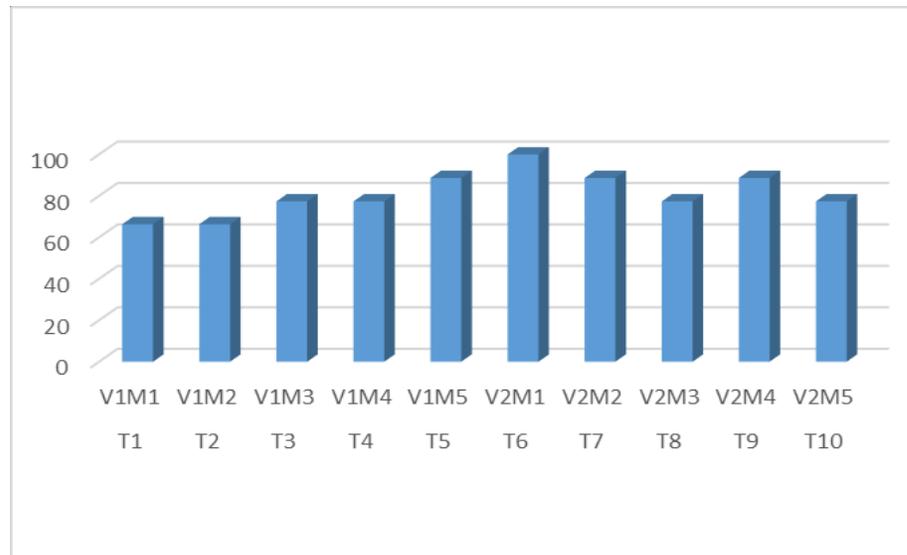
**Cuadro N° 4**  
**Porcentaje (%) de regeneración a los 7 días.**

		REGENERACION				7 DIAS
Tratamientos/Repeticiones		I	II	III	□	X
<b>T1</b>	V1M1	33	66	100	199	66
<b>T2</b>	V1M2	66	100	33	199	66
<b>T3</b>	V1M3	66	100	66	232	77
<b>T4</b>	V1M4	66	66	100	232	77
<b>T5</b>	V1M5	66	100	100	266	89
<b>T6</b>	V2M1	100	100	100	300	100
<b>T7</b>	V2M2	100	100	66	266	89
<b>T8</b>	V2M3	100	66	66	232	77
<b>T9</b>	V2M4	100	66	100	266	89
<b>T10</b>	V2M5	66	100	66	232	77
	□	763	864	797	2424	

En el cuadro se plasma los datos obtenidos en laboratorio de los diferentes tratamientos y réplicas que corresponde al porcentaje de regeneración de los 7 días después de la introducción, para lo cual obtuvo los datos de los 10 tratamientos.

Donde podemos observar que el mejor porcentaje de regeneración se obtuvo con el tratamiento T6, de la variedad 2 con el medio sin hormonas, obteniendo un 100% de regeneración. Posteriormente se encuentran los tratamientos T5, T7 y T9 con un porcentaje de 89 %, finalmente los tratamientos T1 y T2 con el porcentaje más bajo de regeneración de un 66%.

**Grafica N° 1**  
**Porcentaje (%) de regeneración a los 7 días.**



En la Grafica 1, podemos observar que la variedad Kaliteri tuvo un comportamiento muy positivo con el tratamiento T6 con una regeneración del 100%.

Como se pudo observar se muestra que los mejores resultados se obtuvieron sin la aplicación de ninguna fitohormona. Al respecto, (Villalobos y Garcia,1982) citado por (Jimenez, 1999) indican que el tamaño del explante es un factor que influye en la desinfección y regeneración de plantas, a medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación pero más rápido el crecimiento y la regeneración de plantas.

Cuadro N° 5

Análisis de varianza de porcentaje (%) regeneración a los 7 días.

FUENTES DE VAR	SC	GL	CM	FC	Ft5%	Ft1%
<b>TOTAL</b>	12946.80	29				
<b>REPETICIONES</b>	528.20	2	264.1	0.5	3.56	4.84
<b>TRAT</b>	3062.80	9	340.3	0.7	2.46	5.55
<b>ERROR</b>	9355.80	18	519.8	1.0		
<b>VARIEDADES</b>	940.8	1	940.8	1.8	4.41	8.29
<b>MEDIOS</b>	229.13	4	57.3	0.1	2.93	4.58
<b>V/M</b>	1892.87	4	473.2	0.9	2.93	4.58

Al realizar el análisis de varianza de regeneración a los 7 días se ha observado que no existe diferencia significativa entre tratamiento tanto al 5% como 1%.

No se presentan diferencias significativas en los factores variedad, medios y en la interacción de los factores variedad y medio.

#### 4.1.1.2 Porcentaje (%) de regeneración a los 14 días

La regeneración en materiales vegetales es algo complicada cuando no se tiene el método adecuado; sin embargo, se puede lograr altos niveles de regeneración cuando ya se obtiene el medio ideal. A diferencia de la regeneración a los 7 días se pudo evidenciar que no hubo muchos cambios en el porcentaje de regeneración.

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado estéril. En un periodo de una semana hasta 15 días se puede observar el proceso de regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo del cultivo in vitro (Castillo A. 2010). Los valores promedios de las evaluaciones efectuadas a los distintos tratamientos

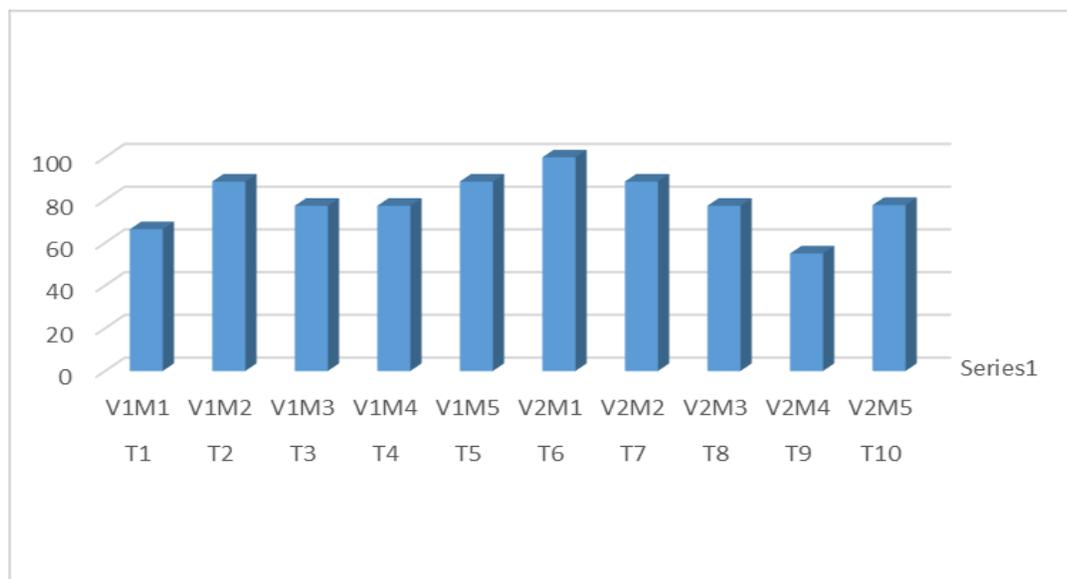
**Cuadro N° 6**  
**Porcentajes (%) de regeneración a los 14 días**

