

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

La biotecnología es una palabra de reciente aparición que describe una disciplina antigua y utilizada por el hombre desde los comienzos de la historia en actividades tales como la preparación del pan, bebidas alcohólicas o el mejoramiento de cultivos y animales domésticos. En términos generales, Biotecnología se puede definir como el uso de organismos vivos o compuestos obtenidos de organismos vivos para obtener productos de valor para el hombre.

En el año 1902 el fisiólogo austriaco Haberlandt fue el primer investigador en intentar cultivar “in vitro”, células vegetales en un medio sintético de cultivo, pero a pesar de que las células sobrevivieron varios meses éstas no proliferaron, sin embargo, Robbins en 1922 inició el cultivo aislado de meristemas y unos años después con el descubrimiento de las hormonas vegetales fue posible promover la dediferenciación de tejidos vegetales y obtener variadas respuestas morfogenéticas.

El cultivo in vitro de células vegetales implica el mantenimiento de partes aisladas del cuerpo de una planta bajo condiciones de asepsia, nutrientes, luz y temperatura.

El uso comercial de estas técnicas, la micropropagación vegetal, posibilita la propagación vegetativa a gran escala de especies de importancia económica.

Hoy, la biotecnología constituye una promesa para consumidores que buscan calidad, seguridad y sabor en sus alimentos preferidos; para los agricultores que buscan nuevos métodos para incrementar la productividad y la renta de sus explotaciones; y para quienes, desde el gobierno o instituciones privadas, tratan de terminar con el hambre en el mundo, asegurar la calidad del medio ambiente, preservar la biodiversidad y promover la sanidad y la seguridad de los alimentos.

A nivel nacional el consumo de flores no puede ser satisfecho por los productores locales por lo que se recurre a la importación especialmente en el departamento de Tarija , en diferentes eventos provienen del departamento de Cochabamba principalmente éstas tienen un costo elevado debido a la distancia de las que son traídas, la idea de la producción local es disminuir los costos, teniendo la misma calidad e incluso mejor, además de tener cantidades importantes para poder llegar a todo el mercado local.

El mercado de las flores no se distingue por el consumo por estratos sociales, ya que el consumo de las mismas, es igual en el caso de clases altas, medias y bajas, sobre todo considerando que en la ciudad de Tarija la población es apegada a muchas tradiciones culturales.

Considerándose que el clavel ocupa un lugar muy importante en el consumo de flores, con el presente trabajo se busca mejorar su calidad y producción con la técnica del cultivo in vitro, aunque también otras técnicas como las de injerto y esquejes esta promete ser la más viable y efectiva para aminorar los defectos que posee la variedad utilizada.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Ya que la oferta actual de claveles en el departamento de Tarija no cubre las exigencias del consumidor en cuanto a cantidad y calidad de la flor de clavel, con el presente trabajo se busca probar alternativas de producción viables como es el caso del cultivo in vitro.

Lo que se propone es evaluar la respuesta de dos tipos de explantes a cuatro concentraciones de Fitorreguladores, en la fase de establecimiento del Cultivo in vitro del clavel.

Ya que con este método se pueden obtener, en tiempo record, gran cantidad de plantas idénticas entre sí, con alto vigor y libres de plagas y enfermedades.

1.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el departamento de Tarija la producción local no satisface a todo el departamento por lo que se recurre a importar flores desde Cochabamba. Tomando en cuenta también que las técnicas de propagación con las que se cuenta no son totalmente eficientes.

1.4. HIPÓTESIS

- A mayor concentración de fitorreguladores mayor porcentaje de regeneración del explante.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. Objetivo General.

- Evaluar la Respuesta de dos tipos de explantes a cuatro concentraciones de Fito reguladores, en la fase de establecimiento del Cultivo in vitro del Clavel

1.5.2. Objetivos Específicos.

- Evaluar la regeneración de los explantes del clavel en la fase de establecimiento del cultivo in vitro
- Determinar la concentración más adecuada de fitorreguladores en la fase de establecimiento
- Determinar el % de contaminación de los dos tipos de explantes.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ORIGEN DEL CULTIVO DE CLAVEL

El clavel tiene su origen en la cuenca del mediterráneo y antiguamente sólo se hallaba como clavel silvestre, el cual tras una gran cantidad de hibridaciones ha llegado a las variedades actuales que hoy conocemos. Lyon alrededor del año 1845 fue el primero en adaptar a la producción de flor cortada al cultivo del clavel. Más tarde a partir de 1942, William Sim alcanzó por hibridaciones y selecciones claveles que llevan su nombre a los cuales se le

denomina: Clavel Sim o Clavel Americano, los que han dado origen al desarrollo de la producción en invernadero y bajo túneles (Montecinos, 2008).

Los claveles utilizados hoy provienen principalmente de Europa. Por otro lado, según cuentan todos o casi todos los propagadores del clavel, el centro de origen y la mayor cantidad de mutaciones, son obtenidas en Italia. Luego se entregan a las casas multiplicadoras.

Estas reúnen 250 especies de las cuales las preferidas para el público, es la que produce flores rojas, seguidas de las blancas, amarillas y naranjas.

2.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Los claveles estándar y miniatura, son una de las más importantes flores de corte en el comercio mundial. Además, debido a su fácil y rápida multiplicación, el clavel es objeto de un importante comercio internacional de esquejes.

Las tendencias del mercado plantean un nuevo reto: la reconversión del producto, ya que el clavel es el tipo de flor más extendido y es necesario un cambio hacia otras especies o híbridos más atractivos para el mercado, mejorando aspectos fitosanitarios como: introducción de resistencias (virus, hongos, etc.), incremento del número de variedades para flor cortada y posibilidad de usar estos híbridos como flor de complemento para el cultivo en maceta y jardinería (jardines, rocallas, etc.).

La producción de claveles se ha trasladado desde los grandes mercados consumidores, como EUA -Estados Unidos de Norteamérica- Japón, Alemania, Holanda, hacia los nuevos países productores para la exportación, como Colombia segundo exportador mundial de flores- Kenya, España, China y otros.

Estos últimos países tienen ventajas en sus costos laborales, en sus muy buenas condiciones de producción -luz, suelos, agua, temperaturas y desarrollo logístico para poner las cajas de flores en aeropuertos que permiten rápido traslado hacia los países y mercados demandante.

Muchos países en vías de desarrollo, tienen condiciones para encontrar una ubicación de la mercadería producida en los grandes centros consumidores. Si bien, los tallos florales que se producen o producían en los países demandantes son de buena calidad, la oferta de estos

en la floricultura los ha llevado a ser demandantes de cajas de flores importadas desde estos países.

Argentina como país cosmopolita y por su flujo de inmigración, se ha constituido en un importante centro consumidor de flores entre las que los claveles tienen una gran trascendencia. Cuanto más avanzada sea una economía como lo son las del hemisferio norte más demandantes de flores son en condiciones de pujanza económica. (Gratina, 2013)

2.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: Vegetal.

Phylum: Tracheophytae.

División: Tracheophytae.

Sub División: Anthophyta.

Clase: Angiospermae.

Sub Clase: Dicotyledoneae

Grado Evolutivo: Archichlamydeae

Grupo de Ordenes: Corolinos

Orden: Centrospermales

Flia: Caryophyllaceae

Nombre científico: *Dianthus cariophyllus* L.

Nombre común: Clavel

Fuente. Herbario U.A.J.M.S

2.4. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS Y MORFOLÓGICAS

El clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) pertenece a la familia *Caryophyllaceae* y al género *Dianthus*. -Etimología: del griego *karya* = nogal y *phyllon* = hoja, en referencia al aroma de las hojas del nogal, de donde se tomó el nombre para el clavo de olor y luego para el clavel.

Es una planta perenne de base leñosa con tallos de hasta 80 cm de altura, glabros y de día largo.

- Raíces: Presenta un sistema radicular fibroso. Sus raíces son de gran longitud, pudiendo alcanzar los 30cm de profundidad.

- Tallos: Presentan varios vástagos largos (hasta 80cm de altura), glabros y con nudos muy pronunciados. Al final de cada vástago se forma una flor terminal.

- Hojas: Las hojas son lineales (0,8-1,5cm de longitud), planas, acuminadas y glaucas. De cada nudo brotan dos hojas opuestas, cuya base envainadora envuelve al mismo.

- Flores: Aparecen en inflorescencias en panícula o cima laxa, a veces solitarias o en grupos de cinco, muy olorosas.

En cuanto a la flor de clavel, desde una perspectiva comercial hay que distinguir dos clases fundamentales:

- Clavel estándar, El clavel estándar es una flor colorida de múltiples pétalos, nativo de los climas del mediterráneo y cultivado en todo el mundo. Son extremadamente populares y se los usa generalmente en los ramilletes, los ojales y los ramos debido a su resistencia, larga vida y versatilidad. En el caso de claveles estándar son mejores las variedades con menos tendencia a emitir brotes laterales.

- El clavel mini, produce más de 5 flores por tallo y dispone de una enorme variedad de colores. Son plantas más pequeñas y rústicas, de modo que su cultivo al aire libre es

bastante sencillo. Los colores más demandados en el mercado son blanco, amarillo, naranja, rosa, rojo y mezclas; sin embargo, es el azul tintado el que alcanza mayor precio. En este caso lo que se pretende es que el clavel tenga el mayor número de botones florales.

2.4.1. Propagación del Clavel

La propagación de plantas consiste en efectuar la multiplicación por medios tanto sexuales como asexuales, se puede realizar de dos maneras: la primera forma tradicional y la segunda mediante el uso de la biotecnología (cultivo *in vitro*.) El clavel se puede multiplicar por semilla o por esqueje.

La propagación del clavel se realiza principalmente mediante esquejes procedentes de plantas madre y por micropropagación *in vitro*. La multiplicación por semilla solo se emplea para hibridaciones.

La duración de cultivo para la planta madre está en los doce o máximo quince meses. (Ministerio de Agricultura 1998)

El cultivo *in vitro*, es una técnica que usa para propagar plantas a partir de plantas madres por lo que las plántulas obtenidas son idénticas entre sí a la planta madre (Serrano 1991). Esta se puede realizar mediante cultivo de meristemos para producir plantas libres de enfermedades (virus, hongos y bacterias).

La multiplicación vegetativa tradicionalmente (por esquejes, división, acodo, y distintos injertos), ha jugado durante muchos años un importante papel en la agricultura; por ejemplo, en el caso de la papa, manzana, pera, muchos bulbos ornamentales y plantas tuberosas, cultivos leñosos, crisantemo, etc. La reproducción vegetativa es importante en el mejor vegetal.

Los métodos clásicos de reproducción o bien son insuficientes para las necesidades reales (demasiado lentos, difíciles, o caros) o a veces son completamente inviables.

2.4.2. Técnicas de Propagación

La propagación del clavel se realiza principalmente mediante esquejes procedentes de plantas madre y por micro propagación *in vitro*. La multiplicación por semilla sólo se emplea para hibridaciones.

Las técnicas de propagación varían de acuerdo al criterio y economía del productor, son las siguientes:

Esta técnica se realiza tomando esquejes de plantas madre cultivadas en invernaderos independientes con extremas medidas de sanidad vegetal.

Para que un esqueje sea de buena calidad, se debe obtener de la parte media del tallo (debido a que los nudos basales son menos vegetativos y los superiores dan lugar a un crecimiento prematuro) con una longitud de 10cm aproximadamente y con 5-6 pares de hojas. La consistencia de los esquejes no debe ser ni excesivamente leñosa ni excesivamente herbácea.

La recolección de los esquejes debe efectuarse a mano, para evitar la diseminación de enfermedades, y durante las horas más frescas de la mañana.

Una vez recolectados, se deben colocar en invernaderos de multiplicación y mantener la humedad relativa en torno al 95% y sobre sustrato esterilizado a una temperatura de 20°C aproximadamente. Los esquejes, también se pueden conservar en frío (0,5-1°C). La duración del almacenaje es de unos 15 días para esquejes enraizados y de 2 meses para no enraizados.

Propagación por semillas, esta es una técnica que no se utiliza mucho en la producción se la realiza más efectivamente para las hibridaciones.

2.4.3. Factores Edafoclimaticos

2.4.3.1 Clima

Temperatura: aunque el clavel soporta hasta los -3/-4°C sin helarse, la formación de yemas florales se para por debajo de 8°C y por encima de 25°C. Los 0°C son fatales para el clavel pues se pueden formar lunares y deformaciones en los pétalos. Evitar temperaturas superiores a 36°C.

En caso de que el cultivo sea implantado en invernadero las condiciones que se requieren son las siguientes:

-Luz: se trata de un factor predominante tanto para el crecimiento como para la floración, por ello es preciso tanto la buena orientación del invernadero como el clavel necesita una iluminación de 40.000 lux. La luz también determina la rigidez del tallo y el tamaño y número de flores.

-Ventilación: permite controlar la temperatura y la higrometría.

Cuadro No 1.

REQUERIMIENTOS DE TEMPERATURA

Temperaturas optimas		
	Diurna	Nocturna
Invierno	15-18°C	10-12°C
verano	21°C	12°C

Fuente: Pizano (2000)

Las variaciones bruscas de temperatura provocan la apertura del cáliz, este fenómeno es frecuente en los cultivos bajo abrigo o con sólo calefacción antihelada; siendo esta reacción muy atenuada en los claveles mediterráneos.

