

INTRODUCCIÓN

Desde la aparición de la agricultura, la humanidad ha seleccionado las plantas que le proporcionaban un mayor rendimiento en alimentos o materias primas necesarias para la obtención de numerosos productos útiles como medicinas, colorantes y especias. De manera que la mejora genética de los productos agrícolas, lo que ahora llamamos la "Biotecnología". De hecho, es posible que sea una de las actividades más antiguas del hombre (Sánchez, 2008).

Durante miles de años, las comunidades humanas se volvieron sedentarias y comenzaron a cultivar plantas y labrar la tierra, y en todo ese tiempo los humanos modificaron las características genéticas de los cultivos y de los animales que criaban. Las plantas fueron modificadas para mejorar su rendimiento, aumentar el sabor y alargar la campaña de cultivo (Redman, 1990).

Los primeros agricultores incrementaban la producción guardando para la siguiente siembra las semillas de las plantas más deseables. En los últimos cien años, con el descubrimiento de las leyes de la herencia por Mendel y el avance de la biotecnología vegetal, la mejora de las plantas se ha incrementado considerablemente. Louis Pasteur contribuyó en forma destacada con su descubrimiento en medicina y microbiología industrial. Antes de ellos, en 1830, T. Schwann y M. Schleiden habían encontrado que todo ser vivo está constituido por células y en su interior se encuentran los cromosomas que contienen a su vez el material hereditario ("Biotecnología." 2013).

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 (Rodríguez, 2001).

El cultivo *in vitro*, es el cultivo de organismos vivos en medios estériles, en condiciones axénicas de laboratorio, dotándole al material vivo todos los requerimientos nutricionales, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido es posible regenerar en poco tiempo miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre, conservando la variedad deseada y disponibilidad en cualquier época del año.

En Tarija son cuatro las variedades de orégano cultivadas: Maru, Kaliteri, Criolla argentina y la Criolla chilena. El orégano se cosecha hasta tres veces al año, dependiendo del clima y del riego, y permanece en terreno hasta seis años, por eso es considerado como el cultivo “ahorro” para el productor (Los Tiempos, 2001).

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

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El orégano es un cultivo no tradicional en Bolivia; está reconocido como un producto de renta porque conlleva mejores ingresos para el productor en relación a productos tradicionales como el maíz o la papa.

Actualmente en Tarija se está produciendo dos variedades de orégano: Maru y Kaliteri. La producción fue apropiada por unas 150 familias agrupadas en la Asociación de Productores de Orégano (APO). Actualmente se cultiva más de 60 hectáreas de en todo el valle central, con perspectivas de ampliar la producción con el objeto de cubrir la demanda. Las variedades de orégano Maru y Kaliteri, de acuerdo a la experiencia desarrollada son las variedades que mejor se adaptan a las condiciones climatológicas y temperatura del valle central de Tarija, la demanda de plantines por

cada gestión alcanza a los 2 millones. El proyecto Múltiple San Jacinto, cubre en parte la demanda de plantines, actualmente produce de 100 a 120 mil plantines, la meta es llegar a cubrir un millón de plantas (“Proyecto Múltiple San Jacinto”, 2013)

Una falencia importante del sistema productivo es el bajo número de genotipos obtenidos por planta madre (20 individuos/ planta/ año), sin la identificación taxonómica apropiada, de escasa homogeneidad genéticas y afectado por enfermedades sistémicas y plagas (nematodos) que son transmitidos de generación en generación. Problemas que surgen como consecuencia de la utilización de los métodos de multiplicación tradicional (semillas, división de matas y/o esquejado) empleados por los productores para la instalación de nuevas parcela productivas.

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

Por otra parte no se han desarrollado en este cultivo el método de cultivo *in vitro*. Método que 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. Este procedimiento también permite obtener plantas libres de enfermedades y patógenos, de esta forma obtener plantas certificadas a nivel internacional para la exportación, que cumplan con todas las normas fitosanitarias requeridas.

1.3 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.

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

Con el presente trabajo de investigación se establecerá *in vitro* el orégano y de esta manera 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, con alto vigor y libres de plagas y enfermedades.

1.4 HIPÓTESIS

Al desarrollar un protocolo y definir los reguladores de crecimiento adecuados, el orégano puede ser establecido y lograr una multiplicación *in vitro* exitosa.

1.5 OBJETIVOS DEL TRABAJO.

1.5.1 Objetivo General.

1. Desarrollar un protocolo para el establecimiento y la multiplicación “*in vitro*”, a partir de segmentos nodales para la producción masiva de orégano (*Origanum vulgare L*)

1.5.2 Objetivos Específicos.

- Evaluar el comportamiento *in vitro* de dos variedades de *Origanum vulgare L*
- Identificar el medio adecuado para el establecimiento *in vitro* del *Origanum vulgare L*.
- Evaluar las concentraciones de fitorreguladores en los medios de cultivo para la inducción de brotes

- Determinar la combinación correcta de fitorreguladores en la etapa de multiplicación del *Origanum vulgare* L.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ORÍGEN

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

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

2.2. TAXONOMÍA

Reino: Vegetal

Phylum: Telemophytae

División: Tracheophytae

Subdivisión: Anthophyta

Clase: Angiospemeae

Subclase: Dicotyledoneae

Grado Evolutivo: Metachlamidae

Grupo de Ordenes: Tetracíclicos

Orden: Escrophulariales

Familia: Labiatae

Nombre Científico: *Origanum vulgare*

Nombre Común: Orégano

2.3. MORFOLOGÍA

2.3.1. Tallo

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

2.3.2. Hojas

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



2.3.3. Raíz

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

2.3.3. Flores

Las flores se disponen en verticilastros que forman espiguillas de hasta 3 centímetros; son muy pequeñas (los pétalos no sobrepasan los 2 ó 3 milímetros de longitud), de color violeta rosado, rezuman unas gotitas de un líquido amarillento aromático. Están protegidas por bractéolas de hasta 5 milímetros, de contorno oval y color verdoso o purpúreo. Florece en verano (Santillán et al, 2011).



Orégano en flor

2.3.5. Fruto

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

2.3.6. Semilla

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

2.4. VARIEDADES

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

2.4.1. Variedad Maru

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

El orégano Maru prende rápidamente y se adapta bien a diferentes climas y suelo. Resiste bien a la sequía y necesita menos agua que la variedad Kaliteri. La planta es menos sensible a las enfermedades y plagas (FDTA-valles, 2007).

2.4.2. Variedad Kaliteri

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

La variedad Kaliteri resiste bien a la sequía, pero es muy sensible a las heladas. Esta variedad es delicada al corte y tiene dificultad al rebrotar. Tiene un proceso más lento de secado, sin embargo, seca siempre verde con mejor contenido de aceite.

2.4.3. Variedad Onites

Tiene importancia por su valor en aceite esencial es Nativa del sur de Grecia. En oposición a las otras especies de orégano, se desarrollan dos tipos de hojas, unas pequeñas durante el periodo de sequía y otras más anchas durante los periodos húmedos. Tolera un suelo con pH entre 5.8 a 7.3 (FDTA-Valles, 2007).

2.5. PROPIEDADES

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

Se cultiva por su demanda en la industria alimentaria, sector farmacéutico, de los licores y cosméticos, además de la industria conservera y semillera. Su uso práctico en cocina es el de aromatizante por excelencia. También la herboristería lo consume ampliamente por sus propiedades tónicas, digestivas, estomacales y antiasmáticas.

La parte útil del orégano son las hojas y las sumidades floridas desecadas. Estos órganos tienen un aroma agradable y sabor algo amargo. Contiene aceite esencial, sustancias tónicas, goma, resina y otros.

La esencia es un líquido de color amarillo hasta pardo, cuyo principal componente es el carvacrol, pero también se puede hallar timol, alfa pineno, cimeno levógiro, terpenos, etc. La cantidad de aceite esencial varía, dependiendo de la producción específica de cada especie, desde trazas hasta 8 mg por cada 100 g de peso seco. El aceite determina el olor, el sabor y varía de acuerdo a varios otros factores (hora de cosecha, condición de secado, nivel de floración, etc.)(Graug, 1985).

2.6. CLIMA Y SUELO

2.6.1 Clima

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

Por región geográfica

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

Clima de altura

Localidades con altitudes que fluctúan entre 1.800 ~ 2.400m.s.n.m. A mayor altura se puede observar que el ciclo vegetativo es más largo, de 5 meses para la primera cosecha y de 3 ~ 4 meses de intervalo después de la cosecha.

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

Clima de valle húmedo

A menor altura se puede observar que el ciclo de producción del orégano es más corto. El primer corte se hace a los 4 meses y de 10 ~ 12 semanas de intervalo después de la cosecha.

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

Clima de valle seco

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

2.6.1.1. Temperatura

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

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

2.6.1.2 Precipitación

Habita en regiones con una precipitación acumulada promedio anual de 500 a 900 mm (Martínez, 1996), aunque su requerimiento mínimo va de 450 a 500 mm de lluvia en el año (FAO, 1994 citado por Tárraga 2009).

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

2.6.2. Suelo

La planta tiene un buen desarrollo en suelos sueltos, permeables y con buen drenaje. No prospera en suelos salinos, además que el orégano es sensible a la asfixia radicular.

La textura puede ser franco-limosa, franco-arenosa o suelo pedregoso-franco por su buen drenaje. El suelo necesita atención especial para asegurar una buena ventilación.

El suelo apto para el cultivo de orégano requiere de buen drenaje, aireación y ausencia de capas endurecidas que obstaculicen el desarrollo de las raíces y el paso del agua. El orégano necesita un suelo profundo (hasta 50cm), con pH 6.8. La planta responde bien en suelos ricos en materia orgánica (Santillán et al, 2011).

2.6.2.1 pH

Influye en el desarrollo y reproducción de muchos microorganismos del suelo como hongos y bacterias, así como también en el desarrollo del cultivo. El orégano se desarrolla en terrenos con pH ligeramente ácido (Martínez, 1996).

2.7. MULTIPLICACIÓN

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

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

2.7.1 Multiplicación por Semillas

El peso medio de 1000 semillas es de 0,035 g y su poder germinativo es del 90%, en 23 días y a una temperatura media de 20°C. Estudios recientes revelan que las semillas de orégano poseen unos requerimientos lumínicos absolutos para la germinación. Además dichos requerimientos van acompañados de un rango pequeño de temperaturas óptimas para dicho proceso biológico (típicas de los climas mediterráneos sin grandes oscilaciones de temperaturas). Este rango de temperaturas oscila entre 15-20 °C. (Muños, 2002)

Semillado: en vivero, bajo chasis a finales de invierno, al aire libre en primavera avanzada. El repicado se hace dos o tres meses después de la siembra. La cantidad de semilla precisa para obtener la planta para 1 hectárea, es de 100 g que se sembrarán en 100 metros cuadrados de vivero (Infojardin, 2013).

2.7.2. Multiplicación por Esqueje

La propagación por esquejes es la práctica más usual en nuestro medio para la plantación de cultivos de orégano debido a que es fácil de obtener (directo de la misma planta), y fácil de instalar en el campo.

Para poder calificar la calidad de los esquejes que se van a plantar es muy importante que éstos deban obtenerse de plantas provenientes de campos con 2 años de cultivo como mínimo, con un tamaño aproximado de 30 cm a 40 cm de altura, de buena consistencia: robustas y vigorosas; libres de plagas y enfermedades. El corte para la obtención de esquejes deberá hacerse cuando el cultivo tenga aproximadamente de 10

a 15 % de emisión de primordios florales. La longitud del esqueje deberá ser de 15 a 20 cm (Kiauer, 2009).

2.7.3. División de la Planta

La multiplicación por división de la planta de orégano se realiza en primavera (septiembre) o en otoño (octubre). Sería preferible tener las jóvenes plantas en un lugar fresco hasta cuando no habrán arraigado y luego ser trasplantadas en su lugar definido en la primavera o al principio del verano (INFOAGRO, 2012)

2.8. CULTIVO

2.8.1. Preparación del Suelo

Es un cultivo que ocupa el terreno de 3 a 5 años, para prolongar la vida de la explotación se debe realizar un buen manejo prestando especial atención al control de malezas y a la sanidad de las plantas (control de nemátodos, hongos y virus).

Las operaciones posteriores de la preparación del suelo son las siguientes:

- Rastrear y arar profundo, con la finalidad de romper el pie de arado, luego regar.
- Agregado de estiércol en banda, con debida antelación para que complete el proceso de descomposición. Éste puede ser de caballo, de cabra o de gallina con cama, de acuerdo a las siguientes cantidades: 20tn/ha, 10tn/ha, 5tn/ha respectivamente.
- Pasar dos veces rastra de discos y de dientes.
- Formar surcos, acondicionar acequias y regar (Menéndez, 2007).

2.8.2. Plantación.

Los meses de temporada de lluvia son los más recomendables para favorecer un mayor prendimiento de las plantas.

Los meses de junio y julio son desfavorables para la plantación por el frío, el cual afecta el prendimiento y el desarrollo de la planta. Esta recomendación es general pero particularmente importante para las zonas de clima de altura.

Para realizar el trasplante del orégano existen dos métodos;

1°.- Realizando un riego profundo días antes del trasplante, luego proceder con el hoyado y el plantado.

2°.- Regando con bastante agua el surco y realizando el trasplante al momento que ha tomado la humedad necesaria para poder introducir el plantín sólo con la ayuda de la mano. Se colocan los plantines (en el talud del surco, para evitar que la fuerza del agua arrastre al plantín y para que absorba la humedad necesaria) al fondo de los surcos en tiempo seco y un poco más arriba en época de lluvia al lado opuesto al sol de la mañana. Es importante apretar la tierra contra la raíz para evitar las bolsas de aire y favorecer un mayor contacto de la planta con el suelo. El primer riego de la nueva plantación deberá ser lento y suave. Un riego regular es crítico para todo el período de prendimiento (FDTA-Valles, 2007).

2.8.3. Espaciamiento

La distancia entre filas no debe exceder de 75 cm y entre los pies de una fila se dejara una distancia de unos 35 cm. La densidad óptima de plantación es de unos 40.000 plantines/Ha (Muños, 2002).

2.9. LABORES CULTURALES.

2.9.1. Fertilización.

Debe considerarse, para el establecimiento del plan de abono de fondo, la duración del cultivo. Ésta puede variar un mínimo de 8 años a un máximo de 10 años. Por lo tanto se aporta estiércol a razón de 3-4 Tm/Ha que se enterrarán en el momento del laboreo principal (aradura).