		<b>REGENERACION</b>				<b>14</b>
						<b>DIAS</b>
<b>Tratamientos/Repeticiones</b>		<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>□</b>	<b>X</b>
<b>T1</b>	V1M1	33	66	100	199	66
<b>T2</b>	V1M2	66	100	100	266	89
<b>T3</b>	V1M3	66	100	66	232	77
<b>T4</b>	V1M4	66	66	100	232	77
<b>T5</b>	V1M5	100	100	66	266	89
<b>T6</b>	V2M1	100	100	100	300	100
<b>T7</b>	V2M2	100	100	66	266	89
<b>T8</b>	V2M3	100	66	66	232	77
<b>T9</b>	V2M4	66	33	66	165	55
<b>T10</b>	V2M5	33	100	100	233	78
	□	730	831	830	2391	

En el cuadro 6 podemos observar los datos obtenidos en laboratorio de los diferentes tratamientos y replicas que corresponde al porcentaje de regeneración de los 14 días después de la introducción, para lo cual obtuvo los datos de los 10 tratamientos.

Donde el porcentaje de regeneración más alto de mantiene con el tratamiento T6, de la variedad 2 con el medio sin hormonas, obteniendo un 100% de regeneración. Posteriormente se encuentran los tratamientos T2, T5 y T7 con un porcentaje de 89 %, restando porcentaje de regeneración del T9 a un 55%, finalmente los tratamientos T1 mantiene su porcentaje de regeneración de un 66%.

**Gráfica N° 2**  
**Porcentaje (%) de regeneración a los 14 días**



En la Grafica 2, podemos observar que el tratamiento T2 (M2) aumento a un 89% el porcentaje de regeneración con la variedad Maru. A diferencia de la variedad kaliteri se mantuvo el tratamiento T6, con el porcentaje mayor de regeneración.

**Cuadro N° 7 Análisis de varianza de porcentaje (%) regeneración a los 14 días.**

<b>FUENTES DE VAR</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>FC</b>	<b>Ft5%</b>	<b>Ft1%</b>
<b>TOTAL</b>	14976.30	29				
<b>REPETICIONES</b>	673.40	2	336.7	0.6	3.56	6.01
<b>TRAT</b>	4388.97	9	487.7	0.9	2.46	3.60
<b>ERROR</b>	9913.93	18	550.8	1.0		
<b>VARIEDADES</b>	0.03333333	1	0.0	0.0	4.41	8.29
<b>MEDIOS</b>	1759.13333	4	439.8	0.8	2.93	4.58
<b>V/M</b>	2629.80	4	657.4	1.2	2.93	4.58

De acuerdo al análisis de varianza del porcentaje de regeneración a los 14 días se puede establecer un análisis los resultados mediante el análisis de varianza se determinó que no existe diferencias significativas (5% y 1%) en cuanto en el factor tratamientos, factores e interacción, por lo que podemos mencionar que todos los tratamientos son indistintos el uno del otro.

#### 4.1.2 LARGO DE BROTES

##### 4.1.2.3 Crecimiento de largo de brote (mm) a los 14 días.

Los valores promedios de las evaluaciones efectuadas a los distintos tratamientos El largo de brotes en el cultivo *in vitro* es importante para la multiplicación.

La altura de la planta llega a ser uniforme en los medios que contengan AIA, AIB y ANA con alturas promedio de 19, 18 y 21mm respectivamente, nos indica claramente que los ápices sembrados a los 14 días antes permanecieron vivos, pero con un poco de crecimiento organizado, pero con un poco de crecimiento organizado (Barba, 1987).

**Cuadro N°8**

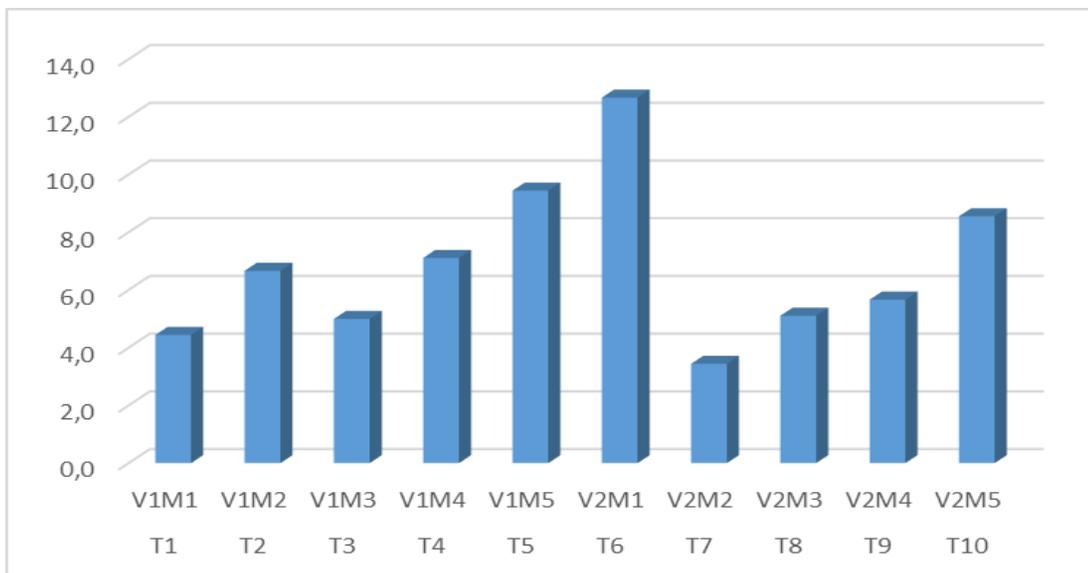
#### Crecimiento de largo de brote (mm) a los 14 días

