

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1.- HISTORIA

Esta especie, comúnmente llamada lisianthus ‘Eustoma grandiflorum’, es originaria del norte de México y sur de Estados Unidos, zonas de clima desértico que le permiten adaptarse a condiciones de baja humedad y temperaturas algo más extremas que las que soportan la generalidad de las flores cultivadas. Si bien crece en condiciones desérticas, no es una verdadera planta del desierto, ya que prospera cerca de ríos y tierras bajas donde siempre tiene acceso al agua. En su hábitat natural florece bajo condiciones de clima seco, razón por la cual, para para obtener buenos resultados con el cultivo hay que tener especial cuidado de no aplicar riego excesivo. De las especies salvajes se realizaron mejoras hasta obtener las variedades híbridas que hoy se cultivan como flor de corte o de maceta (sencillas y dobles), de una amplia gama de colores.

https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_voces_y_ecos_no_35_11lisianthus_una_reina_entre_las_flores.pdf

1.2.-IMPORTANCIA DEL CULTIVO

El lisianthus pertenece a la familia Gentinaceae, es una planta herbácea bienal, cultivada como anual, pétalo erecto, con follaje y flores ornamentales. Entre las flores para corte y lisianthus es una planta de Gran valor ornamental que está siendo introducida en los mercados internacionales.

Las flores de Lisianthus ofrecen una belleza sencilla, así como elegante sofisticación altamente popular debido a su larga vida en florero (2-3 semanas), gran variedad de colores (incluyendo azul), y flores de formas únicas.

<https://sakataornamentals.com/wp-content/uploads/sites/2/2020/03/Tutorial-de-Produccion-de-Lisianthus-Flor-de-Corte-SAKATA-0818>

1.3.- BOTÁNICA

El *lisianthus* es una planta originaria de las praderas húmedas de la zona meridional de los Estados Unidos y norte de México, de ciclo anual o bienal. Forma una roseta de hojas sobre la cual se desarrolla un tallo de 40 ó 50 cm de largo en cuyo extremo aparece en las flores largamente pediceladas de 6 a 9 cm de diámetro (Melgares de Aguilar, 1996).

Los tallos son delgados y rígidos, de 30 a 90 cm de altura, cada uno con 6 a 8 flores largas. Los capullos están encantados y las flores se abren en sección, dibujando una delicada corola semiabierta de 5 cm de ancho. La forma natural es violeta, con pétalos más estrechos que las muchas variedades, más bellos que los demás. Existen en rosa, azul, blanco, dos tonos, a veces incluso tonos amarillos o rojos. Del mismo modo, algunos tienen flores semidobles o muy dobles, similares a las rosas pequeñas. (Melgares de Aguilar, 1996).

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/revista>

1.4.- TAXONOMÍA

Reino: vegetal.

Phylum: Telemophytae.

Division: Tracheophytae.

Subdivision: Anthophyta.

Clase: Angiospermae.

Subclase: Dicotyledoneae.

Grado Evolutivo: Metachlamydeae.

Grupo de Órdenes: Tetracíclicos.

Orden: Contortales.

Familia: Gentianaceae.

Nombre científico: *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinnars.

Nombre común: Lisianthus

Fuente: (Herbario Universitario, 2019).

1.5.- EXIGENCIAS CLIMÁTICAS

1.5.1.- LUZ

Las semillas pueden germinar bajo luz natural, sin embargo, la luz fluorescente es mejor.

La floración no se ve influida por el fotoperiodo por lo que no es necesario técnicas de iluminación para obtenerlo, pero si podría mejorarse la calidad si se ilumina con luz artificial suplementaria en épocas de baja radiación, como puede ser en invierno.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/revista>

1.5.2.- TEMPERATURA

La sensibilidad del Lisianthus a las altas temperatura es elevada en el periodo inmediato después de la germinación de la semilla, época en la que estas pueden inducir a la planta a la formación de una roseta de hojas que no desarrolle el tallo floral, o que esta floración se retrase mucho. Temperaturas de día entre 30 y 35°C y nocturnas entre 20 y 25°C, provocan la formación sistemática de estas rosetas. Esta sensibilidad es muy importante en el período que va desde la siembra a la formación del cuarto par de hojas, se considera que, si la planta ha formado entre el quinto y sexto par de hojas, y no ha aparecido el tallo floral, es que ya se ha formado la roseta. Para evitarlo, habría que asegurar unas temperaturas de 23 grados por el día y 18 por la noche, hasta la formación del segundo o tercer par de hojas; a partir de ese momento, la sensibilidad de la planta a las altas temperaturas parece disminuir (Melgares de Aguilar, 1996).

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/revista>

1.6.- RIEGO Y HUMEDAD

La aspersión alta es el mejor sistema de riego para las 4 primeras semanas después de la plantación. Cuando las plantas empiecen a crecer, de manera que se junten unas con otras, se recomienda la instalación del sistema de riego por goteo, disponiendo líneas con goteros insertados cada 25 - 35 cm, según el tipo de suelo, y colocando 1 línea cada 2 filas de plantas, lo que hace 4 líneas porta-goteros por banqueta. Si no se dispone de aspersión, se puede utilizar inicialmente el riego por goteo. El Lisianthus puede dar doble floración cuando las dotaciones son regulares en tiempos cálidos; así, cuando se observe en la plantación la mayoría de las plantas con una sola flor, podrá aplicarse riegos más frecuentes. Durante los primeros 10-14 días siguientes a la plantación, son los más importantes para una buena implantación del Lisianthus, por lo que la planta no debe soportar estrés hídrico. La conductividad del agua no debe superar en demasía los 500 mS/m. El contenido de cloruro sódico en el agua de riego ha de ser muy bajo.

Texto%20del%20artículo-11479-1-10-20170306%20(1).pdf

1.7.- SUELO – TRASPLANTE

La Eustoma no es particularmente exigente en terrenos. Una buena mezcla podría estar formada por un buen sustrato fértil, al que se sume turba y arena para permitir un buen drenaje del agua de riego, en consideración al hecho de que no tolera encharcamientos. El trasplante se realiza en primavera cada 2/3 años.

La plántula se plantará cuando estén jóvenes y con activo crecimiento (alrededor de estado de 4 hojas verdaderas). el espaciamiento dependerá del sistema de crecimiento en tallo sencillo o con rayamas. En general el espacio es de 10x15 cm y colocar la plántula de tal manera que permita una buena circulación del aire para prevenir enfermedades.

El cultivo debe realizarse en invernadero y los primeros 10 días debe tener bastante humedad y sombra después del trasplante y no dejar que el suelo se seque.

<https://icamex.edomex.gob.mx/lisianthus>

1.8.- PINZADO

Esta práctica consistente en cortar la dominancia apical de las plantas cuando presentan menos de tres nudos. Normalmente se debería realizar con dos, dejando un solo nudo con posibilidades de desarrollar brotes laterales que podrán ser varas florales. El riego por sectores tiene que ser homogéneo, puesto que esta práctica demanda una mayor concentración de fertilizantes. Dependiendo de la época en que se realice, el pinzado puede permitir el retraso de la floración desde dos semanas hasta más de un mes. Si no se realiza selección de tallos, puede generar un gran aumento del número de varas, pero delgadas y cortas (Patricio Maldonado, 2005).

1.9.- FLORACIÓN

El periodo desde la plantación hasta la cosecha está determinado por la variedad utilizada; generalmente transcurren de 90 a 120 días y de la siembra de semilla a cosecha ocurren 210 días.

Se cortan las flores cuando tienen abierta 1 a 2 flores. El corte se efectúa sobre el tallo a nivel de suelo, antes de colocar a las flores en agua. La selección y empaque son de gran importancia, ya que la presentación de la flor es determinante para su comercialización.

Para seleccionar por color y tamaño, se colocan las flores en recipientes con agua dentro de un cuarto fresco y pasan después a la sala de empaque donde se envuelven con papel encerado y se agrupan por docena.

En general se emplean cajas de cartón de 25 cm de grosor por 50 cm de ancho y 11.5 cm de longitud.

El tiempo de vida en florero es de 20 días.

