

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente el género *Chrysanthemum* comprende unas 30 especies originarias de Asia y nordeste de Europa, existen 120 países productores globales siendo los mayores productores: Holanda, Ecuador, México, Brasil, Costa Rica, Kenia, Tailandia, Taiwán, Israel y Zimbawe entre otros. Holanda es el centro de las transacciones y el mayor accionista, con 52.3% en cuanto en producción y exportación con un valor de su producción de 2000 millones de dólares, seguido por Colombia, con valor de sus exportaciones de 600 millones de dólares.

La floricultura es una de las actividades agrícolas con mayor rentabilidad en Bolivia y el país tiene la capacidad de abastecer el mercado interno. La producción de crisantemo es una actividad que se ha implementado en los últimos 15 años, alcanzando un mayor desarrollo en el departamento de Cochabamba considerado como el principal proveedor de esta flor de corte a nivel nacional seguido de Chuquisaca, Tarija y La Paz.

En el departamento de Tarija la producción de dicha flor ha crecido considerablemente debido al aumento de la demanda la cual se incrementa día a día, el crisantemo se encuentra dentro de las flores de corte preferidas por la población tarijeña entre las principales regiones productoras de Crisantemo en Tarija tenemos a: Calamuchita, Tolomosa, San Andrés, Coímata, La Victoria y Erquiz que son los proveedores del mercado interno, sin embargo los volúmenes de producción son bajos. Las falencias de los productores en Tarija los floricultores no producen sus propios plantines, adquiriéndolos a costos elevados del país vecino Argentina.

En la producción de flores y plantas ornamentales la micropropagación por técnicas como cultivo in vitro es uno de los métodos más importantes para la regeneración, de plantas libres de enfermedades fúngicas con el objetivo de mejorar la calidad y producción de las mismas. Las especies utilizadas para ese fin pueden ser herbáceas ó arbustivas y son propagadas tradicionalmente por vía vegetativa.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Después de la rosa, el crisantemo sigue siendo la flor cortada más vendida en el mundo. El blanco es el color más vendido y preferido por la población con una participación en el mercado del 40%; en segundo lugar están los crisantemos amarillos 31% seguidos por los violetas con el 11%.

La importancia del presente trabajo de investigación es probar las concentraciones adecuadas de las fitohormonas en la fase de establecimiento *in vitro* para que sea un avance en la investigación de la obtención de la plantas madres de crisantemo (*Chrysanthemum sp.*) ya que se ve la necesidad de incrementar la producción de plantas madres libres de plagas y enfermedades que es una necesidad para los floricultores.

Por lo tanto el trabajo de investigación consiste precisamente en realizar el establecimiento *in vitro* el plantas madres de crisantemo y la regeneración *in vitro* de las mismas realizando la limpieza de plagas y enfermedades ya que la calidad de la flor de crisantemo son muy importantes para la apreciación de la población para que posteriormente los productores obtengan sus plantines mediante la multiplicación por esquejes para su beneficio, y así hacer de ellos, productores, competitivos y capaces de generar mayores y mejores ingresos, permitiéndoles mejorar notablemente sus condiciones actuales de vida, además de lograr una producción local de manera constante durante todo el año, mejorando la calidad y durabilidad de flor de corte.

1.3. HIPÓTESIS

Las diferentes concentraciones de fitohormonas empleadas en el cultivo *in vitro*, incrementan la regeneración del crisantemo.

1.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La problemática surge como consecuencia de la utilización de los métodos de multiplicación tradicional (división de matas y/o esquejado) obteniendo esquejes de plantas madres, plantas que se encuentran contaminadas por enfermedades sistémicas (virus mosaico de la alfalfa) y plagas (nematodos) que son transmitidos de generación

en generación , una de las principales falencias en la producción es la obtención del material genético, el cual no se encuentran fácilmente a disposición del productor viéndose obligados a adquirirlos del exterior del país o en algunos casos de la Argentina a costos más elevados. El trabajo de establecimiento in vitro se realiza en laboratorio en condiciones controladas y por ende la multiplicación de plantines esto se puede realizar en las distintas variedades de crisantemo como:

- Sembla Blanco.
- Calabria Amarillo.
- Redpin Bronze, etc.

En otros casos los mismos floricultores producen sus propios plantines pero las condiciones que no son adecuados.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. OBJETIVO GENERAL

- Probar la efectividad de cuatro concentraciones de fitohormonas en la fase de establecimiento a través de segmentos nodales de dos variedades de crisantemos.

1.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar el grado de contaminación en cada uno de los tratamientos.
- Evaluar el porcentaje de regeneración en cada tratamiento.
- Medir el tamaño de brote de cada unidad experimental de los tratamientos.
- Verificar el número total de brotes y yemas desarrolladas en cada tratamiento.
- Determinar el efecto de la interacción fitohormonas por variedad en el cultivo de crisantemo.

CAPÍTULO II.

MARCO TEÓRICO

2.1. LA BIOTECNOLOGÍA

La biotecnología es una nueva alternativa que está relacionada con el crecimiento de la población mundial, la pobreza, el desempleo creciente, la asistencia médica y los cambios climáticos globales que limitan las cosechas. La biotecnología vegetal es una herramienta que nos ayuda a obtener mayor rendimiento de los cultivos a través de técnicas de cultivo in vitro, que puede garantizar seguridad y soberanía alimentaria.

Los resultados alcanzados en el desarrollo de las investigaciones biotecnológicas han demostrado que estas nuevas herramientas ofrecen oportunidades para elevar la producción agrícola y mejorar el nivel de vida de los agricultores, obteniendo plantas garantizadas con alta calidad genética y especialmente libre de patógenos contaminantes (**Espinoza, 2013**).

El cultivo de tejidos vegetales es una importante técnica relativamente nueva. Optimización de Medios de Cultivo en la Fase de Multiplicación In Vitro que permite la multiplicación rápida de plantas sanas y la producción libre de virus. Durante los últimos 40 años, la población mundial casi se ha duplicado mientras que la cantidad de terreno disponible para la agricultura ha aumentado solamente 10 por ciento. De hecho, la producción mundial de alimentos por persona ha aumentado un 25 por ciento (Thieman & Palladino, 2016). La técnica de cultivos in vitro es la vía para la obtención de semillas prebásicas con una potencialidad y aprovechamiento en la producción y consumo.

Por su parte, la biotecnología moderna nace con el descubrimiento de la estructura del ADN en 1953 y se consolida en los años 70 con la llegada de la ingeniería genética. El avance en esta disciplina permitió la transferencia de genes de un organismo a otro para introducir características específicas. Este proceso también fue definido internacionalmente por la Convención de Diversidad Biológica, mediante protocolo, (INIAF, 2014).

2.2. La biotecnología agrícola

Las principales características de los cultivos biotecnológicos que se encuentran actualmente en el mercado son: la tolerancia a insectos y tolerancia a herbicidas, en cultivos como soya, algodón, maíz y canola; la tolerancia a estrés hídrico (sequía) en maíz y soya; la modificación de color en claveles y rosas; y la resistencia a virus en papaya y frijón.

Se espera que en los próximos 10 años, se liberen al mercado semillas biotecnológicas que se encuentran en proceso de investigación y desarrollo y que serán de utilidad para enfrentar el cambio climático: maíz, soya, algodón y arroz que hacen un mejor uso del nitrógeno, toleran las sequías y tienen un mayor rendimiento.

2.3. Aspectos generales sobre Biotecnología Vegetal

La biotecnología vegetal considerada como el área de la ciencia y la tecnología que utiliza organismos vivos o algunas partes constituyentes para generar organismos modificados o productos derivados con utilidad clínica, alimentaria o industrial (Espinoza, 2013).

El cultivo in vitro es considerado sinónimo de “Cultivo de tejidos” siendo una herramienta de la biotecnología que permite el uso de un conjunto de técnicas que establecen el cultivo en condiciones asépticas, usando como material de partida, órganos, tejidos, células, etc. Empleando medios nutritivos artificiales (Espinoza, 2013).

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta para la investigación, multiplicación y mejoramiento de las plantas, en relación con otras áreas como la fisiología, bioquímica, morfogénesis, anatomía y otras así como contribuciones prácticas en la multiplicación y mejoramiento de plantas (Murillo, 2014).

Los transgénicos además de ser estudiados para probar su inocuidad o seguridad al consumidor, también han sido evaluados para garantizar que no dañen el medio

ambiente. La biotecnología es una herramienta clave para el desarrollo de la agricultura sostenible.

Algunas de las ventajas medioambientales que brindan los cultivos transgénicos son:

- Los cultivos transgénicos que son resistentes a herbicidas facilitan la adopción de sistemas de producción con labranza mínima. Esto contribuye a la reducción de la erosión, la emisión de gases efecto invernadero, mejora la humedad del suelo y aumenta el almacenamiento de carbono.
- Los cultivos transgénicos en general han reducido la huella ecológica que produce la agricultura, por la disminución en la aplicación de plaguicidas, por una mayor eficiencia en el uso del agua y los mejores rendimientos de las cosechas. Igualmente reducen la emisión de CO₂ por una disminución en el uso de combustibles fósiles.

El Banco Mundial y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) coinciden en que el acceso a nuevas tecnologías por parte de los agricultores es una condición para aumentar la productividad y mejorar la calidad de vida rural. Ya se ha probado que los cultivos biotecnológicos extensivos como el maíz, el algodón, la soya y la canola han incrementado la productividad agrícola y los ingresos de los agricultores, (APIA, 2015).

2.4. Beneficios de la biotecnología agrícola

Los cultivos biotecnológicos o genéticamente modificados han beneficiado a los agricultores y consumidores a lo largo de su implementación desde 1996:

- Ayudan a los agricultores a enfrentar los desafíos del cambio climático. (También puedes leer: Innovación y Biotecnología para el Cambio Climático)
- Se obtienen cosechas de mejor calidad al aumentar la tolerancia de los cultivos a los insectos y/o herbicidas.
- Ayudan a producir más en menor terreno, lo cual aporta para disminuir la huella ambiental de la agricultura.

- Se reducen las emisiones de carbono y la erosión del suelo al implementar prácticas como la siembra directa.
- Brindan al consumidor la posibilidad de tener una mejor experiencia con el producto y de obtener mayor contenido nutricional con productos como las papas con resistencia a las magulladuras y a la oxidación, las manzanas que no se oxidan o el arroz dorado con el beneficio adicional de betacaroteno en el grano. (También puedes leer: La tarea titánica de alimentarnos con el apoyo de la biotecnología tradicional y moderna), (APIA, 2015).

2.5. Cultivo de ápices y meristemas

Los meristemas son grupos de células en estado juvenil con capacidad para dividirse constantemente, los cuales son utilizados esencialmente para la producción de plantas libres de patógenos. La carencia de vías de conducción de virus y viroides en estos tejidos permite lograr la sanidad de las plántulas. La técnica del cultivo de meristemas consiste en la disección e incubación del meristemo apical de una planta en condiciones de asepsia. Se considera meristemo en sentido estricto al domo meristemático del ápice o bien el domo meristemática con uno o dos primordios foliares (Perea & Tirado, 2011). La técnica del cultivo de meristemo es empleada para la obtención de plantas libres de patógenos, microorganismos como virus, bacterias, micro plasmas y otros en los tejidos de la planta infectada (Espinoza, 2013). Esta técnica consiste en aislar el meristema y sembrarlo en un medio de cultivo adecuado que posibilite el desarrollo de una planta completa, (Aguirre & Morante, 2018).

2.6. MORFOLOGÍA DEL CRISANTEMO

Según (Barrera, A, 2007) la planta del crisantemo por lo general es perenne, con hojas de bordes ondulados de color variable entre verde claro y oscuro recubiertas de un polvillo blanquecino que le da un aspecto grisáceo y casi siempre aromáticas.

El género *chrysanthemum* pertenece a la familia de las Asteraceae y es una de las flores más antiguas cultivadas, es una planta perenne, aromática y sub-leñosa en la base.

El crisantemo se cultiva como planta en maceta o para flor de corte, en ambos casos se pueden distinguir dos tipos de cultivo:

2.6.1. Cultivo tradicional: Floración natural de octubre-noviembre.

2.6.2. Cultivo forzado o dirigido: Floración forzada o provocada a lo largo de todo el año manejando el fotoperiodo, ya que se obliga a florecer a la planta en cualquier época del año.

2.6.3. Altura

La planta mide entre 0,50-1,50mts según la variedad.

2.6.4. Raíces

Pivotante, gruesa, con numerosas raíces secundarias finas y muy ramificadas.

2.6.5. Tallo

El tallo es erecto, liso o con poco pubescente, ramificado 2-3 veces en determinados entrenudos, a partir del primero por encima de los 20 cm, dando lugar a nuevos tallos, por “piso”, en ángulo de 45°, que con frecuencia alcanzan en longitud al principal. (www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_del_crisantemo.asp, 2015).

2.6.6. Hoja

Hojas alternas, de color verde-grisáceo, lobadas, lanceoladas a ovadas, 4-9 (-12)cm de largo y 4-6cm de ancho, los segmentos enteros a gruesamente dentados, haz glabra, envés piloso con tricomas; (polvillo blanquecino) que le da un aspecto grisáceo y casi siempre aromáticas, peciolo hasta 4cm de largo, con 2 segmentos auriculados en la base. (www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_del_crisantemo.asp, 2015).

2.6.7. Fruto

Aquenio: cilíndricos de 1-1,5mm de largo.

2.6.8. Semilla

Las semillas son pequeñas, delgadas, alargadas y de color marrón.

2.6.9. Flores

Lo que se conoce por flor en realidad, es una inflorescencia en capitulo, siendo la pieza floral, verdaderamente decorativa, la lígula correspondiente a la flor femenina.

Las verdaderas flores se encuentran en el corazón y son hermafroditas. (www.inta.gob.ar).

Existen diversos tipos de capítulos cultivados comercialmente, aunque, en general, estas inflorescencia. (www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_del_crisantemo.asp, 2015).

2.7. CLASIFICACIÓN SEGÚN SU FORMA DE INFLORESCENCIAS

2.7.1. Sencillas o “margaritas”: tipo margarita. Compuestas de una o dos hileras de flores radiales y con flores hermafroditas centrales.

2.7.2. Anémonas: similares a las sencillas, pero con flores concéntricas tubulares y alargadas. El color de las flores radiales y concéntricas puede ser el mismo o no.

2.7.3. Recurvadas: en forma globular, con las flores radiales recurvadas hacia dentro.

2.7.4. Reflejas: en forma redondeada con las flores radiales doblándose hacia afuera y hacia abajo las flores radiales se incurvan y son tubulares, excepto en el caso de la cuchara.

2.7.5. Pompones: en forma globular, constituidos por flores radiales cortas y uniformes. No presenta flores concéntricas

2.7.6. Decorativas: similares a los pompones, ya que se componen principalmente de flores radiales, aunque las hileras exteriores son más largas que las centrales dando a

la inflorescencia la apariencia de una forma plana e irregular. Los tamaños son en su mayoría de intermedios a planos.