LARGO DE LOS BROTES		14 DIAS				
Tratamientos/Repeticiones		I	II	III	S	X
<b>T1</b>	V1M1	4.3	1.3	7.7	13.3	4.4
<b>T2</b>	V1M2	3.0	7.0	10.0	20.0	6.7
<b>T3</b>	V1M3	4.3	6.3	4.3	15.0	5.0
<b>T4</b>	V1M4	5.0	6.3	10.0	21.3	7.1
<b>T5</b>	V1M5	11.7	9.0	7.7	28.3	9.4
<b>T6</b>	V2M1	16.3	15.7	6.0	38.0	12.7
<b>T7</b>	V2M2	6.3	0.7	3.3	10.3	3.4
<b>T8</b>	V2M3	7.7	3.0	4.7	15.3	5.1
<b>T9</b>	V2M4	7.3	6.0	3.7	17.0	5.7
<b>T10</b>	V2M5	2.7	6.7	16.3	25.7	8.6
	S	68.7	62.0	73.7	204.3	

En el cuadro 8 podemos observar los datos obtenidos en laboratorio de los diferentes tratamientos y replicas que corresponde al crecimiento o largo de brote a los 14 días después de la introducción.

Donde el crecimiento de brote más largo se presenta con el tratamiento T6, de la variedad 2 que es Kaliteri con un tamaño de 12,7mm. Posteriormente se encuentran el tratamiento T5 de la variedad Maru con un largo de brote de 9,4mm. Entre los tratamientos T3, T8 y T9 llegan a tener un crecimiento similar de 5,7mm.

**Gráfica N° 3**  
**Crecimiento de largo de brote (mm) a los 14 días.**



En la Grafica 3, podemos observar que el tratamiento T5 de la variedad Maru fue el mejor medio que se comportó en el crecimiento de brote de 9,5mm, pero el brote más largo se identificó en el T6 de la variedad Kaliteri V2 con el medio M1 llega a tener un crecimiento de 12,7 mm.

El rápido desarrollo podría deberse a una elevada concentración de citoquininas en el tejido, pues estos reguladores de crecimiento están altamente relacionados con el proceso de brotación y crecimiento de los brotes (Conger, 1986).

**Cuadro N° 9**

**Análisis de varianza del crecimiento de largo de brote (mm) a los 14 días.**

<b>FUENTES DE VAR</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>FC</b>	<b>Ft5%</b>	<b>Ft1%</b>
<b>TOTAL</b>	475.26	29				
<b>REPETICIONES</b>	6.85	2	3.4	0.2	3.56	6.01
<b>TRAT</b>	206.37	9	22.9	1.6	2.46	3.60
<b>ERROR</b>	262.04	18	14.6	1.0		
<b>VARIEDADES</b>	2.31	1	2.3	0.2	4.41	8.29
<b>MEDIOS</b>	85.06	4	21.3	1.5	2.93	4.58
<b>V/M</b>	119.00	4	29.8	2.0	2.93	4.58

Realizando el análisis de varianza del crecimiento de brotes a los 14 días se puede observar que no hay una diferencia significativa al 5% y 1% tanto en tratamientos, réplicas.

No se presentan diferencias significativas en los factores variedad, medios y en la interacción de los factores variedad y medio.

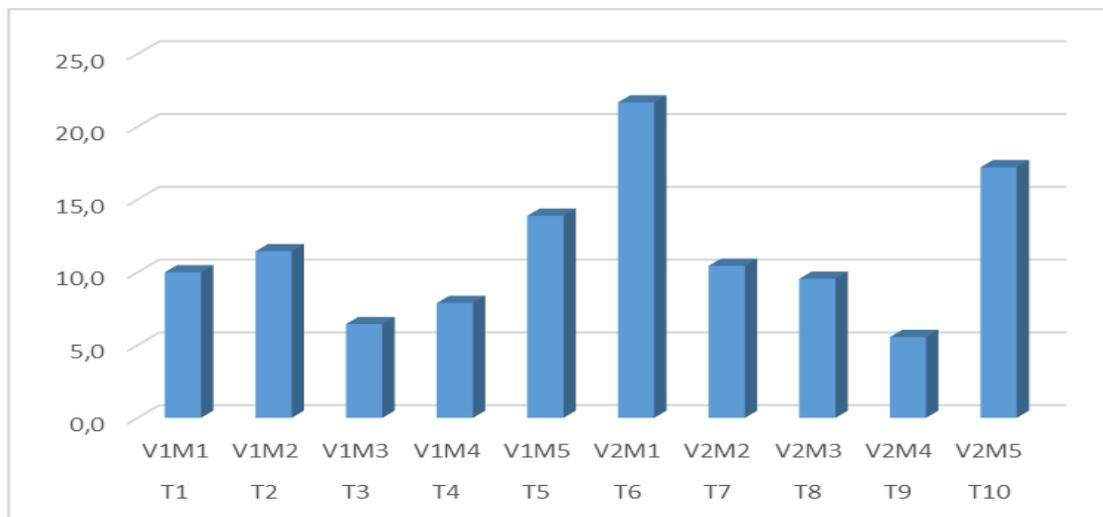
**Cuadro N° 10**  
**Crecimiento de largo de brote (mm) a los 21 días.**

Tratamientos/Repeticiones		LARGO DE LOS BROTES					21 DIAS
		I	II	III	S	X	
<b>T1</b>	V1M1	9.0	1.7	19.3	30.0	10.0	
<b>T2</b>	V1M2	12.7	6.7	15.0	34.3	11.4	
<b>T3</b>	V1M3	5.0	7.7	6.7	19.3	6.4	
<b>T4</b>	V1M4	10.0	7.7	6.0	23.7	7.9	
<b>T5</b>	V1M5	10.0	16.7	15.0	41.7	13.9	
<b>T6</b>	V2M1	20.0	8.3	36.7	65.0	21.7	
<b>T7</b>	V2M2	15.3	11.7	4.3	31.3	10.4	
<b>T8</b>	V2M3	16.0	4.3	8.3	28.7	9.6	
<b>T9</b>	V2M4	11.7	1.7	3.3	16.7	5.6	
<b>T10</b>	V2M5	13.3	26.7	11.7	51.7	17.2	
	S	123.0	93.0	126.3	342. 3		

En el Cuadro 10 Se puede denotar que hubo cambios y crecimiento de brotes a diferencia de los 14 días los tratamientos que aumentaron su tamaño fueron T1, T2 de la variedad Maru aumento el crecimiento a los 21 días manteniéndose el T5 como el mayor de tamaño de largo de brotes con un 13,9 mm.