2.3.4.2 Suelo

Prefiere suelos arenosos y en ningún caso con alto contenido en arcillas. El enarenado va bien, siendo frecuentes los aportes eventuales de estiércol muy descompuesto (15-25 kg/m²), aunque su empleo puede ocasionar contaminaciones de Fusarium. El suelo tiene que ser poroso y tener una elevada capacidad de drenaje para evitar encharcamientos y así enfermedades criptogámicas o asfixias radiculares. Son preferibles los pH comprendidos entre 6,5 y 7,5.

2.4.3.2.1 Salinidad

Al ser una planta rústica puede soportar altas salinidades tanto del suelo como del agua de riego, aunque el óptimo de producción se consigue con una salinidad de 2 mmhos/cm.

2.4.4. Plagas y Enfermedades

2.4.4.1. Plagas

Las principales plagas que atacan el clavel son mosca blanca, Thrips, Áfidos, pulgones, Arañita roja y el nematodo foliar Aphelenchoides ritzemabossi.

- El acaro más común que afecta el cultivo del clavel es la arañita roja, es un artrópodo de ocho patas en su estado adulto, sin alas y con un aparato bucal prensil que le permite perforar las hojas y succionar el contenido de sus células. (Gómez, 1992)
- Áfidos, son una plaga muy frecuente en el clavel. Se alimentan de hojas y flores, en donde succionan los azúcares que se transportan a través de la xilema. (López 1989)
- Trips, estos insectos se alimentan de flores y centros de crecimiento, provocando decoloraciones y deformaciones en los tejidos afectados. Para el control se requieren los controladores sistémicos. (López 1989)
- Nematodos, son endoparásitos que se alimentan de la parte aérea y radicular del clavel, produciendo debilitación, decoloración y enanismo. Pueden actuar como vectores de algunos virus y también son responsables de la invasión de algunas bacterias y hongos sobre las plantas. Para su control se deben identificar los géneros y poblaciones presentes en el suelo. (Marroquín y Arbeláez, 1992)

2.4.4.2. Enfermedades

- Fusariosis. Es una de las enfermedades más graves que puede padecer el clavel. Esta enfermedad ataca desde las partes bajas de la planta hasta llegar a las partes aéreas. Las hojas se secan y los tallos se agrietan exteriormente. Finalmente, la raíz termina por pudrirse y la planta muere.
- Roya. Esta enfermedad produce manchas sobre tallos y hojas con aspecto vellosos que es donde se albergan las esporas que luego se dispersan con el viento, los insectos o el agua de lluvia.
- Mancha foliar. Esta enfermedad la provoca una bacteria que hace que en el follaje aparezcan heridas necróticas de tono rojizo que terminan afectando también el nervio de las hojas. Las hojas pueden llegar a volverse de color negro.
- Stunt del clavel. Este virus debilita la planta de forma preocupante, ya que la planta no se desarrolla. No brotan las flores y el clavel tiene un aspecto débil.
- Carnation Etched Ring Virus o Virus del jaspeado del clavel: Daña únicamente a las plantas de la familia Caryophyllaceae, apareciendo pequeñas manchas en líneas o anillos de color pardo o púrpura. Se lo controla evitando la contaminación por transmisión mecánica.

2.5. BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

La palabra biotecnología está formada con raíces griegas y significa “estudio de las células vivas para conseguir procesos químicos”. Sus componentes léxicos son bios (vida) y techne (técnica), más el sufijo logia (estudio, o tratado).

El avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Este principio general se aplica también al cultivo in vitro de plantas. Haberlandt, un científico alemán, postuló a principios del siglo pasado que las plantas eran capaces de reproducir su crecimiento a partir de células aisladas, originando la hipótesis de la totipotencia celular en plantas. Sin embargo, este investigador no pudo demostrar en forma práctica su hipótesis, debido a que la mayoría de los componentes complejos que integran los medios de cultivo actuales todavía no habían sido descubiertos. (Jiménez 1998)

Aquí tenemos algunas definiciones de biotecnología:

-La biología es el estudio de los seres vivos. La tecnología trata de resolver los problemas y proporcionarnos las cosas que necesitamos.

-La biotecnología es el uso de organismos vivos o de compuestos obtenidos de organismos vivos para obtener productos de valor para el hombre. Como tal, ha sido utilizada desde los comienzos de la historia en diversas actividades, tales como: la preparación del pan y de bebidas alcohólicas, o el mejoramiento de cultivos y de animales domésticos. (Mejía 1994)

- “Aplicación de la ciencia y la tecnología a las plantas, sus partes, productos y modelos, con el fin de alterar materiales vivos o inertes para el desarrollo de conocimiento, bienes y servicios”. (Martínez 2006)

2.6. PROPAGACIÓN DE PLANTAS POR CULTIVO IN VITRO

La expresión cultivo in vitro de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, etc.), y el control de los factores que afectan el crecimiento.

La micro propagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo in vitro, a través de la micro propagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. El explante más usado para los procesos de propagación in vitro son las yemas vegetativas de las plantas. Los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23°C, además de controlar la cantidad de horas de luz. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas reguladoras de crecimiento, azúcar, agua y agar.

Las ventajas principales del cultivo "in vitro" de plantas son:

- Rápida reproducción y multiplicación de cultivos.
- Obtención de cultivos sanos, libres de virus y agentes patógenos.
- Posibilidad de obtener material de siembra a lo largo de todo el año (no estar sujetos al ciclo estacional).
- Posibilidad de reproducir especies de difícil reproducción o de reproducción y crecimientos lentos.
- Facilita la investigación y proporciona nuevas herramientas de gran utilidad en otras técnicas como la del "ADN".
- Mejora las condiciones de almacenamiento, transporte y comercialización de germoplasma, facilitando su transferencia internacional.

(Roca et.al 1991)

2.7. CULTIVO IN VITRO DE VEGETALES

“Cultivo de tejidos vegetales” es una descripción genérica que involucra diferentes técnicas de cultivo de material vegetal diverso, incluyendo las de protoplastos (células desprovistas de su pared celular), células, tejidos, órganos y plantas completas. Mediante éstas y otras técnicas de cultivo, es posible obtener plantas libres de microbios en un medio nutritivo aséptico (estéril) en condiciones ambientales controladas.

Las primeras experiencias relacionadas al cultivo de tejidos vegetales se remontan a 1902, pero recién en 1922 se logró el primer experimento exitoso: germinación in vitro de semillas de orquídeas. Luego de la germinación, las plántulas obtenidas se transfirieron a un medio de cultivo en condiciones asépticas, y así se mantuvieron protegidas del ataque de patógenos (hongos, virus y bacterias).

Cuando no se realiza el estudio con todo el ser vivo sino con solamente una parte del mismo, se utiliza el término explante para indicar la parte del órgano o tejido vegetal que se cultiva in vitro. A la dificultad de reproducir las condiciones naturales en condiciones de laboratorio, se debe añadir en este caso la dificultad de suministrar al explante todo aquello que antes obtenía del sistema completo. (Castillo et al 1991)

El principio fundamental para el desarrollo del cultivo in vitro de vegetales es la autosuficiencia de las células y la capacidad de regenerar a partir de una célula nuevos tejidos, órganos y por ultimo una completa, este principio es conocido como totipotencia. (Aguirre 2007)

Para la manifestación de la totipotencia de los cultivos in vitro existen dos vías:

-Organogénesis. - Proceso morfogénético que origina la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsiguiente desarrollo de este en un brote vegetativo, que mantiene siempre conexión con el tejido paterno. La organogénesis comprende el desarrollo de yemas axilares o adventicias o de meristemos radicales a partir de explante directamente o indirectamente a partir de callos.

-Embriogénesis. - Como embriones somáticos asexuales o adventicios, se han definido los originados a partir de células que son producto de la fusión de gametos. El embrión somático es producido por cualquier órgano o tejido de la planta, tanto vegetativo como reproductivo, a través de la vía sexual.

Con finalidad puramente descriptiva se puede clasificar los principales factores no biológicos que afectaran al desarrollo del cultivo in vitro, incluyendo:

Ambiente químico

- Composición del medio de cultivo
- pH

Ambiente físico

- temperatura
- luz y fotoperiodo
- humedad

(Villegas 1998)

2.7.1. Aplicación de Cultivo In Vitro en Vegetales

Las aplicaciones son muy diversas y de gran utilidad que se han obtenido en el cultivo in vitro de tejidos vegetales.

- Producción de plantas libres de virus, hongos y bacterias; ya que nos facilita una visión más profunda sobre el comportamiento de los virus en las células o tejidos vegetales. Las interacciones huésped- parásito pueden ser estudiadas de forma eficaz, in vitro.
- Nematología. - el cultivo in vitro se está utilizando también con frecuencia en la investigación sobre nematodos (Krusberg y Babineau. 1979 citados por pierrick 1990)
- Inducción de mutaciones que puede ser utilizada para obtener plantas resistentes a enfermedades.
- Propagación masiva. - la micropropagación propagación clonal es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo in vitro, a través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia

uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. (Aguirre G, et al. 2010)

- Mejoramiento genético: permite acortar el tiempo en el mejoramiento genético convencional, además es una técnica fundamental para el mejoramiento genético por medio de la manipulación del ADN (transgénesis)
- Conservación del germoplasma: La mayor variabilidad genética de los cultivos, se encuentra en los centros primarios y secundarios de diversidad de las especies, Dicha variabilidad puede ser recolectada y conservada en bancos de germoplasma (conversión ex situ), o en su hábitat natural (conservación in situ)

Dependiendo de las características genéticas y reproducidas de cada especie, la conservación ex situ puede consistir en: plantaciones en campo, colecciones de semilla y/o polen a baja temperatura, colecciones in vitro de órganos, tejidos vegetativos y/ o reproductivos, y la criopreservación (Roca et, al 1991).

Cada grupo de especies presenta dificultades propias de conservación genética, siendo aquellas que se propagan vegetativamente, las que presentan mayor dificultad (Castillo et. Al 1991), por lo que la técnica de cultivo in vitro de tejidos, se presenta como una buena alternativa para solucionar tal situación.

2.7.2. Cultivo de Segmentos Nodales

La propagación clonal o vegetativa de segmentos nodales es una producción a partir de partes vegetativas. Se utilizan tejidos vegetales que conserven la potencialidad de multiplicación y diferenciación celular para generar nuevos tallos y raíces a partir de cúmulos celulares presentes en diversos órganos.

Este tipo de propagación tiene esencialmente tres variantes, que son:
La micro propagación a partir de tejidos vegetales en cultivo in vitro.
La propagación a partir de bulbos, rizomas, estolones, tubérculos o segmentos (esquejes) de las plantas que conserven la potencialidad de enraizar.
La propagación por injertos de segmentos de la planta sobre tallos de plantas receptoras más resistentes.

Según la parte de la planta de donde se obtienen los segmentos nodales (cortes o fragmentos) se ha dividido en cortes de: hojas, de brotes o renuevos, de raíz y de ramas. La selección de

cualquiera de ellos depende básicamente de las características inherentes a cada especie, de las facilidades para obtener y manipular los cortes (en función del estado fenológico de la planta), del propósito de la propagación y de la disponibilidad de recursos económicos. (Hurtado y Merino 1994).

2.7.3. Cultivo de meristemos

El cultivo de meristemos tiene numerosas aplicaciones. Una de las más importantes es la obtención de plantas libres de virus, ya que esta pequeña zona de tejido generalmente no es afectada por estos patógenos vegetales. Otra muy importante es la multiplicación vegetal. La potencialidad de la técnica se demuestra con un ejemplo: a partir de una yema apical, se pueden obtener 4.000.000 de claveles en un año. La técnica permite también multiplicar especies de plantas con reproducción lenta o dificultosa (como las orquídeas), o acelerar la producción de plantas bianuales.

A partir de un meristema aislado se puede obtener una planta completa. Adaptado de Biotecnología, UNQ 2006.

2.8. Medios de Cultivo

Los medios de cultivo constituyen un elemento fundamental para el cultivo in vitro de células, de tejidos, protoplastos, anteras y para lograr el desarrollo de embriones, la organogénesis, la micro propagación, etc. Los medios de cultivo tienen una serie de componentes generales específicos cuya presencia y concentración estará en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización. (White 1943)

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

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

- Sales inorgánicas

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

- Compuestos orgánicos

Constituidos por tres tipos de compuestos:

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

El agua es el elemento donde se disuelve todos los componentes del medio de cultivo. Se debe prestar gran atención a la calidad de agua, ya que constituye el 95% del medio nutritivo, se debe utilizar agua destilada. (Skoog 1992)

2.8.1. Sales Inorgánicas

Los macronutrientes son constituyentes esenciales para el crecimiento de los tejidos vegetales debido a que intervienen en la conservación del equilibrio iónico en las plantas.