2.7.7. Flores grandes: Son mayores de 10 centímetros y se clasifican de muchas formas. Las flores concéntricas no se presentan en la mayoría de estas formas:

2.7.8. Incurvada doble: Con curva doble hacia dentro; redonda y clásica, con flores radiales similares en tamaño a las flores concéntricas curvadas hacia dentro y hacia la parte superior.

2.7.9. Reflejada doble: Menos clásica y redonda que la curvatura doble hacia dentro, con flores radiales sobre puestas curvadas hacia abajo, excepto por las flores radiales.

fitosofia.blogspot.com/2015/03/crisantemo-primera-parte.html

2.8. TIPOS DE FLORACIÓN COMERCIAL

Según (Barrera A, 2007) clasifica dos tipos de formaciones de floración.

2.8.1. Las formaciones tipo "estándar" o una flor por tallo, la central, se obtienen cuando se eliminan todos los botones florales laterales, dejando que se desarrolle una inflorescencia central por tallo, como sucede en Crisantemo para corte.

2.8.2. Las formaciones tipo "spray" se obtienen cuando se elimina la inflorescencia terminal, central o principal, en el momento en que el color empieza a aparecer en las flores radiales. Dado que se trata de la inflorescencia más antigua, envejecerá antes que las inflorescencias laterales si no se retira.

En el tallo se puede encontrar pubescencia, el grosor generalmente no rebasa los 1.5 cm de diámetro con excepción de las plantas con mucha edad.

Su raíz es fibrosa típica, de apariencia suave y superficial. Su profundidad no alcanza más allá de los 50 cm.

2.9. CONDICIONES AGROECOLÓGICAS DEL CULTIVO

2.9.1. Temperatura

El equilibrio entre la calidad y cantidad de crisantemos producidos, se logra conociendo el rango de temperaturas apropiadas para cada variedad, por lo que estas deben ser ubicadas adecuadamente en los microclimas para evitar problemas.

Un clima de salida óptimo (durante 2-4 semanas). Temperaturas de 17 a 18°C durante la noche y de 18-20°C durante el día.

Un clima de estabilización (durante un periodo de 5-6 semanas). Temperatura de 16 a 17 °C durante la noche y de 18-20°C durante el día.

Un clima final (durante unas 3 semanas), con una temperatura de 12-13 °C por la noche y de 15 a 16°C durante el día. (Cañete, C 2016).

2.9.2. Humedad relativa

Se requiere una humedad relativamente estable, ya que no soportan temperaturas altas y menor humedad en las raíces.

2.9.3. Luminosidad

El papel de regulador de luz sobre el crecimiento de las plantas se debe a que existe procesos reguladores por la luz e intervienen en el crecimiento de las plantas, principalmente en la fotosíntesis y por ende en la producción de azúcares, cuya acumulación influye directamente en la vida posterior de las flores cortadas. A mayor intensidad de luz aumenta el número de brotaciones y el crecimiento de los tallos es más rápido. (Morisigue D, Mata D, Facciuto, 2012).

2.9.4. Suelo

Requiere suelos moderadamente aireados y livianos, aunque también se requiere suelos que retengan humedad.

Cuando se cultivan crisantemos en el mismo lugar de forma consecutiva debe recurrirse a la desinfección del suelo, ya sea por vapor, o con un tratamiento químico consistente

en la aplicación de un fumigante que controle la mayoría de los patógenos del suelo o a patógenos específicos, tales como *Verticillium albo-atrum*. Antes de la desinfección, se retira el rastrojo del cultivo anterior o se muele finamente y se incorpora al suelo con una cultivadora rotatoria. (Reed, D, 2019)

2.9.5. Clasificación de los cultivares según su respuesta fisiológica

Los cultivares pueden dividirse en dos grupos de acuerdo a su respuesta ante la temperatura de crecimiento y la longitud del día (fotoperiodo). (González A, Bañón S y Fernández J, 2012).

2.9.6. Crisantemos de floración veraniega o temprana: Florecen en respuesta a temperaturas cálidas, mayores o iguales a 15° C, independientemente de la longitud del día (termopositivos). La temperatura de 15° C es la media de las temperaturas diurna y nocturna, con temperaturas diurnas que no excedan los 25° C y nocturnas superiores a 10°C. (González A, Bañón S y Fernandez J, 2012).

Crisantemos de todo el año: Responden al fotoperiodo, concretamente a días cortos, y en menor medida a las temperaturas. Manipulando la longitud del día, pueden obtenerse flores en cualquier época del año. Se subdividen en grupos de respuesta, de acuerdo con el número de semanas necesarias entre la iniciación de la yema floral y la floración real. La mayoría de las flores para corte se obtienen de los cultivares de 10 a 12 semanas. (González A, Bañón S y Fernandez J, 2012).

2.10. CULTIVARES DE CRISANTEMO, CLASIFICADOS POR LA RESPUESTA DE LA FLORACIÓN A LA TEMPERATURA:

A la mayoría de las variedades el exceso de temperatura les retrasa la floración. En relación a la influencia de la temperatura sobre la floración existe una clasificación que las agrupa de la siguiente manera:

2.10.1. Grupo Termoneutral: Variedades a las que las temperaturas entre 10 y 27° C no les influyen prácticamente en la floración. Con valores extremos, altos o bajos, ésta se ve ligeramente frenada. (Di Benedetto, A 2018).

2.10.2. Grupo Termo positivo: Variedades que necesitan temperaturas superiores a 15°C para formar la flor. (Di Benedetto, A 2018).

2.10.3. Grupo Termo negativo: Variedades que ven frenada su floración con temperaturas demasiado elevadas.

Las variaciones de temperatura son nefastas para el cultivo de la planta y el desarrollo de las flores. Se aconseja una temperatura diurna de 16 a 18 °C y una nocturna de 15 a 16 °C para la época de invierno. Temperaturas inferiores a 14°C pueden provocar desde la paralización del crecimiento vegetativo al aborto de los botones florales, (Di Benedetto, A 2018).

2.11. PROPAGACIÓN

Según la revista (Infoagro, 2016). De las plantas madres se seleccionan esquejes de 12 a 15 cm de altura o bien de 4 a 5 cm de largo dependiendo del cultivar y de la época del año con 3 o 4 hojas colocadas en bancadas o sobre bandejas de multiplicación. Los esquejes deben tomarse de plantas sanas, cortándolas o separándolas justo por encima de un nudo. (Ávila, L, y Pereyra, M, 2015).

2.11.1. Por semillas: Las mismas son sembradas en almácigos, para luego ser trasplantadas al lugar definitivo. Generalmente estas semillas se obtienen de viveros especializados. (ABC rural, 2003).

2.11.2. Propagación por esquejes: Esta técnica se debe realizar por medio de esquejes terminales obtenidos a partir de plantas madre seleccionadas por su conformación a la progenie, capacidad de cosecha y vigor. Las plantas madre deben estar mantenidas bajo condiciones de día largo para inhibir la formación de botones florales.

Los esquejes terminales deben ser de 8-10cm de longitud.

Éstos se pueden colocar:

- 1) directamente en el medio de enraizamiento.
- 2) almacenarse a 0-3°C durante unas 6 semanas en cajas de cartón forradas con polietileno (evitar la deshidratación).

En ambos casos, debe aplicarse un fungicida de amplio espectro para prevenir el desarrollo de enfermedades tales como borritas, roya, etc. (Infoagro 2016).

El enraizamiento se lleva a cabo en invernadero y, preferiblemente, en bandejas de propagación. Para favorecer dicho enraizamiento, el extremo basal de los esquejes se deben sumergir en ácido indolbutírico (IBA). (Infoagro 2016).

El sustrato debe ser poroso, pudiendo emplear perlita, vermiculita, arena o mezclas de turba y arena en relación 1:2. El contenido total de sales no debe ser superior a 15meq/litro, siendo especialmente perjudicial un alto porcentaje en sodio (>67%) para las raíces.

En cuanto a las condiciones climáticas del invernadero, la temperatura ambiental debe estar en torno a los 15-18°C y la del medio de enraizamiento a 18-21°C. La nebulización es necesaria cuando el nivel de luz y la temperatura del aire son elevados e incluso se puede recurrir al sombreado. (Infoagro 2016).

Al cabo de 10-20 días, dependiendo de la variedad, se puede efectuar el trasplante. Para garantizar que las plantas estén turgentes y tengan reservas antes de arraigar, se debe aplicar un riego con fertilizantes complejos unos días antes de la plantación. (Infoagro 2016).

2.11.3. División en matas.- Para la separación de las matas, tendrás que levantar la mata de los crisantemos y separar cada tallo con sus correspondientes raíces, haciendo un corte con una tijera. Los brotes que están enraizados podrás plantarlos de manera individual o en grupos de hasta cuatro en macetas, hasta el momento en que alcancen su mayor desarrollo.

2.11.4. Propagación in vitro: Esta técnica consiste en la colocación de explantes en un medio nutritivo y en condiciones estériles. (Infoagro 2016).

2.12. LA PROPAGACIÓN VEGETATIVA *IN VITRO*:

La propagación vegetativa in vitro, también denominada micro propagación, es indiscutiblemente es la aplicación más concreta del cultivo del tejidos y la de mayor

impacto. Consiste en reproducir plantas conforme a la planta madre por la estimulación de capacidades naturales de multiplicación vegetativa de la especie o por la inducción de una nueva organogénesis de brotes y raíces. Los objetivos de la micropropagación son los siguientes:

- Adquisición de una gran velocidad de multiplicación y de propagación de “plantas idénticas” a la planta de inicio.
- Constitución de una colección de pies madres. Las técnicas de cultivo in vitro permiten efectivamente almacenar sobre pequeñas superficies, grandes cantidades de “microplantas” que serán utilizadas como plantas madres.
- Recuperación de especies en vía de extinción.

Este método toma todo su interés en la multiplicación masiva de plantas en condiciones estériles, a partir de plántulas provenientes de meristemas y reconocida como sanas, por lo tanto, salvo de contaminaciones. La tasa de multiplicación es muy elevada, de miles por año, lo que permite lograr al horticultor y a los viveristas un producto de calidad y en gran cantidad en un lapso de tiempo muy corto.

El cultivo in vitro consiste en tomar una porción de una planta (a la que se denominará explante, como por ej. el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristema, embrión, nudo, semilla, antera, etc.) y colocarla en un medio nutritivo estéril (usualmente gelificado, semisólido) donde se regenerarán una o muchas plantas.

La formulación del medio cambia según se quiera obtener un tejido des diferenciado (callo), crecer yemas y raíces, u obtener embriones somáticos para producir semillas artificiales. El éxito en la propagación de una planta dependerá de la posibilidad de expresión de la potencialidad celular total, es decir, que algunas células recuperen su condición meristemática. A tal fin, debe inducirse primero la desdiferenciación y luego la redesferenciación celular. Un proceso de este tipo sucede durante la formación de las raíces adventicias en el enraizamiento de estacas, la formación de yemas adventicias, o cuando se busca la propagación de begonias, violeta africana lograr la respuesta morfogénica deseada es la composición del medio de cultivo.

No existen dudas que en todo intento de propagación vegetal, ya sea in vitro o in vivo, el carácter del proceso de diferenciación depende del genoma de la especie, y que está regulado por el balance hormonal propio y por el estado fisiológico del órgano, tejido o célula puesta en cultivo. Sin embargo, también se sabe que ese balance puede ser modificado por el agregado de compuestos que imiten la acción de las hormonas vegetales. Estos compuestos se denominan reguladores del crecimiento, y se emplean en los medios de cultivo para conseguir la micropropagación de una planta.

La totipotencialidad celular es clave en el desarrollo de plantas genéticamente modificadas o transgénicas. Una vez realizada la transformación, ya sea por *Agrobacterium* o por el método de biobalística, el paso siguiente es el cultivo in vitro, con el fin de obtener, a partir del explante inicial transformado, plántulas que lleven el transgén en todas sus células. (Orozco. 2004).

2.13. ETAPAS DEL CULTIVO IN VITRO:

Se puede establecer cinco etapas generales en el cultivo vegetal, como son:

2.13.1. Fase 1: Establecimiento

El objetivo de esta fase es obtener un cultivo aséptico de la especie que se quiere multiplicar. El establecimiento, incluye la selección previa del explante más adecuado, su desinfección y la siembra en condiciones asépticas en un medio de cultivo. Esta fase termina con la obtención de un cultivo libre de contaminaciones visible y suficientemente adaptada a las condiciones in vitro, de modo que pueda presentar una reacción favorable a la aplicación de fitoreguladores en la fase siguiente (multiplicación). (Gallardo, I y Iturriaga, F, 2008)

2.13.2. Selección del explante

Diversos explantes pueden ser utilizados para iniciar la propagación in vitro de una planta. En la selección de los explantes debe considerarse aspectos como el nivel de diferenciación del tejido utilizado y la finalidad de micropropagación. Teóricamente cualquier tejido puede ser utilizado como explante, en vista de la totipotencia de las células vegetales.

Sin embargo es importante considerar el tipo de explante, la edad fisiológica de la planta madre y el estado sanitario. (Gallardo, I y Iturriaga, F, 2008).

2.13.3. Selección y preparación de la planta madre

Para iniciar el cultivo es necesario iniciar la selección del tipo de explante. Esto se basa principalmente en mantener a las plantas madres en condiciones controladas. En este ambiente las plantas se cultivan en condiciones sanitarias óptimas, controlando la nutrición de las mismas y el riego adecuado para su crecimiento ideal. Tiene como finalidad la obtención de yemas variables, de las cuales se puede incrementar el número de brotes. Las partes más viables para utilizarlas como explante son las yemas axilares, nudos, ápices tallo y hoja.

Desinfección de yemas de la planta o parte que se vaya a utilizar como explante: al ser retirados los explantes de la planta madre, se deberá realizar su desinfección para eliminar contaminantes externos como hongos y bacterias. Una vez desinfectado se colocan en el medio de cultivo en condiciones de asepsia. (Castro, D., Díaz, J.2003).

2.13.4. Composición de la solución madre

Los medios de cultivo están conformados por sustancias minerales (macro y micronutrientes), vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento. Estos medios pueden ser líquidos o tener un soporte sólido. (Rodríguez .C., Sánchez W., Mercado P. 2010).

2.13.5. Macronutrientes

Los macronutrientes son constituyentes esenciales para el crecimiento de los tejidos vegetales debido a que interviene en la conservación del equilibrio iónico en la plantas (Bengoa, 1990).Estos macronutrientes proveen los seis elementos indispensables: Nitrógeno (N), Fosforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), y Azufre (S). La concentración óptima de cada nutriente especie y la finalidad del cultivo. (Rodríguez N.C., Sánchez W., Mercado P. 2010).

2.13.6. Micronutrientes

Los micronutrientes representan un papel esencial en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas.

Los principales micronutrientes son: Hierro (Fe), Manganeseo (Mn), Zinc (Zn), Boro (B), Cobre (Cu) y Molibdeno (Mo). Algunos medios contienen Cobalto (Co), Yodo (Y) Y Cloro (Cl), aunque no son esenciales para el crecimiento. (Rodríguez N.C., Sánchez W., Marcado P. 2010).