<https://icamex.edomex.gob.mx/lisianthus>

1.10.- FERTILIZACIÓN

Desde la primavera hasta el final del verano, es recomendable pagar con un fertilizante universal, siguiendo las instrucciones especificadas en el paquete del producto.

En general, el potasio mejora la flor y la fuerza general de la planta. El fertilizante debe contener suficiente nitrógeno para promover el crecimiento de un follaje saludable. Evita los fertilizantes que son demasiado pesados en fósforo. Busca fórmulas como 15-0-15 o 20-10-20, donde los números corresponden al porcentaje de nitrógeno, fósforo y potasio en el fertilizante, respectivamente.

Agrega el fertilizante una vez cada dos semanas antes de que la planta florezca. Después de que esto suceda, reduce el fertilizante a una vez cada tres o cuatro semanas.

<https://deagronomia.com/cultivos/como-cultivar-lisianthus/>

1.11.- PLAGAS Y ENFERMEDADES

Algunas de las principales plagas y enfermedades que atacan al lisianthus son: nematodos, orugas, pulgones y trips; que afectan la calidad y productividad. Estas dos últimas son transmisoras de virus por lo que su control evitaría la aparición de los mismas. Entre las enfermedades pueden presentarse el mildew (*Psuedoperonospora* sp.); a nivel de raíz (*Pythium* sp., *Phytophthora* sp.), *Peronospora* sp. y *Botrytis* sp. Siendo necesario un monitoreo y control inmediato ya que se las flores son productos muy valorados por su calidad.

https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_-cultivo_delisianthus_triptico.pdf

Plagas

- Minador o submarino (*Lyriomiza trifolii*).
- Orugas de noctuidos (*Heliothis* sp, *Prusia* sp, etc.).
- Trips (*Frankliniella occidentalis*).
- Gusanos del suelo (Larvas de coleópteros).

Enfermedades

- Mal del pie (géneros: Phytophthora, Pythium, Rhizoctonia).
- Botrytis.
- Mildiu (Peronospora chlorae).
- Virus del bronceado del tomate (Tomato Spotted Wild Virus-TSW(Maldonado B, 2005).

1.12.- DESARROLLO Y MANEJO DEL CULTIVO

1.12.1.- PROPAGACIÓN

Normalmente su reproducción se realiza por semilla, aunque también se puede realizar por esqueje o cultivo in vitro de tejidos. El número de semillas peletizadas por gramo es de 1.200. La temperatura óptima de germinación es de 21 °C.

La principal forma de propagación es a través de semillas las que germinan alrededor de los 10 a 15 días.

La propagación vegetativa por esquejes o mediante cultivo in vitro de tejidos también se utiliza.

<file:///9947-Texto%20del%20art%C3%ADculo-11479-1-10-20170306.pdf>

1.12.2.- PROPAGACIÓN ASEXUAL

El uso de la propagación asexual es una alternativa es por ello que debido a la necesidad de desarrollar un método para la rápida propagación de genotipos seleccionados de lisanthus se ha desarrollado la multiplicación asexual de clones electos por el medio del cultivo de tejidos in vitro, es decir la multiplicación individual de plantas seleccionadas que posean características sobresalientes como lo son: la alta productividad, habito de crecimiento, resistencia a enfermedades.

http://www.intagri.com/cultivo_invitro_de_tejidos.

1.13.- CULTIVO IN VITRO

El cultivo in vitro consiste en tomar una porción de una planta y colocarla en un medio nutritivo estéril donde se regenerará una o muchas plantas. Durante las últimas décadas, la técnica del 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.

El cultivo in vitro de vegetales se basa en el aislamiento de órganos tejidos o células vegetales y en el ajuste de las condiciones necesarias para la obtención de respuestas fisiológicas Y morfológicas a partir de estos explantes.

La totipotencia es la capacidad de una célula de generar un individuo completamente idéntico a la célula madre la cual tiene la misma información genética y la misma función.

El cultivo se incuba bajo condiciones de luz, temperatura y humedad controladas que junto con los físicos químicos y nutricionales conducen al desarrollo del explante hacia la formación de una masa celular amorfa que producirá órganos o embriones.

La reproducción asexual de plantas por cultivo de tejidos es posible gracias aquí en general las células de un individuo vegetal poseen la capacidad necesaria para permitir el crecimiento y el desarrollo de un nuevo individuo sin que medie ningún tipo de función de células sexuales o gametos.

http://www.intagri.com/cultivo_invitro_de_tejidos

1.14.- VENTAJAS DEL CULTIVO IN VITRO

- Producción de gran número de plantas.
- Obtención de plantas en cualquier época del año.
- Producción de plantas libres de contaminación enfermedades y plagas.
- Propagación de especies de difícil propagación por otros métodos.
- Clonación de individuos élite.

- Obtención de plantas libres de virus.
- Producción de nuevos híbridos.
- Mejora genética de plantas.

http://www.intagri.com/cultivo_invitro_de_tejidos

1.15.- DESVENTAJAS DE LA TÉCNICA IN VITRO

- No todas las especies son viables de propagar en vitro
- Cada especie requiere un método específico
- La estandarización de protocolos resulta costosa

http://www.intagri.com/cultivo_invitro_de_tejidos

1.16.- MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO

Constituyen un elemento fundamental para el cultivo in vitro de células, tejidos y órganos para lograr el desarrollo de los mismos, los medios de cultivo están constituidos por sustancias minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcar, reguladores de crecimiento y otros elementos.

<https://biblioteca.inia.cl/handle/123456789/6144>

1.17.-COMPONENTES INORGÁNICOS DEL MEDIO DE CULTIVO

Los medios de cultivo están constituidos por componentes inorgánicos los cuales son suministrados en cantidades relativamente grandes macronutrientes y otros añadidos en menor cantidad micronutrientes dentro de los macronutrientes se encuentran iones de nitrógeno potasio calcio fósforo magnesio y azufre los micronutrientes son añadidos a los medios de cultivos en hierro níquel color o manganeso zinc cobre y molibdeno.

<http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR32025>

1.18.-COMPONENTES ORGÁNICOS DEL MEDIO DE CULTIVO

Dentro de los componentes orgánicos del medio de cultivo se encuentran carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, extractos naturales y reguladores del crecimiento vegetal.

<http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR32025>

1.19.- CARBOHIDRATOS

La nutrición que es desarrollada en condiciones In vitro A partir de los diferentes órganos y tejidos son ampliamente heterótrofos con respecto al carbono debido a la ausencia o insuficiencia de asimilación clorofílica Por lo cual resulta indispensable Añadir azúcares a los medios de cultivo.

<http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR32025>

1.20.- VITAMINAS

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades las más empleadas son: Tiamina (vitamina B1) se añade como hidrocloreuro de tiamina y constituye una vitamina esencial para el crecimiento de células vegetales. Acido nicotínico forma parte de las coenzimas que intervienen en la transferencia de hidrógeno Piridoxina es añadida como hidrocloreuro de piridoxina participa como coenzima en el metabolismo de los aminoácidos.

<http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR32025>

1.21.- AGENTES GELIFICANTES

El Agar se ha convertido en un material de soporte más ampliamente usado pues provee el medio de un excelente gel húmedo que sirve como soporte a la explante.

<http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR32025>

1.21.- AGUA

Es de Vital importancia la calidad del agua empleada para realizar los medios de cultivo la cual debe ser destilada.

<http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR32025>

4.22.- REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Los reguladores del crecimiento vegetal se agrupan en cinco categorías auxinas citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno.

1.23.- AUXINAS

AIA: Ac. Indol 3-acético.

AIA: Ac. Naftalenacético.

AIB: Ac. Indol 3-butírico.

2.4D: Ac. 2,4 diclorofenoxiacético.

Las auxinas estimulan el crecimiento, la división o la elongación, de las células. La elongación de las células viene dada por el aumento de su volumen interno. Al llegar a la célula la auxina causa dos reacciones.

La primera más rápida estimula el movimiento de las vesículas de la célula, así como la síntesis de ATPasas y enzimas que degradarán la pared celular, para dar sitio al crecimiento celular. La respuesta lenta estimula la transcripción de genes implicados en la síntesis de una nueva pared celular.