Estos macronutrientes proveen los seis elementos indispensables: Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Azufre (S). La concentración óptima de cada nutriente para alcanzar la máxima tasa de crecimiento varía considerablemente entre especies y la finalidad del cultivo. (Aguirre G et al.2010)

Los micronutrientes representan un papel esencial en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas. Los principales micronutrientes son: Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Zinc (Zn), Boro (B), Cobre (Cu) y Molibdeno (Mo). Algunos medios

contienen Cobalto (Co), Iodo (I), y Cloro (Cl), aunque no son esenciales para el crecimiento. (George & Sherington, 1984)

2.8.2. Compuestos Orgánicos

- Compuestos Orgánicos

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

Aminoácidos

El aporte de aminoácidos favorece la proliferación de callos, aunque cuando más se acude a los mismos es en las experiencias sobre la organogénesis y en la multiplicación vegetativa in vitro. Las mezclas de aminoácidos parecen también presentar efectos sinérgicos estimulando fuertemente la proliferación de callos y la organogénesis. Los efectos obtenidos mediante el aporte de aminoácidos parecen muy variables según la especie y el tipo de morfogénesis estudiada. Hasta el momento no es posible obtener una regla general.

La mayor parte de las plantas sintetizan sus propios elementos orgánicos como las vitaminas y aminoácidos, etc. Para alcanzar un mejor crecimiento de las plantas in vitro esencial suplementar al medio una más vitaminas y aminoácidos como : Tiamina(vitamina B1), Piridoxina (vitamina B6), Ácido Nicotínico(Vitamina B3), y Pantotenato de calcio(vitamina B5), además de Myo- Inositol ; son también conocidos como reguladores de desarrollo, algunos autores señalan la adición de numerosas sustancias orgánicas como : la caseína hidrolizada, leche de coco, extracto de malta, extracto de levadura entre otros, son empleados para el desarrollo de ciertos cultivos de callos y órganos. (Martínez 2003)

Vitaminas

Las vitaminas son usadas como catalizadores en varios procesos metabólicos y son añadidas al medio de cultivo para estimular procesos de crecimiento específicos en los tejidos, y no se excluye que la falta de alguna de ellas pueda sea un factor limitante de los fenómenos de organogénesis.

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

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

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

Azúcares

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

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

Carbohidratos

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

2.8.3. Sustancias de Crecimiento

Entre las sustancias de crecimiento de fitohormonas, tenemos fundamentalmente al grupo de auxinas y citoquininas, algunas de las cuales están citadas en el cuadro a continuación:

Cuadro No 2.

FITOHORMONAS

Auxinas	Citoquininas	Otras
Ácido indolacético (AIA)	Kitenina (KIN)	Ácido giberélico (GA3)
Ácido naftalen acético (ANA)	Bencilaminopurina (BAP)	Etileno
Ácido indol butírico (AIB)	Dietilamino-purina (2-ip)	Ácido absicico
2,4- Dicloro phenoxiacetic (2,4D)	zeatina	
Dicamba		

Fuente: Elaboración propia

2.8.3.1 Auxinas

Se añaden frecuentemente a los medios de cultivo en concentraciones de 0.01 – 10 mg/l. Las auxinas generalmente promueven el crecimiento vegetal por alargamiento celular, induciendo a la formación del callo y estimula la iniciación radicular y el crecimiento de las raíces. (Bidwell 1979)

Las auxinas son compuestos que tienen un núcleo indólico, este sintetiza a partir del aminoácido Triptófano que se sintetiza por la vía Shikímica, la principal auxina es el ácido 3-indolacético (AIA), pero también se pueden emplear el ácido 3 – indol propionico (AIP), y el ácido 3 – indolbutírico (AIB), aunque son auxinas relativamente débiles (acidofenilacético) o fuertes: ácido naftalenacético (ANA), el ácido 3 naftoxiacético (NOA), etc. El 2.4 D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) es una auxina muy fuerte.

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

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

El 2,4 -D es una auxina muy fuerte, toxica a concentraciones elevadas, que es un fuerte activador de la actividad meristemática; su empleo es amplio, muchas veces ligado a citoquininas, en trabajos de cultivos celulares, cultivos de tejidos, embriogénesis somática. (Martínez 2003)

Efectos:

- Crecimiento: estimulan la elongación celular en tallos y coleoptilos (tallos jóvenes), incrementan la extensibilidad de la pared celular y estimulan la diferenciación de la xilema y el floema.
- Dominancia apical: la yema apical del tallo inhibe el crecimiento de yemas axilares cercanas.
- Abscisión de órganos (hojas flores y frutos): posee un control genético y las auxinas retrasan, la caída, aunque el etileno lo induce.
- Rizogénesis: estimulan la formación de raíces laterales o adventicias. Inhiben la elongación de la raíz principal. (George 1993) señala que las concentraciones óptimas de auxinas varían de 0,1 a 10 mg/l.

2.8.3.2 Citoquininas

Son un grupo más reducido de hormonas que deben su nombre a su función (citoquinesis). En conjunto con las auxinas estimulan la división celular. (Bidwell 1979)

Derivan de adeninas y las más frecuentes son:

- Naturales

La zeatina N⁶ 8N⁶-4 Hidroxi, 3 metil, 2 butiril), posee un doble enlace en el centro de la cadena y tiene isómeros cis y trans que parecen ser formas naturales.

- Sintéticas

La quinetina (KIN), N6 Bencilaminopurina (BAP), N6benciladenina (BA) N6 dimetil alil aminopurina (2ip). (Mejía, 1994).

Efectos:

- Crecimiento. En conjunto con las auxinas, las citoquininas estimulan la proliferación de células meristemáticas, y también estimulan la expansión de los cotiledones tras el primer haz de luz que reciben. (George, 1993).
- Dominancia lateral: estimulan el crecimiento de yemas laterales inhibiendo la apical (contrario a las auxinas, por lo que deben estar en equilibrio)
- Diferenciación y morfogénesis: Provocan cambios en la morfología según el tipo de crecimiento, junto a las auxinas estimulan la formación de raíces y tallos.
- Senescencia: Son anti-senescentes (García et al, 2006).

2.8.3.3 Giberelinas

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. (Bidwell 1979)

Efectos

- Estimulan el crecimiento de tallos (elongación) e hipocotilos. Tienen un papel mayor que las auxinas en plantas con crecimiento de entrenudos. En la reproducción estimulan la floración, sobre todo en aquellas plantas con floración por factores ambientales o floración del día largo como las coníferas. Producen partenocarpia, reproducción sin fecundación donde el fruto se genera sin semillas). tienden a producir plantas masculinas en especies dioicas.
- La germinación es su principal efecto. Casi todas las semillas germinan inducidas por GA. Posibilitan la movilización de reservas en la semilla, sustituyen requisitos

ambientales. (Roca ,1997) menciona que el uso de AG3 ha demostrado ser bastante activo, en concentraciones optimas de 0,01 a 1mg/l, debido a que niveles superiores a 1 mg/l son tóxicos para el desarrollo del explante.

2.8.4. Agua

El agua es el vehículo principal donde se disuelven todos los componentes del medio de cultivo. Se debe prestar atención a la calidad del agua ya que constituye el 95% del medio nutritivo, se debe utilizar agua destilada (Pierik 1990)

2.8.5. Sustancias Gelificantes

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

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

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

2.8.6. Carbón Activado

El carbón activado presenta cargas residuales que son capaces de absorber las sustancias fenólicas excretadas por el explante, normalmente el carbón activo es prelavado antes de ser incorporado al medio de cultivo y las concentraciones varían de 0,5 a 5%. (Pierik 1990)

2.9. Preparación de Medios de Cultivo

Para la preparación de los medios de cultivo generalmente se preparan soluciones madre o stock a mayores concentraciones para luego ser mezcladas en la preparación de cada medio

especifico. Las soluciones madre son preparadas por separado la de los macronutrientes (M1), la de los micronutrientes (M2) el quelato de fe, las vitaminas y por separado las diferentes hormonas.

Luego de mezclar todos los componentes y enrasar con agua al volumen requerido se debe ajustar el pH de 5.6 a 5.8, y finalmente disolver el agua a concentraciones de 0.6 a 0.8 %. Luego se debe dispensar el medio en recipientes adecuados para el cultivo in vitro y esterilizar en la autoclave.

Cuadro No 3. Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962)

Compuesto	MS mg/lit (mM)
Macro nutrientes	
NH ₄ NO ₃	1650 (20.6)
KNO ₃	1900 (18.8)
MgSO ₄ .7H ₂ O	370 (1.5)
CaCl ₂ .2H ₂ O	440 (2.99)
KH ₂ PO ₄	170 (1.25)
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	—
K ₂ SO ₄	—
Micro nutrientes	
KI	0.83 (0.005)
H ₃ BO ₃	6.2 (0.1)
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3 (0.13)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6 (0.029)
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25 (0.01)
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025 (0.0001)
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025 (0.0001)
Na ₂ EDTA	37.3 (0.1)
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8 (0.1)
NiSO ₄ . 6H ₂ O	—
Zn(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	—

Fuente:

2.10. FASES DEL CULTIVO IN VITRO

2.10.1. Fase 0: Selección de Plantas

La iniciación de un proceso de micropropagación solo tiene sentido cuando se emplea un adecuado material de partida. La constitución de la planta donadora o planta madre es el primer factor relacionado con la frecuencia de variantes somaclonales resultantes del proceso de propagación. (Evans y Bravo1985)

2.10.1.1. Pre tratamiento de Plantas Donantes

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

2.10.1.2. Desinfección a la Planta Madre

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

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

-Inmersión de 30 segundos en alcohol 70 %

-luego 10 minutos en Hipoclorito de Sodio al 2.5 % de solución comercial,

-y posteriormente 3 lavados en agua destilada estéril, cada uno de 3 minutos. (Aguirre G.et al. 2010)

2.10.2. Fase I: 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 medio de cultivo. Esta fase termina con la obtención de un cultivo libre de contaminación visibles y suficientemente adaptada a las condiciones in vitro, de modo que pueda presentar una reacción favorable a la aplicación de fitorreguladores en la fase siguiente (multiplicación). (Villalobos y García 1993)

2.10.3. Fase II: Multiplicación

La fase II se refiere a la multiplicación del propágulo a través de cultivos sucesivos en un medio adecuado para la multiplicación. Se inicia la fase de 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 de tiempo. No basta conseguir altas tasas de multiplicación en algunos explantes, lo importante es la producibilidad del sistema, es decir, conseguir una tasa media satisfactoria con el mínimo de variación del explante a explante. Otro aspecto esencial es la calidad y homogeneidad de las partes aéreas producidas, lo que va a determinar en gran parte el éxito de una fase siguiente de enraizamiento. (Aguirre et al, 2010)

2.10.4. Fase III: Enraizamiento

La fase de enraizamiento, 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 regeneradas en condiciones asépticas y una planta completa es trasplantada en sustrato. En el segundo sistema, las partes aéreas son manipuladas como micro estacas y todo el proceso de enraizamiento se da en el sustrato estéril (aun en condiciones de laboratorio)

Se deben tener en cuenta los siguientes consejos:

- No se deben usar Citoquininas.
- Si se disminuye el contenido de sales del medio se logra una mayor inducción de raíces.
- El aumento de la concentración de sacarosa produce un buen enraizamiento.
- Los medios líquidos aumentan el volumen de plantas y reducen los costos.

2.10.5. Fase IV: Aclimatación

La aclimatación es un proceso que permite que las plantas que han crecido “in vitro”, en condiciones heterótrofas y que sólo han estado expuestas a un microambiente escogido en condiciones totalmente controladas de temperatura, humedad y luz se adapten y sobrevivan en condiciones “in vitro” adquiriendo condiciones autótrofas, donde tendrá que regular adecuadamente sus procesos de absorción, translocación y transpiración de agua. (Aguirre G. et al. 2010)

2.11. TIPOS DE MEDIO DE CULTIVO

a) Medios sólidos. Los medios líquidos son los medios de cultivo que llevarán distintos componentes que tienden a solidificar y mantener el material cultivado en superficie. La selección de un agente gelificante para las plantas específicas es generalmente empírica y por razones desconocidas, los tejidos de algunas especies crecen mejor en algunos gelificantes que en otros. (Orellana, 1998)

El agar es el material de soporte más utilizado en el cultivo de tejidos por proveer al medio de un excelente gel húmedo, sin embargo, no es inerte. (Hurtado & Merino, 1994)

Peres & Claure (2004), mencionan que el agente gelificante más económico hasta ahora probado en laboratorios locales es la carragenina, el mismo se obtiene de algas rojas como principal fuente.

b) Medios líquidos: los medios líquidos son una alternativa interesante para cultivar explantes in vitro. Con ayuda de un agitador el medio de cultivo está constantemente homogeneizado y, lo que es más importante oxigenado. Estas condiciones pueden superar algunas limitantes del medio sólido; sin embargo, puede a su vez suceder una mayor susceptibilidad de los explantes a vitrificarse.

Al momento de utilizar de utilizar medios sólidos colocar el explante sobre un puente de papel filtro que permanece en contacto directo con el medio líquido, generalmente este tipo de medios es utilizado en especies con problemas de oxidación (Mejía & Vittorelli, 1997).

2.12. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

El crecimiento de la plántula in vitro depende de factores nutricionales y ambientales, los cuales interactúan para producir una plántula de características similares a las que crecen en el campo.