2.13.7. Reguladores de crecimiento

Se entiende por reguladores de crecimiento a las hormonas vegetales, las mismas que son sintetizadas en un determinado lugar de la planta y se translocan a otro donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, desarrollo o metabolismo del vegetal. El término “sustancias reguladoras del crecimiento” es más general y abarca a las sustancias, tanto de origen natural como sintetizadas en laboratorio que determina repuestas a nivel de crecimiento, metabolitos o desarrollo de plantas.

Las fitohormonas son las moléculas responsables del desarrollo, aunque no se sabe bien de cómo actúan en las células. Se sabe que su mecanismo de acción con un receptor específico (la sensibilidad de un tejido hace referencia a su número de receptores) y que su modo de acción, una vez recibida la señal es por transducción.

Se denomina nivel de una hormona a las formas que desencadenan respuestas. Es necesario un control u homeostasis hormonal, el cual es importante para el control del crecimiento y la defensa ante situaciones eventuales como cerrar constantemente los estomas en sequía. Para ello existen diversos mecanismos:

- a) **Auxinas.**- Scott citado por Krikorian (1991), menciona que son las primeras hormonas que se describieron. Su estructura es un derivado del fenol o el indol, y tienen anillos aromáticos con dobles enlaces conjugados. Todas las auxinas son ácidos. No se sabe el modo de acción pero este está relacionado

directamente con su estructura, ya que si se modifica pierde su función. Las auxinas pueden ser naturales o sintéticas.

- b) Gibelinas.** Son hormonas que proceden de una estructura química, no de una función concreta. Su estructura química deriva del ent-giberelano. Es un grupo de hormonas muy heterogéneo, son de muchas formas aunque pocas con función.
- c) Citoquininas.-** Son un grupo más reducidos de hormonas que deben su nombre a su función (citoquinesis). En conjunto con las auxinas estimulan la división celular.
- d) Ácido Abscísico.** Históricamente se ha considerado como un inhibidor. Se trata de una molécula terpenica de 15 carbonos (sesquiterpeno) similar a los carotenoides pero con algunas particularidades.
- e) Etileno.-** Es una molécula C_2H_4 , un hidrocarburo insaturado liposuble, capaz de traspasar la membrana celular. Es un gas volátil a temperatura ambiente.

2.13.8. Agentes quelatos

López (1990) indica que son necesarios para la síntesis de la clorofila y en muchas funciones de oxidación y reducción, pues son compuestos cuyas moléculas son capaces de adsorber un ion de un metal.

Existen varios agentes quelatantes, pero el más usado es el EDTA (Ácido Etilendiamin Tetra Acético) por ser menos tóxico que otros quelatos y que en combinación con $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ en bajas concentraciones, estimula el crecimiento permitiendo la disponibilidad de hierro al cultivo (Gonzales, 2004).

2.13.9. Carbohidratos

Los tejidos in vitro son organismos heterótrofos y por esta razón es indispensable añadir una fuente de carbono al medio de cultivo, como fuente de energía y regulador osmótico.

La sacarosa es la fuente de energía más utilizada en cultivo in vitro, pero en ocasiones se emplean otros carbohidratos como la glucosa, fructosa y maltosa, pero estos compuestos son inferiores a la sacarosa, que puede ser sustituida por azúcar comercial, llegándose a obtener óptimos resultados.

La concentración óptimas son de 2 a 3%, sin embargo, en ciertas especies se utilizan concentraciones muy elevadas de 5 a 12%.

2.13.10. Vitaminas

Las vitaminas son utilizadas 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.

- Tiamina es considerada la vitamina imprescindible en el cultivo in vitro para un buen crecimiento del cultivo.
- Myo-inositol estimula el crecimiento y la división celular en muchas especies vegetales con fines de micropropagación. La concentración más utilizada es de 100 mg/l.

Indican que otras vitaminas también han demostrado tener un efecto positivo en el crecimiento in vitro y éstas son: piridoxina (B6), ácido nicotínico (B3), pantotenato cálcico (B5), riboflavina, prolina y glicina.

2.13.11. 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 pero no es posible establecer una regla general (García et al., 2008).

2.13.12. Potencial osmótico

Algunas especies propagadas in vitro presentan diversos desórdenes fisiológicos, como la hiperhidratación, debido entre otros factores a la alta humedad relativa en los recipientes.

Por ello es importante conocer el potencial osmótico del medio de cultivo en función de la concentración de solutos (Cardenas & Villegas, 2002).

Morard & Henry (1998) citados por Molinos da Silva et al. (2004) menciona que el potencial osmótico del medio del cultivo tiene efectos directo en los explantes; conforme sea más negativo, menor será la absorción de agua y por consecuencia, se dificultará la multiplicación de brotes axilares por la baja disponibilidad de los nutrientes del medio. La composición mineral de los medios. La composición mineral de los medios de cultivo resulta fundamental, ya que tiene un efecto decisivo en el potencial osmótico y el pH del medio, así como en la nutrición de los explantes.

2.13.13. Estabilizadores osmóticos

Todos los medio de cultivo de protoplastos contiene estabilizadores osmóticos, conocidos simplemente como osmóticos. Presentan en los protoplastos diferentes niveles óptimos en relación con la presión osmótica y con el tipo de osmótico empleado, si se cultiva en medios no óptimos osmóticamente, es posible que haya un estrés celular y como resultado, una baja eficiencia del cultivo. Los más comunes son el manitol, el sorbitol, la glucosa y la sacarosa.

2.13.14. Suplementos no definidos utilizados en la composición de medios de cultivo

Existe una lógica bien documentada tras el uso de sustancias líquidas como el agua de coco que se encuentran en forma natural. Con el uso individual de estas sustancias se obtiene poco efecto por encima de lo esperado, parece que las sustancias de esta naturaleza pueden desempeñar un papel pequeño pero significativo en la estimulación del crecimiento en los tejidos de los explantes, mediante la división celular Se puede anticipar que los investigadores en los trópicos y subtrópicos tendrán acceso a una

gama de líquidos estimuladores del crecimiento que son de origen novedoso, distintivos o incluso morfológicamente únicos (Stewart, 1959; Shantz, 1966; citados por García et al., 2008).

2.13.15. Carbón activo

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 varía de 0,1 a 5% (González, 2004), describe los siguientes efectos del carbón activo:

- Efecto favorable sobre el crecimiento, debido a la absorción de sustancias tóxicas excretadas por el explante en el proceso de la síntesis fenólica.
- Efecto favorable al desarrollo de raíces.
- Efecto inhibitor sobre el crecimiento debido a la absorción de reguladores de crecimiento (auxinas, citoquininas) contenidas en el medio.

2.13.16. Ph

Es un factor limitante para el crecimiento y desarrollo de los explantes, el rango óptimo de pH fluctúa de 5 a 6 debido a que las sales se encuentran en forma soluble, valores superiores a 6 presenta problemas de precipitación de nutriente y valores inferiores a 3,5 manifiestan mala gelificación.

2.13.17. Agua

En la micropropagación comercial, rutinariamente se usa agua destilada común, pero para los estudios de investigación se requiere formas más puras: desionizada, destilada.

Normalmente, se recomienda que el agua sea desonizada, además de estar destilada en condensador de vidrio.

2.13.18. Fase 2 Multiplicación: Se refiere la multiplicación del propágulo a través del cultivo sucesivo en un medio adecuado para la multiplicación con la obtención de un cultivo de partes aéreas y yemas libres de contaminación y que están suficientemente establecidas y receptivas a la aplicación de fitorreguladores. El principal objetivo de

esta fase es de producir el mayor número de plantas posible, en el menor espacio y tiempo. No basta conseguir altas tasas de multiplicación en algunos explantes, lo importante es la reproducibilidad del sistema, es decir, conseguir una tasa media satisfactoria con el mínimo de variación de explante a explante.

Los factores que determinan la multiplicación, que pueden ser manipulados para optimizar esta fase, son:

- a) La composición del medio de cultivo.
- b) Las condiciones de incubación.
- c) Los cuidados en la manipulación del material durante los subcultivos.

El principalmente tipo de explante utilizado influye de manera significativa en esta etapa ya que en diferentes situaciones se obtiene distintas tasas de diferenciación de yemas. Los explantes que contienen ápices, son favorecidos por desarrollar un número significativo de brotes. Por lo general la formación de yemas adventicias directamente de órganos es la mejor opción para la micropropagación. El número de plantas que se obtiene dependerá de la naturaleza de la especie vegetal y el medio de cultivo en el que se encuentren.

2.13.19. Fase 3 Enraizamiento:

En esta etapa no requiere pasar por esta etapa, ya que se emite raíces en el mismo medio de cultivo donde se desarrolla los brotes nuevos. En ocasiones la etapa de multiplicación y de enraizamiento, ocurre simultáneamente. (Gonzales, S.2004).

Es la preparación de las plántulas para el establecimiento en el suelo, es decir, las partes aéreas producidas in vitro son transferidas a medio de enraizamiento para el subsecuente trasplante al suelo de las plantas obtenidas. El enraizamiento es una etapa que puede ser realizada in vitro o in vivo. En el primer sistema, las raíces son generadas en condiciones asépticas y una planta completa es trasplantada en sustrato.

En el segundo sistema, las partes aérea son manipuladas como microestacas y todo el proceso de enraizamiento se da en sustrato estériles (aun en condiciones de laboratorio).

La opción por uno de los dos sistemas depende fundamentalmente de la calidad de las partes aéreas obtenidas en la multiplicación, de la especie y del genotipo en cuestión. Otra alternativa es inducir el enraizamiento in vitro de las partes aéreas y trasplantarlas a un sustrato estéril (en laboratorio). La rizogénesis puede ser dividida en inducción, iniciación, y enlogamiento de raíces, que normalmente lleva una a tres semanas. Las dos primeras a veces consideradas como una sola responden o dependen de la adición de la auxina en el medio de cultivo, donde el crecimiento y enlogamiento de las raíces es estimulado por la presencia de auxinas. (Gonzales, S.2004).

2.13.20. Fase 4 Aclimatación:

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a la transferencia de la planta de condiciones in vitro a condiciones in vivo en invernadero, las cuales son:

- La planta pasa de una situación de reducido flujo transpirado debido a la baja intensidad de la luz y elevada humedad relativa a un ambiente que demanda que demande un incremento en la tasa de transpiración, quedando muy susceptible al estrés hídrico.
- La planta pasa de una condición heterotrófica, en la cual depende de un suplemento externo de energía (sacarosa en el medio), para un estado autotrófico en el cual precisa realizar fotosíntesis para sobrevivir.
- La planta pasa de una condición de alta disponibilidad de nutrientes en el medio hacia otra donde precisa rápidamente incrementar la absorción de sales.
- La planta sale de un estado aséptico hacia un ambiente donde está sujeta al ataque de microorganismos saprófitos y eventualmente patógenos.

En esta etapa, las plantas micro propagadas entraran en contacto gradual con el ataque de patógenos presentes en el suelo y desarrollaran resistencia a la desecación. (Gonzales, S.2004).

2.14. ENFERMEDADES

2.14.1. Pudrición de raíz y cuello, damping-off (*Pythium ultimum*)

Es la más común de las enfermedades del suelo en el cultivo del crisantemo. El ataque de este hongo es más severo en el verano y principios de otoño. La presencia del patógeno puede darse en las mesas de enraizado detectándose en los esquejes. (Romeiro, R. 2005).

2.14.2. Biología

Pythium es un parásito facultativo, y subsiste en el suelo como saprofito o parásito de raíces fibrosas. Las oosporas son las formas invernantes (en suelo), las semillas infectadas también son fuente de inóculo, las zoosporas, originadas de la oospora a través del esporangio, son las que causan la infección primaria penetrando por las heridas, aberturas naturales o por la zona de contacto directo. (Romeiro, R. 2005).

2.14.3. Detección

Como primeros síntomas son lesiones de color negro en el tallo al nivel del suelo, conforme la enfermedad avanza las lesiones suben provocando marchitez en las hojas, acompañados de ennegrecimiento, (con manchones de micelio blanco) llegando a la necrosis, excepto, cuando las lesiones son restringidas a un solo lado del tallo.

En las camas de cultivo la infección se caracteriza por lesiones que van de color café oscuro a negro en la parte baja del tallo, conforme avanza la enfermedad se extiende hacia arriba afectando el tallo principal, las ramas laterales y los pecíolos de las hojas. Se observa al hacer un corte del tejido dañado una coloración rojiza. (Romeiro, R. 2005).

2.14.4. Marchitez (*Verticillium spp.*)

Conidióforos alargados y más o menos ramificados verticalmente (y en espiral).

Conidios de 3.5 a 5 micras de largo por 1.5 a 2.0 micras de ancho ovoides a elipsoidales blancos y unicelulares, solitarios o en pequeños racimos apicales. Produce micro esclerocios formados por agregación de unas cuantas células de pared gruesa oscura,

rica en melanina; que permiten que sobrevivas por muchos años (12-14) sin perder la viabilidad. (Sarubbi, H; 2014).

2.14.5. Biología

Este hongo inverna en forma de esclerocios o como micelio sobre el hospedante, material propagativo y/o residuos de cosecha.

Los microesclerocios o el micelio germinan cuando las condiciones les son favorables y penetran por las heridas o aberturas naturales en la raíz, crece intracelularmente mediante la ayuda de secreciones enzimáticas, alcanzando el xilema en menos de 3 días, ahí invaden los tejidos conductores y avanza por toda la planta a través de éstos; produce los conidios en el xilema que infectan a otras plantas, ocasionan nuevos síntomas, en estos se forman nuevos conidios que pueden atacar otras plantas o si las condiciones son desfavorables, se producen los microesclerocios para invernar. El hongo se dispersa a través de semilla, tubérculos u otro material propagativo infectado por el agua de riego, de lluvia, viento, implementos, etc. (Sarubbi, H; 2014).

2.14.6. Detección

El primer síntoma es visible a los 35 a 45 días de edad de la planta en la época de floración cuando se observa un amarillamiento entre las venas de las hojas (clorosis intervenal) y pronto se manifiesta la marchitez o muerte intervenal (manchas) y marginal de las hojas, los síntomas continúan hasta producir una defoliación parcial o total seguida de una muerte regresiva de la planta la cual no muere totalmente, excepto en variedades altamente susceptibles. Al hacer un corte transversal de la raíz, tallos o ramas, se observa el xilema necrosado de color café claro a café oscuro según sea el grado de ataque, también se presenta necrosis del floema, los síntomas se manifiestan más en la floración. (Sarubbi, H; 2014).

2.14.7. Pudrición de raíz y cuello (*Fusarium oxysporum* Schelcht)

Esta enfermedad es causada por *Fusarium oxysporum* Schelcht, el desarrollo de la enfermedad depende de varios factores como: variedad de crisantemo, temperatura, fertilizaciones con nitrógeno, suelos ácidos y abundantes aplicaciones de estiércol.

Cuando las condiciones son favorables para su desarrollo (entre los 27 a 32°). (Sarubbi, H; 2014).