Las auxinas se emplean profusamente en agricultura. Tanto en agricultura tradicional donde se utilizan para asegurar el enraizamiento de una planta trasplantada como en agricultura moderna para hacer aparecer las raíces en los procesos de micropropagación.

<http://www.hormona-vegetal-auxinas>

1.24.- CITOQUININAS

BAP: 6-bencilaminopurina.

KINETINA: 6-furfurilaminipurina.

Z: Zeatina.

TDZ: Thidiazuron.

Las citoquininas o citocininas son un grupo de hormonas vegetales (fitohormonas) que promueven la división y la diferenciación celular. Pero hasta ahora no se sabía que también regulan el crecimiento y el desarrollo de las plantas. La citoquinina regula una serie de procesos de la planta, incluyendo la división celular, el crecimiento de los brotes y las raíces, el rendimiento de grano, y la ecologización.

<http://www.hormona-vegetal-citoquinina-regula-el-crecimiento>

1.25.- GIBERELINAS

GA3: Ac. Giberelico.

GA1, GA4, GA7: Giberelinas.

Las giberelinas son un tipo de regulador de crecimiento que afecta a una amplia variedad de fenómenos de desarrollo en las plantas, incluidas la elongación celular y la germinación de las semillas.

Las giberelinas son uno de los varios tipos de reguladores implicados en la elongación del tallo. Las giberelinas podrían facilitar el movimiento de las expansinas para que se sitúen en la posición correcta en la pared celular.

<http://www.fisiolvegetal.blogspot.com/giberilinas.htm>

1.26.- LA FLORICULTURA EN BOLIVIA

Cochabamba es el principal y casi único departamento productor de flores de Bolivia, abastece a todos los departamentos del país con más de 50 variedades que se cultivan en siete municipios del departamento.

Solo la asociación de flores de Pairumani-Iscaypata de Vinto produce más de tres toneladas por semana.

A nivel departamental, se estima que existen unas 10 mil familias floricultoras distribuidas en Chimore, Sipe Sipe, Sacaba, Tarata, Quillacollo, Vinto y Tiquipaya.

Claveles, rosas, saticias, chascas, ilusión, lisianthus, crisantemos, gladiolos, astromelias, nardos y otras variedades abastecen los mercados de todo el país.

El municipio de Quillacollo es el principal productor de flores, cultiva gran cantidad y variedad en las zonas de Bella Vista, Marquina, Ironcollo, que se encuentran en las faldas del Tunari.

<https://los.tiempos.com/flores/demanda/cochabamba>

1.27.- VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA FLORICULTURA

La actividad florícola es rentable en términos económicos, pero afecta a zonas que antes estaban dedicadas a la producción agrícola de consumo interno y popular. Por otra parte, el uso excesivo de productos fitosanitarios podría traer consecuencias adversas en la salud de las personas dedicadas a esta actividad, ya que contienen químicos que ingresan por la piel al aparato respiratorio y al digestivo. Además, los desechos residuales de esa actividad son vertidos en quebradas o ríos y alteran las características fisicoquímicas del suelo.

<http://bo.kalipedia.com/geografia-/tema/ventajas-desventajas->

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MATERIALES Y MÉTODOS

1.1.- UBICACIÓN DEL ENSAYO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Fitopatología y Cultivo In Vitro de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma “Juan Misael Saracho” ubicado en el departamento de Tarija, Provincia Cercado, zona El Tejar.

2.- MATERIAL VEGETAL

El material vegetal que se utilizó para el presente trabajo de investigación serán plantas de lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) obtenidas del vivero del El Portillo.

2.1.- MATERIAL DE LABORATORIO

Área de Preparación

- Frascos o tubos de cría.
- Balanza de precisión.
- Potenciómetro.
- pipetas.
- Matraces.
- Erlenmeyer.

Área de esterilización

- Autoclave.
- Estufa de esterilización para el material in vitro.

Área de siembra

- Cámara de flujo laminar.
- Mechero.
- Pinzas.

- Agujas.
- Bisturís.
- Tijeras.

Área de crecimiento

- Luz fluorescente.
- Control de temperatura.

Medio de cultivo

- Componentes
- Sales
- Macro (MI)- M&S(1)
- Micro (2)- M&S
- Fe EDTA (M3)- M&S
- Compuestos orgánicos (Vitaminas) (mg/l)
- Vitaminas M&S
- Myo-inisitol
- Sustancias de crecimiento (mg/l)
- BAP
- Azúcar (g/l)
- Agar agar (g/l)
- Ph

3.- METODOLOGÍA

3.1.- DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental usado en la investigación es completamente al azar con un arreglo bifactorial (2x3) con 8 tratamientos, con dos factores y tres repeticiones.

3.1.1.- FACTORES

FACTOR EXPLANTES

E1: Explantes de yemas terminales.

E2: Explantes de yemas axilares.

FACTOR MEDIOS DE CULTIVO

M1: M&S Murashige y skoog

M2: M&S Murashige y Skoog + BAP 0,1 mg/l

M3: M&S Murashige y Skoog + BAP 0,3 mg/l

M4: M&S Murashige y Skoog + BAP 0,5 mg/l

5.4.1.2.- TRATAMIENTOS

T1: E1M1: Explantes de yemas terminales Y M&S Murashige y Skoog

T2: E1M2: Explantes de yemas terminales Y M&S Murashige y Skoog + BAP 0,1 mg/l

T3: E1M3: Explantes de yemas terminales Y M&S Murashige y Skoog + BAP 0,3 mg/l

T4: E1M4: Explantes de yemas terminales Y M&S Murashige y Skoog + BAP 0,5 mg/l

T5: E2M1: Explantes de yemas axilares y M&S Murashige y Skoog

T6: E2M2: Explantes de yemas axilares y M&S Murashige y Skoog + BAP 0,1 mg/l

T7: E2M3: Explantes de yemas axilares y M&S Murashige y Skoog + BAP 0,3 mg/l

T8: E2M4: Explantes de yemas axilares y M&S Murashige y Skoog + BAP 0,5 mg/l

UNIDADES EXPERIMENTALES

Las unidades experimentales están compuestas por tres tubos de ensayo, haciendo un total de 72 tubos de ensayo.

VARIABLES

- % de regeneración
- % de contaminación
- Tamaño del crecimiento de los brotes
- Número de yemas en el brote

Unidad experimental: 3 tubos de ensayo

I	II	III
T2	T3	T4
T6	T5	T7
T1	T8	T3
T8	T2	T5
T4	T1	T6
T7	T3	T8
T5	T6	T2
T4	T7	T1

3.- PROCEDIMIENTO

La metodología y secuencia general de los ensayos comenzó con la preparación de los medios de cultivo, disposición en envases adecuados y esterilizados en autoclave vertical /a 120°C y 1,5 atmósferas de presión), durante 20 minutos.

Se inocularon explantes (micro esquejes) en tubos de ensayo con el medio de cultivo a probarse. El desarrollo de éstos será evaluado durante 30 días en los cuales se evaluará altura de planta, tasa de multiplicación y las siguientes variables de respuesta.

- Porcentaje de regeneración.
- Porcentaje de contaminación.
- Tamaño del crecimiento de los brotes.
- Número de yemas en el brote.

La inoculación se realizó siempre con máxima asepsia dentro de la cámara de flujo laminar, donde son llevados a la cámara de crecimiento.

3.1.- MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo que se utilizó como base para la etapa de establecimiento están compuestos por sales inorgánicas del medio propuesto por Murashige y Skoog al cual se modificó las composiciones de fitohormonas. El pH de los medios será ajustado a 5,7-5,8 previo a la esterilización y como gelificante se utilizará agar, a razón de 7,5g/l.

Se probaron cuatro medios de cultivo que fueron esterilizados en tubos de ensayo, con 10ml cada uno en una autoclave a 120°C y 1 atmosfera de presión durante 20 minutos. En esta fase se utilizó cuatro medios de cultivo, basados en Murashige y Skoog al cual se modificó las composiciones de las fitohormonas.

