

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El durazno (*Prunus pérsica L. Batsh*), es una planta de hojas caducifolias en las estaciones de otoño e invierno, son frutas de carozo muy alimenticias e importante, principalmente por su alto contenido de vitamina A, aminoácidos y minerales, que contribuyen a una adecuada alimentación humana.

El duraznero actualmente se encuentra cultivándose en casi todo el mundo, y su producción se concentra en Europa, produciendo 3.5 toneladas por año, lo cual representa el 50% de la producción mundial (Cotevisa, 2015).

La producción de frutales en Bolivia, se ha constituido en una importante actividad económica. La actividad productiva de durazno, está en proceso de crecimiento por la importancia económica que este rubro ha logrado generar no solo para el sector agrícola sino en la generación de otras actividades económicas que están directamente relacionadas con el uso de materia prima.

En Bolivia la mayor producción de durazno se encuentra en el departamento de Cochabamba con 2542 has, seguido por Chuquisaca con 1457 has, la Paz con 904 has y Tarija que ocupa el cuarto lugar con 824 has, con un promedio en nuestro país que no superan las 7 ton/ha. (FDTA - Valles, 2007).

La micropropagación se ha constituido en una técnica muy eficiente para producir plantas enteras fenotípicamente y genotípicamente idénticas a la planta madre de la que derivaron.

El cultivo *in vitro* se basa en el principio de la totipotencia, el cual establece que las células son autosuficientes y que en principio tienen la capacidad de regenerar una planta completa. Las células de las plantas que se encuentran ya diferenciadas están determinadas y normalmente no se dividen.

La división y desdiferenciación de estas células puede inducirse si se colocan porciones de tejido (explantes) en un medio de cultivo adecuado que contenga los nutrientes y los aditivos necesarios. Mediante el uso de citocininas y auxinas se puede obtener respuesta en los explantes y manipulando la proporción de estos dos reguladores de crecimiento, los explantes pueden desarrollar plantas directamente o bien callos que posteriormente se diferencian aleatoriamente en tejidos vasculares brotes y/o raíces (Ramos, 2012).

1.1 JUSTIFICACIÓN

Este trabajo, pretende evaluar dos medios de cultivo en la fase de establecimiento in vitro y evaluar el comportamiento de las yemas axilares y yemas apicales del GxN (Garfield – Nemared), a dos tipos de esterilización en la fase de establecimiento in vitro. De esta manera poder brindar al sector agropecuario una alternativa para obtener porta injertos de duraznos con calidad sanitaria y pureza varietal, minimizando los riesgos de infestación fitosanitarios, asegurando la propagación de plantas aptas para una producción temprana, y de esta manera establecer bases para dar solución a una necesidad urgente de la fruticultura, que puede llegar ser una alternativa para la recuperación de la producción de durazneros en el valle central de Tarija.

La producción in vitro 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. La técnica de cultivo in vitro 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.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La propagación del híbrido Garfi – Nemared usando semillas es casi imposible y la propagación vegetativa por métodos convencionales tales como estacas o brotes de

ramas a menudo se asocia con varias dificultades, debido a algunos desórdenes fisiológicos tales como la baja capacidad de enraizamiento.

1.3 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo General

- Evaluar la regeneración in vitro del portainjerto de durazno GxN (*Garfield – Nemared*), con dos concentraciones de medio de cultivo, en la fase de establecimiento a partir de yemas apicales y yemas axilares, en el laboratorio de Cultivos in vitro de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar cuál es el comportamiento de las yemas axilares y yemas apicales del portainjerto de durazno GxN (*Garfield – Nemared*), al medio de cultivo M&S (Murashige y Skoog) en la fase de establecimiento in vitro.
- Evaluar cuál es el comportamiento de las yemas axilares y yemas apicales del portainjerto de durazno GxN (*Garfield – Nemared*), al medio de cultivo WPM (Medio de Plantas Leñosas) en la fase de establecimiento in vitro.
- Evaluar el porcentaje contaminación de las yemas axilares y yemas apicales del portainjerto de durazno GxN (*Garfield – Nemared*), con el método de desinfección de hipoclorito de sodio al 0,75% y al 1% en la fase de establecimiento in vitro.
- Evaluar el porcentaje de regeneración de las yemas axilares y yemas apicales del portainjerto de durazno GxN (*Garfield – Nemared*), con el método de desinfección de hipoclorito de sodio al 0,75% y al 1% y con los medios de cultivos M&S y WPM en la fase de establecimiento in vitro.