En la variedad Kaliteri los tratamientos que aumentaron en crecimiento de brote fueron T7 y T10 y manteniéndose como el mejor fue T6 con un tamaño de brote con un 21,7mm.

**Gráfica N° 4**  
**Crecimiento de largo de brote (mm) a los 21 días.**



En la siguiente Gráfica 4 Se pudo determinar que el mejor tratamiento T5 con el medio M5 en la variedad Maru presenta 13,9 mm de crecimiento que contiene 0,200ml de ANA y 0,200 de GA<sub>3</sub> a diferencia del de largo de brotes de los 7 días hubo un aumento de crecimiento.

En la variedad, Kaliteri el tratamiento mejor comportado repite el T6 y medio M1 que no contiene fitohormonas llegando a tener un tamaño de 21mm mientras que el tratamiento T7 y T10 aumento su tamaño de brote.

**Cuadro N°11****Análisis de varianza del crecimiento de largo de brote (mm) a los 21 días.**

<b>FUENTES DE VAR</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>FC</b>	<b>Ft5%</b>	<b>Ft1%</b>
<b>TOTAL</b>	1629.93	29				
<b>REPETICIONES</b>	67.41	2	33.7	0.7	3.56	6.01
<b>TRAT</b>	668.45	9	74.3	1.5	2.46	3.60
<b>ERROR</b>	894.07	18	49.7	1.0		
<b>VARIEDADES</b>	65.51	1	65.5	1.3	4.41	8.29
<b>MEDIOS</b>	423.43	4	105.9	2.1	2.93	4.58
<b>V/M</b>	179.50	4	44.9	0.9	2.93	4.58

Al analizar los resultados mediante el análisis de varianza se determinó que no existe diferencia significativa (5% y 1%) en cuanto los factores tratamientos e interacciones variedad /medio no hay diferencias.

#### **4.1.3 NÚMERO DE YEMAS**

##### **4.1.3.1 Número de yemas por brote a los 21 días**

Los valores promedios de las evaluaciones efectuadas a los distintos tratamientos (ver el cuadro N°14).

Una alta concentración de auxinas causa la formación de brotes o yemas por lo que provocamos cambios que da inicio de meristemas, tanto radiculares como apicales, (Hurtado y Merino, 1987).

Por lo tanto, la fitohormona como la auxina nos ayuda a la inducción y formación de brotes que nos sirve para la multiplicación de vitroplantas y también representa la parte foliar de la misma.

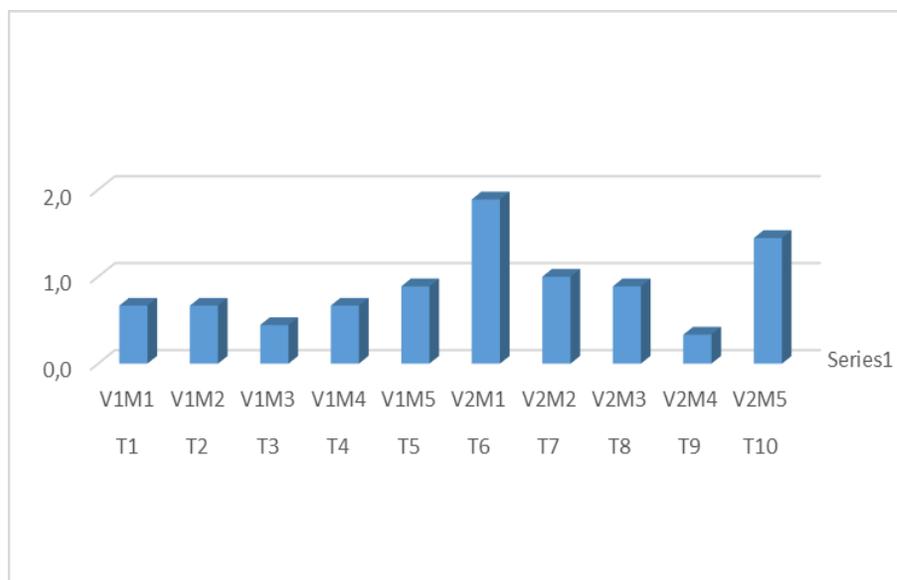
**Cuadro N°12**  
**Número de yemas por vitroplanta**

<b>NÚMERO DE YEMAS</b>		<b>21 DÍAS</b>				
<b>Tratamientos/Repeticiones</b>		<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>S</b>	<b>X</b>
<b>T1</b>	V1M1	0.7	0.0	1.3	2.0	0.7
<b>T2</b>	V1M2	1.3	0.3	0.3	2.0	0.7
<b>T3</b>	V1M3	0.0	0.7	0.7	1.3	0.4
<b>T4</b>	V1M4	1.0	1.0	0.0	2.0	0.7
<b>T5</b>	V1M5	0.0	1.0	1.7	2.7	0.9
<b>T6</b>	V2M1	2.3	0.7	2.7	5.7	1.9
<b>T7</b>	V2M2	1.7	1.0	0.3	3.0	1.0
<b>T8</b>	V2M3	1.7	0.0	1.0	2.7	0.9
<b>T9</b>	V2M4	1.0	0.0	0.0	1.0	0.3
<b>T10</b>	V2M5	0.7	3.0	0.7	4.3	1.4
	<b>S</b>	10.3	7.7	8.7	26.7	

En el siguiente cuadro N°12 se presentan las medias del número de yemas de los diferentes los tratamientos y sus réplicas a partir de los 21 días.

Se observa en el T6 presenta una media más alta de 1,9 yemas, seguido del tratamiento T10 con una media de 1,4, posteriormente se encuentra el tratamiento T7 con una media de 1. Los tratamientos que obtuvieron el menor número de yemas son el T3 y el T9 con 0,4 y 0,3 yemas respectivamente.

**Gráfico N°5**  
**Número de yemas por vitroplanta a los 21 días.**



En la gráfica 5, se puede observar el mayor número de yemas de los tratamientos T6 y el tratamiento T10, con 1,9 y 1,4 yemas respectivamente.