Los factores nutricionales tienen como base el medio de Murashige y Skoog (1952) compuesto de sales orgánicas, vitaminas, aminoácidos, carbohidratos, reguladores de crecimiento y suplementos orgánicos. (Toledo J, 1998)

2.12.1. Preparación de Soluciones Madre

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

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

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

Por otro lado, se podrían pesar las cantidades necesarias de todos y cada uno de los componentes del medio. Ello, no obstante, sería una operación larga y tediosa, además de

imprecisa puesto que obligaría a pesar algunas cantidades muy pequeñas. Por todas esas razones, es una práctica habitual en todos los laboratorios preparar soluciones stock concentrado de los distintos componentes, agrupados de forma que no se produzcan fenómenos de precipitación. Proceder de esa forma simplifica la preparación del medio: un medio como el MS, que contiene un total de 20 sustancias diferentes, requeriría otras tantas pesadas, mientras que a partir de soluciones stock pueden mantenerse durante un cierto tiempo en la nevera o en el congelador.

Para una correcta preparación de las soluciones stock se debe:

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

2.13. PROBLEMAS TÉCNICOS DE CULTIVO IN VITRO

2.13.1. Contaminación

La presencia de microorganismos en los cultivos in vitro reduce el éxito de los resultados, especialmente durante las primeras etapas. Esta situación se genera por las condiciones físicas del cultivo que conforman un ambiente propicio para su desarrollo (Debergh y Zimmerman. 1991)

La mayor fuente de contaminación en el cultivo de tejidos vegetales se produce por la presencia de microorganismos superficiales y sistémicos de la planta donadora. Para controlar la contaminación superficial se deben descartar los individuos que estén mal estado fitosanitario, realizar procedimientos de desinfestación adecuados, utilizando desinfectantes superficiales y fungicidas. A pesar de esto, el material puede o no quedar completamente

estéril, ya que es probable que se presenten microorganismos sistémicos como virus, bacterias y hongos. Algunos de estos contaminantes se pueden tratar con el uso de antibióticos o de tratamientos de quimioterapia y termoterapia (Casells, 1991)

Adicional al uso de sustancias químicas de desinfección, es necesario trabajar en ambientes adecuados, esterilizar los medios de cultivo, y realizar los cultivos siguiendo ciertas normas de asepsia (Roca y Mroginski, 1991)

2.13.2. Oxidación

Durante el cultivo in vitro el explante sufre siempre en mayor o menor medida de situaciones de estrés, ocasionadas por daños mecánicos o por las condiciones del cultivo in vitro (como la composición del medio). Estas situaciones estimulan el metabolismo de los compuestos fenólicos.

La síntesis de fenoles va a producir una serie de reacciones de hipersensibilidad, tales como la exudación al medio del contenido de las células deterioradas. De igual forma, las células vecinas de las que inicialmente fueron lesionadas se ven afectadas, incluso aunque esas células no parezcan estarlo, llevando finalmente a una muerte prematura (Debergh y Read, 1991)

En general, los fenoles son sustancias lábiles y fáciles de oxidar. Los productos generados por la oxidación tienen carácter fitotóxico, por lo que son capaces de alterar eventos morfogénico y/o de crecimiento y desarrollo, potenciando en otras ocasiones otros procesos de oxidación, puesto que se convierten en potentes oxidantes (Dixon & Paiva, 1995)

Por todo lo dicho, en el cultivo de tejidos se hace necesario controlar el efecto de la oxidación. Una forma mediante la cual se puede realizar es evitando el estrés que estimula biosíntesis de compuestos fenólicos, con el fin de impedir que estas sustancias aparezcan en los cultivos y produzcan efectos tóxicos e inhiban el crecimiento (Debergh & Read, 1991)

Otros métodos que han dado buen resultado cuando la síntesis de fenoles no puede evitarse son: la dispersión, adsorción o lavado, con sustancias como el carbón activado (CA) o la polivinilpirrolidona (PVP); la modificación del potencial redox (disminuyendo los agentes

redox), o la disponibilidad oxígeno; la inactivación de enzimas de tipo fenolasa (quelantes), y otros sistemas como la incubación en condiciones de oscuridad, bajo PH, incubación en condiciones de seguridad, bajo PH, incubación a temperaturas más bajas, entre otros. En general lo que se busca al proporcionar estas condiciones es reducir la actividad fenolasa y la disponibilidad de sustratos para esta enzima (Debergh & Read,1991).

La adición de sustancias antioxidantes, es otro de los métodos que suelen aplicarse, aunque es necesario tener mucho cuidado, ya que se pueden convertir en oxidantes muy potentes, invirtiéndose su efecto positivo en el control de fenoles (Debergh & Read,1991).

2.13.3. Vitrificación o Híperhidratación

Es un desorden fisiológico que se presenta en los tejidos cultivados in vitro, especialmente en las hojas, que incide sobre dos de los procesos más importantes que realizan estas estructuras: la fotosíntesis y el intercambio gaseoso. En menor medida los tallos y raíces también resultan afectados por estas anomalías anatómicas, que en ciertos casos van a impedir el establecimiento de plantas micropropagadas en condiciones ex vitro (Ziv, 1991; Kevers et al.2004; Saher et al 2004).

Posibles causas de la hiperhidratacion

Los defectos anatómicos y fisiológicos observados son el resultado de varias alteraciones en determinadas rutas metabólicas. Así los cambios de síntesis de proteínas, inciden en varias enzimas implicadas en la fotosíntesis (rubisco), en la síntesis de celulosa y lignina (fenilalanina amonioliasa, glucacno sintetasa), y en procesos asociados con la producción de etileno (peroxidasas) (Saher et al 2004).

Los niveles de proteínas de hojas hiperhidratadas son inferiores a los de hojas normales.

Factores que influyen en la híperhidratación

Los factores que interviene en la híperhidratación están ligados a las diferentes condiciones de cultivo in vitro, tales como: concentración de sales, el agente gelificante, elevadas dosis

de reguladores de crecimiento (citoquininas, auxinas, etileno, entre otras); una baja intensidad lumínica durante la incubación y la humedad relativa y un potencial hídrico, que según Debergh (1987) son el factor clave para explicar estas complejas anomalías producidas in vitro (Majada et al 2002; Yavad et al 2003).

Signos

Los primeros signos de hiperhidratación en los explantes se manifiestan durante las primeras semanas y se van incrementando con el tiempo de cultivo. Inicialmente parte del explante o de una o dos hojas, generalmente las que están en contacto con el medio. El crecimiento de los brotes es más rápido de lo normal y puede demostrar tamaños anormales en la formación de brotes axilares. Las hojas presentan una apariencia frágil y translúcida y su longitud es menor comparada con la de las hojas normales.

Las características morfológicas y anatómicas de las hojas superhidratadas incluyen cambios estructurales y químicos. La capa cuticular y la epidermis se vuelven más delgadas, las estomas son anormales, aumenta cantidad de tejido parenquimatoso, y se presentan células del meso filo con pocos cloroplastos mal desarrollados y con cantidades bajas de clorofila y proteínas. Todas estas anomalías interfieren en la aclimatación y el trasplante, causando supervivencias bajas e incluso la muerte.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN DEL TRABAJO.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de “Fitopatología y Cultivo in vitro” de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales, de la Universidad Autónoma “Juan Misael Saracho”, ubicado en la ciudad de Tarija provincia Cercado.

3.2. MATERIAL VEGETAL.

Se utilizó la variedad “Harvest moon” obtenida del invernadero de claveles en la institución del Sedag ubicada en “ Erquiz Ceibal ” en la provincia Cercado.

3.3. MATERIAL DE LABORATORIO

3.3.1. Materiales de Vidrio e Instrumentos.

- Tubos de ensayo.
- Placas Petry.
- Pipetas graduadas de 0.1, 1, 2, 5, 10 cc.
- Vasos de precipitación de 50, 100, 500 y 1000 cc.
- Vasos Erlenmeyer de 500 y 1000 cc.
- Varillas de vidrio.
- Probetas de 50 y 500 cc.
- Frascos de vidrio.
- Pinzas de diferentes punta y longitud.
- Bisturís.
- Tijeras.
- Gradillas de metal.

3.3.2. Equipos.

- Balanza analítica.
- pH-metro.
- Estufa.
- Autoclave.
- Cámara de flujo laminar.
- Refrigerador.
- Agitador.
- Destilador.
- Estereoscopio.
- Horno desecador.

3.3.3. Componentes Orgánicos e Inorgánicos del Medio de Cultivo y otros.

- Sales medio Murashige y Skoog.
- Agar.
- Agua destilada.
- Azúcar.
- Vitaminas.
- Fitorreguladores.
- Papel aluminio.
- Algodón.
- Marcadores indelebles.
- Papel filtro.

- Soluciones desinfectantes (alcohol e hipoclorito de sodio).
- Detergente.

3.3.4. Concentraciones utilizadas

Cuadro No 4.

MEDIO DE MURASHIGE Y SKOOG

Compuesto	MS mg/l^t (mM)
Macro nutrientes	
NH ₄ NO ₃	1650 (20.6)
KNO ₃	1900 (18.8)
MgSO ₄ .7H ₂ O	370 (1.5)
CaCl ₂ .2H ₂ O	440 (2.99)
KH ₂ PO ₄	170 (1.25)
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	—
K ₂ SO ₄	—
Micro nutrientes	
KI	0.83 (0.005)
H ₃ BO ₃	6.2 (0.1)
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3 (0.13)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6 (0.029)
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25 (0.01)
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025 (0.0001)
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025 (0.0001)
Na ₂ EDTA	37.3 (0.1)
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8 (0.1)
NiSO ₄ . 6H ₂ O	—
Zn(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	—

Cuadro No 5.

CONCENTRACIONES DE FITOHORMONAS

MEDIO 1	Sin fitohormonas
MEDIO 2	(6-Bencilaminopurina 1.0mg/l+ Acido indolacetico 0.5mg/l)
MEDIO 3	(6-Bencilaminopurina 2.0mg/l+ Acido indolacetico 1.0mg/l)
MEDIO 4	(6-Bencilaminopurina 3.0mg/l+ Acido indolacetico 1.5mg/l)

3.3.5. Materiales y Equipos de la Cámara de Crecimiento.

- Termómetros de máximas y mínimas.
- Estanterías.
- Iluminación fluorescente.
- Calefacción y refrigeración.
- Gradillas para tubos de ensayo.

3.4. PROCEDIMIENTO O DESARROLLO DE LAS DIFERENTES ETAPAS.

Con el objetivo de establecer in vitro el clavel se realizaron ensayos de establecimiento en diferentes medios de cultivo para evaluar la respuesta de dicha especie. Los explantes deben ser seleccionado según las características deseables.

3.4.1. Preparación de Medios de Cultivo

En el siguiente cuadro están las sustancias utilizadas para la preparación de los medios de cultivo utilizados:

Después de determina que concentración se utilizara se realizan los siguientes pasos:

- Se toma un vaso precipitado de 500ml, se adicionan aproximadamente 200 ml de agua destilada y se van adicionando las sales por separado, a la vez que se agita la solución, los siguientes volúmenes:
- Aforar a 500ml y distribuir en vasos precipitados 125 ml del medio para agregar la concentración de hormonas correspondiente para cada una de los tratamientos.
- Una vez ya establecidos cada tratamiento con su concentración adecuada, se debe medir el pH con el pH metro y agregar ácido sulfúrico e hidróxido de sodio según lo requiera el medio hasta llegar a un grado favorable de 5,7 de pH.
- Pesar el agar y agregarlo a la solución.
- Vaciar 12ml en cada tubo de ensayo según el número que se requiera.

- Calentar en el microondas a una temperatura de 90 °C por un intervalo de 10 a 12 minutos.
- Poner 12 ml de la solución a los tubos de ensayo y taparlos
- Esterilizar en la autoclave por 20 min.

3.4.2. Esterilización de Medios e Instrumentos

La esterilización de medios se la realiza en la autoclave durante 20 min. Posteriormente se deja enfriar los medios preparados.

Para la esterilización de instrumentos, se debe tener en cuenta que éstos se encuentren bastante limpios y sin ningún resto de algún ensayo anterior. Después del lavado dejarlo secar o secarlo con algún material estéril, posteriormente envolverlo con papel periódico de manera que quede totalmente cubierto y cerrado.

Por ultimo encender el horno a 125 °C y dejarlo ahí durante dos horas. Después de haber realizado esto se debe dejar enfriar el material para un buen manejo del protocolo en la cámara de flujo laminar.

3.4.3. Extracción y Desinfección de Explantes

En esta fase parte desde la recolección de los esquejes, estos fueron extraídos un día antes de la inoculación.

Al llevarlos al laboratorio se hizo lo siguiente:

- Se procedió a extraer del esqueje los segmentos nodales, es decir las yemas axilares, con una porción de tallo tanto en la parte superior como inferior de la yema para un mejor manejo y desinfección.
- Se lavó los trozos de segmentos nodales con detergente y agua para eliminar restos de tierra y otros. Los dos últimos enjuagues se los realizó con agua destilada.
- Ya en la cámara de flujo laminar el protocolo para la desinfección fue por inmersión en productos desinfectantes (alcohol al 70% por 60 segundos e hipoclorito de sodio al 10% por 15 minutos). Luego se realizó 3 enjuagues sucesivos con agua destilada esterilizada

3.5. Protocolo de Introducción

De acuerdo al explante que introducimos se realizan los siguientes pasos:

3.5.1. Protocolo de Introducción de Segmentos Nodales.

- Después de enjuagar con agua destilada los explantes, se debe proceder a cortar los bordes de cada uno de la parte superior en inferior del tallo para evitar que el tejido muerto sea introducido ya que este tuvo mayor contacto con las sustancias que se utilizaron para desinfectar.
- Se debe tener en cuenta que detrás de cada uso de cada instrumento se debe flamear para evitar la contaminación, incluyendo el bisturí, las pinzas y los tubos donde se inocularan los explantes.
- Una vez que el explante este bien posicionado en el tubo de ensayo se debe flamear la tapa, y la boca de este antes de sellarlo con el nailon adhesivo de cocina.
- Una vez sellado marcar cada tubo con su respectivo tratamiento y fecha.