2.14.8. Biología

El hongo puede estar en la semilla o en el suelo (clamidosporas por más de 5 años) y puede ser diseminado por labores culturales, plántulas infectadas y por el agua de riego. El daño es más intenso a 21-33 °C; con menos de 21 °C o superiores a 33 °C, el hongo se desarrolla más lentamente. Su crecimiento y reproducción son mayores con temperaturas del suelo alrededor de 27- 29 °C; las plantas mueren 2 a 4 semanas de la infección. Otras condiciones que lo favorecen son la baja humedad del suelo, días cortos, alto contenido de nitrógeno combinado con alto contenido de potasio, reducen la enfermedad.

Generalmente el ciclo empieza con la presencia de macroconidios, micelio y/o clamidosporas en el suelo infestado, estos germinan y penetran por heridas o aberturas naturales, atacando el xilema invadiendo todo con el cual éste adquiere cierta tonalidad amarillo-ocre-café, la cual externamente se manifiesta como una clorosis; el micelio sigue desarrollándose y llega a invadir las células adyacentes el xilema; se presenta una marchitez y la muerte de la planta. (Sarubbi, H; 2014).

2.14.9. Detección

Los síntomas inician con una clorosis o amarillamiento en las hojas superiores en un solo lado de la planta, posteriormente estas hojas sufren un enrollamiento y curvatura. El tallo muy a menudo se curva por el lado afectado de la planta, esto ocurre especialmente cuando uno de los lados del sistema vascular está más afectado que el otro, presentándose comúnmente en plantas jóvenes y de crecimiento rápido.

A lo largo de la planta en la parte superior de los tallos afectados, se observan líneas de tejido de color café-rojizo de apariencias secas intercaladas con tejido sano, dando la apariencia de un tallo rayado. Estas líneas de tejido rayado coalescen, ocasionando una necrosis del tallo que puede extenderse a la raíz, y que aparentemente no tiene conexiones visibles externas con la parte basal de la planta. En la superficie de los tallos

necrosados se forman áreas blancas o rosadas que corresponden a micelio y conidios del hongo. (Romeiro, R. 2005).

Al hacer un corte longitudinal de estos tallos, presentan un cambio de coloración de café a café-rojizo en el sistema vascular. A medida que progresa la enfermedad se presenta un marchitamiento, primeramente, en el lado afectado de la planta, y finalmente se presenta una marchitez general y como consecuencia la planta muere.

Cuando la severidad de la enfermedad es baja, la planta produce flores pequeñas y de mala calidad; si, por el contrario, la intensidad es alta el botón se forma, pero no existe un desarrollo normal de la flor. Cabe mencionar que este hongo afecta a las plantas del crisantemo preferentemente durante el verano debido a las altas temperaturas que se presentan en ese tiempo. (Romeiro, R. 2005).

2.14.10. Pudrición de raíz (*Rhizoctonia* spp.)

Este hongo es un habitante del suelo con capacidad patogénica tan extraordinaria que se encuentra en plantíos de todo tipo tal como malezas, ornamentales, árboles frutales y casi cualquier cultivo hortícola con síntomas de ahogamiento, cenurosis, pudrición de la corona, anidamiento, secadera, etc. (Romeiro, R.2005). Se encuentra presente en toda el área florícola del Estado de México.

2.14.11. Biología

Las condiciones que favorecen la incidencia del hongo son un exceso de humedad en el suelo y temperatura alrededor de 15°C. Este hongo produce estructuras de resistencia llamadas microesclerocios como piedrecillas negras, las cuales quedan adheridas en la planta dando el aspecto de que estuviera impregnado de lodo. Se produce al inicio de las lluvias. En plantas suculentas como clavel, gladiolo, crisantemo, etc., se puede observar el micelio como filamentos de color café o ámbar a la altura del cuello de la raíz. Esto lo diferencia de *Fusarium*; además de que en *Fusarium* se puede observar estriaciones de color rosado en la raíz debido a que la epidermis se agrieta y se forman los conidios, *Rhizoctinia* sobrevive también en residuos de cosecha se disemina en la semilla. Los esclerocios germinan entre 8 y 30 °C, con óptimo de 21 a 25 °C.

2.14.12. Detección

Los síntomas más comunes por *Rhizoctonia* spp. En la mayoría de las plantas son el ahogamiento de las plántulas y la pudrición de la raíz, así como la pudrición y el cáncer del tallo de las plantas adultas y plantas en proceso de crecimiento, además ataca ramas y follaje en contacto con el suelo.

Ataca plantas y plántulas desarrolladas; en las primeras se nota un ahogamiento del cuello, pudrición de raíces y consecuentemente la muerte de la plántula, en las plantas grandes se observa una clorosis y marchitez general que avanza rápidamente, secando el follaje y luego sobreviene la muerte de la plántula; estas son fácilmente extraídas del suelo al perder su raíz; en el cuello de la planta se observa una pudrición, donde se descascara fácilmente y se notan los tejidos internos necrosados. Sobre el cuello se puede observar las hifas del hongo con pequeñas partículas de suelo adheridas sobre la superficie del tejido, así se pone la raíz horizontal y contra el sol (García, A.2014).

2.14.13. Roya (*Puccinia horiana*)

La roya blanca del crisantemo es causada por el hongo *Puccinia horiana*. La roya fue detectada por primera vez en Villa Guerrero, Estado de México, a finales de 1992 (Anónimo, 1995). Se reporta que solamente ataca algunas especies del género *Chrysanthemum*; sin embargo, también se ha detectado atacando algunos géneros ubicados en una posición taxonómica muy cercana a la del crisantemo, tales como *Matricaria* y *Dendratherisma*. (García, A.2014).

2.14.14. Biología

La roya blanca es principalmente una enfermedad de invernaderos, en los que el patógeno como parásito obligado sobrevive sobre el huésped a lo largo de todo el ciclo vegetativo (Smits et al, 1992). Por eso la diseminación de basidiosporas por viento es muy limitada. Sin embargo, las teliosporas tienen paredes gruesas relativamente y pueden sobrevivir en hojas secas por 8 semanas en 50% de humedad relativa. Por lo cual, la diseminación de hojas enfermas de crisantemo podría ser a distancias largas. (Romeiro, R. 2005).

La humedad relativa superior al 96% con película de agua sobre las hojas y temperatura de 4 a 36 °C, son necesarias para la germinación de la teliospora madura y de la basidiospora. Con temperatura óptima de 17 °C, las basidiosporas germinan en 3 horas. Consecuentemente, la germinación y penetración puede ocurrir en condiciones óptimas en unas 5 horas.

Las basidiosporas, si llegan a caer en hojas de crisantemo pueden infectarlas. La penetración e infección ocurre en ambos lados de la hoja entre una temperatura de 4 a 24 °C. A la temperatura óptima de 17 a 24 °C, la penetración e infección ocurre entre 2 o 3 horas; el periodo de incubación normalmente es de 7- 10 días, pero los periodos de temperatura elevada retrasan el desarrollo. (Romeiro, R. 2005).

2.14.15. Detección

Los síntomas inicialmente aparecen en el haz de las hojas, como manchas verde claro o amarillo. Estas lesiones crecen gradualmente y pueden alcanzar 5 mm de diámetro más o menos. Más tarde, los centros de las manchas se ponen color café, se hundan y se necrosan. En el envés de las hojas, las pústulas de color amarillo claro cerosas desarrollan las telias y aparecen como cojinetes de consistencia cerosa y color blanco a amarillento, el cual cambia a café claro. Luego las teliosporas se forman de la telia en las pústulas y germinan en el mismo sitio produciendo basidiosporas que tornan las pústulas de color blanco, por eso el nombre de la roya blanca. Las pústulas ocurren raramente en los tallos, brácteas y flores. A medida que la enfermedad progresa, las hojas afectadas se marchitan, cuelgan del tallo y se secan en forma gradual. (Romeiro, R. 2005).

2.14.16. Mancha foliar (*Alternaria* spp.)

2.14.17. Biología

Inverna como conidios y micelio sobre residuos de cosecha, semillas y otros medios y plantas y penetra directamente por los estomas, invadiendo los tejidos de las hojas y tallos formando un micelio intercelular, el cual origina los conidios sobre los tejidos infectados, estos son liberados y acarreados por el viento, insectos, reinfectando las plantas, esos conidios liberados pueden caer sobre plántulas atacándolas a nivel de

tallos y hojas. Los factores que favorecen su desarrollo son: humedad relativa alta y temperaturas de 21 a 28 °C, siendo la óptima de 25 °C. Los suelos con un alto contenido de nitrógeno, hacen a las plantas más susceptibles a la infección. (Ramírez, S.2009).

2.14.18. Detección

En la hoja se observan manchas pequeñas, hundidas, blanquizas y circulares e irregulares, en ocasiones con anillos concéntricos; las manchas posteriormente se extienden a lo largo de las nervaduras de las hojas, el centro es púrpura rodeado de bandas rojizas. Después estas lesiones se cubren de un moho negro que corresponde a la esporulación del hongo. (Ramírez, S.2009).

2.14.19. Mancha foliar (*Septoria chrysanthemi*)

En cultivos bajo invernadero raras veces ocasiona daños considerables, siendo más común en plantaciones a la intemperie. Esta enfermedad suele atacar a los pompones.

Uno de los síntomas que la distingue es que ataca generalmente a las hojas bajas de la planta y progresa hacia la parte superior. (Ramírez, S.2009).

2.14.20. Biología

Los conidios son diseminados por el agua de lluvia, agua de riego, implementos agrícolas, animales, viento, etc. Inverna como micelio y como conidios dentro de los picnidios y sobre semillas infectadas y plantas enfermas que se queden en el campo de cultivo. Cuando el hongo es acarreado en la semilla produce una infección en la germinación y resulta un ahogamiento (damping-off).

El rango óptimo de temperatura del hongo para que cause la enfermedad está entre 10 y 27 °C. (Ramírez, S.2009).

2.14.21. Detección

Inicialmente produce pequeños puntos de color café que aumentan su tamaño hasta unirse, formando manchas oscuras de forma irregular que afectan algunas veces hasta un tercio de la hoja; el tejido infectado de la hoja se amarillenta, se marchita y muere dando apariencia de hoja cortada. En el tejido necrosado se puede observar a simple

vista pequeños puntos que son los picnidios del hongo. Los síntomas visibles se dan de 8 a 21 días después que ocurre la infección. (Ramírez, S.2009).

2.14.22. Tizón del crisantemo (*Ascochyta chrysanthemi*)

El tizón por *Ascochyta* se reportó por primera vez en 1906, en el norte de California.

En México se ha encontrado este hongo sólo en su fase conidial, *Ascochyta chrysanthemi*, causando tizón de plantas jóvenes.

2.14.23. Biología

La temperatura óptima para el desarrollo de picnidios es de 27 °C y para el de peritecios es de 21 °C. Los picnidios se forman más rápidamente que los peritecios, aún a temperaturas favorables para la formación de peritecios. Una lesión debe ser de siete días de edad antes de que se formen los peritecios, mientras que los picnidios se forman en tres días a temperatura óptima. Si se practica un programa de control riguroso en campo, las plantas con lesiones y picnidios pueden detectarse y destruirse antes de formar peritecios. La humedad también influye en el desarrollo de picnidios y peritecios. Los picnidios se producen bajo condiciones de mayor humedad, mientras que cuando la humedad presente es baja se favorece la producción de peritecios. Los peritecios producidos en condiciones de alta humedad son de maduración lenta y si se mantienen bajo condiciones de humedad no liberan las ascosporas de manera violenta. La dispersión a grandes distancias ocurre vía embarque de esqueje infectado o flor de corte y a través de las ascosporas liberadas de plantas infectadas. (Ramírez, S.2009).

2.14.25. Moho gris (*Botrytis cinérea*)

Este hongo ocasiona pudriciones y tizones en muchas plantas ornamentales como la violeta, begonia, caléndula, camelia, dalia, perrito, geranio rosal y crisantemo entre otras.

2.14.26. Biología

El hongo inverna como micelio y esclerocios sobre o dentro de los residuos de cosecha y en el suelo, estos germinan y producen conidióforos que después forman conidios que al ser liberados pueden atacar plantas pequeñas a nivel del cuello, también infectan

flores (pétalos), hojas y frutos; en donde los conidios germinan, penetran e invaden los tejidos, desintegrando las células a su alcance, ocasiona las pudriciones sobre las cuales se desarrollan conidióforos y conidios que forma la capa de moho gris, se liberan de nuevo y atacan otras plantas; cuando las condiciones son desfavorables, forman sobre las pudriciones los esclerocios de los cuales le sirven como estructuras de sobrevivencia. (Ramírez, S.2009).

2.14.27. Detección

El primer síntoma son manchas oscuras de consistencia blanda, en la base del tallo o peciolo de las hojas. El hongo avanza rápidamente y convierte el tejido vegetal en una masa podrida, bajo condiciones húmedas, el hongo produce una capa de fructificaciones sobre el tejido afectado (Fig. 59) con aspecto de moho gris blanco que es característico de *Botrytis* spp. Después de éstas fructificaciones se forman los esclerocios planos o cilíndricos en la masa podrida y finalmente la planta o parte atacada se deshidrata y muere. (Ramírez, S.2009).

2.14.28. Pudrición de tallo (*Sclerotinia sclerotiorum*)

2.14.29. Biología

El hongo sobrevive de una cosecha a otra como esclerocios del hongo en los residuos de cosecha o en el suelo. Los esclerocios son diseminados por medio de los implementos agrícolas, animales, semilla y agua de riego. El inóculo primario lo construyen los esclerocios y las ascosporas del hongo que infectan a los hospedantes susceptibles si se presentan condiciones de humedad adecuada y temperatura alrededor de 25° C. 12. (Bautista, M. 2002).

2.14.30. Detección

El hongo infecta al tallo principal e invade el tejido cortical, con bastante rapidez sin mostrar síntomas visibles hasta que repentinamente la planta se marchita, al examinar una planta enferma se nota abundante micelio superficial, blanco algodonoso y hasta esclerocios jóvenes, estos al principio son de color blanco, pero al madurar se ponen de color castaño oscuro. Cuando el hongo invade la medula de la planta se forman los esclerocios. (Bautista, M. 2002).

2.14.31. Marchitez bacteriana**2.14.32. Tizón bacteriano (*Pectobacterium chrysanthemi*)**

Pectobacterium chrysanthemi produce el tizón bacteriano en condiciones de elevada temperatura (27-32°C) y alta humedad relativa, diseminándose de forma mecánica, por medio de las manos, herramientas, etc. Los primeros síntomas se caracterizan por la aparición de un color gris en las hojas, al que le sigue el marchitamiento durante los días de intensa iluminación. La médula se vuelve gelatinosa y el tallo se aplasta fácilmente y sufre agrietamiento. También aparecen lesiones por hidrólisis del tejido. (Bautista, M. 2002).

2.14.31. Biología

La bacteria se desarrolla en los tejidos y contamina toda la planta por vía ascendente, progresando por el sistema vascular de la parte aérea (tallos, hojas, pecíolos).

Sintetiza toxinas al originar pudriciones.

Esta bacteria puede vivir a las temperaturas de 12, 18, 24, 28 y 32 °C, en suelo no estéril y tallos de crisantemo hasta por un máximo de 3 a 7 semanas respectivamente, por lo que es necesario considerar como fuente de inóculo al suelo y al tejido vegetal infectado. (Bautista, M. 2002).