MEDIOS DE CULTIVO DE INICIO

TABLA 1.- MEDIO DE CULTIVO

FASE		INICIO			
Medio de cultivo		M0	M1	M2	M3
Componentes					
Sales					
Macro (MI)- M&S ⁽¹⁾		100%	100%	100%	100%
Micro (2)- M&S		100%	100%	100%	100%
Fe EDTA (M3)- M&S		100%	100%	100%	100%
Compuestos orgánicos (Vitaminas) (mg/l)					
Vitaminas M&S		100%	100%	100%	100%
Myo-inisitol		100	100	100	100
Sustancias de crecimiento (mg/l)					
BAP		0	0,1	0,3	0,5
Azúcar (g/l)		30	30	30	30
Agar agar (g/l)		6.5	6.75	6.5	6.5
Ph		5.7	5,7	5.7	5.7

(1)M&S Murashige y Skoog.

3.2.-PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

La preparación del medio de cultivo se inició el día 1 de diciembre con la esterilización del material a utilizar.

El día 2 de diciembre se realizó la preparación del medio de cultivo que se preparó de la siguiente manera:

TABLA 2.- PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO ENSAYO 1

	Medio	800ml
1	Ms	3,46gr
2	Mío inositol	8ml
3	Azúcar	24gr
4	Enrazar a	800ml

Dividir:

	A	B	C	D
	200ml	200ml	200ml	200ml
BAP	0	0,1mg/L	0,3mg/L	0,5mg/L
	0	0,02mg/200ml	0,06mg/200ml	0.1mg/200ml
PH	5,7	5,7	5,7	5,7
AGAR	1,4	1,4	1,4	1,4

Una vez preparado el medio de cultivo se procedió a esterilizar en la autoclave a una temperatura de 125°C durante 25 minutos.

El día 3 de diciembre se realizó la siembra de los explantes en la cámara de flujo laminar tomando todos los cuidados de asepsia correspondientes, se empezó seleccionando los explantes de yemas apicales y yemas laterales para después desinfectarlo en alcohol al 70% e hipoclorito de sodio para evitar que en el medio de cultivo de cultivo crezcan hongos y bacterias material vegetal para después introducirlos en los medios de cultivos estériles

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizaron dos ensayos en distintas fechas, en las cuales se evaluó: el porcentaje de regeneración, porcentaje de contaminación, tamaño del brote y numero de yemas en el brote para poder determinar el medio de cultivo y el explante apropiado.

1.1.- REGENERACIÓN A LOS 5 DIAS

TABLA 3.- PORCENTAJE DE REGENERACIÓN

TRA/REP	I	II	III	S	X
E1M1	100%	100%	100%	300	100%
E1M2	100%	100%	100%	300	100%
E1M3	100%	66,6%	66,6%	233,2	77,7%
E1M4	100%	66,6%	100%	266,6	88,8%
E2M1	66,6%	66,6%	66,6%	199,8	66,6%
E2M2	100%	66,6%	33,3%	199,9	66,6%
E2M3	33,3%	33,3%	100%	166,6	55,5%
E2M4	66,6%	66,6%	66,6%	199,8	66,6%
S	666,5	566,3	633,1	1865,9	

En la tabla 3 nos muestra los resultados del porcentaje de regeneración a los 5 días en los explantes de yemas terminales y yemas axilares donde se puede observar que en las yemas apicales en los tratamientos E1M1 y E1M2 tienen un 100% de regeneración y el tratamiento E1M3 con un porcentaje de 77,7% de regeneración, mientras que en las

yemas axilares en los tratamientos E2M1, E2M2 y E2M4 con un 66,6% de regeneración.

TABLA 4.- INTERACCIÓN EXPLANTE/MEDIO.

EXP/MEDIO	M1	M2	M3	M4	S	X
E1	300	300	233,2	266,6	1099,8	274.9
E2	199,8	199,9	166,6	199,8	766,1	191.5
S	499,8	499,9	399.8	466,4	1865,9	
M	249,9	249.9	199,9	233,2		

Tabla de interacción de datos de medias entre explante y medio de cultivo para el cálculo de los factores.

TABLA 5.- ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

FV	GL	SC	CM	FC	FT5%	FT1%
TOTAL	23	12616,4	-	-	-	-
TRAT	7	5938,6	848,4	1,9	2,77	4,28
REPLICAS	2	650,8	325,4	0,8	3,74	6,51
FACTOR EXPLANTES	1	4639,9	4639,9	10,8*	4,60	8,86
FACTOR MEDIO	3	74201,3	24733,8	0,9	3,34	5.56
FACTOR MEDIO/ EXPLANTE	3	72902,6	24300,9	1,4	3,34	5,56
ERROR	14	6027	430,5	-	-	-

En la evaluación de porcentaje de regeneración a los 5 días se puede observar diferencias altamente significativas en el factor explantes de yemas terminales y explantes de yemas apicales en este caso se realizará la prueba de medias de tukey para determinar cuál explante es el mejor.

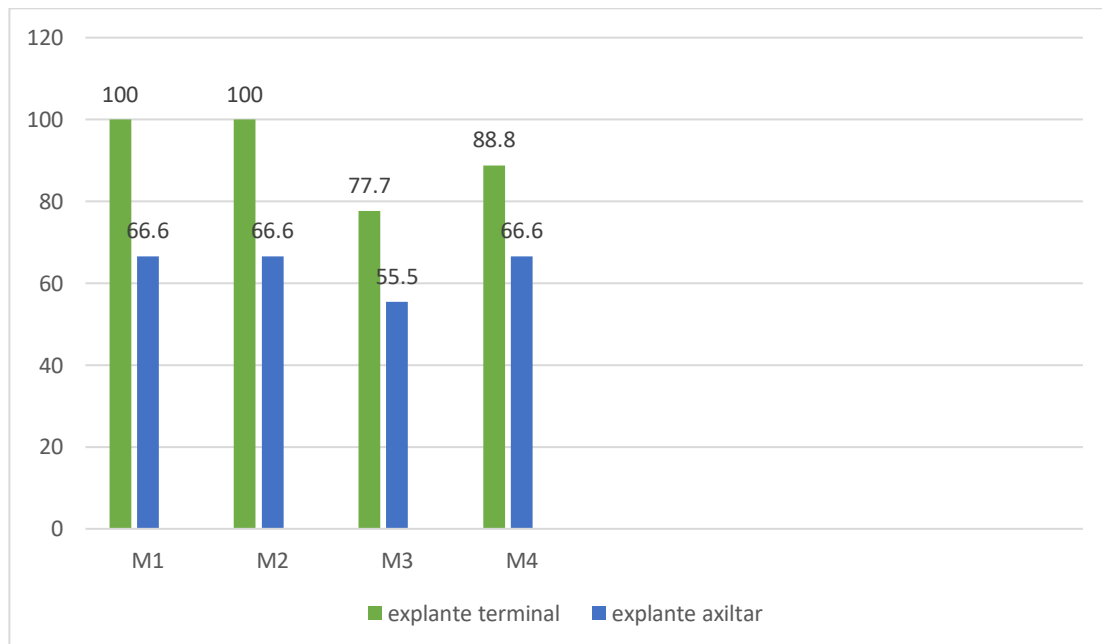
PRUEBA DE MEDIAS TUKEY

Para la prueba de tukey se utilizará las medias de la tabla de interacción explante/ medio

factor	medias	Agrupamiento
E1	274,9	a
E2	191,5	b

En la evaluación de porcentaje de regeneración a los 5 días en la prueba de tukey se puede determinar que de acuerdo a la media mayor el factor E1 de explantes de yemas terminales obtuvo mejores resultados.

GRÁFICA 1.- PORCENTAJE DE REGENERACIÓN



Como se puede observar en la gráfica 1 los explantes con un mayor porcentaje de regeneración son los explantes de yemas terminales con un 100% en M1 y M 2 mientras que en los explantes de yema axilar M1, M2 y M4 tienen un 66,6% de regeneración.