**Cuadro N°13**  
**Análisis de varianza del número de yemas**

FUENTES DE VAR	SC	GL	CM	FC	Ft5%	Ft1%
<b>TOTAL</b>	18.74	29				
<b>REPETICIONES</b>	0.36	2	0.2	0.3	3.56	6.01
<b>TRAT</b>	5.93	9	0.7	1.0	2.46	3.60
<b>ERROR</b>	12.45	18	0.7	1.0		
<b>VARIETADES</b>	1.48	1	1.5	2.1	4.41	8.29
<b>MEDIOS</b>	2.59	4	0.6	0.9	2.93	4.58
<b>V/M</b>	1.85	4	0.5	0.7	2.93	4.58

Al realizar el análisis de varianza para el número de yemas se puede observar que no hay diferencia significativa tanto al 5% y al 1%. En los tratamientos, factor variedad, factores medios y la interacción entre los factores.

Con respecto al número de yemas cabe mencionar se debe estudiar durante los 14 días de forma continua después de la introducción, pero al igual que en el experimento de número de brotes se denota mayor formación en los periodos prolongados del cultivo (Pérez, A 1992).

#### **4.2 ETAPA II (EXTRACCIÓN E INTRODUCCIÓN DE MERISTEMAS DE LAS VITROPLANTAS)**

*Figura 12*



## 4.2.1 REGENERACIÓN

### 4.2.1.1 Porcentaje de regeneración a los 7 días

**Cuadro N°14**  
**Datos de regeneración a los 7 días**

TRATAMIENTOS	RÉPLICAS			SUMA	MEDIA
	R1	R2	R3		
<b>T1(V1C1)</b>	0.00	25.00	50.00	75.00	25.00
<b>T2(V1C2)</b>	25.00	25.00	25.00	75.00	25.00
<b>T3(V1C3)</b>	75.00	100.00	75.00	250.00	83.33
<b>T4(V1C4)</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>T5(V2C1)</b>	33.33	66.66	0.00	99.99	33.33
<b>T6(V2C2)</b>	33.33	33.33	0.00	66.66	22.22
<b>T7(V2C3)</b>	0.00	33.33	66.66	99.99	33.33
<b>T8(V2C4)</b>	66.66	33.33	100.00	199.99	66.66
<b>SUMA</b>	233.32	316.65	316.66	866.63	<b>288.88</b>
<b>MEDIA</b>	29.17	39.58	39.58		

Tal como podemos apreciar en la tabla de regeneración a los 7 días, tenemos datos demasiado dispersos que van desde los 0 % hasta los 100 % de regeneración, sin embargo, se puede observar que en los tratamientos T3(V1C3) y T8(V2C4) obtuvimos un 100% en las réplicas 2 y 3 respectivamente. Por otro lado, podemos observar que el tratamiento T4(V1C4) presentó un 0 % de regeneración en todas sus réplicas, asimismo se puede mencionar que la variedad 2 mostró menos variaciones en los porcentajes de regeneración.

La regeneración por meristemas depende también en gran manera de la parte de donde fue extraído el material vegetal, de esta manera según Hernández afirma que los

meristemas que tienen la mayor capacidad de regenerarse son aquellos meristemas apicales que se encuentran más cercanos al tallo. Se ha descrito que el segmento que puede restaurarse con relativa facilidad, debido a la regenerabilidad y plasticidad es la que se encuentra en la región del ápice meristemático muy cercano al tallo (Hernández, 2008).

**Cuadro N° 15**  
**tabla de doble entrada (Variedad/Concentración)**

<b>TABLA DE DOBLE ENTRADA (VARIEDAD/CONCENTRACIÓN)</b>						
	C1	C2	C3	C4	SUMA	MEDIA
<b>V1</b>	75.00	75.00	250.00	0.00	400.00	100.00
<b>V2</b>	100.00	66.66	100.00	199.99	466.63	116.66
<b>SUMA</b>	174.99	141.66	349.99	199.99	866.63	216.66
<b>MEDIA</b>	87.50	70.83	175.00	100.00		

Como se presenta en la tabla de doble entrada a los 7 días, podemos apreciar que los promedios difieren de 16 % siendo el promedio mayor el de la variedad 2 (Kaliteri) con un 116 % y el de menor valor el de la variedad 1 (Maru), y con relación a las concentraciones aplicadas los promedios son cercanos entre la concentración 1 y la concentración 2 siendo a su vez los dos valores menores, a diferencia de las concentraciones 3 y 4 que tienen valores más elevados y diferentes entre sí.

**Cuadro N° 16**  
**Análisis de varianza**

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	F	F tabulada	
				CALCULADA	5%	1%
TRATAMIENTOS	7	14.768,20	2.109,74	3,48	2,76	4,28
RÉPLICAS	2	578,73	289,36	0,48	3,74	6,51
ERROR	14	8.494,53	606,75			
VARIEDAD	1	184,98	184,98	0,30	4,60	8,86
CONCENTRACIÓN	3	4.236,03	1.412,01	2,33	3,34	5,56
INTERACCIÓN (V/C)	1	10.347,19	10.347,19	17,05	4,60	8,86
TOTAL	23	23.841,46				
C.V=	68,22					

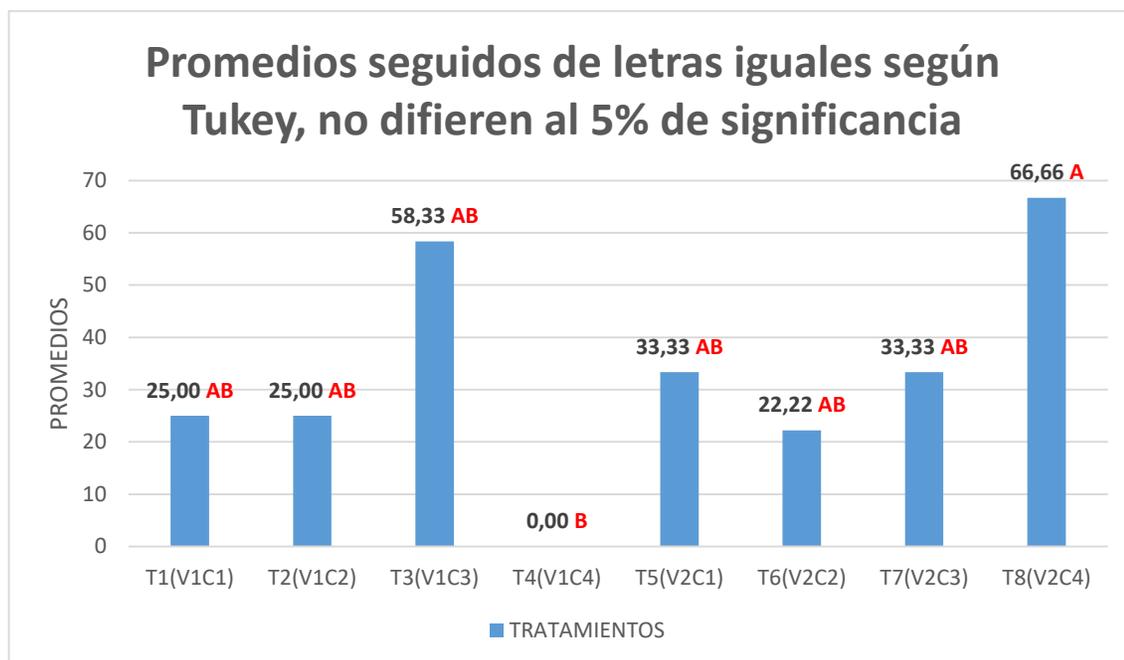
Según el análisis de varianza realizado con los datos de regeneración a los 7 días, podemos ver que, si existen diferencias significativas en los tratamientos al 5% de probabilidad de error, sin embargo, no tenemos diferencias significativas al 1%. Así también observamos el factor variedad y la interacción donde no encontramos diferencias significativas al 1 ni al 5% de probabilidad de error. Debido a lo observado en la tabla solo se realizó la prueba de comparación de medias solo para el factor tratamiento (Concentración).

