

CAPITULO I

1.1.INTRODUCCION.

La especie frutal no tradicional, conocida en nuestro medio como la frutilla o fresa, es también conocida en el mundo con diferentes nombres tales como: Fresa o frutilla en español, fragola en latín, morango en portugués, fraise en francés, strawberry en inglés y terdbeere en alemán.

Si bien, algunos botánicos habían descrito la presencia de sexos separados en frutillas, el Duchense, fue primero en hacer observaciones detalladas y experimentos de polinización controlados con las frutillas. Inicialmente demostró que las plantas de *F. muschata*, cuando eran crecidas aisladas, no producían frutos. Luego cuando se percató que las plantas de frutillas chilenas tampoco producían frutos, pensó que podía tratarse también de un caso de flores unisexuales.

En pruebas de campo realizadas por el Instituto Agronómico Nacional, las vitroplantas han demostrado ser superiores en rendimiento y en calidad a las plantas comunes.

En efecto, las plantas libres de virus, demostraron rendimientos superiores en un 60% a las plantas provenientes de mudas comunes.

La forma de propagación de esta planta se realiza por medio:

- Estolones.
- Semillas.
- Hijuelos.
- Cultivos in vitro.

La multiplicación de plantas a través de las técnicas de cultivo In Vitro, se ha convertido en una herramienta indispensable en la agricultura moderna. Gran parte de este éxito se debe al desarrollo, a partir de la década de 1950, de medios de cultivo con altos contenidos de sales minerales y en particular de amonio.

En la actualidad, el Murais & Scot, es el medio de cultivo más utilizado, para el cultivo in vitro de plantas. En el Departamento de Tarija, en los últimos años ha incrementado la producción del cultivo de la frutilla gracias a algunas instituciones y técnicos que incentivan a la producción de la misma.

En el Departamento de Tarija con la ayuda de la institución “FAUTAPO”, se incrementó la producción de frutilla con más de 65 mil plantas por la zona del Portillo, Tolomosita, Esquíiz Norte, Ceibal, Coimata, etc. con variedades como Aroma y San Andreas, cuyos frutos posteriormente son comercializados en el mercado local de la ciudad.

Técnicos de la Sub gobernación de Cercado junto a la FUNDACIÓN FAUTAPO y el CENTRO DE EDUCACIÓN ALTERNATIVA EL CÓNDROR ADULTOS, auspiciaron un proceso de capacitación con una duración de un año, para apoyar en la producción integral de frutilla, formando a los productores con nivel de técnicos auxiliares e implementando nuevas y modernas tecnologías, además de la aplicación de riego, por goteo en el cultivo de frutilla.

Se realizaron capacitaciones hacia los productores, de gente joven, para tener conocimiento en cuanto al mercado proveedor y mercado consumidor de la frutilla en fruto fresco o realizando algunas conservas.

En la capacitación técnica, se enseñó cómo colocar los plantines, manejo de la tierra, cuidado de la planta, para prevenir las enfermedades de plagas con implementación tecnológica que permita mayor producción. Ese hecho permitió que una planta produzca cerca de 1500, gramos de frutos de frutilla, superando con más del doble al método de producción tradicional que alcanzaba a los 600 gramos de fruto por planta.

Con la técnica de cultivos in vitro, se establecerá plantas en tiempo record con alto vigor, sobre todo manteniendo sus características genéticas de la variedad correspondiente, probando medios de cultivos, como Murashigue&Skook + AIB + GA3 (M1) Murashigue&Skook + BAP + GA3 (M2) y Murashigue&Skook + KIN + GA3 (M3), con dos variedades de frutilla *var. Albion* y *var. San andreas*, dando a las

plantas características de luminosidad, presión atmosférica, humedad atmosférica y temperatura adecuada.

1.2.JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.

Es necesario, recurrir a métodos que incrementen la multiplicación del material vegetal, para cubrir de alguna manera la demanda de plantas.

El cultivo in vitro, permite mantener las características genotípicas de las especies produciendo nuevas plantas más productivas. Además nos permite conocer y compensar a las plantas los nutrientes necesarios que requiere. (Sánchez, 2009).

Los productores de frutilla del Valle Central de Tarija, requieren plantas, por lo que es necesario recurrir a métodos que incrementen la multiplicación del material vegetal en menor tiempo, para cubrir de alguna manera la demanda de plantas que tienen los productores del departamento.

El enfoque de esta investigación es, el establecimiento in vitro de la frutilla y de esta manera posteriormente se podrá realizar la multiplicación y la producción de plantas in vitro, obteniéndose en tiempo record, gran cantidad de plantas de las variedades que cultiva el agricultor y tiene adaptación en esta zona, con alto vigor y sin perder sus características genotípicas.

1.3.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La producción del cultivo de la frutilla día a día, se va haciendo más importante en el departamento y en el país por su alta rentabilidad y el crecimiento de la demanda que existe en el mercado interno, en estos últimos años la cantidad de hectáreas de cultivo está incrementando con alta significancia.

El incremento de hectáreas produciendo frutilla, hace que exista una gran demanda de Plantines, ya que se comporta, para tener una multiplicación de hijuelos hasta la tercera generación.

La mayor cantidad de Plantines, son importados de la Argentina, lo cual se hace un poco difícil la obtención, por los productores de esta zona.

Problemas que surgen, como consecuencia de la utilización de los métodos de multiplicación tradicional (esquejes y otros), empleados por los productores para, la instalación de nuevas parcelas productivas no son suficientes; para cubrir la cantidad de demanda que tiene el departamento.

En consecuencia las actuales prácticas afectan el rendimiento, la calidad de la producción y la vida útil de la plantación, confluendo en un sistema socio-productivo que no es el esperado con respecto al que se podría obtener con algunas mejoras en la producción.

Con el método de cultivo in vitro, se ha revolucionado la producción agrícola en los últimos años, ya que gracias a esta técnica se pueden generar clones de variedades élite en grandes cantidades y en un tiempo menor, con un conjunto de beneficios adicionales respecto a la propagación tradicional. Además, esta técnica permite producir plantas durante todo el año, independientemente del factor climático (temperatura, luz, humedad); porque las condiciones de laboratorio en las que se realizan pueden ser controladas según la necesidad del cultivo. Y poder ofrecer al productor plantines vigorosos y garantizados, para la producción.

La mayoría de los productores del departamento de Tarija, multiplican plantas a partir de hijuelos hasta una tercera generación y tienen que requerir plantas de la República de Argentina, para así cubrir de alguna manera la demanda de las plantas de frutilla, ya que a partir de la tercera generación va perdiendo sus características genéticas.

El desconocimiento de una solución definida apropiada, para el establecimiento in vitro del cultivo de la frutilla en laboratorio.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo general

Establecer el cultivo in vitro, de dos variedades de frutilla (*var. Albion* y *var. san andreas*), determinar el tratamiento adecuado, para el establecimiento en el

laboratorio de Fitopatología y Cultivos in vitro de la “Universidad Autónoma Juan Misael Saracho”.

1.4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el comportamiento en el establecimiento in vitro, de las variedades de frutilla (*Var. Albion y San Andreas*), tomando en cuenta los porcentajes de regeneración.
- Determinar el tratamiento apropiado, para el establecimiento in vitro de dos variedades de frutilla (*Var. Albion y San andreas*) tomando en cuenta los diferentes fitorreguladores utilizados como Kinetina (KIN), Bencilaminopurina (BAP), Acido indolacetico (AIA).

1.4.3. HIPOTESIS DE LA INVESTIGACION

Hipótesis Nula:

En el establecimiento in vitro de la frutilla utilizando distintos tratamientos no se muestran diferencias significativas entre los tratamientos.

Usando distintas variedades no se muestran diferencias significativas, en relación variedad tratamiento.

CAPITULO II

2.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1.1 Biotecnología

La biotecnología, es un conjunto de técnicas que utiliza seres vivos a partes de estos, para producir o modificar productos, aumentar la productividad de las plantas y animales de manera eficiente o también producir microorganismo, para usos específicos.

La biotecnología, incluye las tecnologías de Ingeniería Genética, DNA, recombinante, manipulación de células y embriones.

Podemos difundir esta disciplina, como la intervención del hombre, para desarrollar métodos y crear así nuevas formas de vida que mediante la naturaleza serían imposibles de surgir (M. de Gyves, 1994).

2.1.2. Biotecnología Vegetal

La biotecnología, se la puede definir como “Conjunto de técnicas, que usan materia viva, para fabricar o modificar un producto o un servicio”. Aplicando esta definición podríamos decir que el conjunto de técnicas que permiten aprovechar las propiedades y posibilidades de los microorganismos y de los cultivos celulares, gracias a la aplicación integrada de los conocimientos, técnicas de la bioquímica, microbiología, genética e ingeniería química. (Villaruel S. 1998)

La biotecnología, se ocupa de la utilización de organismos vivos, sus constituyentes y productos o ambos, en beneficio del hombre. Abarca una serie más o menos independiente, aunque interrelacionada, por un conjunto de métodos, que incluye entre otros a:

- El cultivo de tejidos vegetales.
- La ingeniería genética.

- La biología molecular.
- La ingeniería de proteínas.
- La tecnología de células.
- La tecnología inmunológica.

2.1.3. La Propagación de Plantas In Vitro, un Éxito Biotecnológico.

Desde hace 50, años se ha demostrado el avance en el desarrollo de la biotecnología vegetal, principalmente en la propagación de especies vegetales. A este sistema de propagación se le conoce como micro propagación, que tiene como base principal el cultivo in vitro, de tejidos vegetales, una de las más importantes aplicaciones, para la producción masiva de plantas de interés económico o biológico. (Salgado G 2008)

2.1.4. Cultivos in vitro de Tejidos Vegetales.

El término “cultivo In Vitro de tejidos”, significa cultivar algunas partes de las plantas también llamados “explantes”, como segmentos de hoja, tallo y raíces, además de otros tejidos u órganos vegetales, dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial; en los que deben de controlarse la asepsia, el crecimiento y el desarrollo de estos diferentes tejidos.

Para lograr un cultivo in vitro de plantas, los tejidos y órganos (incluyendo semillas) deben ser esterilizados de manera superficial (asepsia) y se cultivan en soluciones nutritivas especiales, con frecuencia en medios solidificados con agar. A estos medios de cultivo se le incorporan combinaciones adecuadas de auxinas y citocininas, dos de las principales fitohormonas del crecimiento vegetal

2.2. Marco Conceptual de Cultivos In vitro.

2.2.1. Cultivo In vitro

Hurtado y Merino (1988) mencionan que desde hace 120 años aproximadamente, en las investigaciones fisiológicas se ha utilizado la técnica de cultivo de tejidos, órganos y células vegetales, que consiste en cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y de tallo, primordios de hoja, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos de tallo y hojas y algunas veces

ovario, óvulos, anteras y polen. El mismo autor, cita que los primeros intentos en esta técnica fueron realizados por Sacks (1860).

Murashige y Skoog en (1962), experimentaron con cultivos de tejidos y células, en medios que contenían sales y azúcares; reportaron en 1932, los resultados de sus primeras experiencias y su teoría sobre la totipotencia celular, que es la capacidad que tienen las células vegetales, para producir una planta completa y fértil a partir de una célula.

2.2.2. Medios de Cultivo In Vitro.

El medio, puede ser preparado, ya sea utilizando ingredientes básicos o adquirirlo preparado. Hay diferentes tipos de medios disponibles así como otros específicos, para ciertas especies diseñados por expertos profesionales. Según Thompson (1980),

Las preparaciones comerciales de Phytamax (Químicos Sigma, Aldrich, Inglaterra) y Murashige y Skoog, cualquiera de estos medios pueden ser preparados, tanto a una concentración parcial o total (la concentración parcial es recomendada, para Murashige y Skoog).