1.2.- CONTAMINACIÓN A LOS 32 DÍAS

TABLA 6.- PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN

TRA/REP	I	II	III	S	X
E1M1	100%	100%	66,6%	266,6	88,8
E1M2	33,3%	66,6%	33,3%	133,2	44,4
E1M3	66,6%	0,0%	100%	166,6	55,5
E1M4	66,6%	66,6%	0,0%	133,2	44,4
E2M1	100%	100%	100%	300	100%
E2M2	100%	100%	100%	300	100%
E2M3	100%	100%	100%	300	100%
E2M4	100%	100%	100%	300	100%
S	666,5	633,2	599,9	1899,6	

En la tabla 6 se puede observar los resultados del % de explantes que se contaminaron donde en lo explantes de yemas terminales el tratamiento E1M2 y E1M4 tienen un porcentaje mínimo de 44,4% y el tratamiento E1M1 tiene un porcentaje de 88,8% mientras que en las yemas axilares se presentó un 100% de contaminación en los cuatro tratamientos.

TABLA 7.- INTERACCIÓN EXPLANTE/MEDIO

E/M	M0	M1	M2	M2	S	X
E1	266,6	133,2	166,6	133,2	699,6	174,7
E2	300	300	300	300	1200	300
S	566,6	433,2	466,6	433,2	1899,6	

Tabla de interacción de datos de medias entre explante y medio de cultivo para el cálculo de los factores.

TABLA 8.- ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

FV	GL	SC	CM	FC	FT5%	FT1%
TOTAL	23	24042,3	-	-	-	-
TRATA	7	14418,6	2059,8	3,1	2,77	4,28
REPLI	2	277,3	138,7	0,2	3,74	6,51
FACTOR E	1	10433,4	10433,4	15,6*	4,60	8,86
FACTOR M	3	1992,3	664,1	0,9	3,34	5,56
INTER E/M	3	1992,9	221,4	6,4	3,34	5,56
ERROR	14	9346,4	667,6	-	-	-

De los explantes que se contaminaron a los 32 días en cuatro medios de cultivo se pudo observar diferencia significativa en el factor explante para esto se realizará la prueba de tukey para determinar que explante se contaminó más.

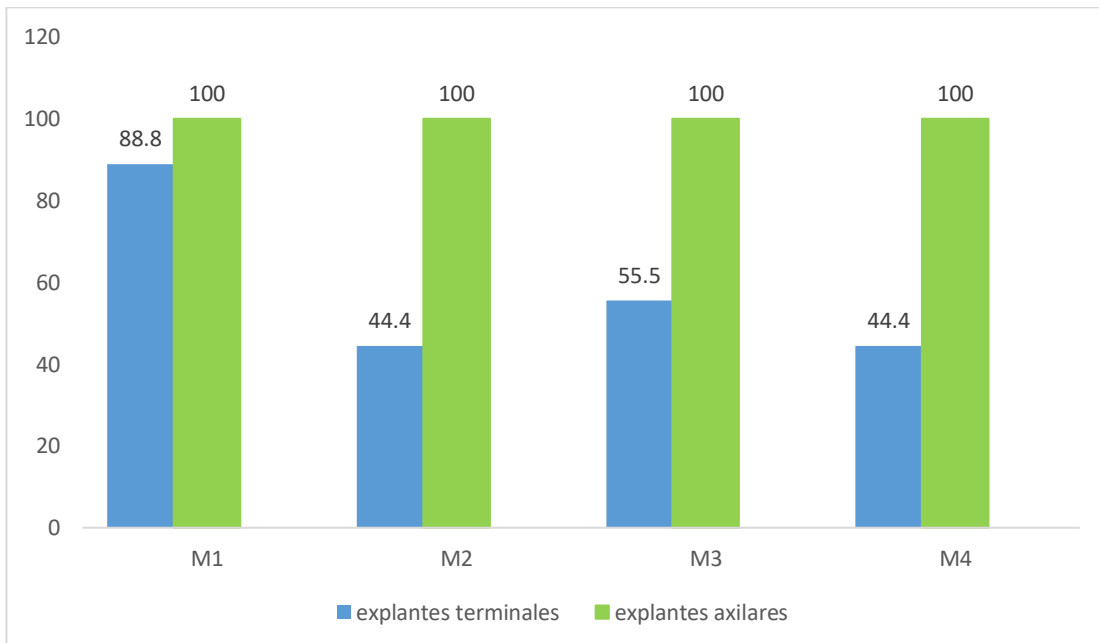
PRUEBA DE MEDIAS TUKEY

Para la prueba de tukey se lo realizara con las medias de la tabla de interacción explante/medio de cultivo.

Factor	Media	Agrupamiento
E2	300	a
E1	147	b

Según la prueba de tukey se pudo determinar de acuerdo a la media mayor que el factor explante con más porcentaje de contaminación a los 32 días es el factor E2 llegando al 100% en contaminación en los cuatro medios de cultivo.

GRÁFICA 2.- PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN



En la gráfica 2 se puede observar que en los explantes de yemas axilares todos tienen un 100% de contaminación mientras que en los explantes de yemas terminales la contaminación mínima es de 44,4% en M2 y M4 y la más alta es de 88,8% en M1.

1.3.- NÚMERO DE YEMAS EN EL BROTE A LOS 32 DÍAS

TABLA 9.- NÚMERO DE YEMAS EN EL BROTE

	I	II	III	S	X
E1M1	2	4	4	10	3,3
E1M2	6	4	6	16	5,3
E1M3	6	2	4	12	4
E1M4	4	4	2	10	3,3
S	18	14	16	48	

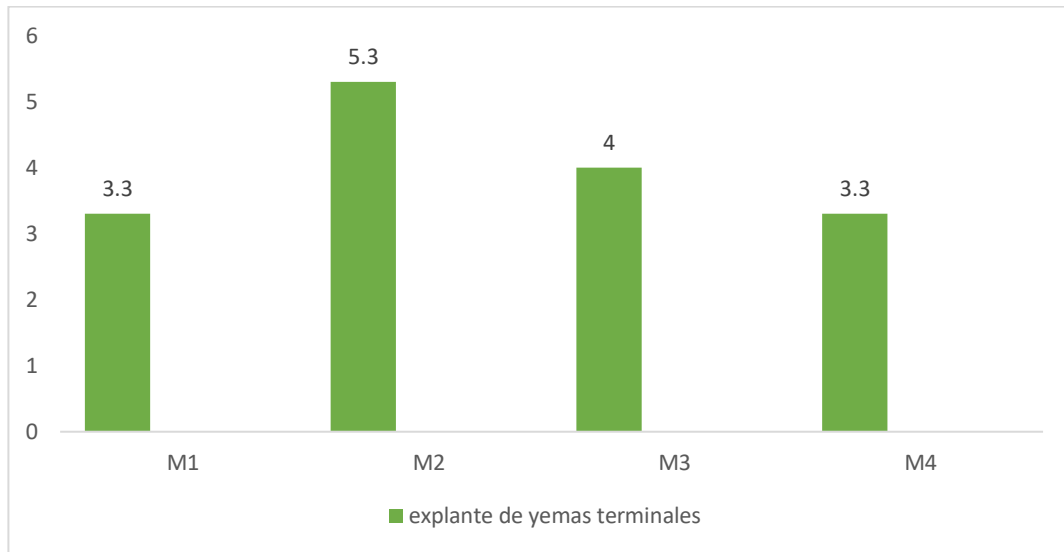
En la tabla 9 se puede observar el número de yemas en el brote en explantes terminales a los 32 días siendo el tratamiento E1M2 con un promedio más alto del número de yemas en el brote con una media de 5,3 y los tratamientos E1M1 y E1M4 con el mínimo promedio de 3,3.

TABLA 10.- ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

FV	GL	SC	CM	FC	FT5%	FT1%
TOTAL	11	24	-	-	-	-
TRAT	3	8	2,7	1,4	3,71	6,55
ERROR	8	16	2	-	-	-

Los resultados obtenidos en el ANOVA en número de yemas en el brote no tuvieron diferencia significativa entre los tratamientos de cuatro medios de cultivo con distintas concentraciones de BAP.