2.14.32. Detección

Los primeros síntomas se observan en la base inferior de las hojas donde se nota la presencia de una lesión aceitosa localizada cerca del pecíolo pudiendo secarse al disminuir la humedad, y la planta manifiesta un lento crecimiento. En un estado más avanzado, se descubre en la base del botón una pudrición humedad café rojiza que puede alcanzar toda la parte aérea y destruir, en condiciones favorables de calor y humedad, la planta entera.

En este cultivo la bacteria produce infección sistémica y la forma de diseminación esporas medio de los esquejes que constituyen la principal fuente de inóculo. (Bautista, M. 2002).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el departamento de Tarija, Provincia Cercado Zona el Tejar, ubicado geográficamente entre los paralelos 21° y 15' de latitud sur y los meridianos 64°21' y 65° 05' de latitud Oeste, con una altura promedio de 1850 m.s.n.m, específicamente 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”.



Laboratorio de Fitopatología y Cultivo *in vitro* de la Facultad de Ciencias Agrícolas y forestales.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Material Vegetal

Para el presente trabajo se utilizó plantas madres de Crisantemos variedad obtenidas de la institución Servicio Departamental Agropecuario de Tarija (SEDAG) en la comunidad de Coímata de la provincia Méndez del municipio de San Lorenzo del departamento de Tarija.

Geográficamente se encuentra ubicado en las siguientes coordenadas:

Latitud Sud: 21°29'57".

Longitud Oeste: 64°47'20".

Altura: 2027m.s.n.m. (SENAMHI, 2012).

CUADRO N°1 Variedad Sembla

Variedad Sembla	
Altura de la planta:	0.90-1.30 metros
Hoja:	Alternas
Borde:	Lobulado
Color:	Verde oscuro, con vellosidades grises
Fragancia:	Aromática
Tallo:	Erecto
Inflorescencia:	Capítulo
Color:	Blanco
Lígulas:	Incurvadas- semi tubular
Clasificación:	Flor cortada
Por el tipo de flor:	Simple
Categoría:	Segunda-Medianas, tipo inglés.

CUADRO N°2 Variedad Calabria

Variedad Calabria	
Altura de la planta:	0.75-1.25 metros
Hoja:	Alterna
Borde:	Lobulado
Color:	Verde oscuro, con vellosidades grises
Fragancia:	Aromática
Tallo:	Erecto
Inflorescencia:	Capitulo
Color:	Amarillo
Lígulas:	Incurvadas-planas
Clasificación:	Flor cortada
Por el tipo de flor:	Simple
Categoría:	Segunda- Medianas, tipo inglés.

3.2.2. Equipos y materiales

En los equipos y materiales necesarios, de acuerdo a las áreas y en base a la experiencia en el laboratorio.

3.2.3. Área de Preparación

- Vaso de precipitación.
- Probeta.
- Balanza de precisión.
- Potenciómetro.
- Pipetas.
- Matraz.
- Balillas.
- pHchímetro portátil.

3.2.4. Área de esterilización

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

- Gradillas.
- Tubos de ensayo.
- Pinzas.
- Cajas Petri.

3.2.5. Área de siembra

- Cámara flujo laminar.
- Mechero.
- Pinzas.
- Agujas.
- Bisturí.
- Alcohol al 70%.
- Algodón.

3.2.6. Área de crecimiento

- Luz fluorescente.
- Control de temperatura.

3.2.7. Material de vestimenta

- Guardapolvo.
- Guantes.
- Barbijo.
- Gorro.

3.2.8. Material de escritorio

- Computadora.
- Impresora.
- Lapicera.
- Cuaderno.
- Cámara.

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. Diseño experimental

Para el presente trabajo de investigación se empleó un diseño experimental completamente aleatorio bi factorial, (2x5) que dieron lugar a 10 tratamientos incluyendo al testigo con 3 repeticiones haciendo un total de 30 unidades experimentales.

Cuadro N°3 Interacción de factores

FACTORES EN ESTUDIO	NIVELES	TRATAMIENTOS	REPLICAS	UNIDADES EXPERIMENTALES
Factor A "variedad de crisantemo"	V1	T1=V1C1	3	30
	V2	T2=V1C2		
Factor B "Medio de cultivo con sus respectivas concentración de fitohormonas"	C1	T3=V1C3		
	C2	T4=V1C4		
	C3	T5=V1C5		
	C4	T6=V2C1		
	C5	T7=V2C2		
		T8=V2C3		
		T9=V2C4		
		T10=V2C5		

FACTORES

Variedades

El factor A lo constituyen las dos variedades de crisantemo

- V1=Sembla Blanco.
- V2=Calabria Amarillo.

Medios de cultivos

El factor B lo constituyen los medios de cultivo con sus respectivas concentraciones:

- C1= Sin fitohormonas.
- C2= 1ml/l de KIN.
- C3=2ml/l de KIN.

- C4= 0,1 ml/l de BAP.
- C5=0,2 ml/l de BAP.

Tratamientos

T1=V1C1 (Variedad Sembla Blanco, sin fitorreguladores de crecimiento).

T2=V1C2 (Variedad Sembla Blanco, 1ml/L de KIN).

T3=V1C3 (Variedad Sembla Blanco, 2ml/L de KIN).

T4=V1C4 (Variedad Sembla Blanco, 0,1ml/L de BAP).

T5=V1C5 (Variedad Sembla Blanco, 0,2 ml/L de BAP).

T6=V2C1 (Variedad Calabria Amarillo, sin fitorreguladores de crecimiento).

T7=V2C2 (Variedad Calabria Amarillo, 1ml/L de KIN).

T8=V2C3 (Variedad Calabria Amarillo, 2ml/L de KIN).

T9=V2C4 (Variedad Calabria Amarillo, 0,1ml/L de BAP).

T10=V2C5 (Variedad Calabria Amarillo, 0,2ml/L de BAP).

3.3.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DE TRABAJO EN LABORATORIO

3.3.1. Preparación del medio de cultivo

Para la preparación de los medios de cultivo previamente se preparó unas soluciones stock. Para ello se pesaron en una balanza analítica diferentes reactivos (macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y hormonas) según las cantidades requeridas, las mismas se disolvieron por separado. Posteriormente, de acuerdo a las necesidades a partir de las soluciones stock se prepararon los diferentes medios de cultivo en base al medio MS ajustando el pH a 5,7 en todos los casos.

Como fuente de energía se utilizó sacarosa al 3% (w/v) y para el soporte agar al 0,7% (w/v). El medio de cultivo fue dispensado según el caso en tubos de ensayo a razón de 2ml y en vasos de vidrio pequeños 5 ml.

La esterilización del medio de cultivo se realizó en una autoclave (tipo olla de presión) por un tiempo de 15 minutos a una 1 atmósfera de presión y 121°C. Los medios de

cultivo e instrumentos como pinzas, bisturís, agua destilada y otros, se esterilizaron normalmente 1 día antes de ser utilizado.

Cuadro N° (5) Concentración de fitoreguladores de crecimiento para el cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum sp.*)

DETALLE	M1 200ml	M2 200ml	M3 200ml	M4 200ml	M5 200ml
Murashige & Skoog	100%	100%	100%	100%	100%
Mioinositol	100 mg				
Kinetina	0	1 ml	2ml	0	0
Bencil amino purina	0	0	0	0,1ml	0,2ml
Sacarosa	30%	30%	30%	30%	30%
Ph	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7
Agar	1,3gr	1,3gr	1,3gr	1,3gr	1,3gr

3.3.2. Tratamiento del material vegetal

Para esta parte del experimento se eligieron plantas con buenas características fenotípicas, con vástagos jóvenes y que estaban en etapa de crecimiento. Con la ayuda de tijeras previamente desinfectadas se procedió a cortar explantes (esquejes de tallo medio) de 2 a 3 cm que contenían por lo menos una yema, los mismos que fueron lavados con agua del grifo. Posteriormente los esquejes fueron trasladados a la cámara de flujo laminar donde fueron tratados para el proceso de desinfección con alcohol al 70% (v/v) por el lapso de 10 segundos, después pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 4% (v/v) durante 10 minutos y luego se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril, la inmersión en agua destilada fue de 3 minutos en cada enjuagues.

3.3.3. Establecimiento in vitro

Una vez ya desinfectados los explantes fueron sembrados en tubos de ensayo que contenían el medio MS, el sellado se realizó con plastifilm. Posteriormente se hizo el marcado correspondiente y los explantes fueron incubados en la sala de crecimiento que tenía una temperatura de 23° C, fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.

Establecido el material vegetal, de las vitroplantas con buena apariencia, se extrajeron los datos para la evaluación.

3.4 VARIABLES E INDICADORES

Para determinar el efecto de los tratamientos en estudio sobre el comportamiento in vitro del crisantemo (*Chrysanthemum* sp.), en la fase de establecimiento se evaluaron las siguientes variables:

VARIABLES	INDICADORES
Porcentaje de contaminación a los 23 días después de la introducción <i>in vitro</i> .	Evaluación en (%).
Porcentaje de regeneración a los 23 días después de la introducción <i>in vitro</i> .	Evaluación en (%).
Largo de brote a los 23, 30,37 días después de la introducción <i>in vitro</i> .	Evaluación en unidad de medida (cm)
Número de yemas por brote a los 23, 30,37 días después de la introducción.	Evaluación en unidades

- **(%) Porcentaje de contaminación.-** Esta variable se evaluó en la fase de establecimiento se tomaron en cuenta todos los tubos de ensayos que se encontraban con moho de contaminación que se presentó durante el plazo de la

evaluación la cual consiste en la mala manipulación de instrumentos o desinfección del material vegetal a usar.

- **(%) Porcentaje de regeneración.-** Se tomaran en cuenta todas las vitroplantas que llegaron a regenerarse durante el lapso de evaluación a partir de los segmentos nodales usados como explantes.
- **Largo de brote.-** El largo de brote o altura de vitroplanta se toma en cuenta con el objetivo de verificar el crecimiento que va desarrollando la vitroplanta en cada semana de evaluación, esta variable fue evaluada con la ayuda de una regla tomando en cuenta a todas las vitroplantas regeneradas que van creciendo.
- **Número de yemas por brote.-** La variable de número de yemas se realiza para tomar en cuenta la siguiente fase de multiplicación que nos determinara el número de vitroplanta a obtener en la siguiente fase.

CAPÍTULO IV

RESULTADO Y DISCUSIONES

4.1 PORCENTAJE DE REGENERACIÓN A LOS 23 DÍAS

El ensayo tuvo una duración de 43 días, la evaluación o la toma de datos se inició a partir de los 23 días después de establecido el trabajo de investigación en el Laboratorio de Cultivo *In Vitro* de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales cuyos datos fueron tabulados para su respectivo análisis estadístico.

Cuadro N°7 Porcentaje de regeneración a los 23 días.

Los valores es el promedio de cada tratamiento (ver cuadro N°7).

% DE REGENERACIÓN					23 DIAS	
Tratamientos/Repeticiones		I	II	III	Σ	X
T1	V1C1	33,33	33,33	33,33	99,99	33,33
T2	V1C2	22	22	0	44	14,67
T3	V1C3	0	33,33	0	33,33	11,11
T4	V1C4	0	0	0	0	0
T5	V1C5	0	0	0	0	0
T6	V2C1	33,33	33,33	22	88,66	29,55
T7	V2C2	33,33	33,33	0	66,66	22,22
T8	V2C3	33,33	33,33	0	66,66	22,22
T9	V2C4	0	33,33	22	55,33	18,44
T10	V2C5	0	33,33	33,33	66,66	22,22
Σ		155,32	255,31	110,66	521,29	

En el presente cuadro N° (7) Se muestra los datos obtenidos del porcentaje de regeneración a los 23 días datos que corresponden a los 10 tratamientos y repeticiones del porcentaje de regeneración después de la introducción, para lo cual se realizó la evaluación a cada uno de los tratamientos.

De acuerdo a la obtención de datos se puede observar en el tratamiento T1 (Variedad de crisantemo V1=Sembla blanco y la concentración de fitoreguladores de crecimiento C1= sin de fitoreguladores de crecimiento) presenta un alto porcentaje de regeneración con el 33,33%, siguiendo con el segundo lugar fue el tratamiento T6 con la (Variedad de crisantemo V2=Calabria amarillo con la concentración C1=sin fitoregulador de

crecimiento) con un 29,55% de regeneración. Los tratamientos T7, T8 y T10 obtuvieron el tercer lugar llegando a un porcentaje de regeneración de 22,22%, T9 llegó al cuarto lugar con un porcentaje de regeneración de 18,44% en quinto lugar está el T2 con un porcentaje de regeneración de 14,67% de regeneración y llegando sexto lugar es el T3 con un 11,11% de regeneración.

Según el autor (Bengoa, 1990) menciona que los macronutrientes son constituyentes esenciales para el crecimiento de los tejidos vegetales debido a que interviene en la conservación del equilibrio iónico en las plantas.

Los tratamientos T4 y T5 son los tratamientos que presentaron un 0% de porcentaje de regeneración de vida de las vitroplantas. En los presente tratamientos de investigación se observó que la variedad V1=Sembla blanco presenta menor resistencia en la cual la dosificación de los fitoreguladores de crecimiento no fueron suficientes para regenerar los explantes, o pudo causar efectos negativos como la muerte de la yema axilar de la misma donde ya no presenta regeneración.

Cuadro N°8 Factores y niveles del porcentaje de regeneración a los 23 días.

FACTORES	C1	C2	C3	C4	C5	Σ	X
V1	99,99	44	33,33	0	0	177,32	11,82
V2	88,66	66,66	66,66	55,33	66,66	343,97	22,93
Σ	188,65	110,66	99,99	55,33	66,66	521,29	
X	94,33	18,44	50	27,67	33,33		

Observando en el cuadro N°(8) de interacción de porcentaje de regeneración a los 23 días se puede evidenciar que la variedad de crisantemo (V2= Calabria Amarillo) tiene una media de mayor porcentaje de regeneración de vitroplantas con un 22,93% en cuanto la variedad (V1= Sembla Blanco) que tiene un porcentaje de 11,82% de regeneración, en cuanto las concentraciones de fitoreguladores de crecimiento la mejor concentración de fitoreguladores de crecimiento en cuanto al desarrollo en el proceso de regeneración fue la C1= 94,33% con un mayor porcentaje de regeneración en cuanto al efecto de los fitoreguladores de crecimiento el segundo lugar la C3=50% de regeneración con 2ml/L de KIN de concentración, la concentración C5= 33,33 con una concentración de 0,2ml/L de BAP.

Cuadro N°9 Análisis de varianza del porcentaje de regeneración a los 23 días.