Señalan que el éxito que se obtenga en un cultivo de tejidos vegetales, depende del uso del medio nutritivo adecuado, como también del empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, asepsia, etc. Según los autores, los ingredientes del medio de cultivo se pueden clasificar en: Sales inorgánicas, compuestos orgánicos, complejos naturales, materiales inertes de soporte. Hurtado y Merino (1988),

2.2.2.1. Sales Inorgánicas

Los mismos autores, mencionan que se han llevado a cabo investigaciones con el fin de optimizar las necesidades de plantas específicas, lo cual ha traído, como consecuencia la formulación de varias mezclas salinas. La fórmula de Murashige y Skoog (1962), se ha demostrado que es el medio adecuado, para una gran variedad de especies, así, como para diferentes partes de una planta. La fórmula, contiene grandes cantidades de macro nutrientes y contiene una alta concentración de nitrógeno en

forma de NH_4NO_3 y KN_3 . Recomiendan, generalmente el empleo de diluciones de 3 a 1. (Hurtado y Merino (1988))

2.2.2.2. Compuestos Orgánicos.

Pueden clasificarlos en tres grupos: Carbohidratos, sustancias hormonales y vitaminas. Frecuentemente, se han obtenido buenos resultados cuando se emplean otros aminoácidos y/o amidas, algunas purinas y pirimidinas, hexitoles y ácidos orgánicos. Según (Hurtado y Merino (1988)).

2.2.2.3. Fuente de Carbono

Estos autores, mencionan que la sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente usada y se emplea a una concentración de 2 a 396 ppm; sin embargo, en ciertas especies se emplean concentraciones muy elevadas (5 a 12%). Ocasionalmente, se emplea la glucosa en cultivos de monocotiledoneas, así como la fructosa y el almidón, para otras especies.

2.2.2.4. Sustancias Hormonales

Las hormonas vegetales, compuestos orgánicos especializados producidos por las plantas, son los principales factores internos que controlan el crecimiento y el desarrollo. Las hormonas, se producen en cantidades muy pequeñas en unas partes de las plantas y son transportadas a otras, donde ejercen su acción. Una misma hormona puede desplegar efectos distintos en diferentes tejidos de destino según (Parra (2007)).

2.2.2.4.1. Auxinas.

El mismo autor señala que la auxina, una de las más importantes hormonas vegetales, se sintetiza en las yemas apicales de los tallos y pasa desde allí a otras partes de la planta, donde puede tanto estimular el crecimiento como inhibirlo. En los tallos, por ejemplo, la auxina favorece el alargamiento de las células y la diferenciación del tejido vascular, mientras que en las raíces inhibe el crecimiento en la parte central y favorece la formación de raíces adventicias. También retrasa la abscisión o caída de flores, frutos y hojas.

Parra (2007), menciona que las funciones de las auxinas son las siguientes: Dominancia apical, aumentar el crecimiento de los tallos, promover la división celular en el cambium vascular y diferenciación del xilema secundario, estimular la formación de raíces adventicias, estimular el desarrollo de frutos (partenocárpicos en ocasiones), fototropismo, promover la división celular, promover la floración en algunas especies, promover la síntesis de etileno (influye en los procesos de maduración de los frutos) y favorece el cuaje y la maduración de los frutos, inhibe la abscisión ó caída de los frutos.

Mencionan que las auxinas, se usan en una concentración de 0,1 a 1 0,0 mg/l. Principales auxinas utilizadas, para la preparación de medios de cultivo: ácido 3-indolacético (ALA) (muy 'termo lábil), ácido 3-indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), ácido 4-clorofenoxiacético (CPA), ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D), ácido 4-amino-3, 5, 6-tricloropicolínico (Tordón, producto comercial, M. R.). Hurtado y Merino (1988),

2.2.2.4.2. Citocininas

Las citocininas, se sintetizan en los meristemos apicales de las raíces, aunque también se producen en los tejidos embrionarios y en las frutas. Transporte en la planta por vía acropétala, Parra (2007).

Los aminoácidos y amidas, que han demostrado tener efectos benéficos son la L-arginina, ácido L-aspártico, L-asparagina, ácido L-glutámico y L-glutamina. La L-serinajuega un papel muy importante en la iniciación de embriones haploides en cultivos de anteras; la L-tirosina es crítica en la formación de tallos de cultivos de callos.

2.2.2.5. Otros Compuestos Orgánicos

Los mismos autores, manifiestan que entre los hexitoles, el inositol tiene un efecto estimulante muy significativo. La concentración de inositol comúnmente empleada es de 100 mg/l. En la producción de embriones haploides a partir de microsporas aisladas se emplean 500 mg/l.

Las citocininas, se usan en una concentración de 0,03 a 30,0 mg/1. Principales auxinas utilizadas, para la preparación de medios de cultivo: N6 bencilaminopurina (BA), N6 dimetilalilaminopurina (2iP), N6 furfurilaminopurina (cinetina), N6 (4-hidroxi, 3-metil, 2-butenil) adenina (zeatina). Según Hurtado y Merino (1988).

2.2.2.5.1. Vitaminas.

Las vitaminas son compuestos orgánicos necesarios, para la realización del metabolismo normal de ciertos organismos vivos, asemejándose a las enzimas u hormonas que el organismo necesita en cantidades relativamente mínimas, para su normal crecimiento y desarrollo. (Miller y Erston 2010).

Dicen que la única vitamina que ha demostrado tener importancia en cultivos de células y órganos es la tiamina; algunas otras se utilizan debido a que pueden estimular procesos de crecimiento específicos. Hurtado y Merino (1988).

2.2.2.5.2. Aminoácidos y Amidas

Los mismos autores, señalan que los requerimientos de aminoácidos y/o amidas se pueden determinar rápidamente por medio de la adición de un hidrolizado proteico. Cualquier efecto positivo puede ser investigado por una adición posterior de una mezcla de aminoácidos y amidas en lugar del hidrolizado. Así, un aminoácido o amida específicos pueden detectarse por un proceso de eliminación.

Las bases nitrogenadas (ácido citidílico y guanílico) promueven el crecimiento de cultivos de callos, usándose en una concentración de 100 mg/1.

2.2.2.6. Complejos Naturales.

Muchas preparaciones de composición indefinida han sido empleadas para enriquecer los medios de cultivo; frecuentemente se han empleado como última alternativa después de que todos los ingredientes definidos del medio han fallado en el establecimiento de cultivos de células y órganos según Hurtado y Merino (1988)

2.2.2.7. Materiales Inertes de Soporte

El agar es el material de soporte más ampliamente usado en el cultivo de tejidos, pues provee al medio de un excelente gel húmedo que sirve como soporte al inóculo. Sin embargo, fisiológicamente no es inerte, puesto que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulantes del crecimiento. Otros agentes gelificantes usados algunas veces en lugar del agar son la poliacrilamida y la silicagel.

En medio líquido se usa, papel filtro como puente o plataforma que es muy frecuente, así como la fibra de vidrio, recomienda añadir carbón, en bajas concentraciones, ayuda a adsorber sustancias que se forman como desecho en algunos medios de cultivo, se emplea carbón que debe ser muy fino y preferentemente prelavado. Según Hurtado y Merino (1988)

3.2.3. Fases del Cultivo In vitro.

2.2.3.1. FASE 0: Selección y Preparación de la Planta Madre.

1. Seleccionar el material de partida: Debe ser una planta joven, vigorosa y sin enfermedades.
2. Obtener un trozo de tallo cilíndrico lo más cercano al meristemo apical.

2.2.3.2. FASE I: Establecimiento en Condiciones de Asepsia.

Una vez escogida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes.

Antes de extraer los explantes se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos y estos puedan perjudicar.

El proceso de desinfección y el restante de trabajos de manipulación del material vegetal se efectúan dentro de una cámara de flujo laminar.

2.2.3.2.1. La Cámara de Flujo Laminar

Buena parte de las manipulaciones propias del cultivo *in vitro* deben realizarse en condiciones de esterilidad total para evitar la contaminación de los cultivos. Para

disponer de una superficie de trabajo estéril que no ponga en peligro la esterilidad de los cultivos se usan las cámaras del flujo laminar.

Una cámara de flujo laminar es un resptaculo en forma generalmente prismática con una única cara libre (la frontal) que da acceso al interior, donde se localiza la superficie de trabajo. La esterilidad de la zona de trabajo, se consigue, porque se hace circular a través del interior de la cámara de una corriente de aire que previamente ha sido micro filtrada, para eliminar toda partícula extraña (Pierik, 1990)

Para evitar que el aire del exterior pueda entrar en la cámara del flujo laminar sin pasar previamente por los filtros se procura que la presión interior sea ligeramente superior a la presión exterior, con lo cual el aire siempre circula de dentro hacia afuera y nunca al revés.

Según el grado de sofisticación de la cámara, puede disponer de elementos accesorios como son: Fuente de luz, lámpara de esterilización por U.V.,pilotos indicadores de funcionamiento, indicador de presión interior, etc.(Medina,2005).

Existen dos tipos de cámara de flujo laminar según sea la forma en la que se hace circular el aire: cámaras de flujo horizontal y cámaras de flujo vertical. En las primeras el flujo se produce desde el fondo de la cámara hasta el frente, de forma que las partículas se mueven horizontalmente a la superficie de trabajo. En las segundas el flujo se produce desde el techo hacia la superficie de trabajo de forma que las partículas de mueven perpendicularmente a ella.

2.2.3.2.2. Desinfección del Material Vegetal.

La técnica de un cultivo, es un proceso que consiste en obtener material vegetal *in vitro* libre de microorganismos, a partir de material vegetal *ex vitro*.

El paso previo y obligado para obtener el material vegetal libre de microorganismos es la esterilización de la superficie de este.

Varios autores, coinciden en que el proceso de esterilización puede resumirse en los siguientes pasos:

- ✓ Lavado del material con agua corriente, para retirar restos de tierra u otras partículas (opcional)
- ✓ Eliminación de las partes muertas e infectadas de la planta.
- ✓ Introducción de la porción de la planta en alcohol al 90%, durante unos segundos.
- ✓ Sumergir la planta en una solución de hipoclorito de sodio (por ejemplo al 1%), con un agente humectante (por ejemplo Tween 20 o Tween 80), durante 10-30 minutos. La fuente más utilizada de hipoclorito de sodio es la lejía. Esta contiene un 5%, de hipoclorito de sodio como agente activo, con lo que la solución estará formada por un 10-20%(v/v) de lejía. Para una mayor eficacia se recomienda agitar la solución mientras dura el proceso
- ✓ Enjuague el material con agua estéril, para eliminar la solución de hipoclorito de sodio. El enjuague debe tener lugar bajo condiciones de asepsia, y suele realizarse en tres veces sucesivas o más de unos 5 o 10, minutos cada una.
- ✓ Este proceso de esterilización generalmente presenta dos problemas los cuales son:
 - ✓ La capacidad de los agentes esterilizantes, para dañar los tejidos vegetales.
 - ✓ Presencia de microorganismos en el interior de dichos tejidos.

En el primer caso, se aconseja disminuir la concentración y/o tiempo de exposición a los agentes esterilizantes. Con esta medida disminuyen los daños al material vegetal, pero aumenta el porcentaje de contaminaciones.

En el segundo caso, el proceso de esterilización no tiene el efecto deseado puesto que, los microorganismos internos no se eliminan y pueden proliferar en el medio de cultivo.