Además, cada año se deberá asegurar un aporte de los tres elementos fundamentales. Para estimular la vegetación y por tanto la producción de biomasa, se aconsejan valores de 120-150 unidades de nitrógeno, equilibrados con aportes de 80-100 unidades de fósforo y de 100-120 unidades de potasio. El nitrógeno debe suministrarse en las fases críticas, es decir, en la recuperación vegetativa y tras las siegas. En particular, después de la última recolección, la planta debe recuperar las energías perdidas para superar bien el invierno y es precisamente de cómo salga de él de lo que depende la producción del año siguiente. En otros términos, el abono debe tender a obtener el máximo, pero también a prolongar lo más posible la duración de la plantación (More, 2010).

2.9.2 Deshierbe

Al tratarse de una especie plurianual, se ha considerado el problema del deshierbe químico y se efectúa en algunos países. Los herbicidas selectivos normalmente utilizados son dos: Lenacilo (materia activa del Venzar) en dosis de 1 kg/ha de producto comercial el primer año, en el momento de la plantación. El segundo es el Terbacilo (materia activa del Simbar) controla mayor número de malas hierbas, será utilizado antes del arranque de la vegetación, a partir del segundo año, en dosis de 1 kg/ha de producto comercial (More, 2010).

2.9.3. Corte Apical

El corte apical o poda se realiza cuando las plantas de orégano estén adaptadas después de 30 a 40 días después del trasplante, favoreciendo al amacollamiento y ramificaciones de la parte baja de la planta (Aguilar et al, 2013).

2.9.4. Aporque

Consiste en amontonar tierra en la parte inicial del tallo de la planta con el propósito de proteger las raíces, dar soporte y que haya amacollamiento (únicamente si no se tiene acolchado) (Aguilar et al, 2013).

2.9.5. Riego

El orégano prefiere suelos secos, debe ser regado poco y a menudo teniendo cuidado a no ensopar el terreno y no dejar encharcamientos que causen la putrefacción de las raíces. Las mayores solicitudes hídricas se tienen cuando la planta todavía es joven y durante la floración (Elicriso, 2014).

2.10. COSECHA

Del orégano se cosechan las hojas y las flores, por lo que se recolectan las sumidades floridas, esto es, los extremos de las ramas que contienen flores y hojas. La época ideal para la recolección es en plena floración (en general, durante el verano), no antes. Vale más esperar a que algunas flores estén marchitas y no precipitarnos cuando empiezan a florecer las primeras, pues la producción de esencia por las flores se incrementa una vez éstas ya se han desarrollado totalmente.

El primer año de vegetación solamente es posible una corta; a partir del segundo año pueden hacerse dos recolecciones anuales, en julio y en octubre. Se recolectarán en el momento de la floración, antes de que abran todas las flores. La siega, efectuada de forma mecánica mediante guadañadora o guadañadora - atadora.

El rendimiento, expresado en producto verde, oscila entre los 3 Tm/Ha de planta fresca en el año de plantación, y de 15 Tm/Ha e incluso más, a partir del segundo año, para alcanzar luego valores más bajos al acercarse el octavo y el noveno año de recolección (Los Tiempos, 2001).

2.10.1. Secado

En el secado del producto se asiste a un descenso del verde al seco de 4:1 (se reduce un 75%). La cantidad de hojas solas obtenidas de 100 kg de planta fresca es aproximadamente de 15 kg. El producto puede destinarse también a la extracción de la esencia. Los rendimientos son muy variables según la zona de cultivo. Las hojas deben desecarse a la sombra, pues el sol destruiría el aceite esencial; luego han de

guardarse en recipientes cerrados herméticamente, en lugares frescos y secos. El secado no es tan delicado como el de la mayorana pero debe efectuarse con la mayor rapidez posible y a una temperatura de 30°C y a la sombra (Muños, 2002).

2.10.2. Producción y mercado

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

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

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

2.11. PLAGAS Y ENFERMEDADES

2.11.1. Enfermedades Causadas por Hongos:

Roya

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

El hongo aparece cuando la planta está madurando; es decir, cuando se inicia la floración. La proliferación del hongo en la planta es de las partes más viejas a las más

jóvenes, o sea, de abajo hacia arriba. Cuando el ataque es intenso, se produce desecamiento de las hojas y la consiguiente caída de las mismas (Kiauer, 2009).

Oídio

Causado por *Erysiphe* sp.

Síntomas

Principal enfermedad del orégano en la actualidad.

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

Se presenta en oréganos con deficiente fertilización y riegos irregulares.

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

Tizón foliar

Causado por el hongo conocido como *Alternaria alternate*

Síntomas

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

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

Alternaría

Nombre Científico. *Alternaria solani*

Síntomas

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

2.11.2. Enfermedades de Origen Viral (7).

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

2.11.3. Insectos

2.11.3.1 Ácaros

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

Nombre común. Arañita o araña roja.

Nombre científico. *Tetranychus cinnabarinus* y *T. urticae* (arañas de dos puntos).

Esta plaga se presenta cuando hay sequía y las plantas están con hojas tiernas. El ataque se caracteriza por que la planta se recubre de una tela muy fina dentro de la cual se encuentran estos ácaros (arañas), limitando la capacidad fotosintética de la planta. A consecuencia de todo ello, las hojas se tornan amarillentas y se caen, llegando hasta secar los tallos, provocando pérdidas fuertes si no se controla a tiempo.

La araña roja se instala en el envés de la hoja alimentándose del jugo celular de la capa superficial de la misma (chupa la savia de la planta) (Aguilar et al, 2013).

2.11.3.2. Pulgón

Los pulgones o áfidos incrustan su pico chupador y absorben savia, desformando hojas y brotes. Como consecuencia, aparece un hongo de color negro (fumagina) sobre la melaza que excretan los pulgones (LosTiempos, 2011).

2.12. PROPAGACIÓN DE PLANTAS POR CULTIVO *IN VITRO*.-

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

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

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

La micropropagación o 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.

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 reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar. La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación (Aguirre, et al. 2010).

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

2.11.1. Multiplicación por Segmentos Nodales

Las plantas cultivadas en este tipo de sistema de cultivo se caracterizaron por el mayor crecimiento de los segmentos nodales, coloración verde y hojas más desarrolladas. La utilización de este tipo de sistema de cultivo en la fase de multiplicación *in vitro* de los segmentos nodales posibilitará incrementar el empleo de la micropropagación para la producción de semilla.

2.11.2. Tipos de Multiplicación *In Vitro*

Conforme el explante es utilizado y subsecuente manipulado, la micropropagacion puede ser conducido de la siguiente manera :

a).- Multiplicación a través de la proliferación de yemas o brotes axilares : Este método de multiplicación incluye a la mayoría de los sistemas de micropropagacion incluyendo el aislamiento de órganos meristemáticos pre-formados (normalmente yemas axilares) y la quiebra de la dominancia apical con la aplicación de citoquinina exógena. Las yemas axilares que naturalmente se forman en las inserciones de las

hojas son estimuladas a crecer, dando origen a partes aéreas nuevas, que a su vez, repiten el mismo proceso. Estas pueden ser subdivididas en conjuntos menores, o en brotes individuales para la formación de nuevos explantes (Aguirre et al, 2010).

b).- Multiplicación a través de la inducción de yemas adventicias : Las yemas adventicias son aquellas originadas en lugares diferentes de aquellas donde se forman en el curso del desarrollo normal de la planta. Esta formación ocurre de manera directa o indirecta. La **organogénesis directa**, se refiere al surgimiento directo de yemas a partir de tejidos que presentan potencial morfogénico en la planta in vivo, pero que en general, no se expresa. Estos tejidos incluyen el cambium vascular, la base del peciolo en las dicotiledóneas, la base de las hojas y escamas en bulbos de monocotiledóneas y segmentos de raíces, entre otros. Un ejemplo claro es la violeta africana, donde el cultivo puede iniciarse a partir de segmentos de la hoja.

La organogénesis indirecta ocurre cuando el proceso de regeneración de yemas es precedido por la formación del callo. A partir de células no organizadas del callo, surgen yemas adventicias que crecen y se desarrollan en nuevas partes aéreas.

c).- Multiplicación a través de embriogénesis somática : la embriogénesis somática es la formación de embriones por vía asexual. En condiciones in vitro, es factible diferenciar embriones a partir de células tanto del esporofito como del gametofito. La embriogénesis puede ser también o indirecta. La gran mayoría de los sistemas de embriogénesis somáticas se da por la vía indirecta, donde los callos embriogénicos son inducidos y mantenidos a lo largo de la multiplicación. Los embriones somáticos son formados en la superficie del callo (Villalobos & Thorpe, 1991. Citado por Aguirre et al, 2010).

2.12. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo constituyen un elemento fundamental para el cultivo *in vitro* de células, de tejidos, protoplastos, anteras y para lograr el desarrollo de embriones, la organogénesis, la micro propagación, etc. Los medios de cultivo tienen una serie de

componentes generales específicos cuya presencia y concentración estará en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización.

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

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

- **Sales Inorgánicas**

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

- **Compuestos Orgánicos**

Constituidos por tres tipos de compuestos:

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

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

- **Sustancias Gelificantes**

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

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

La concentración óptima de agar es variable con 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).

- **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%.

2.12.1. Sales Inorgánicas

2.12.1.1. Macronutrientes

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 et al.2010).

2.12.1.2. Micronutrientes

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. Citado por Aguirre et al,2010).

2.12.2. Compuestos Orgánicos

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

2.12.3. Aminoácidos y Vitaminas

2.12.3.1. 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 (Daves, 1995 ; citado por Tarraga, 2009)

2.12.3.2. Vitaminas

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

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

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 division celular en muchas especies vegetales con fines de micropropagacion. La concentración más utilizada es de 100 mg / l. (Aguirre et al 2010).

2.12.3.3. 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 se utilizan concentraciones muy elevadas de 5 a 12%.

La concentración óptima de azúcar en los medios de cultivo varia entre 20-80 g /l, en dependencia del tipo de cultivo, materia vegetal, etc.Los azucares presentan una acción metabólica y energética (Martinez, 2003 citado por Tarraga, 2009)

2.12.4. Reguladores de Crecimiento

2.12.4.1. Auxinas

Se las define como una sustancia química orgánica producida naturalmente en las plantas que estimula el crecimiento y otras funciones fisiológicas en un sitio alejado del lugar de producción y que actúa en concentraciones bajas (Rodríguez, 1991).

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 (Torres y Martínez 2000, citado por Tárraga, 2000).

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

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

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

Efectos :

- Crecimiento: Estimulan la elongación celular en tallos y coleóptilos (tallos jóvenes), incrementan la extensibilidad de la pared celular y estimulan la diferenciación del 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. Citado por Aguirre et al, 2010) señala que las concentraciones óptimas de auxinas varían de 0,1 a 10 mg/l.

2.12.4.2. 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.

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 Bencil amino purina (BAP), N⁶ benciladenina (BA) N⁶ dimetil alilaminopurina (2ip) (Mejía, 1994. Citado por Aguirre et al, 2010).

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. citado por Aguirre et al, 2010).
- Dominancia lateral: Estimulan el crecimiento de yemas laterales inhibiendo la apical (contrario a las auxinas, por lo deben estar en equilibrio)
- Diferenciación y morfogénesis: Provocan cambios en la morfología según el tipo de crecimiento, junto a las auxinas estimulan la formación de raíces y tallos.
- Senescencia: Son anti-senescentes (García et al, 2006; citado por Aguirre et al, 2010).

2.12.4.3. Giberelinas

Se las define como fitohormonas que son elaboradas de las propias plantas y forman parte del equipo regulador del desarrollo de las plantas superiores que son particularmente eficientes provocando la elongación de los tallos de plantas intactas (Rodríguez, 1991)

Efectos

- Estimulan el crecimiento de tallos (elongación) e hipocótilos. 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 en 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 óptimas de 0,01 a 1mg/l, debido a que niveles superiores a 1 mg/l son tóxicos para el desarrollo del explante.

2.12.4.4. Ácido Abscisico

Históricamente se ha considerado como un inhibidor. Se trata de una molécula terpenica de 15 carbonos (sesquiterpeno) similar a los carotenoides pero con algunas particularidades. Se define como una sustancia natural reguladora del crecimiento de las plantas de igual importancia que las otras hormonas ; auxinas, giberelinas, citoquininas que provocan la senectud y la caída de las hojas (flores y frutos) e induce el letargo en yemas de árboles y semillas (Rodriguez, 1991).

Efectos :

- Estas hormonas proceden de la abscisión de órganos vegetales, pero no es la causante de este en el 90 % de los casos. Es una hormona anti-estrés actúa contra el estrés hídrico provocando el cierre de estomas. Contrarresta el efecto de la auxina, pero no inhibe en el crecimiento en sí. También es esencial para la embriogénesis (formación de embriones viables). Evita la germinación prematura y por eso bloquea las giberelinas.

2.12.4.5. Etileno

Es la molécula C₂H₄, un hidrocarburo insaturado liposoluble, capaz de traspasar la membrana celular. Es un gas volatil a temperatura ambiente.

Efectos :

- En cuanto al crecimiento: Interviene en el desarrollo del síndrome de la triple respuesta. El tallo se curva perdiendo el hábito geotrópico normal, se inhibe el crecimiento en longitud de tallos y raíces los tallos engrosan (el etileno aumenta el grosor de las células parenquimáticas)
- Estimula la elongación en tallos de plantas aromáticas, ya que estas necesitan tener hojas rápidamente fuera del medio.
- El etileno es una hormona de la abscisión casi universal. La abscisión está controlada por la planta de forma predeterminada
- Brotación. En tubérculos contribuye a romper la dormancia de los mismos, favoreciendo la emisión de manera uniforme de los brotes para su siembra.

2.12.5. Material de Soporte

- 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. Citado por Aguirre, 2010).

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 & Claire (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 solido; sin embargo, puede a su vez suceder una mayor susceptibilidad de los explantes a vitrificarse.

Al momento 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: citado por Aguirre et al, 2010).

2.12.6. Preparación del medio de cultivo

El crecimiento de la plantulas *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, 1998).

2.12.6.1. Ajuste de pH

Una vez obtenido el volumen deseado, completado a volumen con agua destilada, se procede a ajustar su pH al valor prefijado mediante la adicción de OHNa y/o HCl 0,1-1 N, para subir o bajar respectivamente hasta obtener el deseado (Hartmann & Kester, 1995. Citado por Aguirre et al, 2010).