3.5.2. Introducción de Meristemas

- Para la introducción de meristemas se realiza el mismo procedimiento hasta la desinfección con hipoclorito de sodio.
- Pero en el caso de los meristemas no es necesario cortar los bordes de los trozos de tallo ya que no será requiere introducir toda la yema.
- Luego dentro de una cámara de flujo laminar, que permite la asepsia, se extrae el tejido meristemático con los dos primordios foliares ayudados por estiletes y bajo una lupa estereoscópica.
- Una vez extraído el explante debe ser colocado en los recipientes con el medio de cultivo específico, siempre con asepsia dentro de la cámara de flujo laminar.
- Rotulación de los tubos de ensayo.

3.6. Diseño del Experimento

El trabajo de establecimiento in vitro del clavel estuvo se desarrolló en dos etapas: la primera fue el establecimiento y la segunda la elongación. En la etapa de establecimiento se evaluó la sobrevivencia, regeneración y contaminación.

En la etapa de elongación se evaluó la altura de los brotes cada 7 días, hasta llegar a las cuatro semanas.

Se trabajó con los siguientes medios de cultivo: M1 (sin fitohormonas), M2 (BAP 1.0mg/l+ AIA 0.5mg/l), M3(BAP 2.0mg/l+ AIA 1.0mg/l), M4(BAP 3.0mg/l+ AIA 1.5mg/l), y dos tipos de explantes, segmentos nodales y meristemas, éstos fueron inoculados en tubos de ensayo con 12ml del medio respectivo.

Con el objetivo de establecer in vitro el clavel se realizó ensayos de establecimiento en diferentes medios de cultivo para evaluar la respuesta de dicha especie. El trabajo se realizó con un diseño experimental completamente aleatorio con 8 tratamientos y 4 repeticiones.

Cuadro No 6.

DISEÑO EXPERIMENTAL

N° Tratamientos	Medio de cultivo	Tipo de explante	Repeticiones			
			1	2	3	4
1	M1	SN				
2	M1	Mer				
3	M2	SN				
4	M2	Mer				
5	M3	SN				
6	M3	Mer				
7	M4	SN				
8	M4	Mer				

Fuente: Elaboración propia

SN = Segmento Nodal

Mer = Meristemo

Cuadro No 7.

ASIGNACIÓN DE TRATAMIENTOS

T1. (SN/M1)	SEGMENTOS NODALES/MEDIO 1(sin fitohormonas)
T2. (SN/M2)	SEGMENTOS NODALES/MEDIO 2(BAP 1.0mg/l+ AIA 0.5mg/l)
T3. (SN/M3)	SEGMENTOS NODALES/MEDIO 3(BAP 2.0mg/l+ AIA 1.0mg/l)
T4. (SN/M4)	SEGMENTOS NODALES/ MEDIO 4 (BAP 3.0mg/l+ AIA 1.5mg/l)
T5. (MER/M1)	MERISTEMAS/MEDIO 1 (sin fitohormonas)
T6. (MER/M2)	MERISTEMAS/MEDIO 2 (BAP 1.0mg/l+ AIA 0.5mg/l)
T7. (MER/M3)	MERISTEMAS/MEDIO3 (BAP 2.0mg/l+ AIA 1.0mg/l)
T8. (MER/M4)	MERISTEMAS/MEDIO 4 (BAP 3.0mg/l+ AIA 1.5mg/l)

3.7. Variables Estudiadas

Las variables respuestas fueron:

- Porcentaje de regeneración
- Porcentaje de contaminación
- Longitud del brote

3.8. Toma de Datos:

En la fase de inicio o establecimiento del clavel se han realizado 2 ensayos con 4 medios de cultivo: M1, M2, M3, M4 mencionados en capítulos precedentes y dos tipos de explantes: segmentos nodales y meristemos.

Para analizar los resultados de las variables de contaminación y regeneración se trabajó con porcentajes ya que en la fase de inicio sólo se tienen variables cualitativas, donde solo es posible registrar dos opciones para cada una de éstas, son: positivo o negativo, donde nos permite conocer la sobrevivencia y el índice de contaminación que presentan los explantes, respecto a las condiciones in vitro a que son sometidas.

Posteriormente para la variable de elongación que vendría a ser cuantitativa se realizó un diseño completamente aleatorio con los análisis de varianza correspondientes y las pruebas

para analizar las diferencias significativas que se presentan entre las medias, en el cuadro de anova.

Para observar el avance del cultivo se realizó evaluaciones cada semana hasta su establecimiento.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los objetivos planteados y en base a la metodología del establecimiento in vitro del clavel, se obtuvieron los siguientes resultados.

4.1. Contaminación

La presencia de microorganismos en los cultivos in vitro reduce el éxito de los resultados, especialmente durante las primeras etapas. Esta situación se genera por las condiciones físicas del cultivo que conforman un ambiente propicio para su desarrollo. (Debergh y Zimmerman. 1991)

La mayor fuente de contaminación en el cultivo de tejidos vegetales se produce por la presencia de microorganismos superficiales y sistémicos de la planta donadora. Para controlar la contaminación superficial se deben descartar los individuos que estén mal estado fitosanitario, realizar procedimientos de desinfestación adecuados, utilizando desinfectantes superficiales y fungicidas. A pesar de esto, el material puede o no quedar completamente estéril, ya que es probable que se presenten microorganismos sistémicos como virus, bacterias y hongos. Algunos de estos contaminantes se pueden tratar con el uso de antibióticos o de tratamientos de quimioterapia y termoterapia (Casells, 1991)

Adicional al uso de sustancias químicas de desinfección, es necesario trabajar en ambientes adecuados, esterilizar los medios de cultivo, y realizar los cultivos siguiendo ciertas normas de asepsia. (Roca y Mroginski, 1991)

Cuadro No 8.

PORCENTAJE NETO DE CONTAMINACIÓN

TRATAMIENTOS	REPETICIONES				SUMA	MEDIA
	I	II	III	IV		
T1. (SN/M1)	-	50,00	50,00	50,00	150,00	37,50
T2. (SN/M2)	-	-	-	100,00	100,00	25,00
T3. (SN/M3)	-	50,00	50,00	50,00	150,00	37,50
T4. (SN/M4)	50,00	50,00	-	100,00	200,00	50,00
T5. (MER/M1)	-	-	-	-	-	-
T6. (MER/M2)	-	-	-	-	-	-
T7. (MER/M3)	33,33	-	-	33,33	66,66	16,67
T8. (MER/M4)	-	-	33,33	33,33	66,66	16,67
SUMA	83,33	150,00	133,33	366,66	733,32	

Fuente: Elaboración propia

Como podemos observar en el cuadro N°8 el T4 con 50% fue el que más presentó porcentaje de contaminación, seguido por el tratamiento T1 y T3 con 37.50%, después tenemos al tratamiento T2 con 25% de contaminación, los tratamientos T7 y T8 con 16.67% y por último los tratamientos T5 y T6 con 0% de contaminación.

Cuadro No 9.**PORCENTAJE NETO DE CONTAMINACIÓN, MEDIO DE CULTIVO/TIPO DE EXPLANTE**

	SN	MER
M1	150,00	-
M2	100,00	-
M3	150,00	66,66
M4	200,00	66,66
SUMA	600,00	133,32
MEDIA	37,50	8,33

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro No. 9 el porcentaje de contaminación según el medio y el tipo de explante se tiene:

El mejor comportamiento de los explantes respecto al índice de contaminación, el que tiene menor incidencia de ese factor, son los meristemos, que presentan un 8.33% de contaminación.

Cuadro No 10.**ANOVA PARA EL PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN**

FUENTES DE VARIACION	GL	SUMA DE CUADRADOS	CM	FC	FT	
					5%	1%
TRATAMIENTOS	7	9.166,83	1.309,55	1,70ns	2,42	3,5
ERROR	24	18.471,78	769,66			
FAC MEDIOS DE CULTIVO	3	2.013,69	671,23	0,87 ns	3,01	4,72
F. TIPOS DE EXPL	1	6.805,94	6.805,94	8,84 **	4,26	7,82
INTERACCION M/T. E	3	9.652,14	3.217,38	4,18 *	3,01	4,72
TOTAL	31	27.638,61

Fuente: Elaboración propia

Como se puede observar en el cuadro de anova se presentan diferencias significativas en la variable de tipos de explantes, e interacción, por lo tanto, es necesario recurrir a una prueba de comparación de medias para poder ver la diferencia que hay entre estas.

Prueba de MDS

$$MDS = \sqrt{\frac{2CME}{N^{\circ}r}} * t$$

$$MDS = \sqrt{\frac{2*769.66}{4}} * 2.09$$

$$MDS = 41$$

Cuadro No 11.

DIFERENCIA DE MEDIAS-CONTAMINACIÓN

		T4	T1	T3	T2	T7	T8	T5	T6
		50	37,5	37,5	25	16,67	16,67	0	0
T6	0	50	37,5	37,5	25	16,67	16,67	0	
T5	0	50	37,5	37,5	25	16,67	16,67	0	
T8	16,67	33,33	20,83	20,83	8,33	0	0		
T7	16,67	33,33	20,83	20,83	8,33				
T2	25	25	12,5	12,5	0				
T3	37,5	12,5	0	0					
T1	37,5	12,5							
T4	50	0							

Para interpretar el cuadro No.8 se simplificará asignando letras en el siguiente:

Cuadro No 12.

INTERPRETACIÓN DE DIFERENCIAS- CONTAMINACIÓN

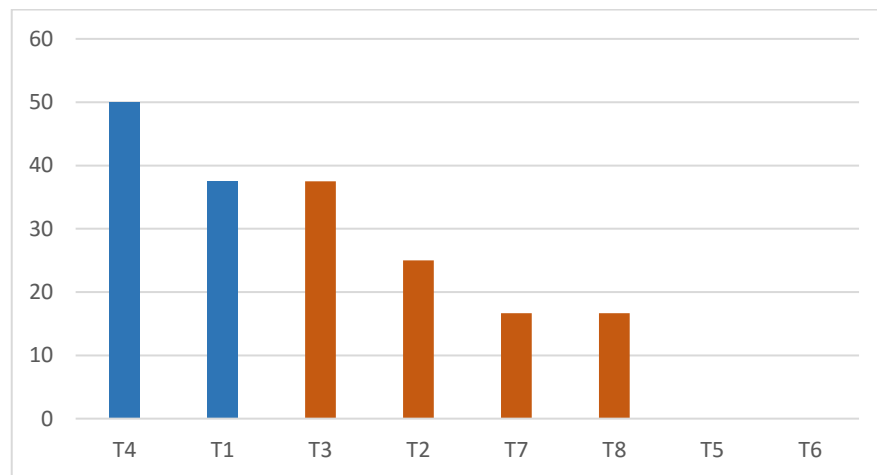
T4	50 a
T1	37,5 a
T3	37,5 b
T2	25 b
T7	16,67 b
T8	16,67 b
T5	0 b

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro No 9 podemos ver que existen diferencias estadísticamente entre los tratamientos los más afectados fueron el T4, T1 y T3.

Grafico 1

PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN CON ASIGNACIÓN DE LETRAS



En el gráfico la letra a tiene color azul, la b tiene color anaranjado y los últimos como no presentaron ningún porcentaje contaminación no llevan ningún color

Al respecto Jiménez (1992), menciona que; la contaminación es el principal problema en propagación masiva y con mayor incidencia en la fase de establecimiento.

Deborff y zimerman (1991) reportan que las primeras etapas se alcanza el mayor porcentaje de contaminación por hongos y bacterias, esta situación se la atribuye a la mala manipulación

del explante y su efecto repercute en el medio de cultivo que conforma un ambiente propicio para el desarrollo de microorganismos.

Cabe la posibilidad de que los porcentajes de contaminación sean consecuencia de una mala manipulación del explante en la cámara del flujo laminar o también mala desinfección de estos antes de introducirlos. Ya que la contaminación por bacterias se presenta en el explante de un color rosado se da cuando por microorganismos que tiene naturalmente éste al haber crecido en el exterior muchas veces es difícil eliminar este problema ya que es un factor que se presenta a nivel mundial en todos los laboratorios. Cuando la contaminación es dada por hongos provenientes de la mala manipulación o fallo del protocolo éste se suele ver como moho a los alrededores del tubo de ensayo, que posteriormente suelen llegar al explante perjudicando su crecimiento.

4.2. Regeneración

Para obtener los datos de regeneración se tomaron datos cualitativos en la primera semana después de haber inoculado los explantes.

Cuadro No 13.