Un producto alternativo al hipoclorito de sodio es el hipoclorito de calcio. Se presenta en forma de polvo que se mezcla con agua a una concentración de 35-100 g/l. el

material vegetal debe permanecer sumergido entre 5-30 minutos y ser enjuagado con agua estéril al finalizar. Pierik (1990), Pérez Ponce (1998),

Otro agente esterilizante es el cloruro de mercurio, el cual se disuelve en agua a una concentración de 0.01-0.05 (p/v). El material vegetal está en contacto con el producto durante 2-12 minutos, para ser enjuagado concienzudamente con agua estéril al final del proceso. Este producto debe utilizarse bajo medidas de seguridad, ya que es nocivo para la salud. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia (Medina, 2005)

2.2.3.2.3. Inicio del Cultivo *In Vitro*.

Torres (2000), indica que en condiciones de asepsia (trabajando en cámaras de flujo laminar) se extraen los explantes del material vegetal y se pondrán en cultivo en un medio de iniciación dentro de un tubo de cultivo, para poder controlar la sanidad y la viabilidad de los explantes.

a. Preparar el medio de cultivo, para el establecimiento: Se utiliza un medio sólido (confeccionado con agar-nutriente) enriquecido con vitaminas, minerales y hormonas. Las sustancias decisivas son las auxinas que promueven la división y alargamiento celular.

b. Extraer e implantar (sembrar) en el medio el ápice meristemático: Lo que en realidad se entierra (siembra) en el medio de cultivo es un conjunto de 2 ó 3 hojas en formación que rodean directamente al ápice meristemático.

c. A los 30 días ya tenemos una o dos vitroplantas por cada meristemo sembrado: En este punto si queremos que las plántulas estén más vigorosas hay que pasarlas a medio de cultivo fresco y estarán listas para la próxima fase. (Gino Aguirre et al. 2010)

2.2.3.3. FASE II: Multiplicación Micro propagación (Clonación *in vitro*)

Objetivo: Lograr el mayor número de plantas posibles, en el menor tiempo, a partir de las plantas establecidas. Evidentemente la multiplicación es en progresión geométrica hasta obtener millones en pocos meses. En este caso la composición del

medio de cultivo (semisólido) cambia, aumentando considerablemente el contenido de citoquininas (6 BAP) que estimulan la aparición de los brotes laterales o "hijos".

En esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron la FASE I originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varios entrenudos.

Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar

2.2.3.4. FASE III: Enraizamiento.

Objetivo: Lograr que las plántulas multiplicadas logren un óptimo sistema de raíces. En este caso el medio utilizado es líquido y lo que aumenta considerablemente es el contenido de auxinas (AIA) que estimulan la diferenciación de las raíces. 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.

2.2.3.5. 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 “*ex vitro*” adquiriendo condiciones autótrofas, donde tendrá que regular adecuadamente sus procesos de absorción, traslocación y transpiración de agua. (Gino Aguirre et al. 2010)

En el momento en que se extraen los explantes de los recipientes de enraizamiento están poco adaptados a crecer en un invernadero, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y

generalmente tienen estomas perezosos para responder al descenso de la humedad relativa, demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula cerosa bien desarrollada, la barrera para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda superficie de la planta (Medina, 2005).

Los explantes deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de la luz.

2.3. Marco Teórico del Cultivo de la Frutilla.

2.3.1 Morfología del Cultivo de la Frutilla

Planta de tipo herbáceo y perenne, constituida por tallos cortos o coronas en forma de rosetas de aproximadamente 2,5 cm de diámetro.

Las coronas están formadas por entrenudos cortos y muy próximos, de 2 mm aproximadamente de longitud, donde se localizan los primordios foliares, radicales y yemas a partir de los cuales se originan los estolones o tallos rastreros de donde se producen las plantas hijas.

Los estolones son tallos largos y delgados, los cuales se originan de las yemas axilares de la corona y se diferencian de ésta por la longitud que presentan los dos primeros entrenudos. Las plantas hijas se originan del segundo entrenudo y están en capacidad de producir sus propios estolones.

Una planta vigorosa puede producir entre 10 a 15 estolones durante el ciclo de crecimiento y desarrollo del cultivo, Asimismo, a lo largo de los estolones se pueden producir alrededor de 100 plantas hijas.

Las plantas hijas son de gran importancia, ya que comercialmente constituyen el principal método de propagación en la frutilla

2.3.1.1. Las Hojas.

Las hojas aparecen en forma de roseta y se insertan en la corona. Son largamente pecioladas y provistas de dos estípulas rojizas. Presentan el limbo dividido en tres foliolos pedunculados, de bordes aserrados.

2.3.1.2. Inflorescencia

Las inflorescencias, pueden desarrollarse a partir de una yema terminal de la corona, o bien a partir de yemas axilares de las hojas. La ramificación de la inflorescencia puede ser basal o distal. En el primer caso aparecen varias flores de porte similar, mientras que en el segundo hay una flor terminal o primaria y otras secundarias de menor tamaño.

2.3.1.3. Las Flores.

La flor tiene entre 5 y 6, pétalos, de 20 a 35, estambres y varios cientos de pistilos sobre un receptáculo carnoso. Cada óvulo fecundado da lugar a un fruto de tipo aquenio. El desarrollo de los aquenios, distribuidos por la superficie del receptáculo carnoso, estimula el crecimiento y la coloración de éste.

2.3.1.4. La Raíz.

El sistema radical es fibroso y adventicio, el 90% de las raíces se concentran en los primeros 25 cm del suelo.

Está compuesto por raíces, las cuales presentan cambium vascular y suberoso, y son perennes y raicillas, que carecen de éste, son de color más claro y tienen un periodo de vida corto (días o semanas).

2.3.2. Variedades de Estudio.

2.3.2.1. Variedad Albión

2.3.2.1.1 Principales Características

- ✓ Excepcional calidad organoléptica del fruto y excepcional sabor.
- ✓ Rendimientos parecidos a Diamante y un poco menos que Aroma.
- ✓ Alta resistencia a condiciones meteorológicas adversas y a enfermedades.

2.3.2.1.2. Descripción

Su principal característica es su excepcional calidad de fruta, tanto por tamaño (superior a Diamante) como por sabor y firmeza de la fruta (del orden de 32, gramos por fruta). Albión es una variedad que mezcla las cualidades buenas de Diamante y las de Aroma. Es de muy fácil recolección y aguanta más el pos-cosecha que estas dos, tiene mejor sabor y aspecto.

2.3.2.1.3. Resistencia a Enfermedades y Plagas

Albión es muy resistente a Anthracnosis, Verticillium y Phytophthora, más resistente que Albion a araña roja.

2.3.2.2.Var. San Andreas.

2.3.2.2.1. Principales Características:

- ✓ Fruta muy firme, más que Candonga, con color rojo medio brillante y sabor y olor excelente.
- ✓ Sensible a la carencia de Boro.
- ✓ Necesario seleccionar plantas con diámetros de corona de 0,8, cm en adelante y totalmente parada del vivero, en caso contrario mejor será retrasar el arranque.
- ✓ Plantaciones tempranas para desarrollar coronas laterales en un marco de 25x25 cm.
- ✓ Usar un abono de base que tenga entre 15-20% de N y entre 8-15% P y K según análisis de suelo.
- ✓ Muy precoz y productiva, pero hay que ayudar a la planta a desarrollar coronas laterales antes que cuaje sus primeras frutas.
- ✓ Cortar primeras flores y estolones, para estimular el crecimiento, necesitamos 2 o 3, coronas laterales antes de cuajar la fruta.
- ✓ Mayor aporte de agua, mantener siempre el lomo húmedo.

- ✓ Empezar un programa de nutrición foliar a las 2-3 semanas de plantar.
- ✓ Durante las siguientes 6-8 semanas aplicar bastante N para desarrollar coronas laterales.
- ✓ Luego bajar la dosis de N y subir la cantidad de K y P

2.3.2.2.2. Descripción

- ✓ San Andreas es una variedad de día neutro moderado (remontante), de excelente calidad de fruta (similar a Albión), excelente sabor, con poca necesidad de frío en vivero, resistente a enfermedades.
- ✓ Es más precoz que Camarosa en plantación de otoño, con curva de producción sin picos y estable durante todo el ciclo, mantiene tamaño hasta final de campaña y muy buena producción.
- ✓ San Andreas, puede significar para el agricultor la mejor variedad pues mantener menos trabajadores por hectárea durante más tiempo y evitar el abandono de superficie por falta de mano de obra en los meses de más producción.
- ✓ San Andreas se adapta muy bien a distintos tipos de plantas (macetas, alveolos, fresca, congelada), fechas de plantación y producción de fruta durante todo el año en distintos países del mundo.
- ✓ Posiblemente la primera variedad de día neutro que se adapte a los mercados de variedades de día corto. Produce muchos menos estolones que Albión cuando está en producción de fruta.

2.3.2.2.3. Resistencia a Enfermedades y Plagas:

Muy resistente Phytophthora y Antracnosis e inclemencias del tiempo, con menos incidencias de botritis y oídio.

CAPITULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.Ubicación del Ensayo

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Fitopatología y Cultivo In Vitro de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales dependiente de la Universidad Autónoma “Juan Misael Saracho” ubicado en el Departamento de Tarija, provincia Cercado, Zona el Tejar a 29°33” con longitud Sud y 64°44”, de longitud; Oeste a una altura de 1859 m.s.n.m. (Instituto Geográfico Militar).

3.2.Materiales Para la Investigación

3.2.1. Material Vegetal

El material vegetal, que se utilizó, para el presente trabajo de investigación fueron plantas madres de frutilla recogidas de invernadero, plantas de buena calidad y rendimiento de la propiedad del Señor Domingo Cadena de la comunidad de Tolomosita Centro.

Las variedades utilizadas en el estudio fueron:

- Var. Albion.
- Var. San Andreas.

La razón por la que se emplearon estas variedades, se debe a que son cultivares que fueron sometidas a una validación agronómica por productores, parte de la asociación de Fruticultores de Tarija (AFRUTAR) y que actualmente son las variedades que más se cultivan en el país y ha presentado mejores rendimientos de adaptación al clima del valle central de Tarija.

3.2.2. Material de Campo y Laboratorio.

3.2.2.1. Área de Preparación

- ✓ Frascos o tubos de cría.
- ✓ Balanza de precisión.
- ✓ Potenciómetro.

- ✓ Pipetas.
- ✓ Matraces.
- ✓ Erlenmeyers.
- ✓ Peachimetro.
- ✓ Conductimetro.

3.2.2.2. Área de Esterilización.

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

3.2.2.3. Área de Siembra.

- ✓ Cámara de flujo laminar.
- ✓ Mechero.
- ✓ Pinzas.
- ✓ Agujas.
- ✓ Bisturís.
- ✓ Tijeras.
- ✓ Cajas Petri.
- ✓ Papel Filtro.
- ✓ Algodón.

3.2.2.4. Área de Crecimiento.

- ✓ Luz fluorescente.
- ✓ Control de temperatura.

3.2.2.5. Material de registro y de campo.

- ✓ Tijeras de podar.
- ✓ bolsa de polietileno negro tipo maceta.
- ✓ Cinta maskin.
- ✓ Marcador indeleble .
- ✓ Papel periódico.
- ✓ Cámara fotográfica.

- ✓ Libreta de campo.

3.3. Medios de Cultivo.

Los medios de cultivos se basaron en las experiencias de Murashigue y Skoog al cual se usaron distintos tipos de fitohormonas, para dicha preparación de las hormonas se siguió un paso que se muestra en el cuadro siguiente.