La adicción del gelificante dependerá si el medio a preparar será un medio sólido o un medio líquido. Se añadirá en el primer caso el agente solidificante y se fundirá por calentamiento breve utilizando horno a microondas o en estufa con agitador.

2.12.6.2. Adicción de la Fuente de Energía

Se añade junto con el agar- agar diluyéndolo por calentamiento (Aguirre et al, 2010).

2.12.6.3. Cantidad y Distribución del Medio

En el caso de los medios sólidos, una vez fundidos por calentamiento, estos deben ser dosificados en los recipientes escogidos. En el caso de los medios líquidos se procederá a dosificar directamente en los frascos escogidos. Tanto si es un medio sólido como líquido, se procederá inmediatamente a autoclavar los contenedores con el medio.

2.12.6.4. Esterilización del Medio

La esterilización se realiza en un autoclave a una temperatura de 110 a 121°C, por 20 minutos a 15 lb/in² de presión. Se debe tener cuidado de que la presión del autoclave, nunca revase las 20 lb/in², ni este por debajo de las 15 lb/in². Transcurridos los 20 minutos, se desconecta el autoclave. Se abre muy lentamente la válvula para liberar el vapor para que la presión comience a bajar (Aguirre et al, 2010).

2.12.7. Preparación de Soluciones Madre

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

Si cualquier solución precipita no poseera 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 soluciones existen dos alternativas que pueden seguirse : 1) combinar sólo componentes que no forman precipitado a altas concentraciones o, 2) preparar sólo 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,

ademas de imprecisa puesto que obligaria a pesar algunas cantidades muy pequeñas. Por todas esas razones, es una práctica habitual en todos los laboratorios preparar soluciones stock concentrados de los distintos componentes, agrupados de forma que no se produzcan fenomenos de precipitación. Proceder de esa forma simplifica la preparación del medio : Un medio como el MS, que contiene un total de 20 sustancias diferentes, requeriria 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 entrará 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.

2.12.8. Desinfección de Explantes

La principal dificultad en la etapa de establecimiento reside en poder obtener un tejido descontaminado sin conducirlo a la muerte después de aislado. Los 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 utilizados 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

comunmente 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 et al, 2010).

2.13. FASES DEL CULTIVO *IN VITRO*.-

Fase 0: Preparativa

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

Fase I: Establecimiento

El objetivo de esta fase es alcanzar 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 adquisición 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) (Hurtado & Merino, 1994).

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 productibilidad 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).

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) (Hurtado & Merino, 1994).

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.

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, traslocación y transpiración de agua (Hurtado y Merino, 1994).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- UBICACIÓN GEOGRÁFICA

El presente trabajo de investigación se ha desarrollado en las instalaciones del laboratorio de Fitopatología y Cultivo In Vitro de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma “Juan Misael Saracho”; ubicado geográficamente entre los paralelos 21° y 15` de latitud sur y los meridianos 64° 21` y 65° 05` de longitud Oeste, con una altura promedio de 1850 m.s.n.m.

3.2.- MATERIAL VEGETAL

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

Variedad Kaliteri:

Altura de la planta: 50 a 60 cm

Hojas: Compuestas

Color: Verde plomiso, más gruesa y pubescente que Maru

Portada: Alterna

Tallo: Erecto, poca ramificación, pubescente

Raíz: Superficial ramificada

Variedad Maru:

Altura de la planta: 35 a 80 cm

Hojas: Compuestas

Color: Verde oscuro con vellosidades

Portada: Alterna

Tallo: Erecto con poca ramificación

Raíz: Superficial, menos de 30 cm

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

3.3.- EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS DE LABORATORIO

Área de Preparación

Material de escritorio

Equipo

Computadora

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

Cámara fotográfica

Lápiz

Regla

Cuaderno de Registro

Materiales

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

Reactivos

- Nitrato de amonio
- Nitrato de potasio
- Cloruro de calcio dihidratado
- Sulfato de magnesio hepta hidratado
- Ortofosfato diácido de potasio
- Sulfato de manganeso tetrahidratado
- Sulfato de zinc heptahidratado

- Ácido bórico
- Ioduro de potasio
- Molibdato de sodio dihidratado
- Sulfato de cobre pentahidratado
- Cloruro de cobalto hexahidratado
- EDTA de sodio
- Sulfato de hierro
- Acido nicotínico
- Piridoxina
- Glicina
- Myo-inositol

Fitorreguladores

- BAP (Bencil aminopurina)
- AG3 (Ácido Giberelico)
- ANA (Ácido Naftalenacético)

Área de esterilización

Equipo

- Autoclave
- Estufa de esterilización para el material in Vitro

Área de siembra

Equipo

- Cámara de flujo laminar

Materiales

- Mechero
- Pinzas

- Agujas
- Bisturís
- Tijeras
- Reglas
- Cajas petri

Reactivos

- Hipoclorito de sodio
- alcohol

Área de Crecimiento

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

3.4.- METODOLOGÍA

Se trabajó con el método de cultivo *in vitro*, abarcando las dos primeras fases del proceso (fase de establecimiento y la fase de Multiplicación), en la fase de establecimiento se usaron como explantes segmentos nodales y en fase de multiplicación se realizó por esquejes o nudos.

3.4.1 Fase I, Establecimiento *In Vitro* de Segmentos Nodales

3.4.1.1. Preparación de Medios de Cultivo

La secuencia seguida de manera general para el cultivo *in vitro*, comenzó con la preparación de las soluciones madres o stock, agrupándose los macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y quelatos. En base a las soluciones madre se procedió a la preparación de los medios de cultivo, regulando el pH a 5.7, posteriormente se dosificó en tubos de ensayo en una cantidad de 10 ml., se efectúa el autoclavado o esterilización (20 minutos en autoclave a 120 °C y 1 atmósfera de presión). Se utilizó

como base el medio de cultivo de Murashigue & Skoog, (Cuadro N° 1) con los complementos orgánicos.



Foto N° 1: Preparación de medios de cultivo

3.4.1.2. Aplicación de Fitorreguladores

Al medio base de Murashigue & Skoog, se le adicionó en la fase establecimiento BAP (Bencil amino purina), en concentraciones de 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 mg/l, tomando en cuenta que Hasenwaga. 1980 citado por Aguirre, et.al. 2010, manifiesta que los fitorreguladores las citoquininas constituyen un grupo indispensable para la quiebra de la dominancia apical y la inducción de yemas axilares. La BAP (Bencil amino purina) en concentraciones de 0.1 a 0.5 mg/l es la citoquinina más eficaz para promover la multiplicación de diferentes especies, siendo además la más económica de todas.

Cuadro N° 1

Composición del medio base de Murashigue y Skoog (1962)

Macroelementos MS	mg/l
NH ₄ NO ₃	1,650.00
KNO ₃	1,900.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370.00
KH ₂ PO ₄	170.00
Microelementos MS	mg/l
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.90
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60
H ₃ BO ₃	6.20
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Fe EDTA MS	mg/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.80
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.30
Compuestos orgánicos MS	mg/l
Ácido nicotínico	0.50
PiridoxineHCl	0.50
Thiamine HCl	0.10
Glycina	2.00
Myo-inositol	100.00
Agente gelificante	g/l
Agar	6.50
Sacarosa	3 %
pH del medio	5.7

Cuadro N° 2

Medios de Cultivo Utilizados para la Fase de Establecimiento *in vitro*

COMPONENTES		Medio 1	Medio 2	Medio 3	Medio 4
Sales Minerales	Macro elementos(M1)	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
	NH4NO3	1650	1650	1650	1650
	KNO3	1900	1900	1900	1900
	CaCl2·H2O	440	440	440	440
	KH2PO4	170	170	170	170
	Micro elementos M2	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
	MnSO4·H2O	16.90	16.9	16.9	16.9
	ZnSO4·7H2O	8.60	8.6	8.6	8.6
	H3BO3	6.2	6.2	6.2	6.2
	Na2MoO4·2H2O	0.25	0.25	0.25	0.25
	CuSO4·5H2O	0.025	0.025	0.025	0.025
	Fe EDTA M3	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
	Fe SO4 · 7H2O	2708	27.8	27.8/	27.8
	Na2EDTA·2H2O	37.30	37.30	37.30	37.30
Compuestos orgánicos	Compuestos orgánicos (vitaminas) M4	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
	Ácido Nicotínico	0.5	0.5	0.5	0.5
	Piridoxina HCl	0.5	0.5	0.5	0.5
	Tiamina HCl	0.5	0.5	0.5	0.5
	Glicina	2	2	2	2
	Myo – inositol	100	100	100	100
	Agentes gelificantes	g/l	g/l	g/l	g/l
	Carragenina	8	8	8	8
	Sacarosa	30	30	30	30
	pH	5.7	5.7	5.7	5.7
Reguladores de crecimiento	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	
	BAP	0.25	0.5	1	1.5

3.4.1.3. Preparación de las Plantas Madre

Las plantas madres se recolectaron (2-09- 2013), del vivero del Proyecto multipropósito San Jacinto, se trasplantó en macetas tomando en cuenta la desinfección del sustrato, manteniéndole en la sala de crecimiento regulando la temperatura y humedad hasta la obtención de los brotes necesarios para realizar su extracción.



Foto N° 2: Preparación plantas madre

3.4.1.4. Extracción y Desinfección de Explantes

El primer ensayo para la fase de establecimiento se empieza en fecha 16-09-2013. Se inició con la selección de los brotes de las plantas madre, los brotes seleccionados fueron cortados en trozos de 2 cm. con una yema axilar o apical (explantes), los explantes se lavaron con unas gotas de detergente y agua destilada, posteriormente se introduce dentro la cámara de flujo laminar donde se realiza la desinfección de acuerdo al siguiente protocolo(Protocolo de desinfección establecido en la micropropagación in vitro de papa): inmersión de 30 segundos en alcohol 70 % v/v,

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.



Foto N° 3: Corte de Explantes

3.4.1.5. Siembra de los Explantes

Una vez desinfectados los explantes se recortan a 1 cm. de longitud tratando de eliminar el tejido quemado en la desinfección, luego se siembran los explantes (segmentos nodales) en tubos de ensayo en los 4 medios de cultivo a probarse y las dos variedades.

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

El desarrollo de estos explantes se evaluó durante 30 días en los cuales se pudo evaluar las siguientes variables de respuesta.

- Porcentaje de regeneración
- Número de días de brotación
- Altura del explante (a los 15 y 30 días)

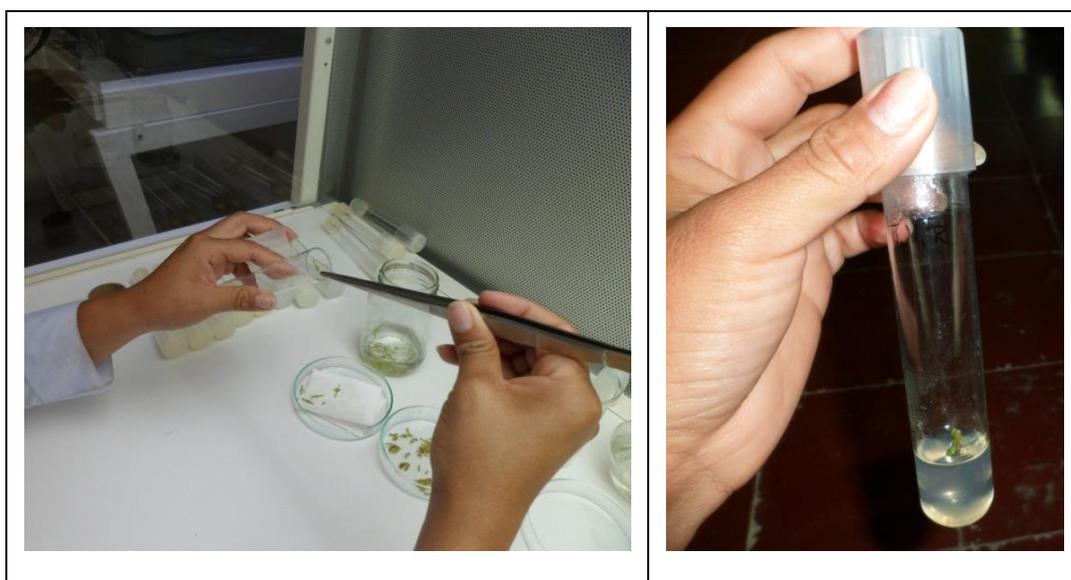


Foto N° 4: siembra de explantes

3.4.1.6.- Diseño Experimental Fase Establecimiento

El diseño completamente al azar, es un diseño en el cual los tratamientos son asignados aleatoriamente a todas las unidades experimentales. Este diseño es usado ampliamente pero su uso se limita a casos en los que se dispone de unidades experimentales homogéneas. En investigaciones donde se emplea la técnica de

cultivo de tejidos vegetales, generalmente se usa el diseño completamente al azar, puesto que el material experimental es homogéneo. (Hurtado. D. 1994)

Para la presente investigación en la fase de establecimiento se usó el diseño experimental completamente al azar de acuerdo al siguiente orden:

Diseño: Completamente al azar con arreglo bifactorial dos por cuatro

Factor A: 2 variedades (Maru y Kaliteri)

Factor B: 4 medios de cultivo (Medio base Murashigue & Skoog, con variación en fitorreguladores)

Nº de repeticiones: 3

Nº de tratamientos: 8

Unidad experimental: 3 tubos de ensayo (un explante por tubo)

3.4.2.- Fase II, Multiplicación o Micropropagación in vitro de Esquejes

En esta fase se utilizó las soluciones madre ya preparadas en la fase anterior, agrupándose los macronutrientes, micronutrientes, los quelatos y las vitaminas:

El procedimiento para la micropropagación o multiplicación *in Vitro* se inició en 8-10-2013, se realizó a partir de las vitro plantas provenientes de la fase de inicio o establecimiento, se trabajó como en la fase anterior en la cámara de flujo laminar con la máxima asepsia, antes de empezar con el proceso de multiplicación.

La multiplicación se la realizó de las vitroplantas regeneradas, obteniéndose esquejes, donde se cortaron los nudos de las plántulas, conteniendo cada microesqueje 1 yema axilar, se repicaron en frascos de 250 ml, con 30 ml de medio de cultivo. Todos los frascos fueron puestos en la sala de crecimiento con iluminación de focos fluorescentes, con 16 horas luz y 8 horas oscuridad, manteniendo la temperatura lo más estable posible entre los 18 y 23°C.