Las diferencias existen porque los datos son un tanto variados y para que exista una dispersión de datos elevada debe existir factores que determinen este caso tales como la ubicación del material vegetal. Las diferencias en cuanto a la respuesta, pueden deberse a la distribución hormonal dentro la misma planta. En consecuencia, el número de vástagos obtenidos, variará dependiendo de la ubicación del explanto en la planta donante. El fenómeno conocido como topófisis, explica la influencia de la posición del

explanto en el vegetal, sobre el crecimiento y desarrollo in vitro luego del aislamiento (Pierik & Mateo-Sagasta, 1990).

### Gráfico N° 6

#### Prueba de comparación de medias (Tukey)



Como habíamos observado en la tabla de análisis de varianza, encontramos diferencias significativas al 5% solo en el factor tratamientos, entonces procedimos a realizar la prueba de comparación de medias (TUKEY) donde observamos que el tratamiento T8 (V2C4) fue el que mejor comportamiento mostró alcanzando un valor del 66,66% en regeneración a los 7 días seguido por el tratamiento T3 (V1C3) que alcanzó un 58,33% de regeneración a los 7 días.

Resultados similares se lograron utilizando BAP en lugar de KIN, en concentraciones de 0,5 mg/L. Según (Flores M. 2014) indica que en la fase de establecimiento el mejor tratamiento es BAP en concentración de 0,5 mg/L aplicado en la variedad Maru.

Los tratamientos T1 (V1C1), T2 (V1C2), T5 (V2C1) Y T6 (V2C2) mostraron un comportamiento similar ya que sus los valores obtenidos iban desde los 22,22% hasta los 33,33%, donde pudimos observar que el rango entre estos valores era pequeño en comparación al tratamiento T8, que fue el que mejor comportamiento mostró.

#### 4.2.1.2 Porcentaje de regeneración a los 14 días

**Cuadro N° 17 Datos de regeneración a los 14 días**

TRATAMIENTOS	REPLICAS			SUMA	MEDIA
	R1	R2	R3		
<b>T1(V1C1)</b>	25.00	50.00	50.00	125.00	41.67
<b>T2(V1C2)</b>	50.00	0.00	25.00	75.00	25.00
<b>T3(V1C3)</b>	50.00	75.00	50.00	175.00	58.33
<b>T4(V1C4)</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>T5(V2C1)</b>	33.33	66.66	33.33	133.32	44.44
<b>T6(V2C2)</b>	66.66	100.00	33.33	199.98	66.66
<b>T7(V2C3)</b>	66.66	100.00	100.00	266.64	88.88
<b>T8(V2C4)</b>	100.00	100.00	100.00	299.97	99.99
<b>SUMA</b>	391.64	491.63	391.64	1274.91	424.97
<b>MEDIA</b>	48.955	61.45375	48.955		

Los promedios de los diferentes tratamientos a los 14 días de regeneración tuvieron una gran diferencia como se puede observar en el tratamiento T8 (V2C4) con un valor del 99,99% a comparación con el T4(V1C4) con un promedio 0.00%, asimismo se pudo observar que el tratamiento T4(V1C4) no mostro regeneración alguna en comparación a los demás tratamientos teniendo un valor de 0%.

**Cuadro N° 18**  
**tabla de doble entrada (Variedad/Concentración)**

<b>TABLA DE DOBLE ENTRADA (VARIEDAD/CONCENTRACIÓN)</b>						
	C1	C2	C3	C4	SUMA	MEDIA
<b>V1</b>	125.00	75.00	175.00	0.00	375.00	93.75
<b>V2</b>	133.32	199.98	266.64	299.97	899.91	224.98
<b>SUMA</b>	258.32	274.98	441.64	299.97	1274.91	318.73
<b>MEDIA</b>	129.16	137.49	220.82	149.99		

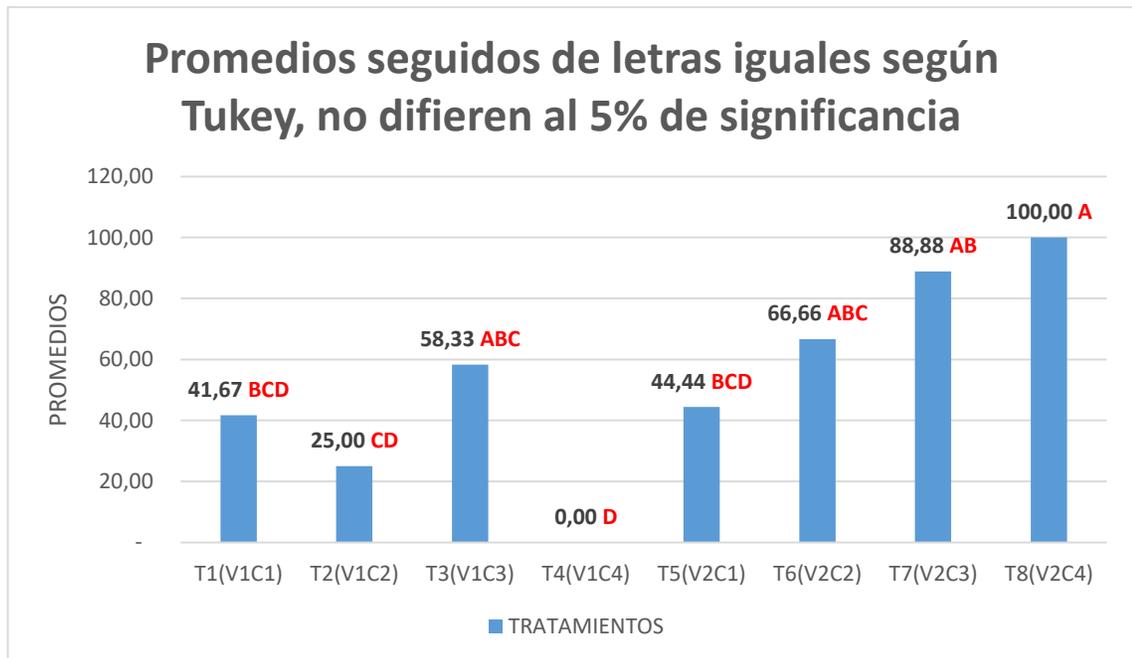
Tal como se puede observar en la tabla xx los promedios en las variedades son altamente diferentes siendo la V1(Maru) la de menor valor con un promedio de 93.75% a diferencia de la variedad V2 (Kaliteri) con un promedio de 224.98 %.