TABLA 1
MEDIOS DE CULTIVO PARA ESTABLECIMIENTO

| FASE | INICIO | | |
|--|--------|------|-------|
| Medio de cultivo | M I | M II | M III |
| Componentes | | | |
| Sales | | | |
| Macro (MI)- M&S ⁽¹⁾ | 100% | 100% | 100% |
| Micro (2)- M&S | 100% | 100% | 100% |
| Fe EDTA (M3)- M&S | 100% | 100% | 100% |
| Compuestos orgánicos (Vitaminas) (mg/l) | | | |
| Vitaminas M&S | 100% | 100% | 100% |
| Myo-inisitol | 100 | 100 | 100 |
| Sustancias de crecimiento (ml/l) | | | |
| BAP | 50 | | |
| KIN | - | 50 | - |
| IBA | - | - | 50 |
| GA3 | 50 | 50 | 50 |
| Azúcar (g/l) | 30 | 30 | 30 |
| Agar agar (g/l) | 6.5 | 6.5 | 6.5 |
| Ph | 5.7 | 5.7 | 5.7 |

(1)M&S Murashige y Skoog

3.4. Metodología de la Investigación.

3.4.1. Metodología

La metodología basada en esta investigación, responde a la tecnología del cultivo *In Vitro*, de Tejidos vegetales, teniendo como objeto: Establecer el cultivo in vitro dos variedades de frutilla (*var. Albion* y *var. san andreas*); determinar el medio de cultivo adecuado y la mejor variedad, para el establecimiento en el laboratorio de Fitopatología y Cultivos In Vitro, para lo cual se realizaron tres ensayos en diferentes épocas.

3.4.1.1. Secuencia general de la experimentación.

La secuencia general de todos los ensayos, comenzó con la preparación de todos los medios de cultivo, disposición de envases adecuados y esterilización en auto clave vertical (a 121°C y 1,5, atmosferas de presión) tomando en cuenta las siguientes fases.

3.4.1.1. Fase 0 preparativa

- ✓ Esta fase se ha constituido en el inicio del experimento, comenzando con la recopilación de la información referente a las técnicas de multiplicación de cultivos in vitro, siguiendo protocolos y experiencias de otras investigaciones realizadas anteriormente y la recopilación bibliográfica en general a base del cultivo de la frutilla y el establecimiento de cultivos in vitro.
- ✓ Por otra parte, se planifico la selección del material vegetal, tomando en cuenta las características de las zonas de donde provienen los ejemplares con mejor vigor sanidad y buen porte, libre de enfermedades y buena calidad de rendimiento en las distintas variedades.

3.4.1.1.2. Fase I inicio del establecimiento

- ✓ La secuencia general del cultivo in vitro, comenzó con la preparación de los medios de cultivo (esto en laboratorio), la disposición de envases adecuados el cual responde a la tecnología del cultivo in vitro, de tejidos vegetales teniendo en cuenta el protocolo a seguir en laboratorio, siguiendo la secuencia de la experimentación.

3.4.1.1.2.1. La Preparación de hormonas de Crecimiento

Preparación del Ácido Indolbutílico (AIB).

Se preparó esta hormona antes con previa revisión bibliográfica lo cual fue soluble en Hidróxido de sodio a 0.5 mg/L, el mismo fue preparado en laboratorio.

Preparación de Bencil Amino purina. (BAP).

Se preparó esta hormona 10 gramos de bencilamonopurina disuelto en tres gotas de Hidróxido de sodio, disolviendo y llegando a aforar hasta completar 50 ml, de agua concentración 0.5 mg/L.

Preparación de Kinetina.

La preparación de esta hormona, primeramente en una balanza de precisión se pesó 10, gramos de kinetina, posteriormente se disolvió en Hidróxido de Sodio con 5 gotas de este compuesto, para luego completara con agua a 50 ml, de solución, con una concentración de 0.5 mg/L.

TABLA 2
PREPARACIÓN DE FITOHORMONAS PARA SU
UTILIZACIÓN

| Sustancias de crecimiento (mg/l) | | | |
|---|-----|-----|-----|
| BAP | 0.5 | | |
| KIN | - | 0.5 | - |
| IBA | - | - | 0.5 |
| GA3 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |

3.4.1.1.2.2. Preparación de medios de cultivo

La metodología y secuencia general de los ensayos comenzó con la preparación de los medios de cultivo que se muestran en el siguiente cuadro.

TABLA 3
MEDIOS DE CULTIVO PARA ESTABLECIMIENTO

| FASE | INICIO | | |
|--|---------------|-------------|--------------|
| Medio de cultivo | M I | M II | M III |
| Componentes | | | |
| Sales | | | |
| Macro (M1)- M&S ⁽¹⁾ | 100% | 100% | 100% |
| Micro (2)- M&S | 100% | 100% | 100% |
| Fe EDTA (M3)- M&S | 100% | 100% | 100% |
| Compuestos orgánicos (Vitaminas) (mg/l) | | | |
| Vitaminas M&S | 100% | 100% | 100% |
| Myo-inositol | 100 | 100 | 100 |
| Sustancias de crecimiento (mg/l) | | | |
| BAP | 100 | | |
| KIN | - | 100 | - |
| IBA | - | - | 100 |

| | | | |
|-----------------|-----|-----|-----|
| GA3 | 50 | 50 | 50 |
| Azúcar (g/l) | 30 | 30 | 30 |
| Agar agar (g/l) | 6.5 | 6.5 | 6.5 |
| Ph | 5.7 | 5.7 | 5.7 |

(2) M&S Murashige y Skoog

Se usaron 54, tubos de ensayo, dos frascos con agua, dos frascos vacíos, todos estos envases adecuados y esterilizados en autoclave vertical /a 120°C y 1,5, atmosferas de presión), durante 20 minutos.

Por otra parte, dos pinzas, dos bisturís, dos cajas Petri, un vaso de 500ml, un tubo de ensayo esterilizado en estufa de esterilización, para material in vitro.

GRAFICA 1

PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO



3.5. SIEMBRA DE LOS EXPLANTOS

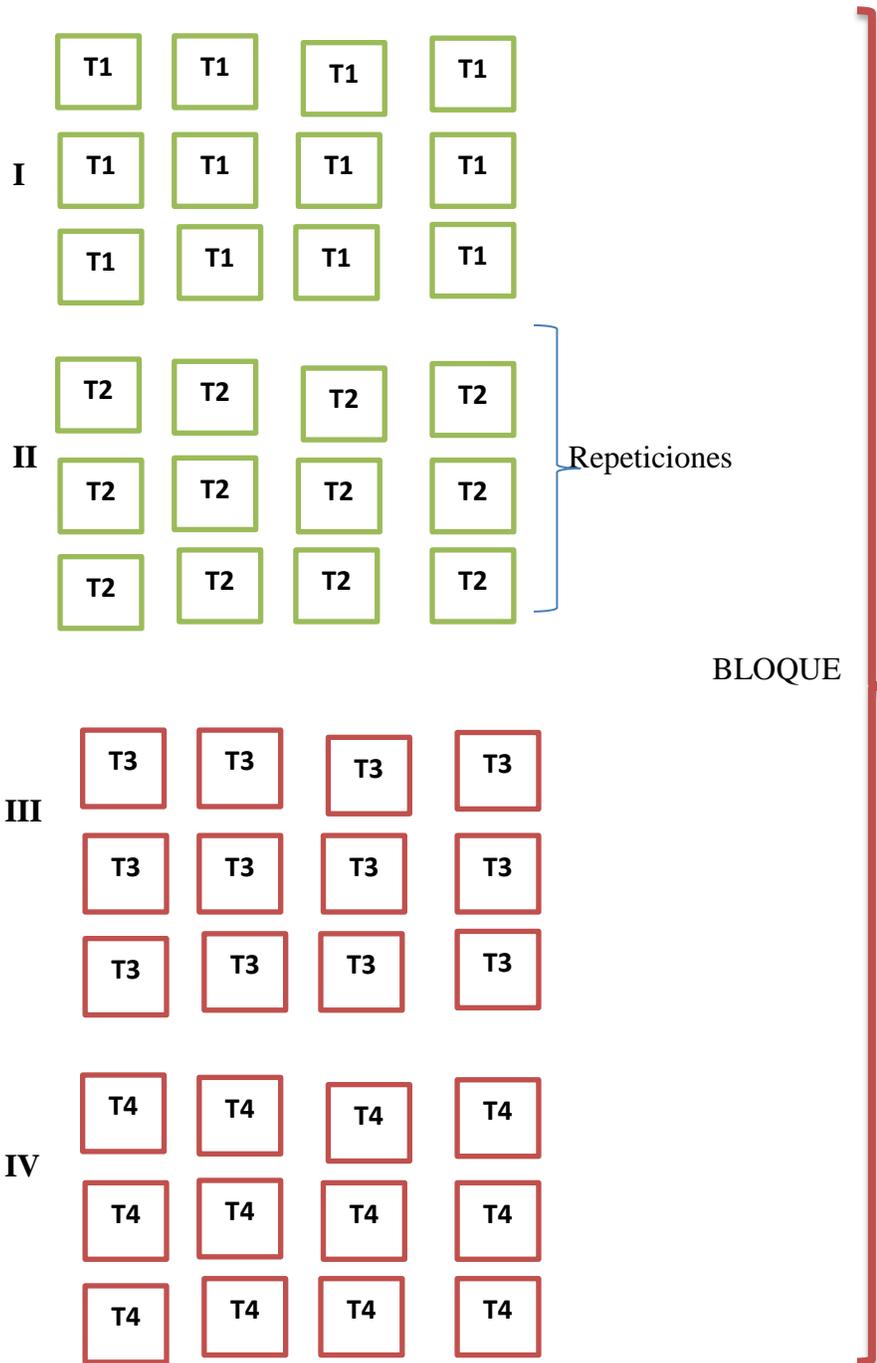
La siembra se realizó, recogiendo las muestras de las plantas madre de invernadero del Señor Domingo Cadena, de la comunidad de Tolomosita Centro, teniendo en cuenta la sanidad de las yemas de las mismas.

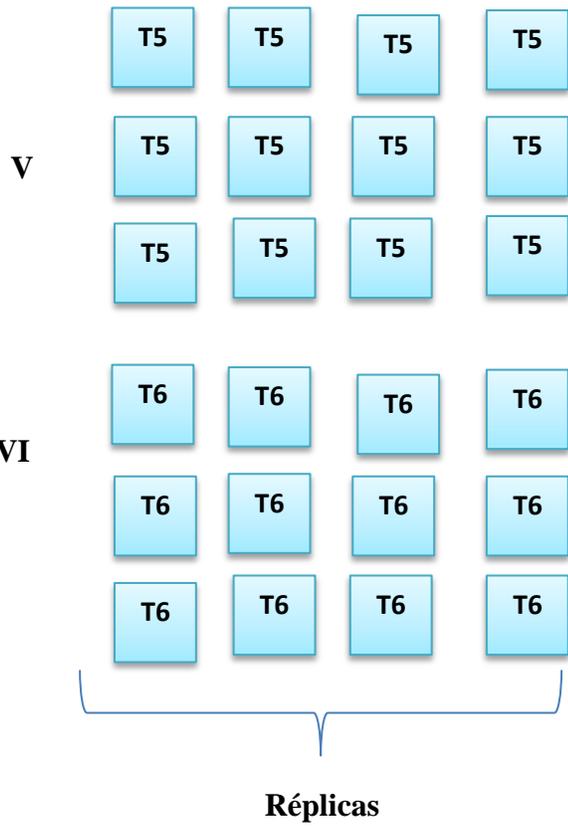
3.5.1. Medios de cultivo

- ✓ Murashigue&Skook + BAP + GA3 T1
- ✓ Murashigue&Skook + KIN + GA3 T2
- ✓ Murashigue&Skook + IBA + GA3 T3

GRAFICAS 2

DISEÑO DEL EXPERIMENTO





A continuación se detalla las actividades desarrolladas, para cada uno de los ensayos.

✚ Primer ensayo establecimiento in vitro de frutilla.

El primer ensayo de inicio, se realizó el 16 de febrero del 2016, para lo cual se recolecto estolones con yemas axilares. Dichos estolones, fueron envueltos en papel periódico, luego humedecidas con agua corriente, para evitar la deshidratación de los tejidos.