GRÁFICA 3.- NÚMERO DE YEMAS EN EL BROTE



En esta gráfica 3 se puede observar que el mayor número de yemas en el brote en yemas terminales está en el M2 con 5,3 mientras que el más bajo se encuentra en M1 y M4 con un 3,3.

1.4.-TAMAÑO DEL BROTE A LOS 32 DÍAS EN CM

TABLA 11.- TAMAÑO DEL BROTE EN CM

	I	II	III	S	X
E1M1	1,5	2	1,5	5	1,7
E1M2	1,5	2,5	2,5	6,5	2,2
E1M3	1	1,5	1,5	4	1,3
E1M4	1	1	1,5	3,5	1,7
S	5	7	7	19	

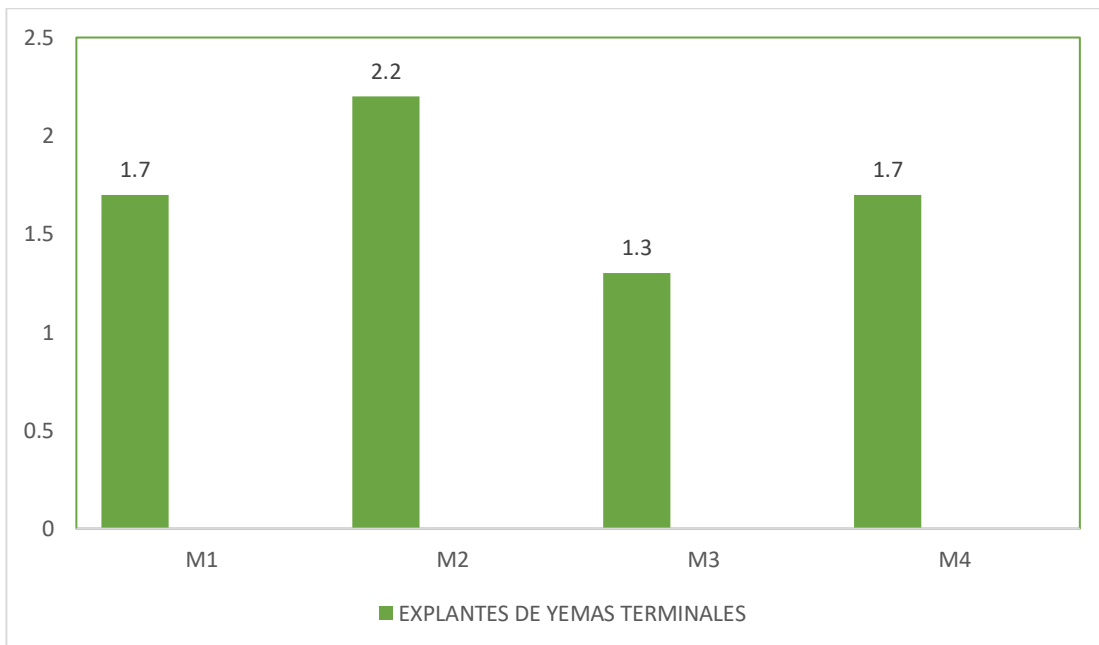
En la tabla 11 se puede observar el resultado del tamaño de los brotes en los explantes de yemas apicales en el tratamiento E1M2 tiene un promedio de 2,2cm siendo el más alto de todos los tratamientos y el tratamiento E1M3 tiene un promedio de 1,3cm siendo este el más bajo de todos los tratamientos.

TABLA 12.- ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

FV	GL	SC	CM	FC	FT5%	FT1%
TOTAL	11	2.9	-	-	-	-
TRAT	3	1,7	0.6	3	3,71	6,55
ERROR	8	1,2	0,2	-	-	-

En ANOVA de la variable tamaño de yemas en cm de yemas terminales a los 32 días no se encontró diferencia significativa teniendo todos los mismos comportamientos en los tratamientos con cuatro medios de cultivo con distintas concentraciones de BAP.

GRÁFICA 4.- TAMAÑO DEL BROTE EN CM



En esta gráfica 4 se puede observar que en los explantes de yemas terminales el tamaño del brote en cm es de 2,2cm el más grande en el tratamiento M2 y el más pequeño es de 1,3cm en el tratamiento M3.

1.1.1.-ENSAYO N°2

Se realizará un segundo ensayo solamente con yemas terminales ya que las yemas axilares no dieron resultado en el primer ensayo.

El segundo ensayo se realizó el día 8 de febrero con la esterilización del material.

El día 9 de febrero se realizó la preparación del medio de cultivo de la siguiente manera:

TABLA 13.- PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO ENSAYO 2

	Medio	400ml
1	ms	1,73gr
2	Mío inositol	4ml
3	azúcar	12gr
4	Enrazar a	400ml

Dividir:

	A	B	C	D
	100ml	100ml	100ml	100ml
BAP	0	0,1mg/L	0,3mg/L	0,5mg/L
	0	0,01mg/200ml	0,03mg/200ml	0,5mg/200ml
PH	5,7	5,7	5,7	5,7
AGAR	0,7	0,7	0,7	0,7

Una vez preparado el medio de cultivo se procedió a esterilizar en la autoclave a una temperatura de 125°C durante 25 minutos.

El día 10 de enero se realizó la siembra de las yemas terminales en la cámara de flujo laminar tomando todos los cuidados de asepsia correspondiente, se empezó seleccionando los explantes de yemas apicales y yemas axilares para después desinfectarlo en alcohol al 70% e hipoclorito de sodio para evitar que en el medio de cultivo de cultivo crezcan hongos y bacterias material vegetal para después introducirlos en los medios de cultivos estériles.

1.1.2.-REGENERACIÓN A LOS 12 DÍAS

TABLA 14.- PORCENTAJE DE REGENERACIÓN

	I	II	III	S	X
M1	66,6%	100%	100%	266,6	88,8
M2	100%	100%	100%	300	100
M3	100%	66,6%	100%	266,6	88,8
M4	100%	66,6%	66,6%	233,2	77,7
S	366,6	333,2	366,6	1066,4	

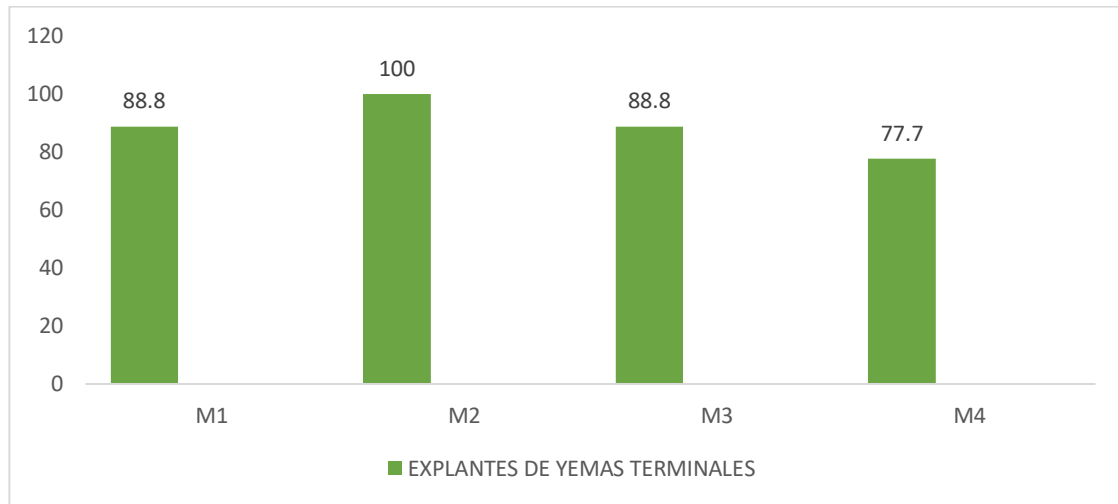
En la tabla 14 se puede observar los datos del porcentaje de regeneración en el ensayo número dos siendo el tratamiento M2 con un 100% de regeneración y el tratamiento M4 con un 77,7% siendo éste el porcentaje más bajo de todos los tratamientos.