El desarrollo de estos se evaluó durante los siguientes 30 días, en los cuáles se pudo evaluar altura de planta, tasa de multiplicación y las siguientes variables de respuesta.

- Número de brotes (Nº brotes / explante).
- Tamaño de brote.(a los 15 y 30 días)
- Número de yemas por brote.(a los 15 y 30 días)



Foto N° 5: Multiplicación

3.4.2.1.- Medios De Cultivo

Se utilizó como base el medio de cultivo de Murashigue & Skoog, con los complementos orgánicos y de fitohormonas detallados en el cuadro N° 1.

Para la fase de establecimiento y multiplicación se utilizaron tres medios de cultivo, ambos basados en el de Murashigue & Skoog, variando solamente en el nivel de Fitohormonas, BAP (Bencil amino purina), AG3 (Ácido Giberelico) y ANA (Ácido Naftalen acético), con dosis que se detallan en el cuadro N°3.

Cuadro N° 3

**MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA LA FASE DE
MULTIPLICACION IN VITRO**

COMPONENTES		Medio 1	Medio 2	Medio 3
Sales Minerales	Macro elementos(M1)	mg/l	mg/l	mg/l
	NH4NO3	1650	1650	1650
	KNO3	1900	1900	1900
	CaCl2·H2O	440	440	440
	KH2PO4	170	170	170
	Micro elementos M2	mg/l	mg/l	mg/l
	MnSO4·H2O	16.90	16.9	16.9
	ZnSO4·7H2O	8.60	8.6	8.6
	H3BO3	6.2	6.2	6.2
	Na2MoO4·2H2O	0.25	0.25	0.25
	CuSO4·5H2O	0.025	0.025	0.025
	Fe EDTA M3	mg/l	mg/l	mg/l
	Fe SO4 · 7H2O	2708	27.8	27.8/
	Na2EDTA·2H2O	37.30	37.30	37.30
Compuestos organicos	Compuestos orgánicos (vitaminas) M4	mg/l	mg/l	mg/l
	Ácido Nicotínico	0.5	0.5	0.5
	Piridoxina HCl	0.5	0.5	0.5
	Tiamina HCl	0.5	0.5	0.5
	Glicina	2	2	2
	Myo – inositol	100	100	100
	Agentes gelificantes	g/l	g/l	g/l
	Agar - Agar	7	7	7
	Sacarosa	30	30	30
	pH	5.7	5.7	5.7
	Reguladores de crecimiento	mg/l	mg/l	mg/l
	BAP	0.5	1	-
	ANA			0.02
	AG3	-	0.25	0.5

3.4.2.2.- Diseño Estadístico Fase Multiplicación

Para la presente investigación en la fase de multiplicación se usó el diseño experimental completamente al azar de acuerdo al siguiente orden:

Diseño: Completamente al azar con arreglo bifactorial dos por tres

Factor A: 2 variedades (Maru y Kaliteri)

Factor B: 3 medios de cultivo (Medio base Murashigue & Skoog, con variación en fitorreguladores)

N° de repeticiones: 3

N° de tratamientos: 6

Unidad experimental: 1 frasco (20 vitroplantas por frasco)



Foto N° 6 vitroplantas

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Debido a que en nuestro medio no se cuenta con protocolos de establecimiento y multiplicación del cultivo del orégano in vitro, por lo que se desconoce el medio en el cual se desarrolle adecuadamente el cultivo, por lo que probamos diferentes dosis de reguladores de crecimiento, los resultados los detallamos a continuación:

4.1 FASE DE ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO

4.1.1. Porcentaje de Regeneración

Cuadro N° 4 Porcentaje de Regeneración

TRATAM./REP		I	II	III	Σ	X
V1	M1	50	75	75	200	66,67
	M2	100	50	75	225	75,00
	M3	50	75	75	200	66,67
	M4	50	75	75	200	66,67
V2	M1	75	75	75	225	75,00
	M2	75	100	75	250	83,33
	M3	75	75	100	250	83,33
	M4	75	75	75	225	75,00
Σ	Σ Blog.	550	600	625	1775	591,67
X						73,96

En el cuadro nos muestra los resultados del porcentaje de regeneración de los explantes, obteniendo el mayor porcentaje de regeneración los tratamientos V2M2 , V2M3 con un 83.33 % seguido de los tratamientos V1M2, V2M1, V2M4 con 75 % y por último los tratamientos V1M1, V1M3, V1M4 con 66.67 % .

Cuadro N° 5. Porcentaje de Regeneración por Variedades y Medios de Cultivo

Varied/medio	M1	M2	M3	M4	Σ	X
V1	200	225	200	200	825	68,8
V2	225	250	250	225	950	79,2
Σ	425	475	450	425	1775	
X	70,8	79,2	75,0	70,8		

El mayor porcentaje de regeneración lo presenta la V2 (Kaliteri) con 79.2 % y el menor porcentaje lo tiene la V1 (Maru) con un 68.8 %. Tomando en cuenta los medios de cultivo tenemos que el mayor porcentaje de regeneración se logró con el medio de cultivo M2 (BAP 0.5 mg/l) con 79.2 %, siguiendo en importancia el medio del cultivo M3 (BAP 1.0 mg/l) con 75.0 % y por último el que obtuvo el resultado más bajo en regeneración es el medio M1 (BAP 0.25mg/l) y el medio M4 (BAP 1.5 mg/l) con 70.8 %.

Cuadro N° 6 Análisis de Varianza para el Porcentaje de Regeneración

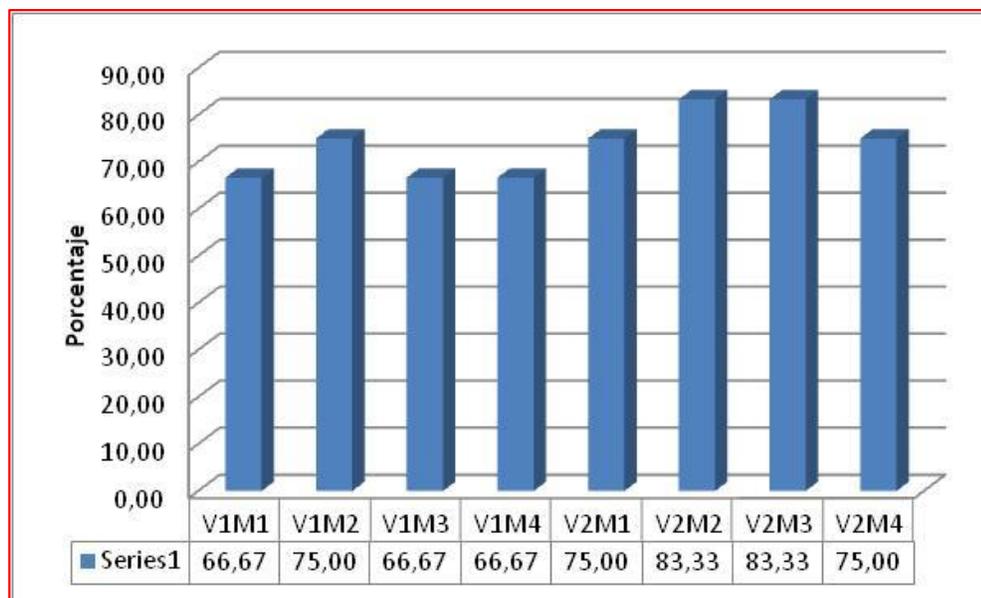
Fv	gl	SC	CM	F _C	F _T 5%	F _T 1%
TOTAL	23	13562.5				
REPETICIONES	2	364,6	182,3	0.860	3,74	6,51
TRATA	7	1015,6	145,1	0.064	2,77	4,28
ERROR	14	2968,8	212,1			
Fact.Var	1	651.03	651.03	3.07	4,6	8,86
Fact.MC	3	286,5	95,5	0.450	3,34	5,56
MC/Var	3	286.45	26.05	0.123	3,34	5,56
CV (%)						19.69

Fuente: Elaboración propia

Observando el análisis de varianza vemos que no existen diferencias significativas en el factor variedad, factor medio de cultivo, ni en las repeticiones. Tomando en cuenta el valor de la F calculada, podemos observar que son valores menores que la F tabulada, por lo que no es necesario llevar a cabo la comparación de medias.

El promedio general del porcentaje de regeneración fue de 73.96 %, con un coeficiente de variación de 19.69 % adecuado para esta investigación.

Grafica N° 1: Efecto de los medios de cultivo y variedades en porcentaje de regeneración



En el gráfico N° 1 podemos observar de que el mejor tratamiento se presentó con la variedad Kaliteri, más la dosis de 0.5 mg/l de BAP, nos muestra que la variedad kaliteri presenta mayor capacidad de quiebre de la dominancia apical, en comparación de la variedad Maru.

Aguirre, et.al. 2010, Indica que este método de multiplicación incluye a la mayoría de los sistemas de micropropagación, incluyendo la quiebra de la dominancia apical con la aplicación de citoquininas exógenas. Depende de la especie o variedad que presente capacidad de elongación y formación de hojas.

4.1.2. Tiempo de Brotación, Número de Días

Cuadro N° 7 Efecto de los Medios de Cultivo y Variedades en el Tiempo de Brotación

TRATAM./REP		I	II	III	Σ	X
V1	M1	5	6,67	8,33	20	6,67
	M2	5	5	6,67	16,67	5,56
	M3	5	6,67	5	16,67	5,56
	M4	5	8,3	5	18,3	6,10
V2	M1	5	5	5	15	5,00
	M2	5	7,5	6,67	19,17	6,39
	M3	5	6,67	5	16,67	5,56
	M4	10	8,3	5	23,3	7,77
Σ	Σ Blog.	45	54,11	46,67	145,78	48,59
X						6,07

En el cuadro nos muestra los resultados del tiempo en brotación de los explantes, se tiene: El menor tiempo de brotación fue del tratamiento V2M1 con 5 días, siguiendo en tiempo los tratamientos V1M2, V1M3 y V2M3 todos con 5.56 días y el de mayor tiempo de brotación el tratamiento V2M4 con 7,77 días.

Cuadro N° 8 Tiempo de Brotación por Variedades y Medios de Cultivo

Varied/medio	M1	M2	M3	M4	Σ	X
V1	20	16,67	16,67	18,3	71,64	6,0
V2	15	19,17	16,67	23,3	74,14	6,2
Σ	35	35,84	33,34	41,6	145,78	
X	5,8	6,0	5,6	6,9		

El menor tiempo de brotación lo presenta la V1 (Maru) con 6.0 días y el mayor valor lo tiene la V2 (Kaliteri) con un tiempo de 6.2 días. Tomando en cuenta los medios de cultivo tenemos que el menor tiempo en brotar se obtuvo con el medio de cultivo M3 (BAP 1.0 mg/l) con 5.6 días, siguiendo en importancia el medio del cultivo M1 (BAP 0.25 mg/l) con 5.8 días y por último el que alcanzó el resultado más alto en número de días de brotación es el medio M4 (BAP 1.5mg/l) con 6.9 días, seguido del medio M2 (BAP 0.5mg/l) con 6.0 días.

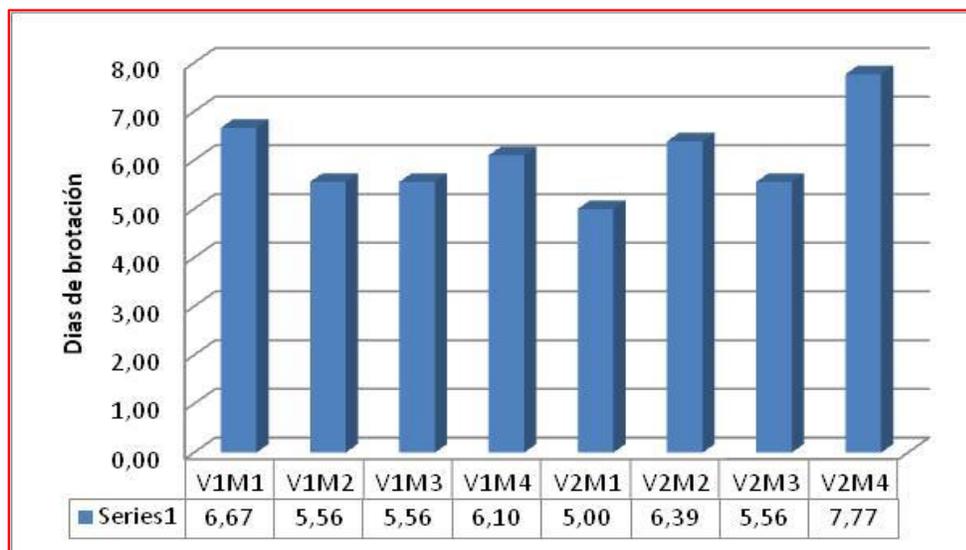
Cuadro N° 9 Análisis de Varianza para el Tiempo de Brotación

Fv	gl	SC	CM	F _c	F _T 5%	F _T 1%
TOTAL	23	95,86				
REPETICIONES	2	5,88	2,94	1,44	3,74	6,51
TRATA	7	15,82	2,26	1,10	2,77	4,28
ERROR	14	28,67	2,04			
Fact.Var	1	0,26	0,24	0,13	4,6	8,86
Fact.MC	3	6,44	2,14	1,05	3,34	5,56
MC/Var	3	9,11	3,04	1,48	3,34	5,56
CV %						23,56

Al establecer el análisis de variancia para los tiempos de brotación, (Cuadro 7). Podemos establecer estadísticamente que en los días que se presentó la brotación no se presentan diferencias significativas entre los tratamientos, factores, ni mucho menos en la interacción de ambos factores. Tomando en cuenta el valor de la F calculada, podemos observar que son valores menores que la F tabulada, por lo que no es necesario llevar a cabo la comparación de medias.

El promedio general del tiempo de brotación fue de 6.07 días, con un coeficiente de variación de 23.56 % adecuado para esta investigación.

Grafica N° 2 Efecto de los Medios de Cultivo y Variedades en el Tiempo de Brotación



En la gráfica podemos observar que los tiempos de brotación se encuentran en un rango de 5 a 7.7 días, donde el tratamiento con menor tiempo de brotación fue del tratamiento V2M1 con 5 días y el de mayor tiempo de brotación el tratamiento V2M4 con 7.77 días.

Aguirre G et al, 2010, Indica que con respecto a los fitorreguladores las citoquininas constituyen un grupo indispensable para la quiebra de la dominancia apical. La BAP (Bencil amino purina) en concentraciones de 0.1 a 0.5 mg/l es la citoquinina más eficaz para la multiplicación de diferentes especies.