Una vez, llegadas las muestras al laboratorio, se cortaron en trozos de aproximadamente 2 a 3 cm de longitud, conteniendo una yema por cada trozo (explante inicial)

La desinfección de los explantes (yemas axilares) iniciales, se realizó siguiendo el protocolo de desinfección de explantes de papa empleado en el laboratorio de Fitopatología y Cultivo in vitro, que a continuación se detalla:

1. Preparación del medio de cultivo. 750 ml

El medio de cultivo está constituido de la siguiente manera:

- ✓ M1: Macro elementos.
 - ✓ M2: Micro elementos.
 - ✓ M3: Vitaminas.
 - ✓ M4: Fuentes de hierro.
 - ✓ Sacarosa.
- 2. Dividir en tres. Cada vaso con 250ml.**
 - 3. Colocar en En cada vaso por separado colocar los fitoreguladores para los diferentes medios de cultivo.**
 - 4. Reguladores de crecimiento.**

TABLA 4
REGULADORES DE CRECIMIENTO

| No Trat | Detalle | Símbolo | Variedad de frutilla. | Medio de cultivo |
|---------|------------------------------|---------|-----------------------|------------------|
| 1 | Murashigue&Skook + IBA + GA3 | AT1 | Albion | T1 |
| 2 | Murashigue&Skook + BAP+ GA3 | AT2 | Albion | T2 |
| 3 | Murashigue&Skook + KIN + GA3 | AT3 | Albion | T3 |
| 4 | Murashigue&Skook + IBA + GA3 | ST1 | San andreas | T4 |
| 5 | Murashigue&Skook + BAP+ GA3 | ST2 | San andreas | T5 |
| 6 | Murashigue&Skook + KIN + GA3 | ST3 | San andreas | T6 |

AT1 (tratamiento 1 constituido de Murashigue&Skook + Acido Indolbutilico+Acido Giberelico experimentado con variedad de frutilla Albion)

ST1 (tratamiento 1 constituido de Murashigue&Skook + Acido Indolbutilico+Acido Giberelico experimentado con variedad de frutilla San andreas)

5. Medir el pH, haciendo llegar el pH=5.7
6. Colocar el agar (1.7 g) y poder calentar para su fácil disolución con cada uno de los tratamientos.
7. Mezclar y vaciar en los tubos de ensayos, calculando una cantidad de 11 ml, de solución, para cada tubo de ensayo.
8. Tapar los tubos de ensayos con sus respectivas tapas con bastante cuidado.
9. La esterilización de los tubos de ensayo juntamente con los tratamientos preparados en auto clave vertical durante un tiempo de 20, minutos mediante la aplicación de calor húmedo, bajo una presión interna de 1.2, atmosferas y una temperatura de 121°C.
10. Cortar las yemas de los estolones en trozos, dejando una yema, para cada trozo (realización de segmentos nodales) de 3-4 Cm, de longitud.

11. Desinfectar la cámara de flujo laminar con alcohol al 90%, para luego introducir los materiales con los cuales se va a trabajar.
12. Desinfectar los materiales introducidos a la cámara de flujo laminar con alcohol.
13. Desinfectar el material vegetal, segmentos nodales de ambas variedades con al 70%, durante 30 segundos, luego se lo pasa al hipoclorito de sodio al 4%, durante 10 minutos.

Alcohol concentración 96%

$$\begin{array}{rcl}
 100 \text{ ml} & \longrightarrow & 96 \\
 x & \longrightarrow & 70 \\
 & & x = 72.91 \text{ ml}
 \end{array}$$

Hipoclorito de sodio concentración 5.5%

$$\begin{array}{rcl}
 100 \text{ ml} & \longrightarrow & 5.5 \\
 x & \longrightarrow & 4 \\
 & & x = 72.72 \text{ ml}
 \end{array}$$

14. Realizar tres enjuagues de los segmentos nodales en agua destilada, cada enjuague de 3 minutos.
15. Posteriormente, para evitar la oxidación de las yemas de los segmentos nodales en una solución con ácido cítrico 1.5, gramos y de ácido ascórbico 1.1, gramos diluidos en agua destilada antes de la siembra.
16. Realizar el flameado de los materiales, para evitar la contaminación.
17. Introducir los segmentos nodales a los tubos de ensayo de ambas variedades..
18. Proceso de seguimiento de evaluación, de los explantes en la fase de establecimiento.
19. Las condiciones termofotoperiodicas de la sala de crecimiento, fueron: Temperatura de 22-25° y un fotoperiodo de 16 horas luz 8 horas de oscuridad.

En este primer ensayo, se utilizaron como explantes segmentos de dos variedades de frutilla, para evaluar el %, de regeneración frente a las tres hormonas con el medio de cultivo MyS.

Las variables respuesta fueron:

+ Porcentaje de regeneración

La necesidad de las yemas, para la regeneración (brotación), dándoles todos los nutrientes, temperaturas.

+ Porcentaje de contaminación

Las muestras serán contaminadas si no se sigue el procedimiento en el protocolo de desinfección, tales como se muestra en anteriores investigaciones, para cultivos. (Aguirre 2006)

+ Tratamiento apropiado, para el cultivo de la frutilla.

De acuerdo a los tratamientos realizados con distintas variedades se puede conocer el medio apropiado de acuerdo al porcentaje de regeneración y el desarrollo de las yemas de los ensayos.

+ Segundo ensayo de establecimiento in vitro de frutilla

El segundo ensayo de inicio se realizó el 10 de marzo del 2016, para lo cual se recolecto estolones con yemas axilares. Dichos estolones fueron envueltos en papel periódico, luego humedecidas con agua corriente para evitar la deshidratación de los tejidos.

El procedimiento se realizó similar al primer ensayo realizado tomando en cuenta las variables a evaluar.

+ Tercer ensayo de establecimiento in vitro de la frutilla.

El tercer ensayo de inicio se realizó el 30 de marzo del 2016 fue siguiendo el mismo protocolo del primer y segundo ensayo, tomando en cuenta las mismas tres variables a evaluar en el procedimiento de evaluación.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente investigación se realizaron tres ensayos en distintas fechas, en las cuales se evaluó: el porcentaje de regeneración, porcentaje de contaminación, y se determinó el medio de cultivo apropiado.

A continuación se presentan los resultados obtenidos, en cada uno de los tres ensayos separadamente para los tratamientos.

4.1. Porcentaje Regeneración Primer Ensayo

TABLA 5

PORCENTAJE DE REGENERACIÓN

| TRATAM./REP | | I | II | III | Σ |
|--------------------|--------|----------|-----------|------------|----------|
| V1 | M1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | M2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | M3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| V2 | M1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | M2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | M3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Σ | ΣBlog. | 0 | 0 | 0 | 0 |

En el primer ensayo se obtuvo un resultado del 100%, de contaminación en las dos variedades y en todas las unidades experimentales preparadas, y en consecuencia a los porcentajes de regeneración son de 0.00%, lo cual nos permitió evaluar el efecto de los medios probados en las variables de respuesta, como se muestran en los cuadros siguientes:

En la tabla 5 nos muestra el porcentaje de regeneración de los explantes, el mismo se puede deducir que tuvo un porcentaje de regeneración de 0.00 % para todos los tratamientos.

4.1.2. Porcentaje de Contaminación.

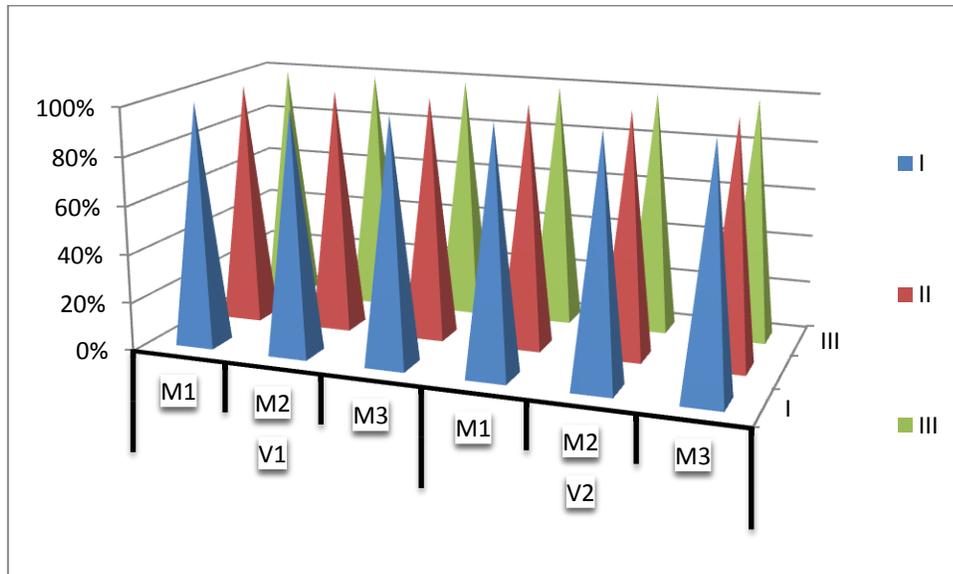
TABLA 6

PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN

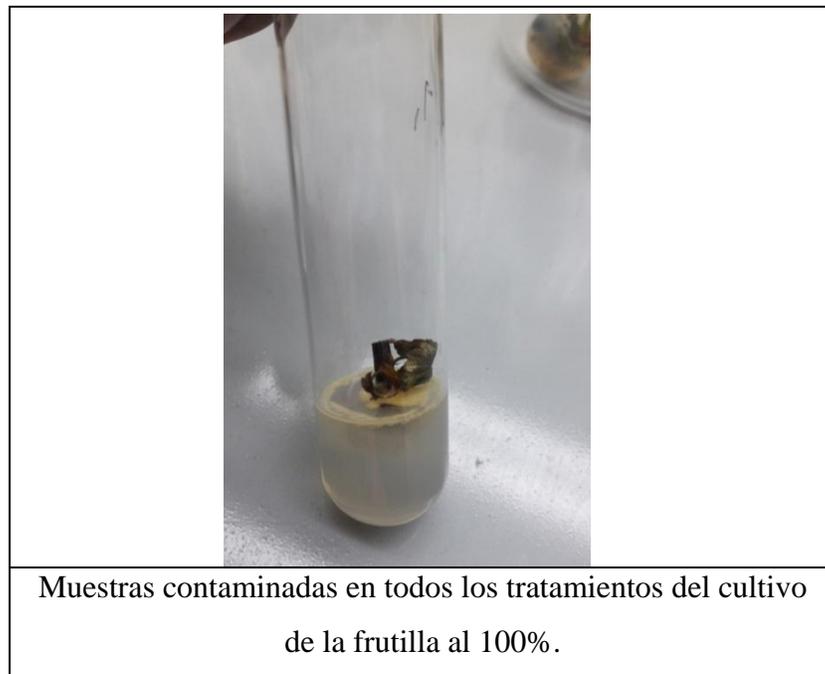
| TRATAM./REP | | I | II | III | Σ |
|--------------------|--------|------------|------------|------------|-------------|
| V1 | M1 | 100 | 100 | 100 | 300 |
| | M2 | 100 | 100 | 100 | 300 |
| | M3 | 100 | 100 | 100 | 300 |
| V2 | M1 | 100 | 100 | 100 | 300 |
| | M2 | 100 | 100 | 100 | 300 |
| | M3 | 100 | 100 | 100 | 300 |
| Σ | ΣBlog. | 600 | 600 | 600 | 1800 |

En la tabla 6, se indica que el porcentaje de contaminación de los explantos, presenta una totalidad del 100%, de las yemas contaminadas a los dos días de evaluación del experimento, esto se puede estimar que fue por un mal protocolo de asepsia en laboratorio.

GRAFICA 3
PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN



La gráfica N° 3 demuestra que el 100% de las muestras, fueron totalmente contaminados, por diversos factores.