FUENTES DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	F TABULADA	
					Ft5%	Ft1%
TOTAL	7319,45	29				
TRATAMIENTO	3374,41	9	374,90	2,37	2,46	3,60
ERROR	2847,83	18	158,21			
FACTOR A variedad	925,74	1	925,70	5,85	4,41	8,28
FACTOR B concentración	1831,46	4	457,87	2,89	2,93	4,58
INTERACCION A/B	617,21	4	154,30	0,98	2,93	4,58

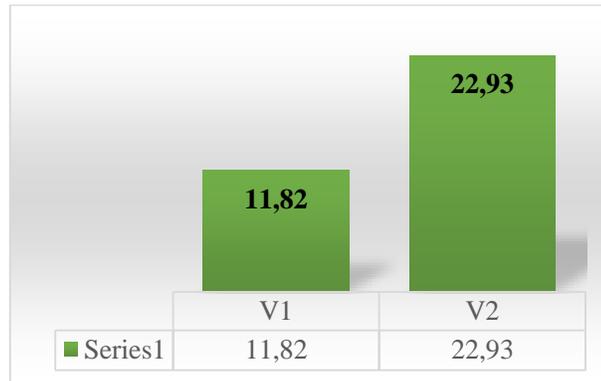
En el cuadro N° (9) De análisis de varianza del porcentaje (%) de regeneración a los 23 días se observó que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos tanto al 5% como al 1%.

Analizando el factor A variedades de crisantemo (V1=Sembla Blanco y V2=Calabria Amarillo) se puede establecer que existe una diferencia significativa, en el porcentaje de regeneración al 5% y no así al 1% por lo tanto se debe realizar la prueba de TUKEY para confirmar las diferencias.

En el factores B concentración de fitoreguladores de crecimiento (C1= sin fitoreguladores de crecimiento; C2= 1ml/l de KIN; C3=2ml/l de KIN; C4= 0,1 ml/l de BAP y C5=0,2 ml/l de BAP) no existe una diferencia significativa. Sin embargo la interacción de los factores variedad/factores concentración de fitoreguladores de crecimiento no fue la excepción no existe una diferencia significativa al 5% y 1% por lo tanto no hubo efecto en ello.

Grafica N°1 Prueba de TUKEY comparación de medias del factor A (variedades de crisantemo) en porcentaje de regeneración a los 23 días.

T =21,24



De acuerdo a la prueba de TUKEY se puede observar que estadísticamente no existe una diferencia entre variedades ya que llegan a tener el mismo comportamiento entre ambas, al calcular las medias de ambas variedades es de 17,37 por lo tanto es menor a la prueba de T= 21,24 es así que estadísticamente las variedades tienen el mismo comportamiento.

A B

22,93 11,82

$|A-B| = 11,11 < 21,24$ Significativamente iguales.

4.2 PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN A LOS 23 DÍAS.

Cuadro N°10 Porcentaje de contaminación a los 23 días.

% DE CONTAMINACION					23 DIAS	
Tratamientos/Repeticiones	I	II	III	Σ	X	
T1	V1C1	22	33,33	33,33	88,66	29,55
T2	V1C2	33,33	0	33,33	66,66	22,22
T3	V1C3	33,33	22	33,33	88,66	29,55
T4	V1C4	22	0	33,33	55,33	18,44
T5	V1C5	0	33,33	22	55,33	18,44
T6	V2C1	0	0	0	0	0
T7	V2C2	0	33,33	0	33,33	11,11
T8	V2C3	33,33	33,33	0	66,66	22,22
T9	V2C4	0	0	33,33	33,33	11,11
T10	V2C5	0	33,33	0	33,33	11,11
Σ		143,99	188,65	188,65	521,29	

En el siguiente cuadro N° (10) Se puede evidenciar que el tratamiento T1 de la variedad de crisantemo (V1=Sembla blanco y la concentración C1=sin fitoreguladores de crecimiento) y el tratamiento T3 de la variedad de crisantemo (V1=Sembla blanco y la concentración C3= 2ml/L de KIN) fueron los que presentaron mayor porcentaje de contaminación con el 29,55%, siguiendo con el segundo lugar el T2 de la variedad de crisantemo (V1= Sembla Blanco con la concentración C2=1ml/L de KIN) y el tratamiento T8 de la variedad de crisantemo (V2= Calabria Amarillo y la concentración C3= 2ml/L de KIM) con un 22,22% de contaminación. El tratamiento T4 variedad (V1=Sembla blanco y la concentración C4=0,1ml/L de BAP), T5 de la variedad de crisantemo (Sembla Blanco con la concentración de C5=0,2 ml/L de BAP) con un porcentaje de contaminación de 18,44%. Cuando un explante es cortado, sus tejidos quedan expuestos tanto a la superficie donde al tratar de metabolizar el oxígeno la planta produce radicales libres, o bien, lo producen como mecanismos de defensa contra agente patógenos u llegan a contaminarse en el manipuleo (Gastón, 1994). El tratamiento presento el 0% de contaminación fue el T6 de la variedad de crisantemo (V2= Calabria Amarillo con la concentración C1=sin concentración de fitoreguladores de crecimiento). Cuando no hay microorganismos u efectos de contaminación es cuando se realizó de forma correcta la esterilización del material vegetal y del medio de cultivo y el trabajo de siembra en la cámara flujo laminar.

Cuadro N°11 Factores y niveles del porcentaje de contaminación a los 23 días.

FACTOR	C1	C2	C3	C4	C5	S	X
V1	88,66	66,66	88,66	55,33	55,33	354,64	23,64
V2	0	33,33	66,66	33,33	33,33	166,65	11,11
S	88,66	99,99	155,32	88,66	88,66	521,29	
X	44,33	16,67	77,66	44,33	44,33		

Observando el cuadro N° (11) se puede determinar la contaminación a los 23 días que hay entre las variedades de crisantemo V1 (Sembla Blanco) tiene una media 23,64% presentando un alto grado de contaminación. La superficie o el interior del explante (endófitos) y microorganismos introducidos durante la manipulación en el laboratorio es cuando se manifiesta la contaminación. Los contaminantes más frecuentes en condiciones in vitro son los hongos, las bacterias y levaduras, denominados "vitropatógenos", aunque también existen otros menos frecuentes como los virus, viroides y microartrópodos (ácaros y trips). (Gutiérrez O, 2001).

La concentración de fitoreguladores de crecimiento los tratamientos que tiene la concentraciones C3=77,66% presenta mayor porcentaje de contaminación durante el periodo siguiendo el segundo lugar está la C1, C4 y C5 con un porcentaje de contaminación de 44,33%.

Cuadro N° 12 Análisis de varianza del porcentaje de contaminación a los 23 días.

FUENTES DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	F TABULADA	
					Ft5%	Ft1%
TOTAL	7319,45	29				
TRATAMIENTO	2296,49	9	255,2	0,94	2,46	3,60
ERROR	4889,99	18	271,67			
FACTOR A variedad	1178,01	1	1178,0	4,34	4,41	8,28
FACTOR B concentración	559,24	4	139,81	0,51	2,93	4,58
INTERACCIÓN A/B	559,24	4	139,81	0,51	2,93	4,58

En el cuadro N° (12) De análisis de varianza de porcentaje de contaminación a los 23 días se puede evidenciar que no existe una diferencia significativa entre tratamientos tanto al 5% y al 1%. Sin embargo en el caso del factor A variedad se puede observar de la misma manera que no existe una diferencia significativa entre variedades de crisantemo (V1= Sembla blanco y V2= Calabria amarillo) al 5% y al 1%.

Analizando en el factor B concentración de fitoreguladores de crecimiento (C1= sin fitoreguladores de crecimiento; C2= 1ml/l de KIN; C3=2ml/l de KIN; C4= 0,1 ml/l de BAP y C5=0,2 ml/l de BAP) de fitoreguladores de crecimiento se puede observar que no existe una diferencia significativa al 5% y al 1%, la interacción de los factores variedades de crisantemo/concentración de fitoreguladores de crecimiento no presento una diferencia significativa. Aunque algunos explantes sean desinfectados, estos no tienen la capacidad funcional de crecimiento debido al grado de contaminación que presenta los diferentes tratamientos.

4.3 LARGO DE BROTES A LOS 23 DÍAS

Cuadro N°13 Largo de brotes a los 23 días.

LARGO DE LOS BROTES						23DIAS
Tratamientos/Repeticiones		I	II	III	S	X
T1	V1C1	5,70	3	1	9,70	3,23
T2	V1C2	4	2	0	6	2
T3	V1C3	0	5	0	5	1,67
T4	V1C4	0	0	0	0	0
T5	V1C5	0	0	0	0	0
T6	V2C1	2	1	1	4	1,33
T7	V2C2	1	1	0	2	0,67
T8	V2C3	3,02	0,80	0	3,82	1,27
T9	V2C4	0	3	2,25	5,25	1,75
T10	V2C5	0	1,40	2	3,40	1,13
Σ		15,72	17,20	6,25	39,17	

En el siguiente cuadro N° (13) Se puede apreciar los datos obtenidos de largo de brote de las vitro planta obtenidos a los 23 días después de la introducción, la unidad de medida es tomada por una regla la unidad de medida (cm) que posteriormente fueron promediados.

De acuerdo al cálculo de medias se pudo determinar que el tratamiento T1 (Variedad de crisantemo V1= Sembla blanco con la concentración de C1= sin fitoreguladores de crecimiento) presenta un promedio de largo de brote de 3,23cm de largo de brote, siguiendo el segundo lugar de tratamiento T9 (Variedad de crisantemo V2= Calabria amarillo y la concentración C4=0,1ml/L de BAP) con un promedio de 1,75cm de largo de brote en el tercer lugar está el T3 (Variedad de crisantemo V1= Sembla blanco con la concentración C3= 2ml/L de KIN), con una media de largo de brote de 1,67cm de largo de brote, siguiendo con el cuarto lugar se encuentra el tratamiento T6 de la variedad (Calabria amarillo y la concentración C1= sin reguladores de crecimiento) con un promedio de 1,33cm de largo en el quinto lugar se posesiona el T8 de la variedad de crisantemo (Calabria amarillo y la concentración C3= 2ml/L de KIN), con una media de largo de brote de 1,27cm.

Los tratamientos T4 y T5 fueron los tratamientos que no se obtuvieron datos sobre largo de brote. La acción de las fitohormonas es responsables de la elongación celular, si bien los efectos de este producto son más notables desarrollo de los tallos, pecíolos y pedúnculos, aumenta el grosor de la lámina y produce una coloración verde de las vitroplantas.

Cuadro N°14 Factores y niveles de largo de brote a los 23 días.

FACTOR	C1	C2	C3	C4	C5	S	X
V1	9,70	6	5	0	0	20,70	1,38
V2	4	2	3,82	5,25	3,40	18,47	1,23
S	13,70	8	8,82	5,25	3,40	39,17	
X	6,85	1,33	4,41	2,63	1,70		

Observando el cuadro N° (14) de los factores de niveles en el largo de brote a los 23 días se puede observar que la variedad V2 (Calabria Amarillo) obtuvo una media de 1,38cm de largo de brote más que la otra variedad V1 (Sembla blanco) en cuanto al desarrollo de brotes y las concentración que mostraron mayor rendimiento fue la C1=6,85cm de largo sin fitoreguladores de crecimiento la C3= 4,41cm con 2ml/LBAP, se posesionaron como las mejores concentraciones que mostraron rendimiento al crecimiento de largo de brote a los 23 días.

Cuadro N° 15 Análisis de varianza de largo de brote a los 23 días.

FUENTES DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	F TABULADA	
					Ft5%	Ft1%
TOTAL	51,89	29				
TRATAMIENTO	26,10	9	2,9	2,13	2,46	3,60
ERROR	24,48	18	1,36			
FACTOR A variedad	1,02	1	1,0	0,75	4,41	8,28
FACTOR B concentración	11,47	4	2,87	2,11	2,93	4,58
INTERACCIÓN A/B	13,62	4	3,41	2,50	2,93	4,58

De acuerdo al cuadro N° (15) de análisis de varianza se puede evidenciar que no existe diferencia significativa entre los tratamientos tanto al 5% y al 1%. En el factor A variedades de crisantemo (V1= Sembla blanco y V2= Calabria amarillo) y el factor B

concentración de fitoreguladores de crecimiento (C1= testigo, C2= 1ml/l de KIN, C3=2ml/l de KIN, C4= 0,1 ml/l de BAP y C5=0,2 ml/l de BAP), presenta la misma situación que no hay una diferencia significativa como al 5% y al 1%.

La fitohormona (BAP) son responsables del procesos de división celular, tales como la formación y crecimiento de brotes axilares, maduración de cloroplastos (órganos celulares fotosintetizadores) y diferenciación celular que ayuda a los explantes a la estimulación y desarrollo de los brotes.

La interacción de los factores A variedad / factor B concentración de fitoreguladores de crecimiento tampoco son la excepción de diferencias.

4.4 NÚMERO DE YEMAS POR BROTE A LOS 23 DÍAS

Cuadro N°16 Número de yemas por brote a los 23 días.

NÚMERO DE YEMAS POR BROTES						23 DÍAS
Tratamientos/Repeticiones		I	II	III	S	X
T1	V1C1	7	3	3	13	4,33
T2	V1C2	2	2	0	4	1,33
T3	V1C3	0	6	0	6	2
T4	V1C4	0	0	0	0	0
T5	V1C5	0	0	0	0	0
T6	V2C1	2,30	3	4	9,30	3,10
T7	V2C2	1	1	0	2	0,67
T8	V2C3	3	2	0	5	1,67
T9	V2C4	0	2	3,50	5,50	1,83
T10	V2C5	0	4	2	6	2
Σ		15,30	23,00	12,50	50,80	

En el siguiente cuadro N° (16) Se puede apreciar los datos obtenidos en laboratorio de los distintos tratamientos y sus repeticiones a lo que corresponde al número de yemas a los 23 días después de la introducción, se realizó un conteo de las yemas y posteriormente a promediar los datos obtenidos.

Se puede determinar que el tratamiento T1 (variedad de crisantemo V1=Sembla blanco y la concentración de fitoreguladores de crecimiento C1=sin fitoreguladores) presenta

una media de 4,33 de números de yemas por brote, siguiendo el segundo lugar fue el tratamiento T6 (Variedad de crisantemo V2= Calabria amarillo y la concentración C1= sin fitoreguladores de crecimiento), con una media de 3,10 números de yemas por brote. En el tercer lugar se encuentra en el tratamiento T3 (Variedad de crisantemo V1= Sembla blanco con la concentración C3=2ml/L KIN) con una media de número de yemas 2 yemas por brote, en el cuarto lugar se posesiono el tratamiento el T9 con la variedad de crisantemo (V2= Calabria Amarillo y la concentración C=0,1ml/L de BAP) con 1,83 número de yemas por vitroplanta en el quinto lugar está el tratamiento T8 de la variedad de crisantemo (V2=.Calabria amarillo) y la concentración C3= 2ml/L de KIN con un numero de yemas 1,67 por brote. Los efectos de la citoquininas que se han descrito a este grupo de hormonas son: la división celular y la formación de órganos, desarrollo de yemas laterales y promoción de la formación de vástagos, entre otras.

Los tratamientos que no presentaron yemas fueron T4 y T5 razón por la que no presentaron regeneración por diversos factores como el mal manipuleo en la esterilización de los explantes que son tejidos vivos separado de su órgano propio y transferido a un medio artificial de crecimiento, especialmente para identificar a los tejidos vegetales cultivados in vitro.