4.1.3. Longitud de los Brotes a los 15 Días del Establecimiento

Los Mismos se presentan en el cuadro siguiente:

Cuadro N° 10 Longitud de los Brotes a los 15 Días

TRATAM/REP		I	II	III	Σ	X
V1	M1	0,8	0,9	1,1	2,8	0,93
	M2	1,1	1,1	0,9	3,1	1,03
	M3	0,8	0,7	1,3	2,8	0,93
	M4	0,5	0,8	1,3	2,6	0,87
V2	M1	0,8	0,7	1,4	2,9	0,97
	M2	1,4	0,6	1,3	3,3	1,10
	M3	0,6	0,7	0,7	2	0,67
	M4	0,8	0,6	1,5	2,9	0,97
Σ	Σ Blog.	6,8	6,1	9,5	22,4	7,47
X						0,93

Con relación al tamaño de los brotes a los 15 días, se tiene: el brote de mayor tamaño lo presenta el tratamiento V2M2 con 1.10 cm de largo, siguiendo en importancia el tratamiento V1 M2 con 1.03 cm de largo y el de menor tamaño se presenta en el tratamiento V2M3 con una longitud de 0.67 cm.

Cuadro N° 11 Longitud de los Brotes a los 15 Días por Variedades y Medios de Cultivo

Varied/medio	M1	M2	M3	M4	Σ	X
V1	2,8	3,1	2,8	2,6	11,3	0,9
V2	2,9	3,3	2	2,9	11,1	0,9
Σ	5,7	6,4	4,8	5,5	22,4	
X	1,0	1,1	0,8	0,9		

Este cuadro nos muestra el tamaño de los brotes a los 15 días por variedad y medios de cultivo, donde se tiene:

El tamaño en longitud de brotes a los 15 días es similar en las dos variedades V1 (Maru) y V2 (Kaliteri) con 0.9 cm. de largo. En cuando a los medios de cultivo, el medio que obtuvo el tamaño más largo es el medio M2 (BAP 0.5 mg/l) con 1.1 cm, seguido del medio M1 (BAP 0.25 mg/l) con 1.0 cm, posteriormente el medio M4 (BAP 1.5 mg/l) con 0.9 cm y finalmente el medio M3 (BAP 1.0 mg/l) con 0.8 cm de largo.

Cuadro N° 12 Análisis de Varianza para la Longitud de los Brotes a los 15 Días

Fv	gl	SC	CM	F_C	F_T 5%	F_T 1%
TOTAL	23	22,98				
REPETICIONES	2	0,81	0,40	6,13	3,74	6,51 *
TRATA	7	0,35	0,05	0,75	2,77	4,28
ERROR	14	0,92	0,07			
Fact.Var	1	0,002	0,002	0,03	4,6	8,86
Fact.MC	3	0,22	0,07	1,09	3,34	5,56
MC/Var	3	0,13	0,04	0,650	0,65	5,56
CV (%)						27,48

El análisis de varianza para la variable longitud de los brotes o explantes a los 15 días, se pudo establecer estadísticamente que no se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos evaluados para los factores variedades (V) y medios de cultivo (M), ni tampoco para la interacción variedades x medios (VxM). Pero si se encuentra diferencia significativa para las repeticiones. Por lo que es necesario llevar a cabo la comparación de medias. El coeficiente de variación fue de 27.48 % y la media general de los brotes a los 15 días fue de 0.93 cm.(cuadro N°10).

Hurtado D. 1994, indica que las investigaciones donde se emplea la técnica de cultivo de tejidos vegetales, generalmente se utiliza el diseño completamente al azar, puesto que el material experimental es homogéneo, usado para determinar cuál es el medio de cultivo adecuado para meristemas, yemas, hojas, anteras o embriones.

Al no presentarse diferencias en los tratamientos que son los únicos factores de variación controlada en nuestro trabajo de investigación, consideramos que la diferencia que se presenta en las repeticiones es probable a las diferentes intensidades lumínicas que se muestran en los extremos de la cámara de crecimiento.

Prueba de DMS

Esta prueba ideada por Fisher, no debe ser utilizada a menos que la prueba F sea significativa (DMS) solo debe emplearse para comparar medias en un arreglo ordenado –medias dispuestas por orden de magnitud (Rodríguez, 2000)

$$S = \frac{\sqrt{2*CM}}{3} \quad DMS = 0.12* 1.345 \text{ (valor tabla)}$$

$$S = \frac{\sqrt{2*0.07}}{3} = 0.12 \quad DMS = 0.12$$

Cuadro N°13 Distribución de frecuencias

$X_a - X_b > MDS*$ Cualquier diferencia entre dos medias que sea mayor a DMS será significativa.

MDS=0.12		V2M2	V1M2	V2M1	V2M4	V1M1	V1M3	V1M4
		1,10	1,03	0,97	0,97	0,93	0,93	0,87
V2M3	0,67	0,43	0,36	0,30	0,30	0,26	0,26	0,20
V1M4	0,87	0,23	0,16	0,10	0,10	0,06	0,06	
V1M1	0,93	0,17	0,10	0,04	0,04	0,00		
V1M3	0,93	0,17	0,10	0,04	0,04			
V2M1	0,97	0,13	0,06	0,00				
V2M4	0,97	0,13	0,06					
V1M2	1,03	0,07						

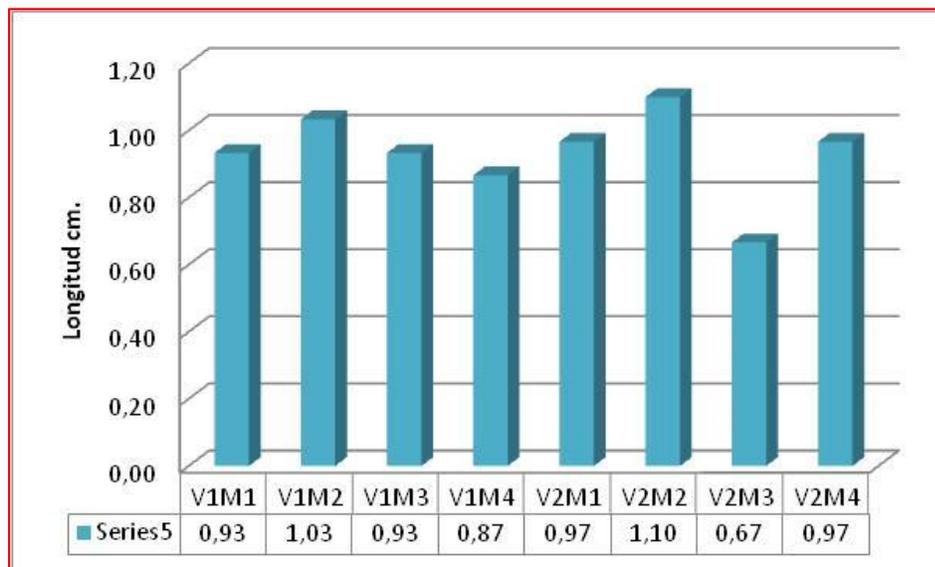
Cuadro N° 14 Tratamientos y su Respectiva Media de Tamaño Brotes a los 15 Días

Letras iguales según DMS *

N°	TRAT.	DESCRIPCION	M	RANGO
1	V2M2	Variedad Kaliteri + medio 2 BAP 0,5 mg/l	1,10	a
2	V1M2	Variedad Maru + medio 2 BAP 0,5 mg/l	1,03	ab
3	V2M1	Variedad Kaliteri + medio 2 BAP 0,25 mg/l	0,97	bc
4	V2M4	Variedad Kaliteri + medio 2 BAP 1,5 mg/l	0,97	bc
5	V1M1	Variedad Maru + medio 2 BAP 0,25 mg/l	0,93	bc
6	V1M3	Variedad Maru + medio 2 BAP 1,0mg/l	0,93	bc
7	V1M4	Variedad Maru + medio 2 BAP 1,5 mg/l	0,87	c
8	V2M3	Variedad Kaliteri + medio 2 BAP 1,0 mg/l	0,67	d

En el presente cuadro podemos deducir que: con la prueba de DMS, nos muestra que los tratamientos son. (V2M2, V1M2), pero presentando diferencias significativas con los tratamientos (V2M1, V2M4, V1M1, V1M3 Y V1M4), con la excepción del tratamiento V2 M3 que es diferente significativamente con los demás tratamientos.

Gráfica N°3 Efecto de los Medios de Cultivo y Variedades en el Tamaño de Brotación a los 15 Días



En el presente gráfico nos muestra el tamaño de los brotes a los 15 días, donde el tratamiento V2M2 (Variedad Kaliteri + 0.5 mg/l de BAP) alcanzando un valor de 1.1

cm. mientras que el valor inferior corresponde al tratamiento V2M3 (Variedad Kaliteri + 1.0 mg/l de BAP) con un tamaño de 0.67 cm.

4.1.4. Longitud de los Brotes a los 30 Días del Establecimiento

Cuadro N° 15 Longitud de los Brotes a los 30 Días del Establecimiento

TRATAM/REP		I	II	III	Σ	X
V1	M1	5,1	6,1	6,1	17,3	5,77
	M2	6,4	5,3	7,2	18,9	6,30
	M3	7,4	6,1	6	19,5	6,50
	M4	3,1	4,5	4,3	11,9	3,97
V2	M1	6,1	6,2	6,1	18,4	6,13
	M2	7,5	6,4	6,5	20,4	6,80
	M3	4,3	5,6	3,4	13,3	4,43
	M4	3,8	2,9	1,6	8,3	2,77
Σ	Σ Blog.	43,7	40,01	34,17	128	42,67
X						5,33

Con relación al tamaño de los brotes a los 30 días, el brote que obtuvo el mayor tamaño fue el tratamiento V2M2 con 6.80 cm de largo seguido del tratamiento V1M3 con 6.50 cm de largo y el tratamiento que presento el menor tamaño fue el tratamiento V2M4 con 2.77 cm de largo

Cuadro N° 16 Longitud de los Brotes a los 30 días por Variedades y Medios de Cultivo

Varied/medio	M1	M2	M3	M4	Σ	X
V1	17,3	18,9	19,5	11,9	67,6	5,6
V2	18,4	20,4	13,3	8,3	60,4	5,0
Σ	35,7	39,3	32,8	20,2	128	
X	6,0	6,6	5,5	3,4		5,3

Este cuadro nos muestra el tamaño de los brotes a los 30 días por variedad y medios de cultivo, donde se tiene:

El tamaño en longitud de brotes a los 30 días es diferente en las dos variedades, la V1 (Maru) con 5.6 y V2 (Kaliteri) con 5.0 cm. de largo. En cuando a los medios de cultivo, el medio que obtuvo el tamaño más largo es el medio M2 (BAP 0.5 mg/l) con

6.6 cm, seguido del medio M1 (BAP 0.25 mg/l) con 6.0 cm, posteriormente el medio M3 (BAP 1.0 mg/l) con 5.5 cm y finalmente el medio M4 (BAP 1.5 mg/l) con 3.4 cm de largo.

Cuadro N°17 Análisis de Varianza para la Longitud de los Brotes a los 30 Días

Fv	gl	SC	CM	F _C	F _T 5%	F _T 1%	
TOTAL	23	7.36					
REPETICIONES	2	0.43	0.21	0.29	3,74	6,51	
TRATA	7	43,62	6,23	8.67	2,77	4,28	**
ERROR	14	10.08	0.72				
Fact.Var	1	2.16	2.16	3.04	4,6	8,86	
Fact.MC	3	34.48	11,49	15.99	3,34	5,56	**
MC/Var	3	6.98	2.33	3.24	3,34	5,56	
CV (%)						15.90	

El análisis de varianza para la variable tamaño de los brotes o explantes a los 30 días, se pudo establecer estadísticamente que no se encuentran diferencias significativas para los factores variedades (V), repeticiones ni en la interacción de ambos factores. Pero si se presentan diferencias altamente significativas para los tratamientos y el factor medio de cultivo. Obteniendo un coeficiente de variación de 15.99 %

Prueba de DMS

$$S = \frac{\sqrt{2*CM}}{3}$$

MDS = 0.39 * 1.345

$$S = \frac{\sqrt{2*0.72}}{3} = 0.29$$

MDS = 0.54

Cuadro N° 18 Distribución de Frecuencias

$X_a - X_b > \text{MDS}^*$ Cualquier diferencia entre dos medias que sea mayor a DMS será significativa.

MDS=0.54		V2M2	V1M3	V1M2	V2M1	V1M1	V2M3	V1M4
		6,80	6,50	6,30	6,13	5,77	4,43	3,97
V2M4	2,77	4,03	3,73	3,53	3,36	3,00	1,66	1,20
V1M4	3,97	2,83	2,53	2,33	2,16	1,80	0,46	
V2M3	4,43	2,37	2,07	1,87	1,70	1,34		
V1M1	5,77	1,03	0,73	0,53	0,36			
V2M1	6,13	0,67	0,37	0,17				
V1M2	6,30	0,50	0,20					
V1M3	6,50	0,30						

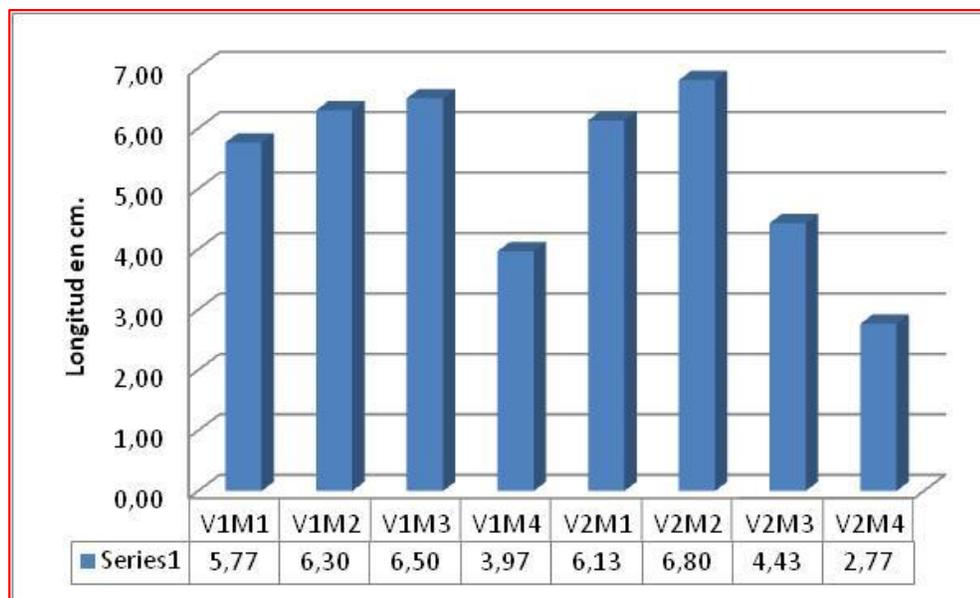
Cuadro N° 19 Tratamientos y su Respectiva Media de Tamaño de Brotes a los 30 Días

Letras iguales según DMS *

N°	TRAT.	DESCRIPCION	CM	RANGO
1	V2M2	Variedad Kaliteri(M2 BAP 0,5 mg/l)	6,80	a
2	V1M3	Variedad Maru (M3 BAP 1,0 mg/l)	6,50	ab
3	V1M2	Variedad Maru (M2 BAP 0,5 mg/l)	6,30	abc
4	V2M1	Variedad kaliteri(M1 BAP 0,25 mg/l)	6,13	bc
5	V1M1	Variedad Maru (M1 BAP 0,25 mg/l)	5,77	c
6	V2M3	Variedad Kaliteri (M3 BAP 1,0 mg/l)	4,43	d
7	V1M4	Variedad Maru (M4 BAP 1,5 mg/l)	3,97	d
8	V2M4	Variedad Kaliteri (M4 BAP 1,5 mg/l)	2,77	e

En el presente cuadro podemos deducir que: la tabla de promedios indica tres mejores tratamientos (V2M2, V1M3, V1M2) no presentan diferencias significativas, los siguientes tratamientos (V2M3, V1M4 y V2M4) son significativamente diferentes del resto.