4.1.3. Segundo ensayo Porcentaje de Regeneración

TABLA 7

PORCENTAJE DE REGENERACIÓN

| TRATAM./REP | | I | II | III | Σ | X |
|-------------|----------------|------------|-----------|------------|------------|--------|
| V1 | M1 | 50 | 0 | 25 | 75 | 25,00 |
| | M2 | 25 | 25 | 25 | 75 | 25,00 |
| | M3 | 50 | 25 | 25 | 100 | 33,33 |
| V2 | M1 | 0 | 0 | 25 | 25 | 8,33 |
| | M2 | 50 | 0 | 25 | 75 | 25,00 |
| | M3 | 0 | 25 | 25 | 50 | 16,67 |
| Σ | Σ Blog. | 175 | 75 | 150 | 400 | 133,33 |

La Tabla 7, indica los resultados del porcentaje de regeneración de los explantes, obteniendo el mayor porcentaje de regeneración el tratamiento 3 V1M3 (variedad Albion IBA+GA3 con 33.33%, seguido por los tratamientos V1M1, V1M2, V2 M2 y por último los tratamientos V2M3 y V2M1 el más bajo con un porcentaje de 8.33%.

TABLA 8

PORCENTAJE DE REGENERACIÓN POR VARIEDADES Y MEDIOS DE CULTIVO/MC

| VARIED/TRAT | M1 | M2 | M3 | Σ | X |
|-------------|--------------|-----------|-----------|---------------|-----|
| V1 | 25,00 | 25 | 33,33 | 83,33 | 6,9 |
| V2 | 8,33 | 25 | 16,67 | 50 | 4,2 |
| Σ | 33,33 | 50 | 50 | 133,33 | |
| X | 5,6 | 8,3 | 8,3 | | |

El porcentaje de regeneración, deducido del cuadro 7, son las siguientes: La mejor variedad y medio de cultivo o tratamiento es V1M3 (IBA +GA3) con un valor de 33.33 % y la variedad y el medio de cultivo con bajo porcentaje de regeneración es V2M1, con un valor de 8.33%, de regeneración de sus explantos.

Ejercicio de Cálculo.

$$F_c = \frac{(GT)^2}{N} = \frac{(400)^2}{18} = 8888,888889$$

SUMA DE CUADRADOS.

Suma de Cuadrados Totales.

$$SCT = \sum(y)^2 - F_c = (50)^2 + (25)^2 + \dots (50)^2 - F_c = 4.861,11$$

Suma de cuadrados de tratamientos.

$$SC_t = \sum \frac{(t)^2}{r} - F_c = \frac{(75)^2}{3} + \frac{(75)^2}{3} + \frac{(100)^2}{3} + \frac{(25)^2}{3} + \dots \frac{(50)^2}{3} - F_c = 1111,111111$$

Suma de cuadrados del error.

$$SC_e = SCT - SC_t = 3.750,00$$

GRADOS DE LIBERTAD.

Grados de Libertad para un total.

$$-GL_T = n - 1 = 18 - 1 = 17$$

Grados de Libertad, para tratamientos.

$$-GL_t = t - 1 = 6 - 1 = 5$$

Grados de Libertad para el error.

$$-GL_e = -GL_T - GL_t = 17 - 5 = 12$$

CUADRADO MEDIO DE LOS TRATAMIENTOS.

Cuadrado medio de los tratamientos.

$$-CM_t = \frac{SC_t}{GL_t} = \frac{1111,11111}{5} = 222,22$$

Cuadrado medio del error.

$$-CM_e = \frac{SC_e}{GLE} = \frac{3.750,00}{12} = 312.500$$

“F” Calculada.

$$FC = \frac{CM_t}{CM_e} = \frac{222,222}{312.500} = 0.711$$

$F_c \leq F_t$ NS (No existe diferencia).

$F_c > F_t * 5\%$ (Existe diferencias significativas).

$F_c > F_t ** 1\%$ (Diferencias altamente significativas).

$F_c > F_t *** 0.1\%$ (Diferencias muy altamente significativas).

TABLA 9
ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

| Fv | gl | SC | CM | F _C | F _T 5% | F _T 1% |
|-------|----|----------|---------|----------------|-------------------|-------------------|
| TOTAL | 17 | 4861 | | | | |
| TRATA | 5 | 1111,111 | 222,222 | 0,711 | 3,11 | 5,06 |
| ERROR | 12 | 3750,000 | 312,500 | | | |

Analizando el cuadro, F_c , es menor que la F_t al 5%, por lo tanto según los análisis no existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos, en cuanto se puede decir que los tratamientos no tienen significancia en la regeneración.

Prueba de comparación de medias.

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

$$MDS = \sqrt{\frac{2 \cdot 312.500}{3}} * 2.31 = 33.33$$

TABLA 10
CUALQUIER DIFERENCIA ENTRE $X_a - X_b > MDS * \text{PORCENTAJE DE}$
REGENERACIÓN DEL SEGUNDO ENSAYO

| MDS=33,34 | | V1M3 | V2M3 | V2M2 | V1M1 | V1M2 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 33,33 | 25 | 25 | 25 | 16,67 |
| V1M1 | 8,33 | 25,00 | 16,67 | 16,67 | 16,67 | 8,34 |
| V1M2 | 16,67 | 16,66 | 8,33 | 8,33 | 8,33 | 0,00 |
| V1M1 | 25 | 8,33 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | -8,33 |
| V2M2 | 25 | 8,33 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| V2M3 | 25 | 8,33 | 0,00 | 0,00 | | |

Letras iguales según MDS, no difieren a 5% de probabilidad.

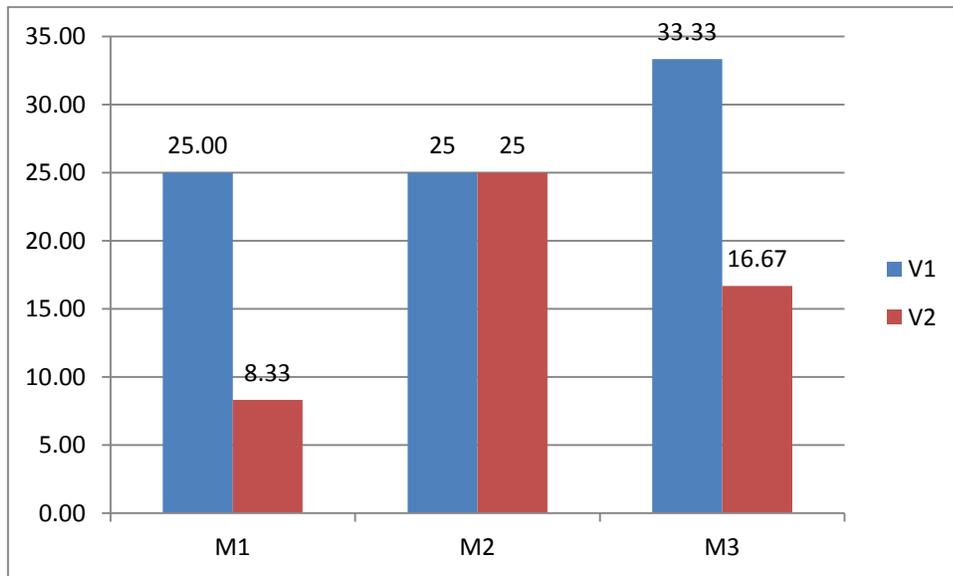
TABLA 11

Cuadro de análisis de varianza

| N° | TRAT. | DESCRIPCION | CM | RANGO |
|----|-------|-------------------------------------|-------|-------|
| 1 | V1M3 | Variedad San Alvion (M3 IBA +GA3) | 33,33 | b |
| 2 | V2M2 | Variedad San Andreas (M2 KIN+GA3) | 25 | b |
| 3 | V2M3 | Variedad San Andreas (M3 IBA +GA31) | 25 | b |
| 4 | V2M1 | Variedad San Andreas (M1 BAP+GA3) | 25 | c |
| 5 | V1M2 | Variedad Alvion (M2 KIN +GA3) | 16,67 | c |
| 6 | V1M1 | Variedad Alvion (M1BAP+GA3) | 8,33 | c |

El cuadro demuestra que no hay diferencias significativas en la Variedad, tratamientos.

GRAFICA 4
PORCENTAJE DE REGENERACIÓN DE LOS EXPLANTOS



De acuerdo a la interpretación de la gráfica 4, se puede decir, que el tratamiento que tuvo mayor porcentaje de explantes regenerados fue el tratamiento V1M3 (Variedad Albion (M3 IBA +GA3)), con un valor de 33.33 %, explantes regeneradas, al contrario el tratamiento V2M1 (Variedad San Andreas (M2 KIN+GA3)) el cual significa a un 8.33 %, regeneradas.

TABLA 12
PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN

| TRATAM./REP | | I | II | III | Σ | X |
|-------------|----------------|------------|------------|------------|-------------|--------------|
| V1 | M1 | 50 | 100 | 75 | 225 | 75,00 |
| | M2 | 75 | 0 | 75 | 150 | 50,00 |
| | M3 | 50 | 0 | 50 | 100 | 33,33 |
| V2 | M1 | 75 | 75 | 25 | 175 | 58,33 |
| | M2 | 50 | 75 | 25 | 150 | 50,00 |
| | M3 | 100 | 75 | 75 | 250 | 83,33 |
| Σ | Σ Blog. | 400 | 325 | 325 | 1050 | 350,00 |
| X | | | | | | 43,75 |

En la tabla anterior, se indica el porcentaje de contaminación de los explantes, teniendo el valor de los porcentajes más elevado la variedad 2, San Andreas con 83.33% de contaminación y la variedad V1, Variedad Albion con 33.33%, de contaminación.

TABLA 13
PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN POR VARIEDADES Y MEDIOS DE CULTIVO

| VARIED/MEDIO | M1 | M2 | M3 | Σ | X |
|---------------------|---------------|------------|---------------|---------------|----------|
| V1 | 75,00 | 50 | 33,33 | 158,33 | 13,2 |
| V2 | 58,33 | 50 | 83,33 | 191,66 | 16,0 |
| Σ | 133,33 | 100 | 116,66 | 349,99 | |
| X | 22,2 | 16,7 | 19,4 | | |

En el cuadro 12 se indica el porcentaje de contaminación, donde el ensayo que presento mayor porcentaje es la variedad V2, Variedad San Andreas, con un porcentaje de 16.0%, de contaminación, representando el máximo porcentaje de contaminación referente a los tratamientos, el cual fue el medio de cultivo V2M3, con 83.3 %, seguido V1M1, con 75%, V2M1, con 58.3%, V2M2, V1M2 con 50%, el más bajo de los porcentajes de contaminación V1M3, con 33.33, y la variedad V1, con 13.2%, de contaminación.

Calculo de ejercicios

$$F_c = \frac{(GT)^2}{N} = \frac{(1050)^2}{18} = 61250$$

SUMA DE CUADRADOS.

Suma de Cuadrados Totales.

$$SCT = \sum(y)^2 - F_c = (50)^2 + (75)^2 + \dots \dots \dots (75)^2 - F_c =$$

Suma de cuadrados de tratamientos.

$$SC_t = \sum \frac{(t)^2}{r} - Fc = \frac{(225)^2}{3} + \frac{(150)^2}{3} + \frac{(100)^2}{3} + \frac{(225)^2}{3} + \dots + \frac{(250)^2}{3} - Fc = 5000$$

Suma de cuadrados del error.

$$SC_e = SCT - SC_t = 10.000,00$$

GRADOS DE LIBERTAD.

Grados de Libertad para un total de muestras.

$$-GL_T = n - 1 = 18 - 1 = 17$$

Grados de Libertad, para tratamientos.

$$-GL_t = t - 1 = 6 - 1 = 5$$

Grados de Libertad para el error.

$$-GL_e = -GL_T - GL_t = 17 - 5 = 12$$

CUADRADO MEDIO DE LOS TRATAMIENTOS.