TABLA 15.- ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

FV	GL	SC	CM	FC	FT5%	FT1%
TOTAL	11	2,7	-	-	-	-
TRAT	3	0,7	0,2	0,7	3,71	6,55
ERROR	8	2	0,3	-	-	-

Analizando el cuadro, Fc es menor que la Ft al 5% por lo tanto en el porcentaje de explantes que reaccionaron no se encuentra diferencia significativa entre los tratamientos siendo todos del mismo comportamiento en los cuatro medios de cultivo.

GRÁFICA 5.- PORCENTAJE DE REGENERACIÓN



En la gráfica 5 se puede observar que en el segundo ensayo en el porcentaje de regeneración el tratamiento M2 tiene un 100% de regeneración y el tratamiento M4 tiene un 77,7% siendo este el más bajo de todos los tratamientos.

1.1.3.-CONTAMINACIÓN A LOS 12 DÍAS

TABLA 16.- PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN

	I	II	III	S	X
M1	33,3%	66,6%	33,3%	133,2	44,4
M2	100%	33,3%	33,3%	166,6	55,5
M3	33,3%	33,3%	66,6%	133,2	44,4
M4	66,6%	66,6%	66,6%	199,8	66,6
S	233,2	199,8	199,8	632,8	

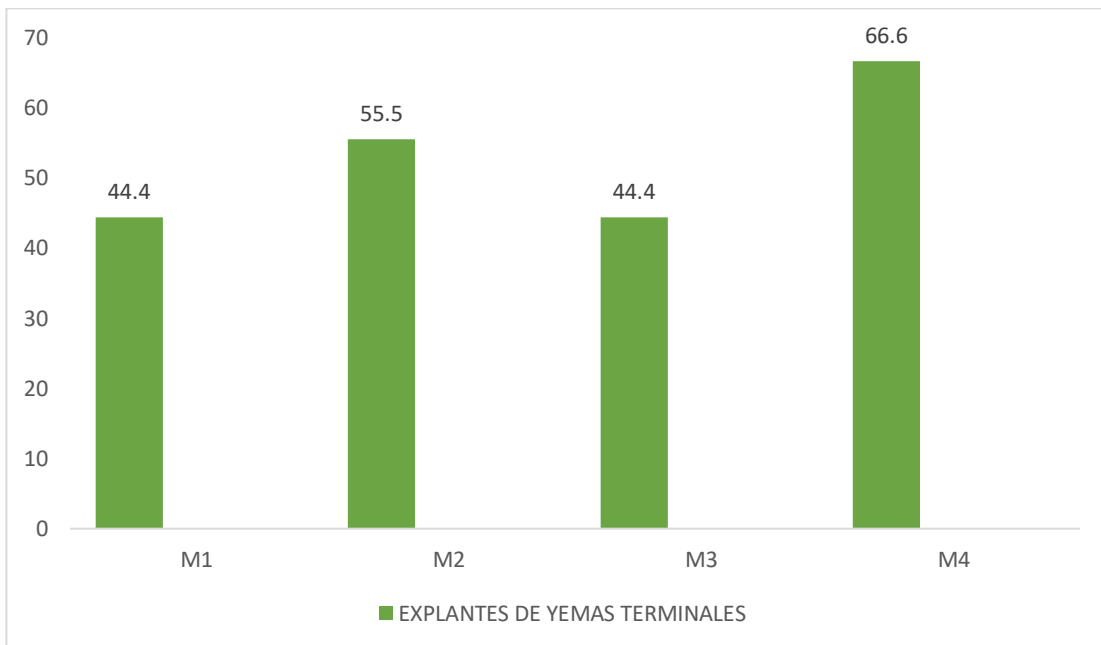
En la tabla 16 se muestran resultados del porcentaje de contaminación del segundo ensayo de explantes de yemas apicales en los tratamientos M1 y M3 con un porcentaje mínimo de 44,4% y en el tratamiento M4 con un 66,6% siendo este el porcentaje más alto de contaminación.

TABLA 17.- ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

FV	GL	SC	CM	FC	FT5%	FT1%
TOTAL	11	5461,4	-	-	-	-
TRAT	3	1016,9	338,9	0,6	3,71	6,55
ERROR	8	4444,5	555,6	-	-	-

Analizando la interpretación de los datos Fc es menor a Ft 5% por lo tanto en el porcentaje de explantes que se contaminaron no se encontró diferencia significativa en los tratamientos en los cuatro medios de cultivo comportándose todos de igual manera.

GRÁFICA 6.- PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN



En la gráfica 6 se puede observar en el segundo ensayo el porcentaje de contaminación más alto está en el tratamiento M4 con un 66,6% y la más baja está en los tratamientos M1 y M3 con un porcentaje de 44,4%.

1.1.4.-NÚMERO DE YEMAS EN EL BROTE A LOS 30 DÍAS

TABLA 18.- NÚMERO DE YEMAS EN EL BROTE

	I	II	III	S	X
M1	2	4	4	10	3,3
M2	4	6	4	14	4,7
M3	4	2	2	10	3,3
M4	2	4	4	10	3,3
S	12	16	16	44	

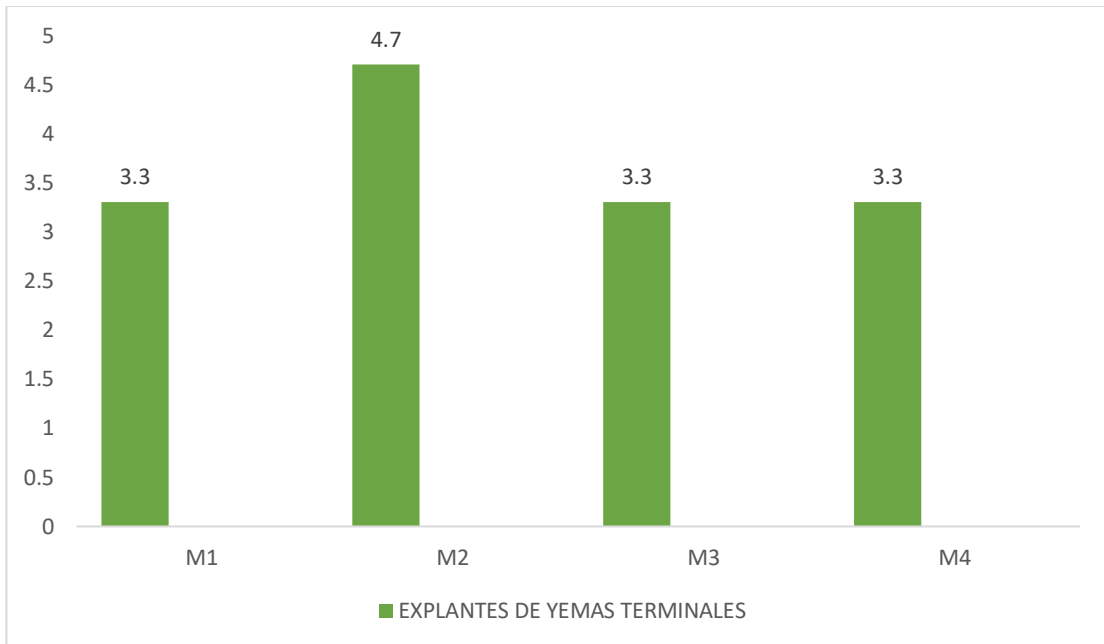
En la tabla 18 se muestran los resultados del número de yemas de los explantes de yemas terminales siendo el tratamiento M2 con un promedio de 4,7 y los tratamientos M1, M3 y M4 con un promedio de 3,3.

TABLA 19.- ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

FV	GL	SC	CM	FC	FT5%	FT1%
TOTAL	11	14,7	-	-	-	-
TRAT	3	4,03	1,3	1	3,71	6,55
ERROR	8	10,7	1,3	-	-	-

Tomando en cuenta que la Fc es menor a Ft 5% entonces no hay diferencia significativa en los tratamientos en el número de yemas siendo de igual comportamiento en los cuatro medios de cultivo con distintas concentraciones de BAP.