Gráfica N° 4 Efecto de los Medios de Cultivo y Variedades en el Tamaño de los Brotes a los 30 Días



En el presente gráfico nos muestra la longitud de los brotes a los 30 días, donde el tratamiento V2M2 (Variedad Kaliteri + 0.5 mg/l de BAP) alcanzando un valor de 6.80 cm. mientras que el valor inferior corresponde al tratamiento V2M4 (Variedad Kaliteri + 1.5 mg/l de BAP) con un tamaño de 2.77 cm.

4.2. FASE DE MULTIPLICACIÓN

4.2.1. Longitud de las Plantas a los 15 Días

Cuadro N° 20 Longitud Plantas a los 15 Días

TRATAM./REP		I	II	III	Σ	X
V1	M1	2	2,2	2,1	6,30	2,10
	M2	2,3	1,8	1,9	6,00	2,00
	M3	2,5	3,3	2,3	8,10	2,70
V2	M1	1,7	1,3	1,9	4,90	1,63
	M2	0,8	1,2	0,2	2,20	0,73
	M3	1,5	0,9	1,1	3,50	1,17
Σ	Σ Blog.	10,8	10,7	9,5	31,00	10,33
X						1,72

En el cuadro nos muestra los resultados de longitud de las plantas a los 15 días, obteniendo el mayor tamaño el tratamiento V1M3 con 2.70 cm de longitud, seguido del tratamiento V1M1 con 2.10 cm y el tratamiento V1M2 con 2.00 cm de longitud, por último el de menor tamaño fue el tratamiento V2M2 con 0.73 cm.

Cuadro N° 21 Longitud Plantas a los 15 días por Variedades y Medios de Cultivo

Variedad/medio	M1	M2	M3	Σ	X
V1	6,30	6,00	8,10	20,40	2,3
V2	4,90	2,20	3,50	10,60	1,2
Σ	11,20	8,20	11,60	31,00	
X	1,9	1,4	1,9		

La mayor longitud de las plantas a los 15 días lo presenta la V1 (Maru) con 2.3 cm y la menor longitud lo expone la V2 (Kaliteri) con 1.2 cm. Tomando en cuenta los medios de cultivo tenemos que la mayor longitud se obtuvo con el medio de cultivo M1 (BAP 0.5 mg/l) y el medio M3 (ANA 0.02 mg/l + AG3 0.5 mg/l) con 1.9 cm, y por último el medio del cultivo M2 (BAP 1.0 mg/l + AG3 0.25 mg/l) con 1.4 cm de longitud.

Cuadro N° 22 Análisis de Varianza para la Longitud de Plantas a los 15 Días

Fv	gl	SC	CM	F _C	F _T 5%	F _T 1%
TOTAL	17	62.4				
REPETICIONES	2	0.17	0.08	0.61	4.10	7.56
TRATA	5	7.41	1.48	10.39	3.33	5.64 **
ERROR	10	1.43	0.14			
Fact.Var	1	5.33	5.33	37.46	4.96	10 **
Fact.MC	2	1.15	0.58	4.237	4.1	7.56 *
MC/Var	2	0.92	0.46	3.24	4.1	7.56
CV (%)						21.92

Al establecer el análisis de variancia para la longitud de las plantas a los 15 días, (Cuadro 24). Podemos establecer estadísticamente que no se presentan diferencias significativas entre las repeticiones y la interacción entre medio de cultivo y variedad.

Tomando en cuenta el valor de la F calculada, podemos observar que son valores mayores que la F tabulada, pero se exponen diferencias altamente significativas entre los tratamientos, variedades y medios de cultivo por lo que es necesario llevar a cabo la comparación de medias.

El tamaño promedio de las plantas a los 15 días fue de 1.72 cm, con un coeficiente de variación de 21.92 % adecuado para esta investigación.

Prueba de DMS

$$S = \frac{\sqrt{2*CM}}{3}$$

$$MDS = 0.178 * 1.345 \text{ (Valor tabla)}$$

$$S = \frac{\sqrt{2*0.14}}{3} = 0.178$$

$$MDS = 0.24$$

Cuadro N° 23 Distribución de Frecuencias

$X_a - X_b > MDS^*$ Cualquier diferencia entre dos medias que sea mayor a DMS será significativa.

MDS=0,24		V1M3	V1M1	V1M2	V2M1	V2M3	V2M2
		2,70	2,10	2,00	1,63	1,17	0,73
V2M2	0,73	1,97	1,37	1,27	0,90	0,44	0,00
V2M3	1,17	1,53	0,93	0,83	0,46	0,00	
V2M1	1,63	1,07	0,47	0,37	0,00		
V1M2	2,00	0,70	0,10	0,00			
V1M1	2,10	0,60	0,00				
V1M3	2,70	0,00					

Cuadro N° 24 Tratamientos y su Respectiva Media para la Longitud de Plantas a los 15 Días

Letras iguales según DMS *

N°	TRAT.	DESCRIPCION	CM	RANGO
1	V1M3	Variedad Maru M3(ANA 0,02 mg/l + AG3 0,5 mg/l)	2,70	a
2	V1M1	Variedad Maru M1(BAP 0,5 mg/l)	2,10	b
3	V1M2	Variedad Maru M2(BAP 1mg/l + AG3 0,25 mg/l)	2,00	b
4	V2M1	Variedad Kaliteri M1(BAP 0,5 mg/l)	1,63	c
5	V2M3	Variedad Kaliteri M3(ANA 0,02 mg/l +AG3 0,5 mg/l)	1,17	d
6	V2M2	Variedad Kaliteri M2(BAP 1 mg/l +AG3 0,25 mg/l)	0,73	e

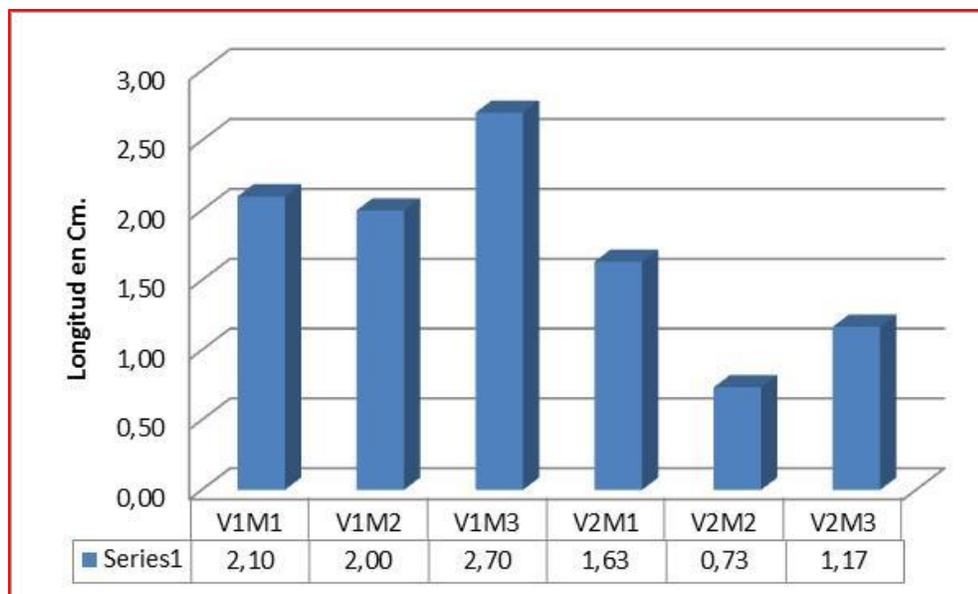
De acuerdo a la prueba de MDS, podemos observar que existen diferencias significativas entre el tratamiento V1M3 frente a los demás tratamientos, los tratamientos V1M1 y V1M2 son similares, y los tratamientos V2M1, V2M3 y V2M2 presentan diferencias significativas.

Podemos observar que en la fase de multiplicación, la que tiene mejor respuesta es la variedad Maru, pero analizando los fitorreguladores usados, podemos observar que no se presentan diferencias significativas con el uso de ANA (ácido naftalen acético) + AG3 (Ácido giberelico), en comparación del uso de BAP (Bencil amino purina).

Hasenwaga. 1980 citado por Aguirre. et.al. 2010, Respecto a los fitorreguladores las citoquininas constituyen un grupo indispensable para la quiebra de la dominancia apical y la inducción de yemas axilares. La BAP (Bencil amino purina) en concentraciones de 0.1 a 0.5 mg/l es la citoquinina más eficaz para promover la multiplicación de diferentes especies, siendo además la más económica de todas.

Aguirre. et.al. 2010 indica que complementariamente las auxinas son utilizadas para estimular el crecimiento de las partes aéreas. Las concentraciones son frecuentemente bajas comparadas a las citoquininas, balance auxina/citoquinina menor a 1. Las giberelinas son usadas en la fase de multiplicación en algunas especies, donde se requiere el alongamiento de la parte aérea para la multiplicación de los entrenudos.

Gráfica N° 5 Efecto de los Medios de Cultivo y Variedades en la Longitud de las Plantas a los 15 Días



En el presente gráfico nos muestra la longitud de las plantas a los 15 días donde se pudo observar que el tratamiento V1M3 (Variedad Maru +ANA 0.02 mg/l +AG3 0.5 mg/l) Alcanzó el mayor tamaño con 2.70 cm de longitud seguido de los tratamientos V1M1 con 2.10 cm, y el tratamiento V1M2 con 2 cm, por último los tratamientos de la variedad V2 (Variedad Kaliteri).

4.2.2. Longitud de las Plantas a los 30 Días

Cuadro N° 25 Longitud Plantas a los 30 Días

TRATAM/REP	I	II	III	Σ	X
M1	3,2	3,4	3,2	9,8	3,27
M2	3,9	2,6	3	9,5	3,17
M3	4,3	5,04	4,4	13,74	4,58
M1	1,8	1,5	2,1	5,4	1,80
M2	1,6	2,2	1,6	5,4	1,80
M3	1,5	1,6	2,7	5,8	1,93
Σ Blog.	16,3	16,34	17	49,64	16,55
					2,76

En el cuadro nos muestra los resultados de longitud de las plantas a los 30 días, obteniendo el mayor tamaño el tratamiento V1M3 con 4.58 cm de longitud, seguido

del tratamiento V1M1 con 3.27 cm y el tratamiento V1M2 con 3.17 cm de longitud, por último los de menor tamaño fueron los tratamientos V2M1 y V2M2 con 1.80 cm.

Cuadro N° 26 Longitud Plantas a los 30 días por Variedades y Medios de Cultivo

Varied/medio	M1	M2	M3	Σ	X
V1	9,8	9,5	13,74	33,04	3,7
V2	5,4	5,4	5,8	16,6	1,8
Σ	15,2	14,9	19,54	49,64	
X	2,5	2,5	3,3		

La mayor longitud de las plantas a los 30 días lo presenta la V1 (Maru) con 3.7 cm y la menor longitud lo presenta la V2 (Kaliteri) con 1.8 cm. Tomando en cuenta los medios de cultivo tenemos que la mayor longitud se obtuvo con el medio de cultivo M3 (ANA 0.02 mg/l + AG3 0.5 mg/l) con 3.3 cm y por último los medios de cultivo M1 (BAP 0.5 mg/l) y M2 (BAP 1 mg/l + AG3 0.25 mg/l) con 2.5 cm de longitud.

Cuadro N° 27 Análisis de Varianza para la Longitud de Plantas a los 30 Días

Fv	gl	SC	CM	F _C	F _T 5%	F _T 1%	
TOTAL	17	158.22					
REPETICIONES	2	0.05	0,03	0,10	4,1	7,56	
TRATA	5	18,78	3,76	15,08	3,33	5,64	**
ERROR	10	2,49	0,25				
Fact.Var	1	15.01	15.01	60.28	4,96	10	**
Fact.MC	2	2.25	1,12	4,51	4,1	7,56	*
MC/Var	2	1.52	0.76	3.05	4,1	7,56	
CV (%)						18.10	

Al establecer el análisis de varianza para la longitud de las plantas a los 30 días, (Cuadro 31). Podemos instaurar estadísticamente que se presentan diferencias altamente significativas entre los tratamientos y el factor variedad, tomando en cuenta el valor de la F calculada, podemos observar que son valores mayores que la F tabulada. Se presentan diferencias significativas entre el factor medio de cultivo. Por lo que es necesario llevar a cabo la comparación de medias.

El tamaño promedio de las plantas a los 30 días fue de 2.76 cm, con un coeficiente de variación de 3.02 % adecuado para esta investigación.