Cuadro N°17 Factores y niveles de número de yemas a los 23 días.

FACTOR	C1	C2	C3	C4	C5	S	X
V1	13	4	6	0	0	23	1,53
V2	9,30	2	5	5,50	6	27,80	1,85
S	22,30	6	11	5,50	6	50,80	
X	11,15	1,00	5,50	2,75	3		

En el cuadro N° (17) de factores de niveles la Variedad de crisantemo V2= Calabria amarillo es el que presento mayor número de yemas con una media de 27,80, en cuanto a las concentraciones la concentración C1= sin fitoreguladores de crecimiento se puede evidenciar que obtuvo un mejor comportamiento en cuanto al número de yemas con 11,15 yemas por brote, siguiendo en el segundo lugar está la concentración C3=5,50 y el tercera concentración esta C5= 3 yemas por brote. Los efectos de las citoquininas en la dominancia lateral estimula el crecimiento de yemas laterales inhibiendo de igual manera las yemas apicales (García, 2006).

Cuadro N°18 Análisis de varianza de número de yemas a los 23 días.

FUENTES DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	F TABULADA	
					Ft5%	Ft1%
TOTAL	106,52	29				
TRATAMIENTO	48,23	9	5,36	0,60	2,77	4,25
ERROR	52,38	18	2,91			
FACTOR A variedad	0,77	1	0,77	0,26	4,41	8,28
FACTOR B concentración	34,07	4	8,52	2,93	2,93	4,58
INTERACCIÓN A/B	13,39	4	3,35	1,15	2,93	4,58

Observando el cuadro (18) de análisis de varianza de número de yemas por brote a los 23 días se puede establecer que existe una diferencia significativa entre tratamientos al 5%.

Analizando los factores A variedades de crisantemo (V1=Sembla blanco y V2= Calabria amarillo) se puede establecer que no existe una diferencia significativa entre variedades tanto al 5% y al 1%.

En el factor B concentración de fitoreguladores de crecimiento (C1=testigo; C2=1ml/L de KIN; C3=2ml/L de KIN; C4=0,1ml/L de BAP y C5=0,2ml/L de BAP), presenta una diferencia significativa variable la cual determinara que concentración de fitoreguladores de crecimiento es adecuado para el desarrollo de números de yemas para la siguiente fase.

Sin embargo, en las interacciones de factores variedades/concentración de fitoreguladores de crecimientos al no existir diferencias significativas se establece que ocurre un efecto diferente en el factor variedades de crisantemos.

4.5. LARGO DE BROTE A LOS 30 DÍAS

Cuadro N°19 Largo de brote a los 30 días.

LARGO DE LOS BROTES						30 DÍAS
Tratamientos/Repeticiones		I	II	III	S	X
T1	V1C1	7,25	5	1,50	14	4,58
T2	V1C2	6	4	0	10	3,33
T3	V1C3	0	5	0	5	1,67
T4	V1C4	0	0	0	0	0
T5	V1C5	0	0	0	0	0
T6	V2C1	2,50	1	3,50	7	2,33
T7	V2C2	2,50	2	0	5	1,50
T8	V2C3	5,50	2	0	8	2,50
T9	V2C4	0	3	2,53	5,53	1,84
T10	V2C5	0	2,37	3	5,37	1,79
Σ		23,75	19,37	10,53	53,65	

En el siguiente cuadro (19) Se muestra que corresponden al largo de brote a los 30 días. Se puede observar que el tratamiento T1 (Variedad de crisantemo V1= Sembla blanco y la concentración C1= sin fitoreguladores de crecimiento) presenta una media de 4,58cm de largo de brote, siguiendo el segundo lugar está el T2 (Variedad de crisantemo V1= Sembla blanco y la concentración de fitoreguladores de crecimiento C2= 1ml/L de KIN), en el tercer lugar esta tratamiento T8 (Variedad de crisantemo V2= Calabria amarillo y la concentración C3= 2ml/L de KIN de fitoreguladores de crecimiento) con una media de 2,50 cm de largo de brote en el cuarto lugar se encuentra el tratamiento T6 (Variedad de Crisantemo V2= Calabria amarillo y la concentración C1=sin fitoreguladores de crecimiento) con un largo de brote de 2,33cm, en el quinto lugar está el tratamiento T9 (Variedad de Crisantemo V2= Calabria Amarillo y la concentración C4= 0,1ml/L de BAP) con una media de largo de brote de 1,84cm . Por otra parte, (Barceló, 1995) señalan que, al aplicar hormonas al medio de cultivo, debe existir un balance entre ambos; así, al aumentar la cantidad de citoquinina con respecto a la auxina, se induce la formación de brotes, el desarrollo de brotes se ve favorecido mayormente por el fitoregulador como la kinetina.

Los tratamientos que no presentaron brotes a los 30 días fueron los que no regeneraron a los 23 días después de la introducción T4 Y T5 de la misma manera.

Cuadro N°20 Análisis de varianza de largo de brote a los 30 días.

FUENTES DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	F TABULADA	
					Ft5%	Ft1%
TOTAL	129,89	29				
TRATAMIENTO	62,05	9	6,89	0,77	2,77	4,25
ERROR	58,77	18	3,26			
FACTOR A variedad	1,26	1	1,3	0,39	4,41	8,28
FACTOR B concentración	30,14	4	7,53	2,31	2,93	4,58
INTERACCIÓN A/B	30,65	4	7,66	2,35	2,93	4,58

Al observar el cuadro N°(20) de análisis de varianza para el largo de brote a los 30 días, se pudo observar que no existe una diferencia significativa entre tratamientos, sin embargo realizando la observación en el factores A (variedades de crisantemo V1= Sembla blanco y la variedad V2= Calabria amarillo) mostrando la diferencias entre las variedades y factor B (concentraciones de fitoreguladores de crecimiento (C1=testigo, C2=1ml/L de KIN, C3=2ml/L de KIN, C4=0,1ml/L de BAP y C5=0,2ml/L de BAP), sobre el crecimiento y la vigorosidad de las vitro plantas, aunque no son la excepción por lo tanto no existe una diferencia significativa tanto al 5% y al 1%.

Analizando la interacción de los factores variedad/concentración de fitoreguladores de crecimiento no existen diferencias significativas.

4.6. NÚMERO DE YEMAS POR BROTE A LOS 30 DÍAS

Cuadro N°21 Número de yemas por brote a los 30 días.

NÚMERO DE YEMAS						30 DÍAS
Tratamientos/Repeticiones		I	II	III	S	X
T1	V1C1	8,50	6	8	22,50	7,50
T2	V1C2	3	4,50	0	8	2,50
T3	V1C3	0	6	0	6	2
T4	V1C4	0	0	0	0	0
T5	V1C5	0	0	0	0	0
T6	V2C1	7	9	3,50	19,50	6,50
T7	V2C2	3	3	0	6	2
T8	V2C3	9	3	0	12	4
T9	V2C4	0	3	5,50	8,50	2,83
T10	V2C5	0	6	4	10	3,33
Σ		30,50	34,50	21,00	86	

El presente cuadro (N°21) se puede evidenciar los datos tomados del número de yemas a los 30 días. Se puede evidenciar que el tratamiento T1 (De la variedad de crisantemo V1= Sembla blanco y la concentración C1= sin fitoreguladores de crecimiento) presenta una media de 7,50 de número de yemas por brote, en el segundo lugar se encuentra el tratamiento T6 (De la variedad de crisantemo V2= Calabria amarillo y la concentración C1= sin fitoreguladores de crecimiento) que obtuvo una media de 6,50 número de yemas, en el tercer lugar esta T8 con una media de 4 en número de yemas, siguiendo en el cuarto lugar está el tratamientos T10 de la variedad (V2= Calabria amarillo con la concentración C5=0,2ml/L de BAP) con una media de numero de yemas 2,83 en los tratamientos T4 y T5 no presentaron número de yemas razón porque no hubo regeneración en estos tratamientos. El porcentaje de aumento de la biomasa es inferior al que corresponde al aumento en el número de células, pero esta relación luego se invierte debido al incremento del tamaño celular.

Cuadro N°22 Factores de niveles de número de yemas a los 30 días.

FACTOR	C1	C2	C3	C4	C5	S	X
V1	22,50	8	0	0	0	30	2
V2	19,50	6	12	8,50	10	56	3,73
S	42	13,50	12	8,50	10	86	
X	21	2,25	6	4,25	5		

En el presente evaluación de niveles de medias de numero de yemas el cuadro N° (22) se puede evidenciar que la variedad V2= Calabria amarillo es la que va mostrando mayores rendimientos y desarrollo, que la variedad V1 ya que presenta una media de 3,37 número de yemas en cuanto en cuanto en las concentraciones de fitoreguladores de crecimiento se puede evidenciar que la concentración C1= sin fitoreguladores de crecimiento es la que presenta una media de 21 de número de yemas, en las segunda semana de evaluación siguiendo en el segundo lugar está la concentración C3= 6 con una media de yemas que contiene 2ml/L de BAP.

En el tercer lugar está la C5=5 con una media de numero de yemas con 0,2ml/L de BAP.

Cuadro N°23 Análisis de varianza de número de yemas a los 30 días.

FUENTES DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	F TABULADA	
					Ft5%	Ft1%
TOTAL	296,47	29				
TRATAMIENTO	185,13	9	20,57	2,29	2,77	4,25
ERROR	101,72	18	5,65			
FACTOR A variedad	22,53	1	22,53	3,99	4,41	8,28
FACTOR B concentración	130,55	4	32,64	5,78	2,93	4,58
INTERACCIÓN A/B	32,05	4	8,01	1,42	2,93	4,58

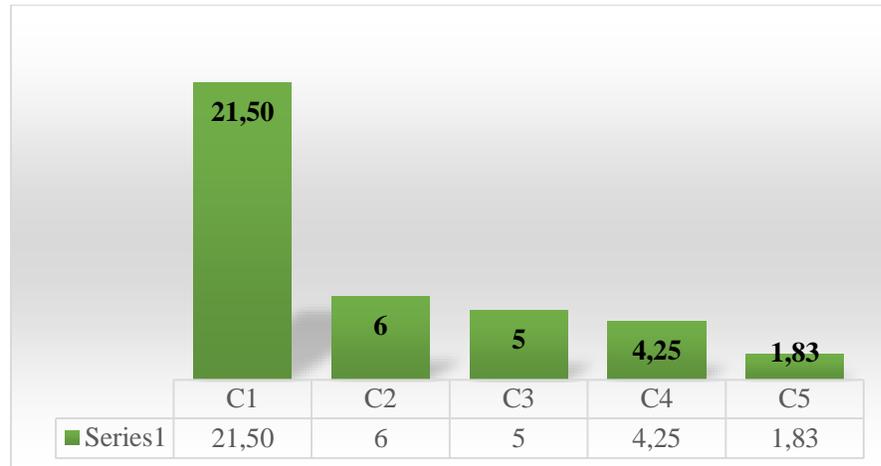
Analizando los resultados mediante el análisis de varianza de número de yemas a los 30 días se determinó que no existe diferencia significativa al 5% y 1% entre tratamientos, en el factor A (variedades de crisantemo V1= Sembla blanco y V2= Calabria amarillo) se puede observar que existe una diferencia significativa solo en el 5%.

Al observar el factor B (concentración de fitoreguladores de crecimiento C1= Sin fitoreguladores de crecimiento, C2=1ml/L de KIN, C3=2ml/L de KIN, C4=0,1ml/L de BAP y C5=0,2ml/L de BAP), se puede evidenciar que es altamente significativo como 5% y al 1%. Esta es en general las fitohormonas son más efectiva en la inducción de yemas axilares. Sin embargo, un balance apropiado entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo es necesario para la multiplicación de plantas a partir de meristemas, ápices o yemas. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y del tipo de explante.

Analizando la interacción entre factores se puede observar que no existe una diferencia significativa al 5% y al 1%.

Gráfica N°2 Prueba de TUKEY de comparación de medias en el factor B (concentración de fitoreguladores de crecimiento) de número de yemas a los 30 días.

T=6,83



La concentración E (C1=sin concentración de fitoreguladores de crecimiento) presenta la mejor media de número de yemas por vitro planta con 21,5 siguiendo con los segundos lugares tenemos a las concentraciones C (C3= 2ml/LKIN) y D (C5=0.2ml/L de BAP), que realizando la prueba se observa estadísticamente que hay concentraciones que son significativamente diferentes como las concentraciones $|A-E|=19,67 < 6,83$; $|B-E|=17,25 < 6,83$; $|C-E|=16,5 < 6,83$; $|D-E|=15,5 < 6,83$

Significativamente diferente a las demás concentraciones.

A	B	C	D	E
1,83	4,25	5	6	21,5

$|A-B| = 2,42 < 6,83$ Significativamente iguales.

$|A-C| = 3,17 < 6,83$ Significativamente iguales.

$|A-D| = 4,17 < 6,83$ Significativamente iguales.

$|A-E| = 19,67 < 6,83$ Significativamente diferente.

$|B-C| = 0,75 < 6,83$ Significativamente iguales.

$|B-D| = 1,75 < 6,83$ Significativamente iguales.

$|B-E| = 17,25 < 6,83$ Significativamente diferente.

$|C-D| = 1 < 6,83$ Significativamente iguales.

$|C-E| = 16,5 < 6,83$ Significativamente diferente.

$|D-E| = 15,5 < 6,83$ Significativamente diferente.

4.7. LARGO DE BROTE A LOS 37 DÍAS

Cuadro N°24 Largo de brote a los 37 días.

LARGO DE LOS BROTES						37 DÍAS
Tratamientos/Repeticiones	I	II	III	Σ	X	
T1	V1C1	13,50	8,50	1	23	7,67
T2	V1C2	3	8	0	11	4
T3	V1C3	0	5	0	5	1,67
T4	V1C4	0	0	0	0	0
T5	V1C5	0	0	0	0	0
T6	V2C1	4,16	3	5,50	12,66	4,22
T7	V2C2	6	6	0	12	4
T8	V2C3	9	3	0	12	4
T9	V2C4	0	5	9	14	4,67
T10	V2C5	0	5,33	5	10,33	3,44
Σ		35,66	38,83	20,50	94,99	

En el siguiente cuadro N°24 se muestran los datos obtenidos de largo de brote a los 37 días después de la introducción de los 10 tratamientos con sus respectivas repeticiones.

Observando la gráfica el tratamiento de mayor largo de brote a los 37 días fue el tratamiento T1 (Variedad de crisantemo V1=Sembla blanco y la concentración C1= sin concentración de fitoreguladores de crecimiento) con una media de largo de brote de 7,47 cm de largo de brote, siguiendo el segundo lugar fue el tratamiento T9 (Variedad de crisantemo V2=Calabria amarillo y la concentración C4= 0,1 ml/L de BAP concentración de fitoreguladores de crecimiento) con una media de largo de brote de 4,67 cm de largo de brote siguiendo con el tercer lugar el tratamiento T6 (variedad de crisantemo V2= sin concentración de fitoreguladores de crecimiento) con una media de 4,22cm de largo de brote. En el cuarto lugar está el T2, T7 y T8 con un promedio de 4 cm de largo de brote. Estos resultados pudieron deberse a que las fitohormonas

indujeron un crecimiento de forma gradual en la actividad del tejido meristemático como consecuencia el crecimiento lento del explante debido a los cortes, que pudo afectar la regeneración celular, el crecimiento y desarrollo de la planta.