**Cuadro N° 19**  
**Análisis de varianza**

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	F	F tabulada	
				CALCULADA	5%	1%
<b>TRATAMIENTOS</b>	7	22.515,22	3.216,46	<b>9,09</b>	<b>2,76</b>	4,28
<b>REPLICAS</b>	2	833,17	416,58	1,18	3,74	6,51
<b>ERROR</b>	<b>14</b>	4.953,13	353,79			
<b>VARIEDAD</b>	1	11.480,44	11.480,44	32,45	4,60	8,86
<b>CONCENTRACIÓN</b>	3	3.503,71	1.167,90	3,30	3,34	5,56
<b>INTERACCIÓN (V/C)</b>	1	7.531,08	7.531,08	21,29	4,60	8,86
<b>TOTAL</b>	23	28.301,52				
C.V=	35,41					

Una vez concluida el análisis de varianza ANOVA para los datos de regeneración medidos a los 14 días pudimos observar que las diferencias significativas de los tratamientos al 5% observados en la primera medición se mantuvieron. Así también se vio que no hubo diferencias significativas en el factor variedad por lo tanto solo se realizó la prueba de comparación de medias para los tratamientos.

**Gráfico N° 7**  
**Prueba de comparación de medias (Tukey)**



Tal como el análisis de varianza indicó la diferencia significativa de los tratamientos ameritaba una prueba de comparación de medias, de tal modo que pudimos concluir que el tratamiento con mejor resultado observado fue el tratamiento T8 (V2C4) con un 100% de regeneración representado con la letra A, asimismo se observó que el tratamiento T7 (V2C3) fue el que más se acercó al tratamiento T8(V2C4) con un 88,88% de regeneración representado por las letras AB.

A diferencia de esos dos tratamientos ya mencionados, los tratamientos T3 (V1C3) Y T6 (V2C2) se mantuvieron con un comportamiento medio obteniendo valores de 58,33 y 66,66% respectivamente, mientras que el tratamiento T4 (V1C4) no mostró señales

de regeneración alguna, ya que desde la primera medición se mantuvo con el 0% de regeneración.

#### 4.2.1.3 Porcentaje de regeneración a los 21 días

*Figura 13*



**Cuadro N° 20**

**Datos de regeneración a los 21 días**

TRATAMIENTO S	REPLICAS			SUMA	MEDIA
	R1	R2	R3		
T1(V1C1)	25.00	50.00	50.00	125.00	41.67
T2(V1C2)	50.00	0.00	25.00	75.00	25.00
T3(V1C3)	50.00	75.00	50.00	175.00	58.33
T4(V1C4)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T5(V2C1)	66.33	66.66	33.33	166.32	55.44
T6(V2C2)	66.66	100.00	66.66	233.32	77.77
T7(V2C3)	66.66	100.00	100.00	266.66	88.89
T8(V2C4)	100.00	100.00	100.00	300.00	100.00
<b>SUMA</b>	424.65	491.66	424.99	1341.30	447.10
<b>MEDIA</b>	53.08	61.46	53.12		

El mayor porcentaje de regeneración lo presenta el tratamiento T8(V2C4) con el 100% y el menor porcentaje lo tiene el tratamiento T4(V1C4) al 0% que no obtuvo ninguna regeneración, pero también cabe mencionar que el tratamiento T7(V2C3) se vio un porcentaje de regeneración elevado con un 88,89 % así mismo se puede evidenciar que el tratamiento T2(V1C2) también obtuvo un bajo porcentaje de regeneración con un 25%.

En una investigación de regeneración in vitro de arroz por callogénesis, se obtuvieron resultados similares, sin embargo, a diferencias de las concentraciones utilizadas en esta investigación fue que la Kinetina fue utilizada en una concentración de 3 mg/L. Sin embargo, ciertas variaciones que ocurrieron se los atribuyo al material utilizado ya que se cree que el genotipo influye mucho en estos casos. La tendencia decreciente de la eficiencia de formación de callos, al incrementarse las concentraciones de 2,4-D, puede deberse a un efecto del genotipo de la variedad en estudio, cuya respuesta en la callogénesis se afecta a concentraciones de 2,4-D por encima de 2 mg/L, según los resultados de este estudio (Pérez, 2008).

**Cuadro N° 21**  
**tabla de doble entrada**

<b>TABLA DE DOBLE ENTRADA (VARIEDAD/CONCENTRACIÓN)</b>						
	C1	C2	C3	C4	SUMA	MEDIA
<b>V1</b>	125.00	75.00	175.00	0.00	375.00	93.75
<b>V2</b>	166.32	233.32	266.66	300.00	966.30	241.58
<b>SUMA</b>	291.32	308.32	441.66	300.00	1341.30	335.33
<b>MEDIA</b>	145.66	154.16	220.83	150.00		