GRÁFICA 7.- NÚMERO DE YEMAS EN EL BROTE



Según la gráfica 7 en el segundo ensayo en el número de yemas en el brote se puede observar que el tratamiento M2 es el más alto con un promedio de 4,7 y los tratamientos M1, M3 y M4 con un promedio de 3,3 yemas en el brote.

1.1.5.-TAMAÑO DEL BROTE A LOS 30 DÍAS EN CM

TABLA 20.- TAMAÑO DEL BROTE EN CM

	I	II	III	S	X
M1	1	2	1,5	4,5	1,5
M2	1,5	1,5	2	5	1,7
M3	2	1	1	4	1,3
M4	1	1	1,5	3,5	1,2
S	5,5	5,5	6	17	

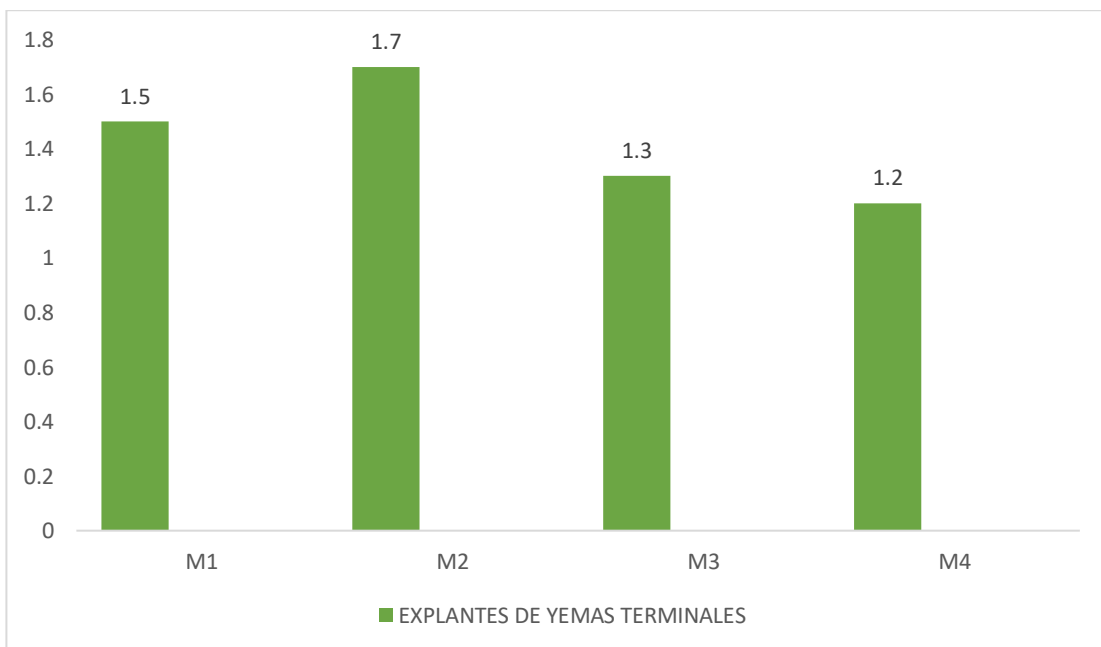
En la tabla 20 se observa los datos del tamaño de las yemas terminales en cm siendo el tratamiento M2 con un promedio de 1,7cm siendo éste el más alto seguido del tratamiento M1 con 1,5cm y el tratamiento M4 con 1,2cm siendo éste el más bajo de todos los tratamientos.

TABLA 21.- ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

FV	GL	SC	CM	FC	FT5%	FT1%
TOTAL	11	1,9	-	-	-	-
TRAT	3	0,5	0,2	1	3,71	6,55
ERROR	8	1,4	0,2	-	-	-

Tomando en cuenta la interpretación de ANOVA, la Fc es menor a Ft 5% por lo tanto no hay diferencia significativa entre los tratamientos siendo todos del mismo comportamiento en los cuatro medios de cultivo con distintas concentraciones de BAP.

GRÁFICA 8.- TAMAÑO DEL BROTE EN CM



Según la gráfica 8 se puede observar que en el segundo ensayo en el tamaño del brote en cm el tratamiento M2 tiene un promedio de 1,7cm siendo éste el más alto y el tratamiento M4 tiene un promedio de 1,2cm siendo éste el más bajo de todos los tratamientos.

CAPÍTULO IV
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1.- CONCLUSIONES

Se realizó dos ensayos, el primer ensayo fue bifactorial con 8 tratamientos la interacción de dos tipos de explantes terminales y axilares y cuatro medios de cultivo, el segundo ensayo se realizó solamente con explantes de yemas terminales con 4 tratamientos.

De acuerdo a los resultados obtenidos al probar cuatro medios de cultivo en el establecimiento de cultivo in vitro M1, M2, M3 y M4 con distintas concentraciones de BAP se determinó que no hay diferencia entre los medios por lo tanto se puede utilizar cualquiera.

En el primer ensayo se presentó una regeneración de 100% en el tratamiento E1M1 y E1M2 y un mínimo de 77,7% en el tratamiento E1M3 en los explantes de yemas terminales y en las yemas axilares se presentó un 66,6% en los tratamientos E2M1, E2M1 y E2M4, y un mínimo de 55,5% en el tratamiento E2M3.

En el segundo ensayo de regeneración se hizo solamente con explantes de yemas terminales y presentó una regeneración de 100% en el tratamiento M2 y un mínimo de 77,7% en el tratamiento M4.

En el porcentaje de contaminación en el primer ensayo presentó una contaminación de 88,8% en el tratamiento E1M1 y una contaminación mínima de 44,4% en los tratamientos E1M2 y E1M4 en las yemas terminales y en las yemas axilares presento un 100% de contaminación en los cuatro tratamientos a posible causa de la descomposición de la parte del resto de hojas de las yemas axilares.

En el segundo ensayo en el porcentaje de contaminación presentó un 66,6% en el tratamiento M4 y un mínimo de 44,4% en los tratamientos M1 y M3.

En el número de yemas en el brote en el primer ensayo se obtuvo un resultado de 5,3 en el tratamiento E1M2 y un mínimo de 3,3 en los tratamientos E1M1 y E1M4.

En el segundo ensayo se obtuvo un resultado de 4,7 en el tratamiento M2 y un mínimo de 3,3 en los tratamientos M1, M3 y M4.

En el primer ensayo en el tamaño del brote en cm se obtuvo un resultado de 2,2cm en el tratamiento E1M2 y un mínimo de 1,3cm en el tratamiento E1M3.

En el tamaño del brote en cm presentó un resultado de 1,7cm en el tratamiento M2 y un mínimo de 1,2cm en el tratamiento M4.

Al evaluar el comportamiento de los explantes de yemas axilares y yemas terminales en los diferentes medios de cultivo se determinó que las yemas axilares no son óptimas para el establecimiento de cultivo in vitro ya que dieron un 100% de contaminación en los cuatro tratamientos y no mostraron resultados en su crecimiento siendo mejor las yemas terminales ya que dieron más bajo porcentaje de contaminación de 44,4% y mostraron mejores resultados en el porcentaje de regeneración se tuvo un 100% en los tratamientos M1 y M2.

Se puede determinar que se puede utilizar cualquier medio que se probó con sus respectivas concentraciones de fitohormonas de BAP el M1 sin BAP, M2 BAP 0,1mg/l, M3 BAP 0,3mg/l M4 BAP 0,5mg/l en la fase de establecimiento del cultivo in vitro.

Realizando los análisis a cada ensayo se puede deducir que la hipótesis planteada es nula, los tratamientos no presentan diferencia significativa.

2.-RECOMENDACIONES

_Se recomienda seguir sistemática y rigurosamente el protocolo de asepsia para evitar problemas de contaminación en la fase de establecimientos

_De acuerdo a los resultados en la fase de establecimiento no es recomendable la propagación con yemas laterales por su rápida contaminación a causa de la descomposición de los restos de hoja.

_Se recomienda usar plantas madres sanas y libres de contaminación.

_ Se recomienda tener mayor capacitación en el área de cultivo in vitro, puesto que es una técnica que puede fortalecer de alguna manera las necesidades del agro.