PORCENTAJE DE REGENERACIÓN NETO

TRATAMIENTOS	REPETICIONES				SUMA	MEDIA
	I	II	III	IV		
T1. (SN/M1)	-	100,00	50,00	100,00	250,00	62,50
T2. (SN/M2)	50,00	100,00	50,00	100,00	300,00	75,00
T3. (SN/M3)	100,00	50,00	50,00	100,00	300,00	75,00
T4. (SN/M4)	-	50,00	-	100,00	150,00	37,50
T5. (MER/M1)	66,66	100,00	66,66	66,66	299,98	75,00
T6. (MER/M2)	100,00	100,00	100,00	33,33	333,33	83,33
T7. (MER/M3)	100,00	100,00	100,00	100,00	400,00	100,00
T8. (MER/M4)	100,00	100,00	100,00	66,66	366,66	91,67
SUMA	516,66	700,00	516,66	666,65	2.399,97	

Fuente: Elaboración propia

Como se puede observar en el cuadro N°13 consideramos que se han logrado excelentes porcentajes de regeneración para los dos tipos de explantes y medios de cultivo con respecto al ensayo realizado.

El tratamiento que se destacó fue el T7. (MER/M3) y T8. (MER/M4) con un 100% de regeneración en meristemos seguido del T2. (SN/M2) en segmentos nodales con 87.50% siguiendo en importancia los tratamientos T6. (MER/M2), T4. (SN/M4), T1. (SN/M1), y por último el tratamiento T4 con 37.50% de regeneración.

Haciendo un promedio general se obtuvo un 75% de regeneración tomando en cuenta tipos de explantes y medios.

Cuadro No 14.

PORCENTAJE DE REGENERACIÓN NETA, MEDIO DE CULTIVO Y TIPO DE EXPLANTE

	SN	MER
M1	250,00	299,98
M2	300,00	333,33
M3	300,00	400,00
M4	150,00	366,66
SUMA	1.000,00	1.399,97
MEDIA	62,50	87,50

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro N°14 de porcentaje de regeneración según medio de cultivo y explante se tiene: El mayor porcentaje de regeneración respecto al medio es el M3 (BAP 2.0mg/l+ AIA 1.0mg/l) y M2 (BAP 1.0mg/l+ AIA 0.5mg/l) con 81.25% seguido del M1 (sin fitohormonas), con 68.75 y por último el M4 con 64.58%.

Respecto al tipo de explante los meristemos son los que presentan mayor regeneración con 85.42% seguido de segmentos nodales con 62.50%.

Cuadro No 15.

ANOVA PARA EL PORCENTAJE DE REGENERACIÓN

FUENTES DE VARIACION	G L	SUMA DE CUADRADOS	CM	FC	FT	
					5%	1%
TRATAMIENTOS	7	10.138,61	1.448,3 7	1,46	2,42	3,5
ERROR	24	23.751,00	989,63			
FAC MEDIOS DE CULTIVO	3	2.569,81	856,60	0,87	3,01	4,72
F. TIPOS DE EXPL	1	4.999,25	4.999,2 5	5,05	4,26	7,82
INTERACCION M/T. E	3	16.181,94	5.393,9 8	5,45	3,01	4,72
TOTAL	31	33.889,61

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro N°15 en el análisis de varianza sobre el porcentaje de regeneración se tiene: Sólo hay diferencias significativas en la interacción de los factores de medio de cultivo y tipo de explante, ya que la Fc. mayor a la Ft. por lo tanto, se recurrirá a una prueba de comparación de medias.

Prueba de MDS

$$MDS = \sqrt{\frac{2CME}{N^{\circ}r}} * t$$

$$MDS = \sqrt{\frac{989.63}{4}} * 2.09$$

$$MDS = 46.49$$

Cuadro No 16.

DIFERENCIA DE MEDIAS EN REGENERACIÓN

T7	T8	T2	T6	T5	T3	T1	t4
----	----	----	----	----	----	----	----

		100	91,67	87,5	83,33	75	62,5	62,5	37,5
T4	37,5	62,5	54,17	50	45,83	37,5	25	25	0
T1	62,5	37,5	29,17	25	20,83	12,5	0	0	
T3	62,5	37,5	29,17	25	20,83	12,5			
T5	75	25	16,67	12,5	8,33	0			
T6	83,33	16,67	8,34	4,17	0				
T2	87,5	12,5	4,17	0					
T8	91,67	8,33	0						
T7	100	0							

Fuente: Elaboración propia

Para un mejor entendimiento del cuadro No. 13 se realizó una tabla de asignación de letras, que está a continuación:

Cuadro No 17.

INTERPRETACIÓN DE DIFERENCIAS- REGENERACIÓN

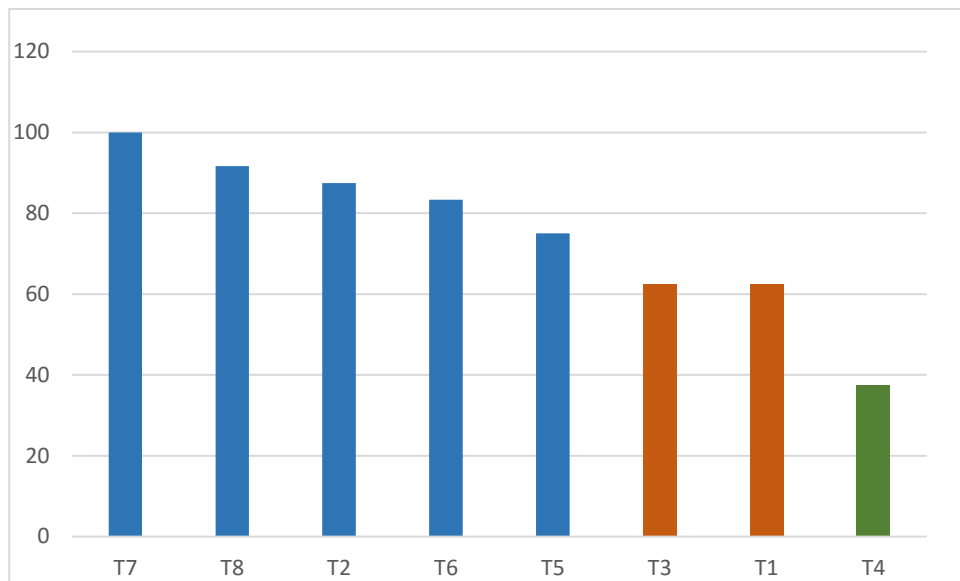
T7	100 a
T8	91,67 a
T2	87,5 a
T6	83,33 a
T5	75 a
T3	62,5 b
T1	62,5 b
T4	37,5 c

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro anterior podemos observar que hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Ya que a diferentes letras mayor diferencia.

GRÁFICO N° 2

PORCENTAJE DE REGENERACIÓN CON ASIGNACIÓN DE LETRAS



En el gráfico No.2 el color azul representa a los tratamientos asignados con la letra a, el naranja representa a la letra b, y el verde la letra c.

Murashige (1974) y Narayasmamy (1977) citados por Pierrick (1966), han descrito ciertos factores que deben ser considerados por la multiplicación exitosa de la organogénesis. Se incluyen los factores relacionados con el explante (su edad fisiológica, y ontogénica, su tamaño y el tejido u órgano que es extraído) así como el estado fisiológico de la planta madre y con la época del año en que se realiza el cultivo

Se pudo comprobar que cualquiera de los factores, puede afectar profundamente la respuesta del cultivo in vitro del clavel.

En otros estudios realizados en clavel revelan que cada variedad se comporta de forma diferente en el cultivo in vitro de acuerdo con Densco (1987) la respuesta del explante de la variedad puede estar afectada por el genotipo de la variedad.

Por lo tanto, el establecimiento del material no sólo debe estar basado en las condiciones in vitro sino en el genotipo de la variedad

4.3. Longitud del brote

Se evaluó el crecimiento de la longitud del brote cada siete días en los dos tipos de explante.

Cuadro No 18.

LONGITUD DEL BROTE EN LA PRIMERA SEMANA

TRATAMIENTOS	REPETICIONES				SUMA	MEDIA
	I	II	III	IV		
T1. (SN/M1)	-	0,25	0,10	0,45	0,80	0,20
T2. (SN/M2)	0,35	0,45	0,20	0,35	1,35	0,34
T3. (SN/M3)	0,30	0,30	-	0,80	1,40	0,35
T4. (SN/M4)	-	0,15	-	0,40	0,55	0,14
T5. (MER/M1)	0,30	0,23	0,13	0,33	1,00	0,25
T6. (MER/M2)	0,63	0,50	0,13	0,23	1,50	0,38
T7. (MER/M3)	0,73	0,40	0,53	0,80	2,47	0,62
T8. (MER/M4)	0,33	0,30	0,37	0,70	1,70	0,43
SUMA	2,65	2,58	1,47	4,07	10,77	

Fuente: Elaboración propia

En cuanto a elongación podemos observar que el medio T7. (MER/M3) es el que presenta mayor longitud con un promedio 0.62cm seguido del T8. (MER/M4) con 0.43 cm. Le siguen en orden consecutivo por los tratamientos T6 T6. (MER/M2), T3. (SN/M3), T2. (SN/M2), T5. (MER/M1, T1. (SN/M1, y por último el tratamiento T4. (SN/M4). Cabe recalcar que los explantes fueron obtenidos un día antes de la inoculación

Cuadro No 19.

LONGITUD DE BROTE EN MEDIO DE CULTIVO Y EXPLANTE EN LA 1RA SEMANA

	SN	MER
M1	0,80	1,00
M2	1,35	1,50
M3	1,40	2,47
M4	0,55	1,70
SUMA	4,10	6,67

MEDIA	0,26	0,42
--------------	------	------

Como podemos observar en el cuadro No.16 el medio M3(BAP 2.0mg/l+ AIA 1.0mg/l), es el que presenta mayor longitud del brote con un promedio de 0.48 cm, en cuanto al explante los meristemas tiene mayor longitud con un promedio de 0.42cm.

Cuadro No 20.

ANOVA PARA LONGITUD DE BROTE EN LA 1RA. SEMANA

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SUMA DE CUADRADOS	CM	FC	FT	
					5%	1%
TRATAMIENTOS	7	0,61	0,09	2,17ns	2,42	3,5
ERROR	24	0,97	0,04			
FAC MEDIOS DE CULTIVO	3	0,30	0,10	2,46*	3,01	4,72
F. TIPOS DE EXPL	1	0,21	0,21	5,08 *	4,26	7,82
INTERACCIÓN M/T. E	3	0,47	0,16	3,84 *	3,01	4,72
TOTAL	31	1,59

Fuente: Elaboración propia

Como se puede observar en el cuadro N°21 hay diferencias significativas en factor medio de cultivo, tipo de explante y en la interacción de estos. Por lo tanto, recurrirá a una prueba de comparación de medias.

Prueba de MDS

$$MDS = \sqrt{\frac{2CME}{N^{\circ}r}} * t$$

$$MDS = \sqrt{\frac{2 * 0.04}{4}} * 2.09$$

MDS = 2.92

Cuadro No 21.

DIFERENCIA DE MEDIAS, LONGITUD DE BROTE EN LA 1RA SEMANA

		T7	T8	T2	T6	T5	T3	T1	T4
		0,62	0,43	0,38	0,35	0,34	0,25	0,20	0,14
T4	0,14	0,48	0,29	0,24	0,21	0,20	0,11	0,06	-
T1	0,20	0,42	0,23	0,18	0,15	0,14	0,05	-	
T3	0,25	0,37	0,18	0,13	0,10	0,09	-		
T5	0,34	0,28	0,09	0,04	0,01	-			
T6	0,35	0,27	0,08	0,03	-				
T2	0,38	0,24	0,05	-					
T8	0,43	0,19	-						
T7	0,62	-							

Para realizar una mejor interpretación y entendimiento se realizó el cuadro con asignación de letras.

Cuadro No 22.

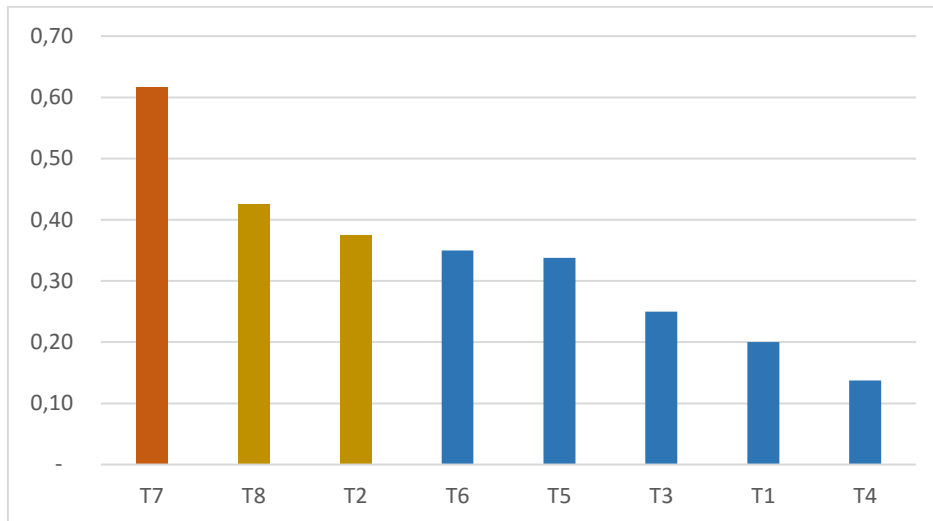
INTERPRETACIÓN DE DIFERENCIAS EN LAS 1RA. SEMANA

T7	0,62 a
T8	0,43 ab
T2	0,38 ab
T6	0,35 c
T5	0,34 c
T3	0,25 c
T1	0,20 c
T4	0,14 c

En el cuadro No. 23 podemos observar que el T7 lleva la letra a es el valor más alto en cuanto a crecimiento. En el tratamiento T7 y T8 no hay diferencias altamente significativas.