Cuadro N° 25 Factores de niveles de largo de brote a los 37 días.

FACTOR	C1	C2	C3	C4	C5	S	X
V1	23	11	0	0	0	34	2,27
V2	12,66	12	12	14	10,33	60,99	4,07
S	35,66	23	12	14	10,33	94,99	
X	17,83	3,83	6	7	5,17		

Observando el cuadro N° (25) los factores de interacción se puede observar que la variedad V2= Calabria amarillo es la que mejor se comportó en cuanto en largo de brote con una media de 4,07 cm de en las concentraciones de fitoreguladores de crecimiento C1= sin fitoreguladores de crecimiento con una media de 17,83cm de largo en el segundo lugar que mostro mayor rendimiento de crecimiento está la C3=2ml/L de KIN con una media de largo de brote de 6cm de largo de brote, en el tercer lugar se encuentra la C5=0,2ml/L de BAP con una media de 5,17cm de largo de brote en 37 días.

Cuadro N°26 Análisis de varianza de largo de brote a los 37 días.

FUENTES DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	F TABULADA	
					Ft5%	Ft1%
TOTAL	405,69	29				
TRATAMIENTO	166,22	9	18,5	2,05	2,77	4,25
ERROR	220,27	18	12,24			
FACTOR A variedad	24,28	1	24,3	1,98	4,41	8,28
FACTOR B concentración	73,79	4	18,45	1,51	2,93	4,58
INTERACCIÓN A/B	68,16	4	17,04	1,39	2,93	4,58

Analizando el cuadro N°26 de análisis de varianza se puede determinar que existe una diferencia significativa al 5% y al 1% entre los tratamientos. Los factores A (variedades de crisantemo V1= Sembla blanco y V2= Calabria amarillo) se puede determinar que existe una diferencia altamente significativa al 1% y 5%.

En cuanto al factor B (concentración de fitoreguladores de crecimiento C1= sin fitoreguladores de crecimiento, C2=1ml/L de KIN, C3=2ml/L de KIN, C4=0,1ml/L de BAP y C5= 0,2ml/L de BAP no existe una diferencia significativa al 5% y al 1% la interacción entre factores tampoco son la excepción no hay una diferencia significativa.

4.8. NÚMERO DE YEMAS POR BROTE A LOS 37 DÍAS.

Cuadro N°27 Número de yemas a los 37 días.

NÚMERO DE YEMAS					37 DÍAS	
Tratamientos/Repeticiones	I	II	III	S	X	
T1	V1C1	11	8,00	10	29	9,67
T2	V1C2	5	7	0	12	4
T3	V1C3	0	6	0	6	2
T4	V1C4	0	0	0	0	0
T5	V1C5	0	0	0	0	0
T6	V2C1	9,60	11	8	28,10	9,37
T7	V2C2	10	3	0	13	4,33
T8	V2C3	14	10	0	24	8
T9	V2C4	0	11	19	30	10
T10	V2C5	0	11,33	6	17,33	5,78
Σ		49,60	61,33	42,50	153,43	

En el siguiente cuadro se muestra los datos obtenidos en laboratorio correspondiente al número de yemas a los 37 días datos tomados a los diez tratamientos la cual la medición fue tomada a simple vista realizando un conteo de número de yemas.

Observando la gráfica el tratamiento T9 (De la variedad de crisantemo V2= Calabria amarillo con la concentración C4= 0,1 ml/L de KIN fitoreguladores de crecimiento) se obtuvo una media de 10 número de yemas, el segundo lugar fue el tratamiento T1 (V1=Sembla blanco y la concentración C1= sin concentración de fitoreguladores de crecimiento) presenta una media de 9,67 de número de yemas siguiendo el tercer lugar esta tratamiento T6 (De la variedad de crisantemo V2= Calabria amarillo y la concentración C1= sin fitoreguladores de crecimiento) con una media de 9,37 de número de yemas a los 37 días, siguiendo los tratamientos T6, T8 y T10.

Cuadro N°28 Factores y niveles de número de yemas a los 37 días.

FACTOR	C1	C2	C3	C4	C5	S	X
V1	29	12	0	0	0	41	2,73
V2	28,10	13	24	30	17,33	112,43	7,50
S	57,10	25	24	30	17,33	153,43	
X	28,55	4,17	12	15	8,67		

Observando los factores de niveles de número de yemas por brote a los 37 días se puede evidenciar que la variedad V2 =Calabria amarillo es la que mostro mayor número de yemas con una media de 7,50 en cuanto a las concentraciones C1=sin fitoreguladores de crecimiento mostro mayor número de yemas con una media de 28,55cm en el segundo lugar está la concentración C4=0,1ml/L de BAP con una media de 15 yemas en el tercer lugar está la concentración C3=2ml/L de KIN y el cuarto lugar esta C5= 0,2ml/L con una media de 8,67 yemas a los 37 días.

Cuadro N°29 Análisis de varianza de número de yemas a los 37 días.

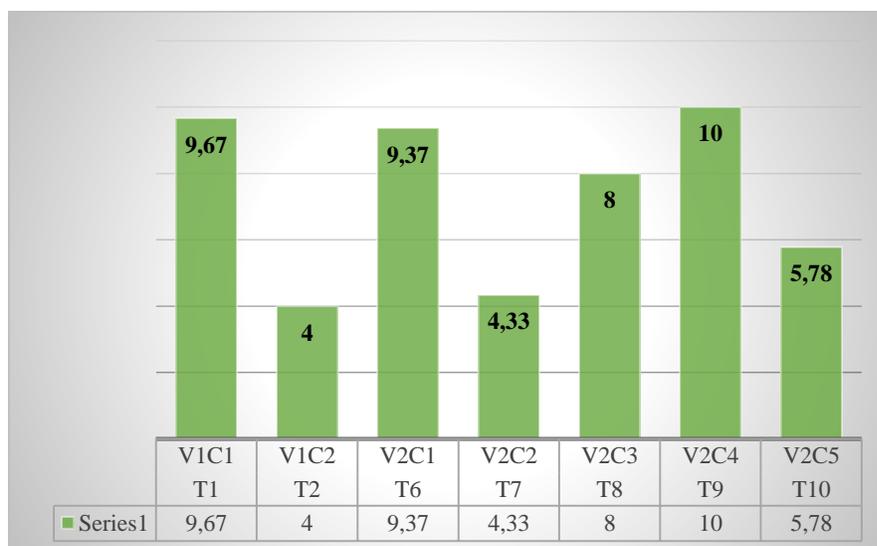
FUENTES DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	F TABULADA	
					Ft5%	Ft1%
TOTAL	895,09	29				
TRATAMIENTO	455,29	9	50,6	5,6	2,77	4,25
ERROR	421,71	18	23,43	2,2		
FACTOR A variedad	170,07	1	170,1	7,3	4,41	8,28
FACTOR B concentración	158,93	4	39,73	1,7	2,93	4,58
INTERACCIÓN A/B	126,28	4	31,57	1,3	2,93	4,58

Al analizar los resultados mediante el análisis de varianza se determinó se determinó que no existe diferencia significativa (5% y al 1%) para los tratamientos en estudio, en cuanto al factor A (variedad) se puede evidenciar que si existe diferencia significativa al 5% por lo tanto se debe realizar la prueba de TUKEY.

En el factor B (concentración de fitoreguladores de crecimiento) tampoco existe una diferencia significativa al 5% y al 1%. La interacción de factores tampoco es la excepción.

Gráfica N°3 Prueba de TUKEY de comparación de medias en tratamientos de número de yemas a los 37 días.

T=2,48



Observando estadísticamente el T9 (Variedad de crisantemo V2= Calabria amarillo y la concentración C4=0,1 ml/L de BAP) con una media de 10 en números de yemas y segundo lugar está el T1 (Variedad de crisantemo V1= Sembla blanco y la concentración C1= Testigo sin fitoreguladores de crecimiento), con una media de 9,67 número de yemas en tercer lugar está en T6 (Variedad de crisantemo V2= Calabria amarillo y la concentración C1= sin concentración de fitoreguladores de crecimiento), con una media de 9,37 siguiendo los T8,T10, T7.

A	B	C	D	E	F	G
10	9,67	9,37	8	5,78	4,33	4

$|A-B| = 0,33 < 2,48$ Significativamente iguales.

$|A-C| = 0,63 < 2,48$ Significativamente iguales.

$|A-D| = 2 < 2,48$ Significativamente iguales.

$|A-E| = 4,22 > 2,48$ Significativamente diferente.

$|A-F| = 5,67 > 2,48$ significativamente diferente.

$|A-G| = 6 > 2,48$ significativamente diferente.

$|B-C| = 0,3 < 2,48$ Significativamente iguales.

$|B-D| = 1,67 < 2,48$ Significativamente iguales.

$|B-E| = 3,89 > 2,48$ Significativamente diferente.

$|B-F| = 5,34 > 2,48$ Significativamente diferente.

$|B-G| = 5,67 > 2,48$ Significativamente diferente.

$|C-D| = 1,37 < 2,48$ Significativamente iguales.

$|C-E| = 3,59 > 2,48$ Significativamente diferente.

$|C-F| = 5,04 > 2,48$ Significativamente diferente.

$|C-G| = 5,37 > 2,48$ Significativamente diferente.

$|D-E| = 2,22 < 2,48$ Significativamente iguales.

$|D-F| = 3,67 > 2,48$ Significativamente diferente.

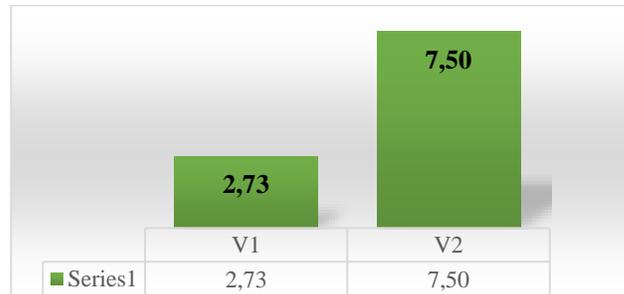
$|D-G| = 4 > 2,48$ Significativamente diferente.

$|E-F| = 1,45 < 2,48$ Significativamente iguales.

$|E-G| = 1,78 < 2,48$ Significativamente iguales.

$|F-G| = 0,33 < 2,48$ Significativamente iguales.

Gráfica N°4 Prueba de TUKEY de comparación de medias en el factor A (Variedad) de número de yemas a los 37 de días.



Realizando la prueba de TUKEY se puede observar que variedad V2= Calabria amarillo es la mejor variedad que presenta una media de mayor número de yemas pero estadísticamente realizando la comparación de medias entre variedades es de 4,93 por lo tanto es menor $T=2,48$ lo que lo indica que las variedades son significativamente iguales en cuanto al comportamiento.

A	B
7,47	2,4

$|A-B| = 4,93 > 2,48$ significativamente iguales.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

De los objetivos propuestos los resultados obtenidos de cada variable se mencionaran con las siguientes conclusiones:

- El tratamiento que presento mayor grado de contaminación en la primera semana de evaluación que fue a los 23 días, después de la introducción se pudo evidenciar que el tratamiento T1 de la variedad de crisantemo (V1=Sembla blanco y la concentración C1= sin fitoreguladores de crecimiento) y el tratamiento T3 de la variedad de crisantemo (V1=Sembla blanco y la concentración C3= 2ml/L de KIN) fueron los tratamientos con mayor porcentaje de contaminación con una media de 29,55% produciendo un alto grado de contaminación y el tratamiento T6 (V2=Calabria amarillo y al concentración C1= sin fitoreguladores de crecimiento) presento un 0% de contaminación entre los diez tratamientos evaluados la que presento mayor resistencia en cuanto a enfermedades.
- La evaluación del comportamiento del porcentaje de regeneración a los 23 días después de la introducción de los explantes se procedió a evaluar el porcentaje de regeneración que es la partida del proyecto de investigación de las diez tratamientos evaluados el tratamiento T1 (Variedad de crisantemo V1=Sembla blanco y la concentración de fitoreguladores de crecimiento C1=sin fitoreguladores de crecimiento) presenta un alto porcentaje medio de regeneración con el 33,33%. Los tratamientos T4 y T5 son los tratamientos que presentaron el 0% de porcentaje de regeneración que pertenecen a la variedad Sembla blanco que presentó menor resistencia en cuanto al porcentaje de regeneración y se aplicó las fitoreguladores de kinetina.
- Con respecto a la variable de largo de brote a los 23,30,37 días el tratamiento que presento mayor largo de brote, que llego hasta la última etapa de evaluación de días fue el tratamiento T1 (Variedad de crisantemo V1=Sembla

blanco y la concentración C1=sin fitoreguladores de crecimiento) con una media de 3,23cm de largo de brote a los 23 días, 4,58cm de largo a los 30 días y 7,67 cm de largo de brote a los 37 días después de la introducción.

- De las variante de numero de yemas, de dos variedades de crisantemo y concentraciones de fitoreguladores de crecimiento los tratamientos que presto mayor respuesta cuanto al número de yemas a los 23, 30, 37 días el tratamiento T1 (De la variedad de crisantemo V1= Sembla blanco y la concentración C1= testigo sin fitoreguladores de crecimiento), demostró una media de 4,33 de número de yemas por brote a los 23 días, 7,50 número de yemas por brote a los 30 días pero hubo un cambio en la tercera evaluación ya que el tratamiento T10 (De la variedad de crisantemo V2= Calabria amarillo con la concentración C4= 0,1 ml/L de KIN fitoreguladores de crecimiento) obtuvo una media de 10 número de yemas por brote que servirán para la siguiente etapa la fase de multiplicación.
- Determinando el efecto de la interacción fitohormonas por variedad en el cultivo de crisantemo se observaron que el efecto de las fitoreguladores de crecimiento no pueden ser necesarios en la variedades de crisantemo para el trabajo de cultivo in vitro ya que los tratamientos que no se agregaron fitoreguladores de crecimiento presentaron mayores rendimientos y mejores características a diferencia de los tratamiento que si tenían una concentración de fitorregulador de crecimiento.

- **5.2. RECOMENDACIONES**

En función de las conclusiones obtenidas se recomienda:

- Se recomienda utilizar un medio de cultivo sin concentración de fitoreguladores de crecimiento porque fue el ensayo que obtuvo mejores resultados durante el periodo de evaluación.
- Utilizar como segmentos nodales a su adecuado tiempo porque puede resultar un factor en cuanto a la obtención de vitroplantas.
- Realizar ensayos de este tipo con este cultivo ya que la producción de crisantemo en el mercado local es de gran importancia económica, es por eso que es importante la obtención de plantas madres para la producción interna de nuestro departamento.
- Continuar la investigación con las siguientes fases para la conclusión del trabajo de investigación que es la obtención de plantas madres de crisantemo.