Prueba de DMS

$$S = \frac{\sqrt{2*CM}}{3} \quad \text{MDS} = 0.23 * 1.345 \text{ (Valor tabla)}$$

$$S = \frac{\sqrt{2*0.25}}{3} = 0.23 \quad \text{MDS} = 0.32$$

Cuadro N° 28 Distribución de Frecuencias

$X_a - X_b > \text{MDS}^*$ Cualquier diferencia entre dos medias que sea mayor a DMS será significativa.

MDS=0,32		V1M3	V1M1	V1M2	V2M3	V2M1	V2M3
		4,58	3,27	3,17	1,93	1,80	1,80
V2M2	1,80	2,78	1,47	1,37	0,13	0,00	0,00
V2M1	1,80	2,78	1,47	1,37	0,13	0,00	
V2M3	1,93	2,65	1,34	1,24	0,00		
V1M2	3,17	1,41	0,10	0,00			
V1M1	3,27	1,31	0,00				
V1M3	4,58	0,00					

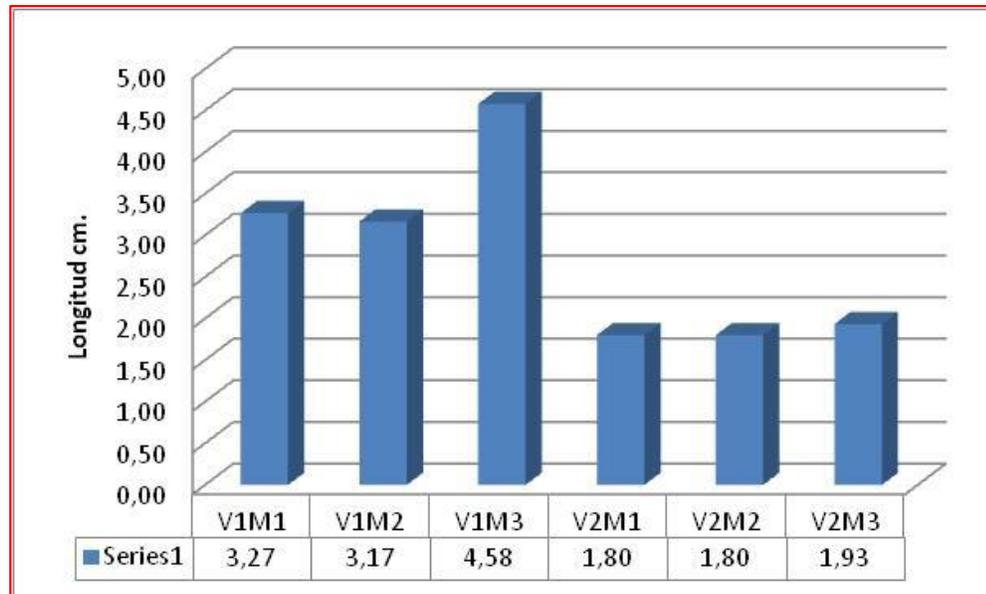
Cuadro N° 29 Tratamientos y su Respectiva Media para la Longitud de Plantas a los 30 Días

Letras iguales según DMS *

N°	TRAT.	DESCRIPCION	CM	RANGO
1	V1M3	Variedad Maru M3 (ANA 0,02 mg/l +AG3 0,5 mg/l)	4,58	a
2	V1M1	Variedad Maru M1 (BAB 0,5 mg/l)	3,27	ab
3	V1M2	Variedad Maru M2 (BAB 1 mg/l + AG3 0,25 mg/l)	3,17	b
4	V2M3	Variedad Kaliteri M3 (ANA 0,02 mg /l +AG3 0,5 mg/l)	1,93	c
5	V2M1	Variedad Kaliteri M1 (BAP 0,5 mg/l)	1,80	c
6	V2M2	Variedad Kaliteri M2 (BAP 1 mg/l +AG3 0,25 mg /l)	1,80	c

En el presente cuadro podemos deducir que, de acuerdo a las diferencias de medias indica que el mejor tratamiento es el V1M3, presentando diferencias significativas, con todos los tratamientos, pero los tratamientos V1M2 Y V1M1 presentan diferencias significativas con los tratamientos V2M3, V2M1 y V2M2.

Gráfica N° 6 Efecto de los Medios de Cultivo y Variedades en la Longitud de las Plantas a los 30 Días



En el presente gráfico nos muestra la longitud de las vitroplantas a los 30 días, donde el tratamiento V1M3 (Variedad Maru + 0.02 mg/l de ANA + 0.5 de AG3) alcanzando una mayor longitud de 4.58 cm. mientras que el valor inferior corresponde a los tratamientos V2M1 (Variedad Kaliteri + 0.5 mg/l de BAP) y V2M2 (Variedad Kaliteri + 1. mg/l de BAP + 0.25 mg/l de AG3) con una longitud de las vitroplantas de 1.80 cm.

La longitud de las plantas a los 15 días, presenta la misma respuesta de los tratamientos, la interacción de medios de cultivo y variedades como a los 30 días. Obteniéndose mayor longitud con la combinación de ANA y AG3.

Aguirre, et.al. 2010. Manifiesta que las auxinas son utilizadas para estimular el crecimiento de las partes aéreas. Las concentraciones son frecuentemente bajas comparadas a las citoquininas, balance auxina/citoquinina menor a 1. Las giberelinas son usadas en la fase de multiplicación en algunas especies, donde se requiere el alargamiento de la parte aérea para la multiplicación de los entrenudos.

4.2.3. Número de Yemas a los 15 Días

Cuadro N° 30 Número de Yemas a los 15 Días

TRATAM./REP		I	II	III	Σ	X
V1	M1	3	2	2	7	2,33
	M2	3	2	2	7	2,33
	M3	2	3	2	7	2,33
V2	M1	2	2	3	7	2,33
	M2	1	1	1	3	1,00
	M3	2	1	2	5	1,67
Σ	Σ Blog.	13	11	12	36	12,00
X						2,00

En el cuadro nos muestra los resultados de N° yemas a los a los 15 días, obteniendo el mayor N° de yemas los tratamiento V1M1, V1M2, V1M3 y V2M1 con 2 yemas por planta , seguido del tratamiento V2M2 y V2M3 con 1 yema por planta.

Cuadro N° 31 Número de Yemas a los 15 días por Variedades y Medios de Cultivo

Varied/medio	M1	M2	M3	Σ	X
V1	7	7	7	21	2,3
V2	7	3	5	15	1,7
Σ	14	10	12	36	
X	2,3	1,7	2,0		

El mayor N° de yemas por plantas a los 15 días lo presenta la V1 (Maru) con 2.3 yemas y el menor N° de yemas lo presenta la V2 (Kaliteri) con 1.7 yemas por planta. Tomando en cuenta los medios de cultivo tenemos que el mayor N° de yemas se obtuvo con el medio de cultivo M1 (BAP 0.5 mg/l) con 2.3 yemas, seguido del medio de cultivo M3 (ANA 0.02 mg/l + AG3 0.5 mg/l) con 2.00 yemas y por último el medio de cultivo M2 (BAP 1 mg/l + AG3 0.25 mg/l) con 1.7 yemas.

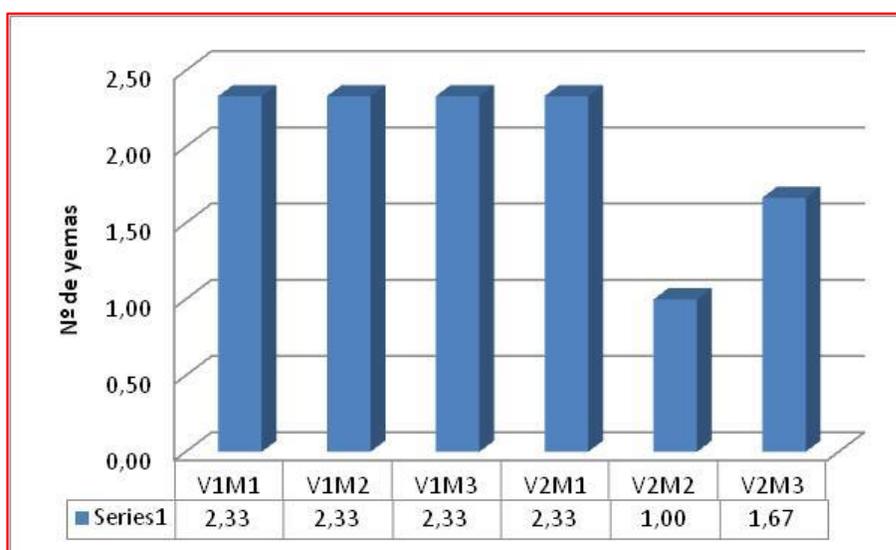
Cuadro N° 32 Análisis de Varianza para el Número de Yemas a los 15 Días

Fv	gl	SC	CM	F _c	F _T 5%	F _T 1%
TOTAL	17	80				
REPETICIONES	2	0,33	0,16	0,55	4,1	7,56
TRATA	5	4,66	0,93	3,11	3,33	5,64
ERROR	10	3,0	0,3			
Fact.Var	1	2	2	3	4,96	10
Fact.MC	2	1,33	0,66	1	4,1	7,56
MC/Var	2	1,33	0,66	2,22	4,1	7,56
CV (%)						27,39

Al establecer el análisis de variancia para el N° de yemas a los 15 días, podemos establecer estadísticamente que no se presentan diferencias significativas entre las variedades, medio de cultivo, la interacción de ambos factores tomando en cuenta el valor de la F calculada es menor que la F tabulada tanto al 1 % como al 5 %. Por lo que no es necesario llevar a cabo la comparación de medias.

El N° promedio de yemas por plantas a los 15 días fue de 2 yemas, con un coeficiente de variación de 27.39 % adecuado para esta investigación.

Gráfica N° 7 Efecto de los Medios de Cultivo y Variedades para el N° de Yemas a los 15 Días



En la presente gráfica nos muestra el N° de yemas a los 15 días por planta donde los tratamientos (Variedad Maru), V1M1, V1M2, V1M3 y V2M1 presentando 2.33

yemas por planta y el tratamiento que obtuvo menor N° de yemas fue el tratamiento V2M2 (Variedad Kaliteri+ 1 mg/l de BAP + 0.25 mg/l de AG3) con 1.00 yemas por planta.

4.2.4. Número de Yemas a los 30 Días

Cuadro N° 33 Número de Yemas a los 30 Días

TRATAM/REP		I	II	III	Σ	X
V1	M1	5	5	6	16	5,33
	M2	7	5	6	18	6,00
	M3	6	6	6	18	6,00
V2	M1	3	3	3	9	3,00
	M2	3	3	1	7	2,33
	M3	1	2	3	6	2,00
Σ	ΣBlog.	25	24	25	74	24,67
X						4,11

En el cuadro nos muestra los resultados de N° yemas a los a los 30 días, obteniendo el mayor N° de yemas los tratamiento V1M2, V1M3 con 6 yemas por planta , seguido del tratamiento V1M1 con 5.33 yemas y finalmente los tratamientos con la variedad V2 (V2M1,V2M2 y V2M3).

Cuadro N° 34. Número de Yemas a los 30 días por Variedades y Medios de Cultivo

Varied/medio	M1	M2	M3	Σ	X
V1	16	18	18	52	5,8
V2	9	7	6	22	2,4
Σ	25	25	24	74	
X	4,2	4,2	4,0		

El mayor N° de yemas por plantas a los 30 días lo presenta la V1 (Maru) con 5.8 yemas y el menor N° de yemas lo presenta la V2 (Kaliteri) con 2.4 yemas por planta. Tomando en cuenta los medios de cultivo tenemos que el mayor N° de yemas se obtuvo con los medios de cultivo M1 (BAP 0.25 mg/l) y M2 (BAP1.0 mg/ + AG3 0.25 mg/l) con 4.2 yemas por planta, y por último el medio de cultivo M3 (ANA 0.025 mg/l + AG3 0.5 mg/l) con 4.00 yemas por planta.

Cuadro N° 35 Análisis de Varianza para el N° de Yemas a los 30 Días

Fv	gl	SC	CM	F _C	F _T 5%	F _T 1%
TOTAL	17	364				
REPETICIONES	2	0,11	5,55	0,07	4,1	7,56
TRATA	5	52,44	52,44	14,52	3,33	5,64
ERROR	10	7,22	0,72			
Fact.Var	1	50	50	69,23	4,96	10
Fact.MC	2	0,11	0,05	0,07	4,1	7,56
MC/Var	2	2,33	1,17	1,65	4,1	7,56
CV (%)						20,67

Al establecer el análisis de variancia para el N° de yemas a los 30 días, podemos establecer estadísticamente que se presentan diferencias altamente significativas entre los tratamientos y el factor variedad, tomando en cuenta el valor de la F calculada del factor variedad, podemos observar que son valores mayores que la F tabulada. Pero no se muestran diferencias significativas entre el factor medio de cultivo. Por lo que se realiza la prueba de comparación de medias.

El N° promedio de yemas por plantas a los 30 días fue de 4.11 yemas, con un coeficiente de variación de 20.67 % adecuado para esta investigación.

Prueba de DMS

$$S = \frac{\sqrt{2 \cdot CM}}{3} \quad \text{MDS} = 0.69 \cdot 1.3722 \text{ (Valor tabla)}$$

$$S = \frac{\sqrt{2 \cdot 0.7}}{3} = 0.69 \quad \text{MDS} = 0.95$$

Cuadro N° 36 Distribución de Frecuencias

$X_a - X_b > \text{MDS}^*$ Cualquier diferencia entre dos medias que sea mayor a DMS será significativa.