Cuadrado medio de los tratamientos.

$$-CM_t = \frac{SC_t}{GL_t} = \frac{5000}{5} = 1000,000$$

Cuadrado medio del error.

$$-CM_e = \frac{SC_e}{GL_e} = \frac{10000}{12} = 883,33$$

“F” Calculada.

$$FC = \frac{CM_t}{CM_e} = \frac{1000,000}{883,33} = 1,2000$$

$F_c \leq F_t$ NS (No existe diferencia).

$F_c > F_t * 5\%$ (Existe diferencias significativas).

$F_c > F_t ** 1\%$, (Diferencias altamente significativas).

$F_c > F_t **** 0.1\%$, (Diferencias muy altamente significativas).

TABLA 14
ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

| Fv | gl | SC | CM | F_C | F_T 5% | F_T 1% |
|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------------|-------------------------|-------------------------|
| TOTAL | 17 | 15000 | | | | |
| TRATA | 5 | 5000,000 | 1000,000 | 1,200 | 3,11 | 5,06 |
| ERROR | 12 | 10000,000 | 833,333 | | | |

Haciendo la interpretación de os datos $F_c < F_t$ no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

Coficiente de variación.

$$Cv = \frac{\sqrt{CMe}}{\bar{X}} * 100 = \frac{\sqrt{833.333}}{43.75} * 100 = 65.98$$

Prueba de comparación de medias.

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

$$MDS = \sqrt{\frac{2*312.500}{3}} * 2.31 = 33.33$$

TABLA 15

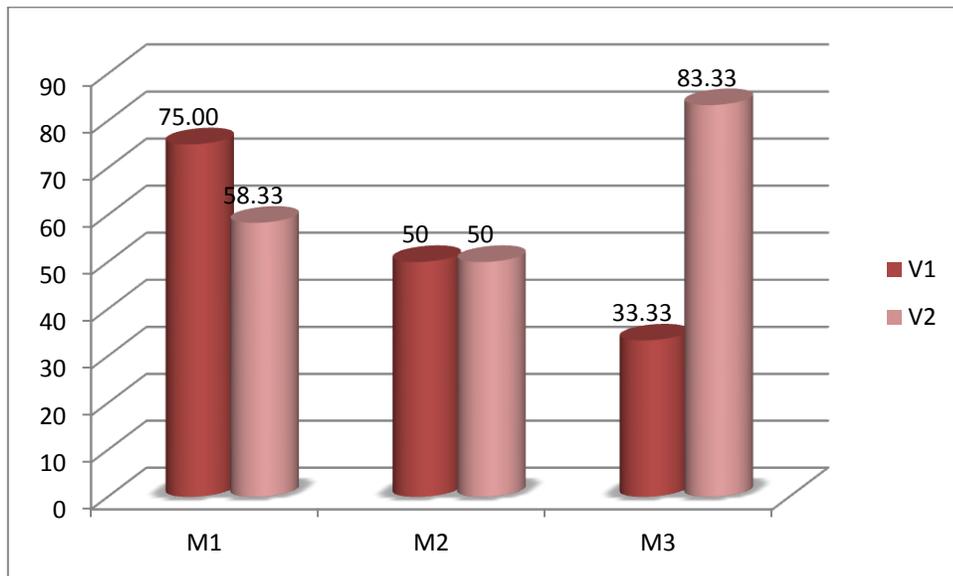
CUALQUIER DIFERENCIA ENTRE $X_a - X_b > MDS * \text{PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN DEL SEGUNDO ENSAYO}$

| MDS=54,44 | | V1M3 | V2M2 | V2M2 | V1M1 | V2M3 |
|-----------|-------|-------|--------|--------|-------|--------|
| | | 75 | 58,33 | 50 | 50 | 33,33 |
| V2M3 | 33,33 | 41,67 | 25,00 | 16,67 | 16,67 | 0,00 |
| V2M2 | 50 | 25,00 | 8,33 | 0,00 | 0,00 | -16,67 |
| V1M2 | 50 | 25,00 | 8,33 | 0,00 | 0,00 | -16,67 |
| V1M1 | 58,33 | 16,67 | 0,00 | -8,33 | -8,33 | |
| V1M3 | 75 | 0,00 | -16,67 | -25,00 | | |

No existe diferencia significativa entre los tratamientos se cumple la hipótesis nula que según el análisis estadístico porcentual realizado de bloques al azar no existe diferencias entre los tratamientos.

GRAFICAS 5

PORCENTAJE DE LA CONTAMINACIÓN



Según la gráfica, se deduce lo siguiente, En el ensayo la variedad 2 (variedad San Andreas), con el tratamiento 3, tuvo mayor contaminación, con el 83.33%,

contaminados, luego la variedad Albión V1 T1, con el tratamiento II, llegando a la contaminación del 75%, de los experimentos contaminados, el que tuvo menor contaminación fue la variedad V1M3, con el tratamiento 3, llegando solamente a la contaminación del 33.33%, de la contaminación de los experimentos

4.1.4. Tercer Ensayo, porcentaje de regeneración

**TABLA 16
PORCENTAJE DE REGENERACIÓN**

| TRATAM./REP | | I | II | III | Σ | X |
|-------------|----------------|------------|------------|------------|------------|--------------|
| V1 | M1 | 50 | 0 | 0 | 50 | 16,67 |
| | M2 | 50 | 0 | 25 | 75 | 25,00 |
| | M3 | 75 | 25 | 25 | 125 | 41,67 |
| V2 | M1 | 50 | 50 | 0 | 100 | 33,33 |
| | M2 | 50 | 75 | 25 | 150 | 50,00 |
| | M3 | 50 | 50 | 25 | 125 | 41,67 |
| Σ | Σ Blog. | 325 | 200 | 100 | 625 | 208,33 |
| X | | | | | | 26,04 |

La tabla 16 muestra los resultados del porcentaje de regeneración de los explantes teniendo valor mayor de regeneración La Variedad San Andreas la V2M2 con 50% de regeneración y el menor la Variedad Albion V1M2 con 25% de explantes regenerados.

**TABLA 17
PORCENTAJE DE REGENERACIÓN POR VARIEDADES Y MEDIOS DE CULTIVO**

| VARIED/MEDIO | M1 | M2 | M3 | Σ | X |
|--------------|-----------|------------|--------------|---------------|------|
| V1 | 16,67 | 55 | 41,67 | 113,34 | 9,4 |
| V2 | 33,33 | 50 | 41,67 | 125 | 10,4 |
| Σ | 50 | 105 | 83,34 | 238,34 | |
| X | 8,3 | 17,5 | 13,9 | | |

Los resultados del tercer ensayo tal como muestra la tabla 17, determinaron que la variedad San Andreas V2 tuvo mayor porcentaje de regeneración con 10,4% y segunda de en la variedad V1 Variedad Albion con 9,4 % de explantos regenerados.

Tomando en cuenta relación variedad /medio de cultivo la tabla indica, que la V1M3 tuvieron mayor porcentaje de regeneración alcanzando al 55% y la que obtuvo mayor porcentaje de regeneración fue la V2M1.

Ejercicio de Cálculo.

$$F_c = \frac{(GT)^2}{N} = \frac{(625)^2}{18} = 21701,39$$

SUMA DE CUADRADOS.

Suma de Cuadrados Totales.

$$SCT = \sum(y)^2 - F_c = (50)^2 + (50)^2 + \dots (25)^2 - F_c = 10.173,61$$

Suma de cuadrados de tratamientos.

$$SCt = \sum \frac{(t)^2}{r} - F_c = \frac{(50)^2}{3} + \frac{(75)^2}{3} + \frac{(75)^2}{3} + \frac{(100)^2}{3} + \dots \frac{(150)^2}{3} - F_c = 2256,944$$

Suma de cuadrados del error.

$$SCe = SCT - SCt = 7.916,67$$

GRADOS DE LIBERTAD.

Grados de Libertad para un total.

$$-GL_T = n - 1 = 18 - 1 = 17$$

Grados de Liberta para tratamientos.

$$-GL_t = t - 1 = 6 - 1 = 5$$

Grados de Libertad para el error.

$$-GL_e = -GL_T - GL_t = 17 - 5 = 12$$

CUADRADO MEDIO DE LOS TRATAMIENTOS.

Cuadrado medio de los tratamientos.

$$-CM_t = \frac{SC_t}{GL_t} = \frac{1111,111111}{5} = 451,389$$

Cuadrado medio del error.

$$-CM_e = \frac{SC_e}{GL_e} = \frac{3.750,00}{12} = 659,722$$

“F” Calculada.

$$FC = \frac{CM_t}{CM_e} = \frac{222,222}{312.500} = 0,684$$

$F_c \leq F_t$ NS (No existe diferencia).

$F_c > F_t * 5 \%$ (Existe diferencias significativas).

$F_c > F_t ** 1 \%$ (Diferencias altamente significativas).

$F_c > F_t *** 0.1 \%$ (Diferencias muy altamente significativas).

TABLA 18
ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

| Fv | gl | SC | CM | F_C | F_T 5% | F_T 1% |
|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------------|-------------------------|-------------------------|
| TOTAL | 17 | 10174 | | | | |
| trat | 5 | 2256,944 | 451,389 | 0,684 | 3,11 | 5,06 |
| ERROR | 12 | 7916,667 | 659,722 | | | |

Coefficiente de variación.

$$Cv = \frac{\sqrt{CMe}}{X} * 100 = \frac{\sqrt{659.7723}}{26.4} * 100 = 98.63$$

Tomando en cuenta la interpretación de la tabla de ANOVA, la Fc es menor a la Ft 5% entonces por tanto “No existen diferencias significativas entre los tratamientos de regeneración de las yemas en el ensayo”. En cuanto se deduce que la hipótesis es nula.

Prueba de comparación de medias.

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

$$MDS = \sqrt{\frac{2*659.722}{3}} * 2.31 = 31.87$$

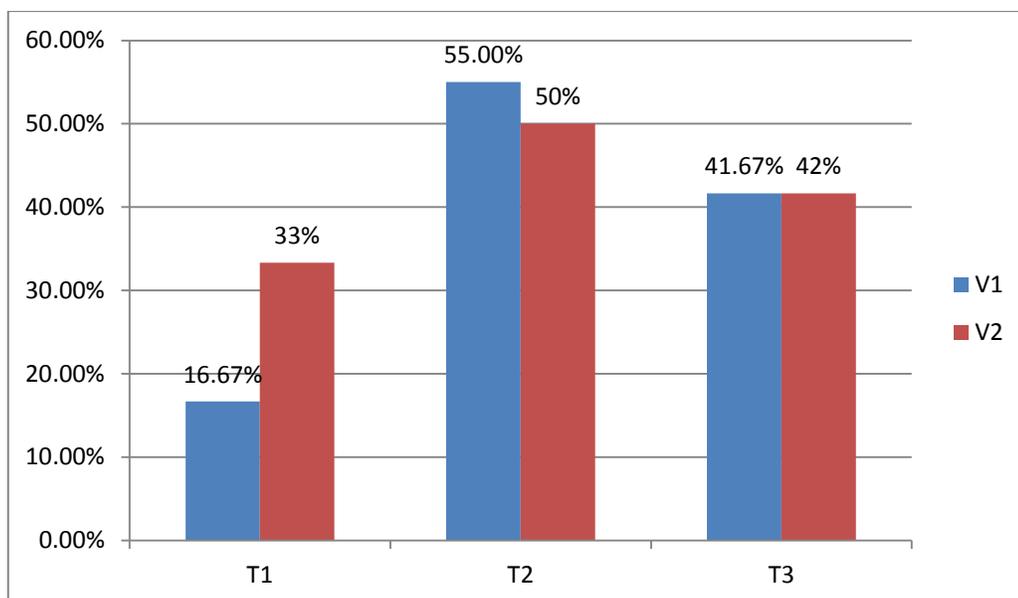
TABLA 19

CUALQUIER DIFERENCIA ENTRE $X_a - X_b > MDS * \text{PORCENTAJE DE REGENERACIÓN DEL TERCER ENSAYO}$

| MDS=31,87 | | V1M3 | V2M2 | V2M2 | V1M1 | V2M3 |
|-----------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| | | 41,67 | 41,67 | 33,33 | 25 | 16,67 |
| V2M3 | 25,00 | 16,67 | 16,67 | 8,33 | 0,00 | -8,33 |
| V2M2 | 33,33 | 8,34 | 8,34 | 0,00 | -8,33 | -16,66 |
| V1M2 | 41,67 | 0,00 | 0,00 | -8,34 | -16,67 | -25,00 |
| V1M1 | 41,67 | 0,00 | 0,00 | -8,34 | -16,67 | |
| V1M3 | 50,00 | -8,33 | -8,33 | -16,67 | | |

GRAFICAS 6

PORCENTAJE DE REGENERACIÓN DE LOS EXPLANTOS



En la interpretación de la gráfica 6 se deduce que la mejor variedad y tratamiento para el establecimiento de los explantes es V1M2 con un valor porcentual de 55% de regeneración del bloque de los explantes y la variedad que tiene el valor porcentual bajo es la variedad V2T1 con un valor de 16.67% de explantos regenerados.