Gráfico No. 3

LONGITUD DE BROTE EN LA 1RA. SEMANA CON ASIGNACIÓN DE LETRAS



Las letras iguales no reflejan diferencias significativas, como podemos observar en el gráfico al color naranja está asignado la letra a, al color b, la mostaza y por último el c es el azul. Se puede observar que en el grafico que entre los tratamientos realizados con meristemos no existen diferencias ya que tienen asignada una sola letra, esto quiere decir que se presentó cierta homogeneidad en el crecimiento de estos.

Según (Cáceres 2006) por su parte indica que efectivamente la edad fisiológica es un aspecto de gran influencia en la morfogénesis, y que, en la micropropagación de plantas leñosas, la edad de las plantas es un factor crítico, es decir que mientras más jóvenes son los tejidos, el establecimiento es más exitoso.

En el caso del estudio realizado los explantes de las plantas madres obtenidas fueron de tejidos jóvenes, que estaban en los primeros brotes, por lo tanto, la bibliografía consultada tiene gran validez ya que se cumplen los parámetros establecidos.

Según (Pérez 1998) el estado fisiológico de la planta que dona el explante es de gran influencia en la respuesta de los tejidos en cultivo, generalmente se utilizan plantas en estado de crecimiento activo que muestren un desarrollo vigoroso y sano.

Corroborando lo propuesto por Pérez las platas madre fueron extraídas de un invernadero bien instalado, éstas se encontraban en buen estado fitosanitario y desarrollo vigoroso, gracias a estos factores se obtuvieron buenos resultados, los cuales pudimos observar en esta 1ra semana de regeneración.

Cuadro No 23.

LONGITUD DE BROTE EN LA SEGUNDA SEMANA

TRATAMIENTOS	REPETICIONES				SUMA	MEDIA
	I	II	III	IV		
T1. (SN/M1)	0,85	0,50	0,25	-	1,60	0,40
T2. (SN/M2)	0,80	1,55	1,55	1,35	5,25	1,31
T3. (SN/M3)	0,95	0,75	1,15	0,25	3,10	0,78
T4. (SN/M4)	0,50	0,40	0,35	-	1,25	0,31
T5. (MER/M1)	0,40	0,57	0,67	0,37	2,00	0,50
T6. (MER/M2)	0,90	0,97	0,43	0,47	2,77	0,69
T7. (MER/M3)	0,93	0,83	1,07	1,10	3,93	0,98
T8. (MER/M4)	1,00	0,70	0,80	0,97	3,47	0,87
SUMA	6,33	6,27	6,27	4,50	23,37	

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro N°24 podemos observar que el tratamiento T2. (SN/M2) mostró un gran avance llegando a los 1.31 cm le sigue el T7. (MER/M3) con 0.98cm. En orden consecutivo le siguen los tratamientos T8. (MER/M4) con 0.87, T6. (MER/M2) con 0.69, T1. (SN/M1) con 0.40, T5. (MER/M1) con 0.50, T4. (SN/M4) con 0.31. Cabe mencionar que en la primera semana los tratamientos más exitosos fueron el T7. (MER/M3) y T8. (MER/M4), en esta segunda

semana no bajaron su crecimiento activo, pero se pudo ver un gran avance del tratamiento T2 con el explante segmentos nodales.

Cuadro No 24.

LONGITUD DE BROTE EN MEDIO DE CULTIVO Y EXPLANTE EN LA SEGUNDA SEMANA

	SN	MER
M1	2,45	2,00
M2	4,05	2,77
M3	6,05	3,93
M4	1,75	3,47
SUMA	14,30	12,17
MEDIA	0,89	0,76

Fuente: Elaboración propia

Como podemos observar en el cuadro No. 25 en cuanto al tipo de explante el que presentó mayor tamaño del brote con un promedio general de 0.89cm los segmentos nodales y con 0.76 cm los meristemas.

Realizando el análisis de varianza de (ANOVA), se llegó a determinar los siguientes resultados desde el punto de vista estadístico.

Cuadro No 25.

ANOVA EN LONGITUD DE BROTE EN LA 2DA SEMANA

FUENTES DE VARIACION	GL	SUMA DE CUADRADOS	CM	FC	FT	
					5%	1%
TRATAMIENTOS	7	3,41	0,49	2,84ns	2,42	3,5
BLOQUES	3	1,58	0,53	3,08ns	3,05	4,87
ERROR	24	4,11	0,17			
FAC MEDIOS DE CULTIVO	3	2,25	0,75	4,38*	3,01	4,72
F. TIPOS DE EXPL	1	0,14	0,14	0,83ns	4,26	7,82
INTERACCION M/T. E	3	1,72	0,57	3,34*	3,01	4,72
TOTAL	31	7,53

Fuente: Elaboración propia

Como en el cuadro N°26 hay diferencias significativas entre tipos de explante e interacción de factores, se fue a una prueba de comparación de medias.

Prueba de MDS

$$MDS = \sqrt{\frac{2CME}{N^{\circ}r} * t}$$

$$MDS = \sqrt{\frac{2 * 0.17}{4} * 2.09}$$

MDS = 0.61

Cuadro No 26.

DIFERENCIA DE MEDIAS EN LA 2DA SEMANA

		T7	T8	T2	T6	T5	T3	T1	T4
		1,51	1,01	0,98	0,87	0,69	0,61	0,50	0,44
T4	0,44	1,08	0,58	0,55	0,43	0,25	0,18	0,06	-
T1	0,50	1,01	0,51	0,48	0,37	0,19	0,11	-	
T3	0,61	0,90	0,40	0,37	0,25	0,08	-		
T5	0,69	0,82	0,32	0,29	0,18	-			
T6	0,87	0,65	0,15	0,12	-				
T2	0,98	0,53	0,03	-					
T7	1,01	0,50	-						
T4	1,51	-							

Fuente: Elaboración propia

Para una mejor interpretación se realizó un cuadro de asignación de letras para los tratamientos correspondientes.

Cuadro No 27.

INTERPRETACIÓN DE DIFERENCIAS DE BROTE EN LA 2DA SEMANA

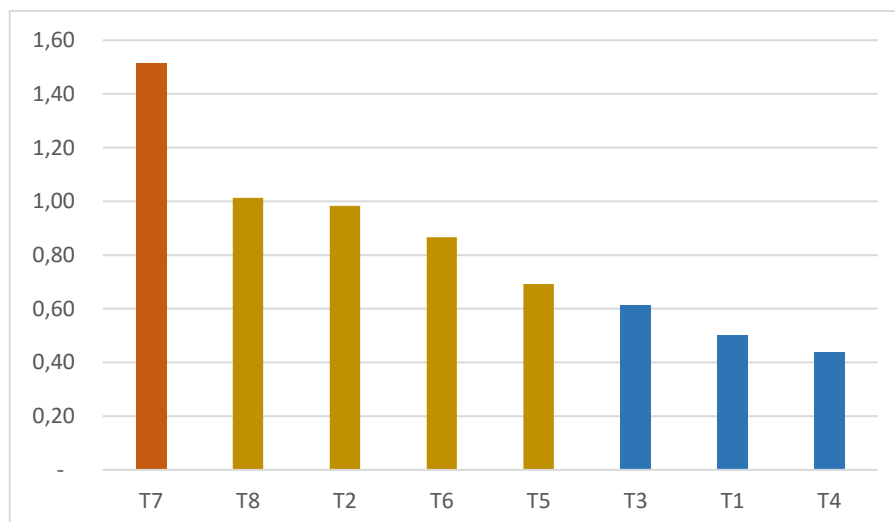
T7	0,62 a
T8	0,43 b
T2	0,38 b
T6	0,35 b
T5	0,34 b
T3	0,25 c
T1	0,20 c
T4	0,14 c

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo con el cuadro No 24 no hay diferencias significativas entre los tratamientos T8. (MER/M4), T2. (SN/M2), T6. (MER/M2), T5. (MER/M1). Para mostrar más claramente estos resultados se tiene el siguiente gráfico:

Gráfico No.4

ASIGNACIÓN DE LETRAS PARA LONGITUD DE BROTE EN LA 2DA SEMANA



En el gráfico N°4 la letra a esta representada por el color naranja, la b por la mostaza y la c por el azul, las letras iguales no reflejan diferencias significativas, por lo tanto

Según (Rogemberg y Tabor 1971) el éxito del cultivo de tejidos vegetales depende sustancialmente del medio de cultivo empleado. Para establecer un sistema de cultivo de tejidos, se elabora primero un medio de cultivo optimo que se ajuste a los principales requerimientos nutricionales de la especie vegetal, al tipo de explante, y al sistema de cultivo. La efectividad de un cultivo depende tanto de los ingredientes básicos como del agente gelatinizador.

Hartman et.al (1997), reportan que al usar el tejido meristemático proveniente de zonas de intensa división celular como las yemas apicales o axilares, se produce una organogénesis directa, manifestada en la formación de un nuevo brote y raíces a partir de la yema explantada.

Corroborando lo que plantea Hartman et.al (1997) se obtuvo un buen crecimiento de los brotes de los meristemas.

Según (Calva y Ríos 1999, Seabrook 1980, Street 1977), las plantas jóvenes o en desarrollo con tejidos meristemáticos y crecimiento vigoroso son la mejor fuente de explantes. Aunque en una misma planta se puede encontrar tanto crecimiento juvenil como adulto, el primero se caracteriza por ser activo y por la ausencia de estructuras reproductoras, mientras que el adulto es más lento y presenta estructuras sexuales para la reproducción de la planta. Además, las plantas pueden haber acumulado mayor cantidad de microorganismos en sus tejidos y contener menos células meristemáticas, necesarias para establecer los cultivos in vitro.

Cuadro No 28.

LONGITUD DEL BROTE EN LA TERCERA SEMANA

TRATAMIENTOS	REPETICIONES				SUMA	MEDIA
	I	II	III	IV		
T1. (SN/M1)	0,20	1,60	0,50	-	2,30	0,58
T2. (SN/M2)	0,34	1,00	2,00	0,50	3,84	0,96
T3. (SN/M3)	0,35	3,00	2,70	2,25	8,30	2,08
T4. (SN/M4)	0,65	0,85	0,65	-	2,15	0,54
T5. (MER/M1)	0,25	0,80	1,07	0,83	2,95	0,18

T6. (MER/M2)	0,38	1,60	0,97	1,13	4,08	1,02
T7. (MER/M3)	0,62	2,00	1,50	1,83	5,95	1,49
T8. (MER/M4)	0,43	1,27	1,10	1,27	4,06	1,01
SUMA	3,20	12,12	10,48	7,82	33,62	

Fuente: Elaboración propia

Como se puede observar el cuadro N° los T3 con 2.08 cm seguido del T7 con 1.49 cm seguido en orden consecutivo el tratamiento T6, T8, T2, T5, T1 por ultimo el T1 con 0.58cm.

Cuadro No 29.

LONGITUD DEL BROTE EN MEDIO DE CULTIVO Y EXPLANTE EN LA TERCERA SEMANA

	SN	MER
M1	2,30	2,95
M2	3,84	4,08
M3	8,30	5,95
M4	2,15	4,06
SUMA	16,59	17,03
MEDIA	1,04	1,06

Como podemos observar en el cuadro N° en esta semana el medio que se destacó más fue el M3 con una longitud de brote de forma general de 1.78cm, y en cuanto al explante, aunque sin una diferencia significativa los meristemas con 1.06 cm.

Cuadro No 30.

ANOVA PARA LONGITUD DE BROTE EN LA 3RA SEMANA

FUENTES DE VARIACION	GL	SUMA DE CUADRADOS	CM	FC	FT	
					5%	1%
TRATAMIENTOS	7	7,35	1,05	2,37*	2,42	3,5
ERROR	24	10,62	0,44			
FAC MEDIOS DE CULTIVO	3	6,15	2,05	4,63*	3,01	4,72

F. TIPOS DE EXPL	1	0,01	0,01	0,01*	4,26	7,82
INTERACCION M/T. E	3	4,47	1,49	3,37*	3,01	4,72
TOTAL	31	17,98

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo al cuadro N°27 de análisis de varianza podemos ver que hay diferencias significativas en todos los aspectos por lo tanto recurriremos una prueba de medias.

Prueba de MDS

$$MDS = \sqrt{\frac{2CME}{N^{\circ}r} * t}$$

$$MDS = \sqrt{\frac{2 * 0.44}{4} * 2.09}$$

$$MDS = 0.98$$

Cuadro No 31.

DIFERENCIA DE MEDIAS PARA LONGITUD DE BROTE EN LA 3RA SEMANA

		T3	T7	T6	T8	T2	T5	T1	T4	
		2,08	1,49	1,02	1,01	0,96	0,74	0,58	0,54	Para una mejor
T4	0,54	1,54	0,95	0,48	0,48	0,42	0,20	0,04	-	
T1	0,58	1,50	0,91	0,44	0,44	0,38	0,16	-		
T3	0,74	1,34	0,75	0,28	0,28	0,22	-			
T5	0,96	1,12	0,53	0,06	0,06	-				
T6	1,01	1,06	0,47	0,00	-					
T2	1,02	0,52	0,47	-						
T7	1,49	0,59	-							
T3	2,08	1,54								

interpretación del cuadro de diferencia de medias se recurre a una tabla de asignación de letras.