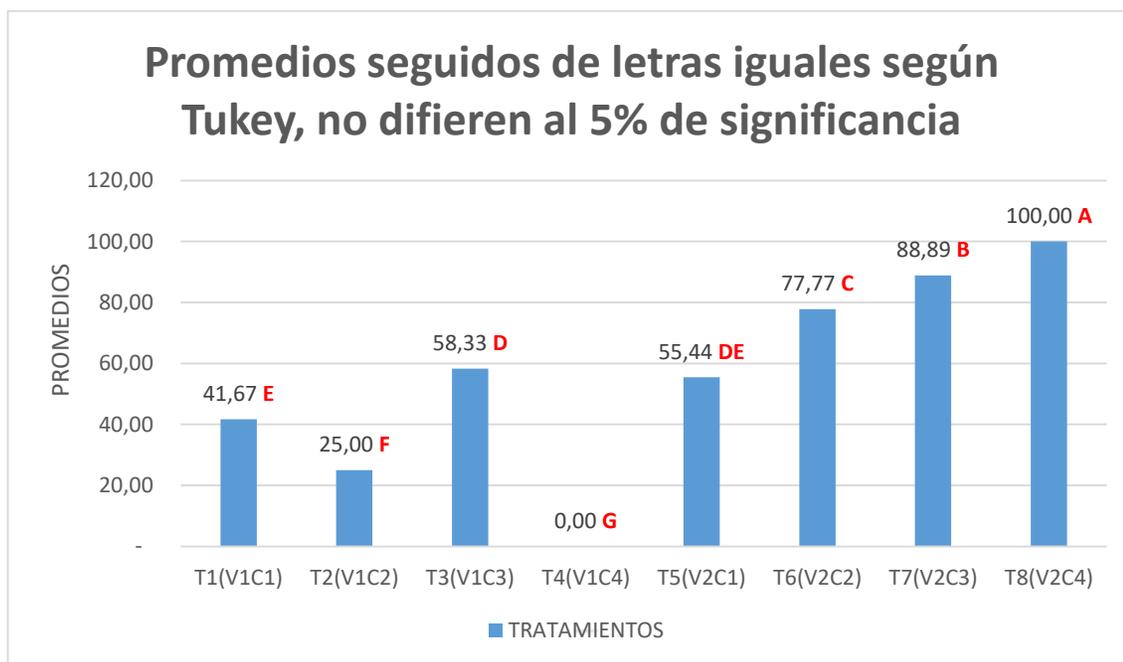
Teniendo en cuenta la tabla de doble entrada a los 21 días de regeneración se tuvo una mejor regeneración en la variedad V2 (KALITERI) con un promedio de 241,58 % seguido por la variedad V1 (MARU) al 93.75% de regeneración.

**Cuadro N° 22**  
**Análisis de varianza**

FUENTES DE VARIACION	GL	SC	CM	F CALCULADA	F tabulada	
					5%	1%
TRATAMIENTOS	7	23.399,14	3.342,73	11,92	2,76	4,28
RÉPLICAS	2	372,31	186,15	0,66	3,74	6,51
ERROR	14	3.926,43	280,46			
VARIEDAD	1	14.568,15	14.568,15	51,94	4,60	8,86
CONCENTRACIÓN	3	2.536,78	845,59	3,02	3,34	5,56
INTERACCIÓN (V/C)	1	6.294,20	6.294,20	22,44	4,60	8,86
TOTAL	23	27.697,88				
C.V=	29,97					

Una vez realizada el análisis de varianza de varianza, pudimos observar la interacción en los tratamientos al 5% de probabilidad de error al igual que observamos en los análisis anteriores, y de igual manera no se observó diferencias significativas en el factor variedad, por lo tanto, se recurrió al análisis de comparación de medias para los tratamientos.

**Gráfico N° 8**  
**Prueba de comparación de medias (Tukey)**



Ya concluida la prueba de comparación de medias TUKEY pudimos observar que el comportamiento fue muy similar que el que se mostró a los 14 días. El tratamiento con mejor comportamiento fue el tratamiento T8 (V2C4) con un 100% de regeneración representado por la letra A, seguido de los tratamientos T7 (V2C3) y T6 (V2C2) que mostraron un comportamiento igual estadísticamente ya que ambos se representan por las letras AB. Del mismo modo que en los anteriores análisis no se observó demasiados cambios en los demás tratamientos ya que los tratamientos, T1 (V1C1), T2 (V1C2), T3 (V1C3) y T(V1C4) se mantuvieron con los mismos valores que en los análisis anteriores.

Según una investigación realizada por Molina, sugiere que en la regeneración debe aplicarse BAP, KINETINA O GA3, para mejores resultados, sin embargo, su dependencia por el factor genético siempre persiste, de tal manera que los mejores

resultados fueron obtenidos con la aplicación de 0,3 mg/L de Kinetina. Para la obtención de los máximos valores de regeneración, es necesaria la adición de, por lo menos, BAP y/o CIN (cinetina) y/o AG3 (ácido giberélico); dependiendo del explanto y el genotipo que se cultiva. Cuando se utilizaron como explanto yemas axilares, el número de vástagos por explantos fue superior cuando al medio se adicionó solamente 1mg/l de BAP (Molina et al, 2013).

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 CONCLUSIONES

- El mejor tratamiento que se contempló a los 21 días de regeneración fue el tratamiento T4 (V2C4), tratamiento basado en el medio M&S con una concentración de 0,3 mg de Kinetina aplicados a la variedad 2 (Kaliteri).
- El mayor porcentaje de regeneración durante la primera etapa de multiplicación por segmentos nodales se evidenció en el tratamiento T3 (V1C3), variedad Maru sin la aplicación de ninguna fitohormona.
- Se pudo observar la dispersión de datos en etapa II, caso que se lo atribuyó a la obtención del material vegetal, más específicamente a la ubicación de donde dicho material fue extraído de la planta madre.

Los resultados obtenidos a los 7 días tuvieron cierta variación comparado a los 21 días, ya que a los 7 días se pudo observar que el tratamiento T3 (V1C3), fue el que mejor comportamiento mostraba, sin embargo, a los 21 días el tratamiento que mejor comportamiento mostro completando el 100% de regeneración fue el tratamiento T8 (V2C4).

- Es factible regenerar y obtener plantas a partir de meristemos en el orégano debido a los altos porcentajes de regeneración obtenidos.
- La variedad Kaliteri es la variedad que mejor comportamiento mostró al regenerarse por medio de meristemas aplicándose Kinetina como fitohormona en el medio de cultivo.

## 5.2 RECOMENDACIONES

- Durante la etapa inicial de regeneración por mediante segmentos nodales es aconsejable no utilizar fitohormonas, ya que los mejores resultados se obtuvieron sin utilizar ningún tipo de fitohormonas.
- En la etapa de multiplicación por meristemas se recomienda utilizar la concentración de Kinetina en una concentración de 0,3 g/L para mejores resultados en el periodo inicial de regeneración.
- Debe continuarse con esta investigación, ya que el objetivo principal es la obtención de plantas libres de enfermedades lo que servirá a todos los productores de orégano como base fundamental.