MDS= 0,95		V1M2	V1M3	V1M1	V2M1	V2M2
		6,00	6,00	5,33	3,00	2,30
V2M3	2,00	4,00	4,00	3,33	1,00	0,30
V2M2	2,30	3,70	3,70	3,03	0,70	
V2M1	3,00	3,00	3,00	2,33		
V1M1	5,33	0,67	0,67			
V1M3	6,00	0,00				

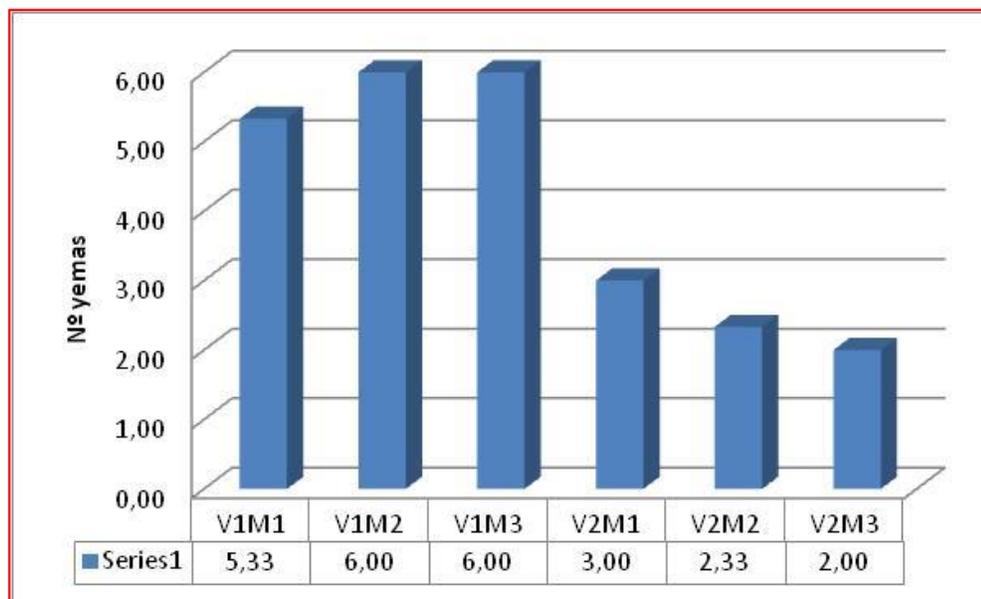
Cuadro N°37 Tratamientos y su Respectiva Media para el N° de Yemas a los 30 Días

Letras iguales según DMS *

N°	TRAT.	DESCRIPCION	M	RANGO
1	V1M2	Variedad Maru M2 (BAB 1 mg/l + AG3 0,25 mg/l)	6,00	a
2	V1M3	Variedad Maru M3 (ANA 0,02 mg/l +AG3 0,5 mg/l)	6,00	a
3	V1M1	Variedad Maru M1 (BAP 0,5 mg/l)	5,33	a
4	V2M1	Variedad Kaliteri M1 (BAP 0,5 mg/l)	3,00	b
5	V2M2	Variedad Kaliteri M3 (ANA 0,02 mg /l +AG3 0,5 mg/l)	2,30	b
6	V2M3	Variedad Kaliteri M2 (BAP 1 mg/l +AG3 0,25 mg /l)	2,00	c

En el presente cuadro se puede deducir que, de acuerdo a las diferencias de medias indica que los mejores tratamientos a los 30 días son el V1M1, V1M2 y V1M3, presentando diferencias significativas con los tratamientos V2M1, V2M2 y V2M3.

Gráfica N° 8 Efecto de los Medios de Cultivo y Variedades para el N° de Yemas a los 30 Días



En el presente gráfico nos muestra el N° de yemas a los 30 días donde: Los tratamientos de la variedad Maru, V1M2 y V1M3 presentan el número más alto de yemas por planta, seguido del tratamiento V1M1 con 5.33 yemas posteriormente se encuentran los tratamientos de la variedad Kaliteri, V2M1, V2M2 y V2M3.

La variedad Maru presenta una mejor respuesta a la formación de yemas, es decir expone una mayor tasa de multiplicación de 6, en comparación de la variedad Kaliteri, que presenta una tasa de 3.

Aguirre, et.al. 2010, manifiesta que el periodo de incubación más común entre repicajes es de cuatro semanas. Sin embargo este puede no ser un intervalo ideal para optimizar la tasa de multiplicación. En algunas especies o variedades que presentan periodos de adaptación más largos, requieren de periodos más largos de multiplicación.

4.2.5. Número de Brotes a los 30 Días

Cuadro N° 38 Número de Brotes a los 30 Días

TRATAM/REP		I	II	III	Σ	X
V1	M1	2	2	2	6	2,00
	M2	2	2	3	7	2,33
	M3	2	2	2	6	2,00
V2	M1	2	1	2	5	1,67
	M2	1	2	2	5	1,67
	M3	1	2	2	5	1,67
Σ	ΣBlog.	10	11	13	34	11,33
X						1,89

El presente cuadro nos muestra los resultados del N° de brotes a los 30 días, obteniendo el mayor N° de brotes el tratamiento V1M2 con 2.33 brotes por planta, seguido de los tratamientos V1M1 y V1M3 con 2 brotes por planta y por último los tratamientos de la variedad V2 con 1.67 brotes por plantas.

Cuadro N° 39 Número de Brotes a los 30 días por Variedades y Medios de Cultivo

Varied/medio	M1	M2	M3	Σ	X
V1	6	7	6	19	2,1
V2	5	5	5	15	1,7
Σ	11	12	11	34	
X	1,8	2,0	1,8		

El mayor N° de brotes por plantas a los 30 días lo presenta la V1 (Maru) con 2.1 brotes y el menor N° de brotes lo expone la V2 (Kaliteri) con 1.7 brotes por planta. Tomando en cuenta los medios de cultivo tenemos que el mayor N° de brotes se obtuvo con el medio de cultivo M2 (BAP 1.0 mg/l + AG3 0.25 mg/l) con 2.00 brotes y por último los medios M1 (BAP 0.5 mg/l) y el medio M3 (ANA 0.02 mg/l + AG3 0.5 mg/l) con 1.7 brotes por planta.

Cuadro N° 40 Análisis de Varianza para el N° de Brotes a los 30 Días

Fv	gl	SC	CM	F _C	F _T 5%	F _T 1%
TOTAL	17	68				
REPETICIONES	2	0,77	0,38	2,059	4,1	7,56
TRATA	5	1,11	0,22	1,18	3,33	5,64
ERROR	10	1,88	0,18			
Fact.Var	1	0,88	0,88	4,97	4,96	10
Fact.MC	2	0,11	0,05	0,29	4,1	7,56
MC/Var	2	0,11	0,02	0,29	4,1	7,56
CV (%)						23,01

Al establecer el análisis de variancia para el N° de brotes a los 30 días, podemos instaurar estadísticamente que se presentan diferencias significativas en el factor variedad, tomando en cuenta el valor de la F calculada del factor variedad, podemos observar que son valores mayores que la F tabulada. Pero no se muestran diferencias significativas entre el factor medio de cultivo. Por lo que se realiza la prueba de comparación de medias.

El N° promedio de brotes por plantas a los 30 días fue de 1.89 brotes, con un coeficiente de variación de 23.01 % adecuado para esta investigación.

Prueba de DMS

$$S = \frac{\sqrt{2 \cdot CM}}{3}$$

$$MDS = 0.20 \cdot 1.3722 \text{ (Valor tabla)}$$

$$S = \frac{\sqrt{2 \cdot 0.18}}{3} = 0.20$$

$$MDS = 0.28$$

Cuadro N° 41 Distribución de Frecuencias

$X_a - X_b > MDS^*$ Cualquier diferencia entre dos medias que sea mayor a DMS será significativa.

MDS= 0,28		V1M2	V1M1	V1M3	V2M1	V2M2
		2,33	2,00	2,00	1,67	1,67
V2M3	1,67	0,66	0,33	0,33	0,00	0,00
V2M2	1,67	0,66	0,33	0,33	0,00	
V2M1	1,67	0,66	0,33	0,33		
V1M3	2,00	0,33	0,00			
V1M1	2,00	0,33				

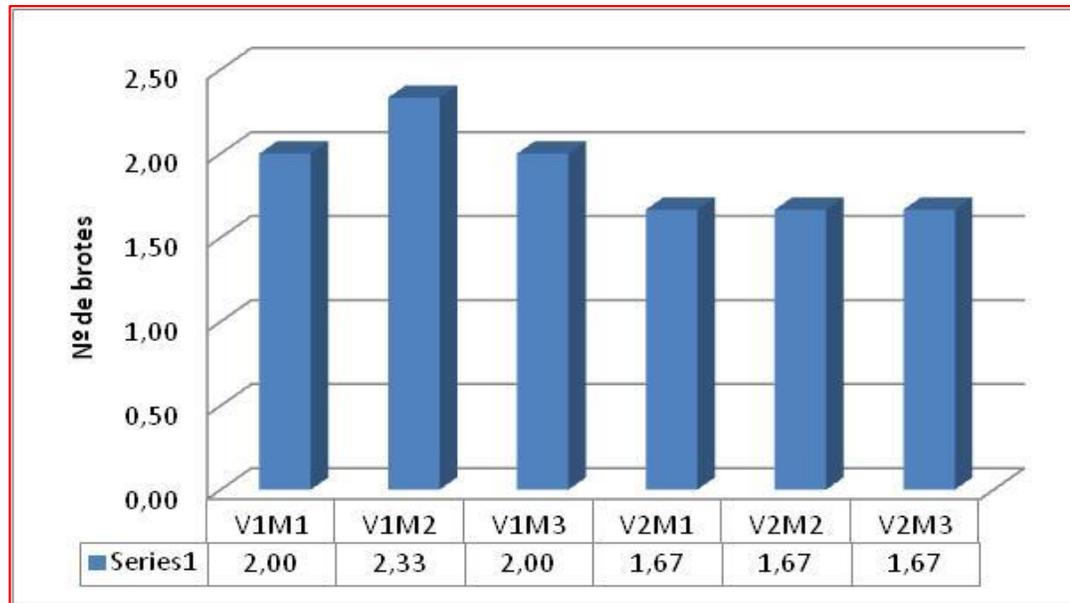
Cuadro N° 42 Tratamientos y su Respectiva Media para el N° de Brotes a los 30 Días

Letras iguales según DMS *

N°	TRAT.	DESCRIPCION	M	RANGO
1	V1M2	Variedad Maru M2 (BAB 1 mg/l + AG3 0,25 mg/l)	2,33	a
2	V1M1	Variedad Maru M1 (BAP 0,5 mg/l)	2,00	a
3	V1M3	Variedad Maru M3 (ANA 0,02 mg/l +AG3 0,5 mg/l)	2,00	a
4	V2M1	Variedad Kaliteri M1 (BAP 0,5 mg/l)	1,67	b
5	V2M2	Variedad Kaliteri M3 (ANA 0,02 mg /l +AG3 0,5 mg/l)	1,67	b
6	V2M3	Variedad Kaliteri M2 (BAP 1 mg/l +AG3 0,25 mg /l)	1,67	b

En el presente cuadro se puede deducir que de acuerdo a las diferencias de medias indica que los mejores tratamientos en N° de brotes a los 30 días son el tratamiento V1M2, V1M1 y V1M3, presentando diferencias significativas con los tratamientos V2M1, V2M2 y V2M3.

Gráfica N° 9 Efecto de los Medios de Cultivo y Variedades para el N° de Brotes a los 30 Días



En el presente gráfico evaluamos el N° de brotes que muestra cada planta a los 30 días donde podemos observar: Que los tratamientos de la variedad Maru, V1M2 presentó el número más alto de brotes por planta 2.33, seguido del tratamiento V1M1 y V1M3 con 2.00 brotes, posteriormente se encuentran los tratamientos de la variedad Kaliteri, V2M1, V2M2 y V2M3 con 1.67 brotes.

Roca y Mroginski 1991, Indican que las citoquininas estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos y la inducción de brotes, siendo las más usadas el BAP (Bencil amino purina). Por otro lado, las auxinas promueven el crecimiento, la diferenciación celular y la diferenciación de raíces, y las más usadas son el IBA (ácido indol-3-butírico y el ANA (ácido naftalén acético) que sirven para el enraizamiento.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

En el presente trabajo se presentan las siguientes conclusiones, donde se puede observar que las aplicación de varias concentraciones de fitorreguladores, presentaron diferentes reacciones, así como las variedades respondieron en forma diferente a los medios de cultivo.

- Las variedades Kaliteri y Maru, mostraron diferentes reacciones en las fases de micropropagación, siendo la que presentó mejor respuesta en la fase de establecimiento la variedad Kaliteri, pero en la fase de multiplicación respondió con mejores resultados y tasas de multiplicación la variedad Maru.
- En la fase del establecimiento, el porcentaje de regeneración no presenta diferencias significativas en los medios de cultivo, pero si se presentan diferencias en las variedades, respondiendo de mejor manera en la regeneración la variedad Kaliteri, sobre la variedad Maru. El mejor % de regeneración lo demostró el tratamiento V2M2 (Var. Maru + BAP 0.5 mg/l). Identificándose como el mejor medio de cultivo para esta fase.
- Las diferentes concentraciones del fitorregulador usado no presentaron diferencias para la inducción de brotes, obteniéndose un promedio general de 6.07 días.
- La mayor longitud de los brotes en la fase de establecimiento, se logró con el tratamiento V2M2 (Var. Maru + BAP 0.5 mg/l). no encontrándose diferencias significativas con el tratamiento V1M2 (Var. Kaliteri + BAP 0.5 mg/l). donde se prueba que la concentración más adecuada para lograr una mayor longitud de brotes en 0.5 mg/l de BAP

- Se determinó que la mejor combinación de fitorreguladores en la etapa de multiplicación, es el M3 (ANA 0.02 mg/l + AG3 0.5 mg/l), que obtuvo la más alta longitud de brotes con una media de 4.58 cm. mostrando diferencias significativas con el resto de los tratamientos.
- Se presenta una tasa de multiplicación alta en la variedad Maru con respecto a la variedad Kaliteri, obteniéndose una media de 6 yemas por vitroplanta, no encontrándose diferencias en los medios de cultivos.
- Con respecto al número de brotes, el mejor tratamiento se presentó en los tratamientos con la Variedad Maru con un promedio de 2.33 brotes, en relación a los tratamientos de la Variedad Kaliteri con un promedio de 1.67 brotes. La concentración de fitorreguladores que presentó una mayor inducción al número de brotes fue del tratamiento V1M2 (variedad Maru, medio BAP 1.00 mg/l + AG3 0.5 mg/l)

5.2 RECOMENDACIONES

- En la fase de establecimiento de segmentos nodales de orégano, para obtener un óptimo desarrollo de brotes se aconseja utilizar el medio de cultivo MS suplido con 0.5 mg/l BAP
- Para estimular una mayor brotación y el largo de las vitroplantas en la fase de multiplicación, utilizar el medio de cultivo MS suplido con ANA 0.02 mg/l + AG3 0.5 mg/l. obteniéndose con este medio la tasa más alta de multiplicación.
- Se debe seguir probando diferentes concentraciones de hormonas en diferentes medios, para poder obtener el medio más adecuado para la multiplicación de la variedad Kaliteri.
- Realizar un seguimiento en el campo del material vegetal que se sometió al cultivo *in vitro* para validar el proceso de micropropagación.