4.1.5. Porcentaje de Contaminación.

TABLA 20

PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN

| TRATAM./REP | | I | II | III | Σ | X |
|-------------|----------------|------------|------------|------------|-------------|--------|
| V1 | M1 | 50 | 100 | 100 | 250 | 83,33 |
| | M2 | 50 | 100 | 75 | 225 | 75,00 |
| | M3 | 25 | 75 | 75 | 175 | 58,33 |
| V2 | M1 | 50 | 50 | 100 | 200 | 66,67 |
| | M2 | 50 | 25 | 75 | 150 | 50,00 |
| | M3 | 50 | 100 | 75 | 225 | 75,00 |
| Σ | Σ Blog. | 275 | 450 | 500 | 1225 | 408,33 |

En la tabla 20, se puede deducir tomando en cuenta el porcentaje de contaminación en los ensayos de la fase de establecimiento que la Variedad Albion medio de cultivo 1 (V1M1), con un valor de 83.3%, de contaminación de los explantes, la variedad que mostro menor contaminación es la variedad San Andreas, medio de cultivo 2(V2M2) con un valor de 50,00%de explantes contaminados

TABLA 21
PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN POR VARIEDADES Y MEDIOS DE CULTIVO

| VARIED/MEDIO | M1 | M2 | M3 | Σ | X |
|--------------|------------|------------|---------------|---------------|------|
| V1 | 83,33 | 75 | 58,33 | 216,66 | 18,1 |
| V2 | 66,67 | 50 | 75 | 191,67 | 16,0 |
| Σ | 150 | 125 | 133,33 | 408,33 | |
| X | 25,0 | 20,8 | 22,2 | | |

Deduciendo la tabla 21, se observa que la variedad V1, presenta una contaminación con valor 18.1% de los explantes del ensayo y la variedad 2, presenta un valor de 16.0 % de contaminación de los explantes.

Ejercicio de Cálculo.

$$F_c = \frac{(GT)^2}{N} = \frac{(1255)^2}{18} = 83368,0556$$

SUMA DE CUADRADOS.

Suma de Cuadrados Totales.

$$SCT = \sum(y)^2 - F_c = (50)^2 + (50)^2 + \dots \dots \dots (75)^2 - F_c = 11.006,94$$

Suma de cuadrados de tratamientos.

$$SCt = \sum \frac{(t)^2}{r} - F_c = \frac{(250)^2}{3} + \frac{(225)^2}{3} + \frac{(175)^2}{3} + \frac{(200)^2}{3} + \frac{(225)^2}{3} - F_c = 2256,94444$$

Suma de cuadrados del error.

$$SC_e = SCT - SC_t = 8.750,00$$

GRADOS DE LIBERTAD.

Grados de Libertad para un total.

$$-GL_T = n - 1 = 18 - 1 = 17$$

Grados de Libertad para tratamientos.

$$-GL_t = t - 1 = 6 - 1 = 5$$

Grados de Libertad para el error.

$$-GL_e = -GL_T - GL_t = 17 - 5 = 12$$

CUADRADO MEDIO DE LOS TRATAMIENTOS.

Cuadrado medio de los tratamientos.

$$-CM_t = \frac{SC_t}{GL_t} = \frac{2256,94444}{5} = 451,389$$

Cuadrado medio del error.

$$-CM_e = \frac{SC_e}{GL_e} = \frac{8750}{12} = 729,167$$

“F” Calculada.

$$FC = \frac{CM_t}{CM_e} = \frac{451,389}{729,167} = 0,619$$

$F_c \leq F_t$ NS (No existe diferencia).

$F_c > F_t * 5\%$ (Existe diferencias significativas).

$F_c > F_t ** 1\%$ (Diferencias altamente significativas).

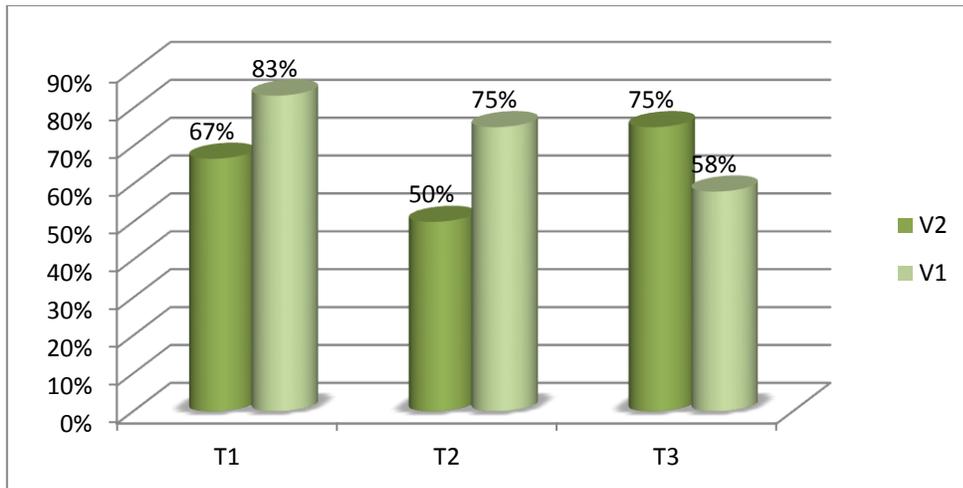
$F_c > F_t$ *** 0.1 % (Diferencias muy altamente significativas).

TABLA 22
ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

| Fv | gl | SC | CM | F_C | F_T 5% | F_T 1% |
|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------------|-------------------------|-------------------------|
| TOTAL | 17 | 11007 | | | | |
| trat | 5 | 2256,944 | 451,389 | 0,619 | 3,11 | 5,06 |
| ERROR | 12 | 8750,000 | 729,167 | | | |

Según los análisis realizados la relación de los tratamientos con interacción con las variedades y tomando en cuenta la F_c es menor a la F_t al 5%, la cual implica que “No existen diferencias significativas entre los tratamientos” utilizados, tomando en cuenta la contaminación. Por tanto se considera que la hipótesis es nula.

GRAFICAS 7
PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN POR VARIEDADES Y MEDIOS DE CULTIVO



Deduciendo el grafico 7 se observa que la variedad V1 presenta una contaminación con valor 18.1% de los explantes del ensayo y la variedad 2 presenta un valor de 16.0 % de contaminación de los explantes.

4.2. Discusión

Se realizaron tres ensayos, cada ensayo constaba de 6 tratamientos la interacción de dos variedades y tres medios de cultivo.

En el primer ensayo, ninguna yema regeneró, pero si se presentó contaminación con un alto valor al 100%, a los dos días de siembra, pese que se colocó a cámara oscura y se hizo el seguimiento paso a paso en el protocolo de desinfección, un factor a tomar en cuenta es que se dejó los medios de cultivo esterilizados a la intemperie de laboratorio, y esto puede ser un causante de la contaminación..

El segundo ensayo presento un porcentaje de regeneración en la V1M3, (IBA +GA3) con un valor de 33.33 % y la variedad medio de cultivo con bajo porcentaje de regeneración es V2M1, con un valor de 8.33% de regeneración de sus explantos, se tuvo altos porcentajes de contaminación.

Según la figura se deduce que en el ensayo de la variedad 2 (variedad San Andreas) con el tratamiento 3 tuvo mayor contaminación, con el 83.33% contaminados, luego la variedad V1 T1 con el tratamiento 1 llegando a la contaminación del 75% de los experimentos contaminados, el que tuvo menor contaminación fue la variedad V1M3 con el tratamiento 3 llegando solamente al 33.33% de la contaminación de los experimentos.

El tercer ensayo presentó altos porcentajes de regeneración de los explantes de ambas variedades en relación con el medio de cultivo utilizado, él mismo se observa a los veinte días de la siembra. Entre los valores de regeneración tenemos mejor variedad y tratamiento para el establecimiento de los explantes es la variedad Albion, con el medio de cultivo (M&S+KIN+GA3) V1M2 con un valor porcentual de 55% de regeneración del bloque de los explantes. Y la variedad que tiene el valor porcentual más bajo es la variedad V2T1 con un valor de 16.67% de explantos regenerados.

También se tuvo un elevado porcentaje de contaminación, tal cual muestra la figura 7 que la variedad Albion V1 presenta una contaminación con valor 18.1%, de los explantes del ensayo y la variedad San Andreas V2 presenta un valor de 16.0 %, de contaminación de los explantes.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- En primera instancia, La contaminación se presentó de diferente manera en cada ensayo detallando de la siguiente forma: el primer ensayo realizado se contaminaron las muestras en un 100%, a los dos días de la siembra, en el segundo ensayo el mejor tratamiento fue el tratamiento 3 (V1M3), y en el tercer ensayo, el mejor tratamiento fue el tratamiento 5 (V2M2).
- En el porcentaje de regeneración de los explantos, dio como mejor resultado el tratamiento 2 (V1M2), Variedad Albion con el medio de cultivo (M&S+KIN+GA3) con un porcentaje del 55%, de explantos regenerados.
- Realizando los análisis a cada ensayo se puede deducir que la hipótesis planteada en la investigación es nula, todos los tratamientos estudiados en la investigación son iguales no presentan diferencia significativa.

5.2 RECOMENDACIONES.

- Se recomienda seguir sistemática y rigurosamente el protocolo de la Asepsia, para evitar problemas de contaminación en la fase de establecimiento.
- De acuerdo a los resultados en la fase de establecimiento se recomienda usar el tratamiento 2 (V1M2), Variedad Albion, con el medio de cultivo (M&S+KIN+GA3) por su comportamiento y adaptación al cultivo in vitro.
- Siempre se debe usar antioxidantes para evitar la oxidación de los explantos los cuales deben ser sumergidos al ácido cítrico (1.5g/l) y ácido ascórbico (1.1g/l) diluidos en agua destilada.

- Se recomienda seguir con la investigación en las fases posteriores al establecimiento como ser: Multiplicación, enraizamiento y aclimatación para poder evaluar que el método *in vitro* si es viable y satisface las necesidades de los productores con plantas sanas y mayor precocidad.
- Se debe seguir experimentando diferentes concentraciones de hormonas en diferentes medios, para poder obtener el medio más adecuado para el establecimiento *in vitro* de la frutilla.
- Se recomienda tener mayor capacitación en el área de cultivo *In Vitro*, puesto que es una técnica que puede fortalecer de alguna manera las necesidades del agro.