Cuadro No 32.

DIFERENCIA DE MEDIAS PARA LONGITUD DE BROTE EN LA 3RA SEMANA

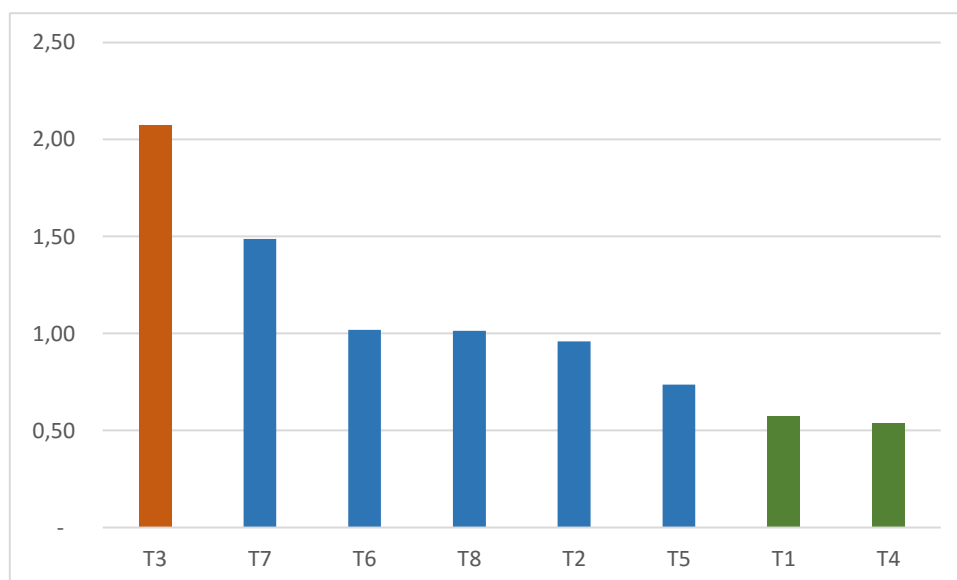
T3	2,08 a
T7	1,49 a
T6	1,02 b
T8	1,01 b
T2	0,96 b
T5	0,74 b
T1	0,58 c
T4	0,54 c

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro No. 29 podemos observar que hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ya que tuvimos que asignar 3 letras diferentes. Para ver de forma más resumida estos resultados presentamos el siguiente gráfico:

Gráfico No.5

ASIGNACIÓN DE LETRAS PARA LONGITUD DE BROTE EN LA 3RA SEMANA



Según (Calva y Ríos 1999, Seabrook 1980, Street 1977), las plantas jóvenes o en desarrollo con tejidos meristemáticos y crecimiento vigoroso son la mejor fuente de explantes. Aunque en una misma planta se puede encontrar tanto crecimiento juvenil como adulto, el primero se caracteriza por ser activo y por la ausencia de estructuras reproductoras, mientras que el adulto es más lento y presenta estructuras sexuales para la reproducción de la planta. Además, las plantas pueden haber acumulado mayor cantidad de microorganismos en sus tejidos y contener menos células meristemáticas, necesarias para establecer los cultivos in vitro.

Fal et.al (2002) los factores genéticos determinan la sensibilidad del material vegetal, a las condiciones ambientales que se refleja en las respuestas de crecimiento y morfogénesis in vitro. También reportan que entre los diferentes genotipos de las plantas de clavel se presentan diferencias. Densco (1987) sugiere que la respuesta del explante puede estar afectada por el genotipo.

Tomando en cuenta los datos obtenidos y los reportes de Fal et.al y Densco podemos decir afirmar que el tipo de explante tiene gran influencia en los resultados en cuanto a crecimiento.

Cuadro No 33.

LONGITUD DE BROTE EN LA CUARTA SEMANA

TRATAMIENTOS	REPETICIONES				SUMA	MEDIA
	I	II	III	IV		
T1.(SN/M1)	3,50	1,85	0,50	-	5,85	1,46
T2.(SN/M2)	0,80	0,80	2,20	0,95	4,75	1,19
T3.(SN/M3)	1,90	2,50	1,85	3,00	9,25	2,31
T4.(SN/M4)	-	0,75	1,90	-	2,65	0,66
T5.(MER/M1)	0,73	0,80	1,07	0,83	3,43	0,86
T6.(MER/M2)	2,00	1,60	0,97	1,13	5,70	1,43
T7.(MER/M3)	1,83	2,00	0,83	1,17	5,83	1,46
T8.(MER/M4)	1,67	1,27	1,10	1,27	5,30	1,33
SUMA	12,43	11,57	10,42	8,35	42,77	

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro N°34 podemos observar que el tratamiento T3 es el que presenta mayor elongación en cuanto a la longitud del brote seguido del T7 con 1.82 cm, en orden consecutivo le siguen los tratamientos T5, T6, T8, T2, T1 y por último el T4.

Un balance hormonal entre auxinas y citocininas es la clave en la división celular y el crecimiento de la región meristemática presente en las yemas que es a su vez, lo que determina la iniciación de las hojas nuevas y la proliferación de brotes.

El balance de esas es muy importante como podemos observar las diferentes concentraciones de estas hormonas provocan ya sea un mayor o menor crecimiento de los explantes.

Cuadro No 34.

LONGITUD DE BROTE PARA LA CUARTA SEMANA, MEDIOS DE CULTIVO/TIPO DE EXPLANTE

	SN	MER	SUMA	MEDIA
M1	3,10	7,00	10,10	1,26
M2	4,35	5,17	9,52	1,19
M3	8,35	7,27	15,62	1,95
M4	2,15	4,47	6,62	0,83
SUMA	17,95	23,90		
MEDIA	1,12	1,49		

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro N ° se puede observar que el medio que presenta mayor crecimiento es el medio 3 y el explante más vigoroso en cuanto a la elongación del brote son los meristemas.

Cuadro No 35.

ANOVA PARA LONGITUD DE BROTE EN LA CUARTA SEMANA

FUENTES DE VARIACION	GL	SUMA DE CUADRADOS	CM	FC	FT	
					5%	1%
TRATAMIENTOS	7	8,10	1,16	1,54 ns	2,42	3,5
ERROR	24	18,09	0,75			
FAC MEDIOS DE CULTIVO	3	5,30	1,77	2,34 ns	3,01	4,72
F. TIPOS DE EXPL	1	1,11	1,11	1,47ns	4,26	7,82
INTERACCION M/T. E	3	11,68	3,89	5,17 **	3,01	4,72
TOTAL	31	26,19

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro N°36 en el análisis de varianza podemos ver que hay diferencias altamente significativas en la interacción de factores por lo tanto recurriremos a una prueba de comparación de medias.

Prueba de MDS

$$MDS = \sqrt{\frac{2CME}{N^{\circ}r}} * t$$

$$MDS = \sqrt{\frac{2 * 0.75}{4}} * 2.09$$

$$MDS = 1.28$$

Cuadro No 36.

DIFERENCIA DE MEDIAS PARA LONGITUD DE BROTE EN LA CUARTA SEMANA

		T7	T8	T2	T6	T5	T3	T1	T4
		2,09	1,82	1,75	1,29	1,12	1,09	0,78	0,54
T4	0,54	1,55	1,28	1,21	0,75	0,58	0,55	0,24	-
T1	0,78	1,31	1,04	0,98	0,52	0,34	0,31	-	
T3	1,09	1,00	0,73	0,66	0,20	0,03	-		
T5	1,12	0,97	0,70	0,63	0,18	-			
T6	1,29	0,80	0,53	0,46					
T2	1,75	0,34	0,07	-					
T7	1,82	0,27	-						
T4	2,09	-							

Para poder interpretar mejor estas diferencias se realizó una tabla de asignación de letras para poder resumir los datos encontrados.

Cuadro No 37.

INTERPRETACIÓN DE MEDIAS EN LA CUARTA SEMANA

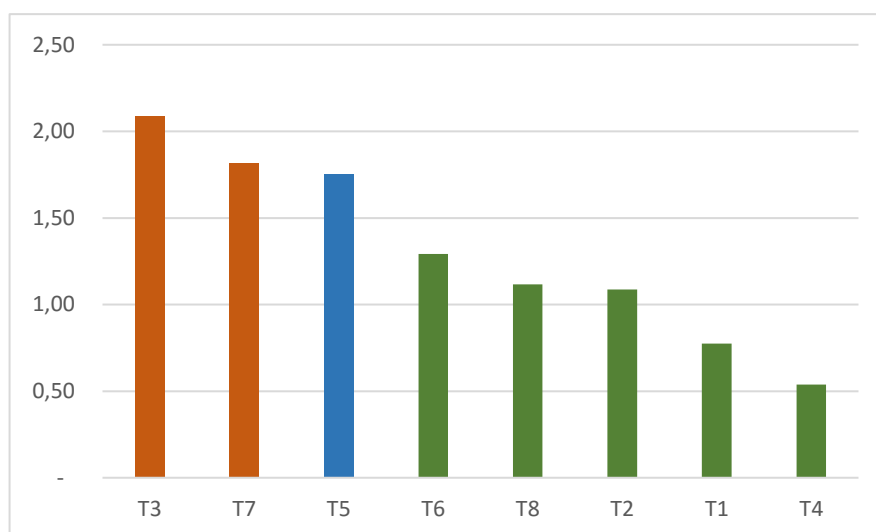
T3	2,09 a
T7	1,82 b
T5	1,75 c
T6	1,29 c
T8	1,12 c
T2	1,09 c
T1	0,78 c
T4	0,54 c

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro No.34 podemos observar que existen diferencias significativas del tratamiento T3 con respecto a los demás tratamientos, ya que a letras diferentes hay diferencias significativas, de igual manera el tratamiento T7 hay una gran diferencia en comparación a los otros tratamientos, entre los restantes no hay diferencias altamente significativas. Para demostrarlo de manera más clara se tiene el siguiente gráfico:

Gráfico No. 5

ASIGNACIÓN DE LETRAS PARA LONGITUD DE BROTE EN LA 4TA SEMANA



En la gráfica podemos ver que Smith (1992), expone que los tejidos meristemáticos jóvenes demuestran tener mayor capacidad regenerativa, por otro lado, el tamaño del explante también influye, ya que los explantes grandes poseen un potencial regenerador considerablemente mayor con respecto a los de menor tamaño, los cuales por su parte presentan una viabilidad y capacidad regenerativa baja.

Por lo tanto, el crecimiento vigoroso de los segmentos nodales afirma el reporte de Smith (1992) aunque en los meristemas hay menor porcentaje de contaminación en segmentos nodales el medio 3 es el más efectivo.

Como podemos ver el T1 y el T5, aunque estos no presentan adición de hormonas al medio de cultivo de igual forma se hubo elongación del brote, esto se atribuye a los estudios realizados por Cuzzoul et.al (1996) que afirman que ese crecimiento se debe a la presencia de auxinas endógenas en la planta, ya que las partes aéreas de la planta especialmente las

hojas tienen una producción intensa de auxinas, que pueden ser trasladadas a todos los órganos de la planta.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos y al análisis de los resultados obtenidos, presentamos las siguientes conclusiones:

- El estado fisiológico y la condición fitosanitaria de esquejes que se van a someter a cultivo in vitro son relevantes para el éxito de los procedimientos dirigidos.
- El porcentaje de contaminación durante el establecimiento, se asoció con la presencia de microorganismos (hongos y bacterias).
- El medio más adecuado para el desarrollo del clavel fue el M3 con una concentración de (2.0mg/L de BAP+ 1.0mg/l de AIA).
- En cuanto al tipo de explante utilizado de manera general se obtuvieron mejores resultados con los meristemos respecto a los segmentos nodales, para la regeneración in vitro.
- La diferencia de explantes regenerados en cada uno de los medios, se debe a la relación auxina-citocinina, tal como puede observarse en el cuadro N°, en donde la 6-Bencilaminopurina se encuentra en mayor concentración en el medio "3" en el cual se presentó una mayor longitud del brote. Este hecho está en razón que la citoquinina (BAP) es la más efectiva para la formación y desarrollo de yemas en este caso, tanto en segmentos nodales como en meristemos.

5.2. Recomendaciones

En base a los resultados obtenidos se llegó a las siguientes recomendaciones:

- Se debe realizar protocolo de desinfección del explante con mucha cautela antes de la inoculación, es muy importante para reducir la tasa de contaminación, ya que este factor influye de gran manera en la regeneración y el crecimiento del brote.
- Es necesario recordar que un buen balance de auxinas-citocininas empleados en los medios de cultivo dará mejores resultados.
- Mientras la planta madre sea de buena calidad y joven, se obtendrán mejores resultados.
- Es conveniente realizar la recolección de esquejes un día antes de la inoculación para mantener fresco el material vegetal y así poder tener mejores resultados.
- En el momento de la inoculación tanto de segmentos nodales como de meristemos es necesario que la yema o el meristemo esté dispuesto hacia arriba ya que influye en el crecimiento de los brotes.