1.4 HIPÓTESIS

El establecimiento de cultivos in vitro de tejidos procedentes de plantas leñosas, se verá impedido por la aparición de oscurecimiento y necrosis de los tejidos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 GENERALIDADES

2.1.1 Importancia del cultivo de durazno

El duraznero, también llamado melocotonero, es una de las especies frutales más populares que se cultivan en las zonas templadas de todo el mundo. Gracias al continuo trabajo de mejoramiento genético ha evolucionado muchísimo desde su estado silvestre hasta nuestros días. Es el frutal con mayor número de variedades, apareciendo constantemente nuevos cultivares, con mejores características, especialmente en su fruta. (Gratacós, 2011).

La producción de durazno en Bolivia, y Tarija es realizada por pequeños agricultores, y está distribuida en valles entre 1.500 y 3.300 msnm (FDTA - Valles, 2007).

2.1.2 Componentes nutritivos y funcionales del durazno

El durazno, con un aporte energético de 40 kilocalorías se sitúa como un fruto moderadamente calórico. Los frutos contienen 9% de glúcidos (azúcares), los cuales pueden aumentar en las variedades más tardías. Estos últimos están constituidos mayormente por sacarosa (más de $\frac{3}{4}$ del total). El aporte vitamínico del durazno se modifica entre variedades. Las vitaminas del grupo B, están bien representadas, en particular la vitamina B3 (1 mg/100 g) y el ácido pantoténico o vitamina B5 (0.16 mg/100g), lo mismo que la vitamina E (0.5 mg/100 g). Posee un buen contenido de provitamina A (caroteno), con valores entre 0.5-1 mg/100 g dependiendo del color de la pulpa. (Uned, 2006).

La fruta en la mayoría de las variedades contiene entre 85 – 89% de agua, la cantidad de azúcar (Brix) varía con la variedad y el manejo de la plantación, además contiene una buena cantidad de sales minerales, compuestos aromáticos, ácidos orgánicos y vitaminas (FDTA - Valles, 2007).

2.1.3 Origen del GxN

El portainjerto ‘GXN 15’, llamado también ‘Garnem’ fue obtenido en España por el Servicio de Investigación Agraria de la Diputación General de Aragón, Zaragoza. Es un híbrido entre almendro (*Prunus dulcis* (Mill) D.A.Webb) y durazno seleccionado entre las plantas originadas por el cruzamiento del ‘Garfi x Nemared’ (Serie G x N). El árbol es de vigor grande, porte erguido, poco ramificado, con ramas que emiten pocos anticipados. Las hojas son grandes, de aspecto intermedio entre las de almendro y durazno. En primavera tiene un color rojo que durante el verano vira a verde bronceado. Las flores son grandes, de color rosa pálido y los frutos son pequeños, redondeados, de color verde oscuro con tonalidades rojizas, indehiscentes y con hueso libre. Este portainjerto es muy empleado para durazno (*P. persica* (L.) Batsch.), nectarín (*Prunus persica* var. nectarina) y sobre todo para almendro. Es inmune a los nemátodos agalladores (*Meloidogyne* spp.), tolerante a nemátodos lesionadores (*Pratylenchus* spp.) y resistente a asfixia radical (Cotevisa, 2015).

2.1.4 Taxonomía del Duraznero

Reino: Vegetal

Phylum: Telemophytae.

División: Tracheophytae.

Subdivision: Antophyta.

Clase: Angiospermae.

Subclase: Dicotyledoneae.

Grupo de ordenes: Corolinos.

Orden: Rosales.

Familia: Rosaceae.

Subfamilia: Prunoideae.

Nombre Científico: *Prunus pérsica* (L) Batsh.

Nombre Comun: Duraznero.

Fuente: (Acosta, 2019).

2.1.5 Características morfológicas

2.1.5.1 Tipo de árbol

Es un árbol pequeño, caducifolio que puede alcanzar 6 m de altura, aunque a veces no pasa de talla arbustiva, con la corteza lisa, cenicienta, que se desprende en láminas. Ramillas lisas, de color verde en el lado expuesto al sol (Ardaya, 2009).

2.1.5.2 Raíz

Las raíces del híbrido; están muy ramificadas e igual que en la mayor parte de las plantas arbóreas, están extendidas y poco profundas, tiene un típico color anaranjado, no tolera la excesiva humedad; son sensibles a la presencia de raíces de otras especies; el antagonismo que se establece entre los sistemas radiculares de las plantas próximas es tan acentuado que induce a las raíces de cada planta a no invadir el terreno de la planta adyacente adquiriendo unas dimensiones medias de crecimiento. Sí es expuesto a una elevada humedad llega a morir aun en el tercer año de vida Hebert., (2008); (Laime, 2015).

2.1.5.3 Hojas

Simples, lanceoladas, de 7.5-15 cm. de longitud y 2-3.5 cm. de anchura, largamente acuminadas, con el margen finamente aserrado. Pecíolo de 1-1.5 cm. de longitud, con 2-4 glándulas cerca del limbo. Las hojas del híbrido (GxN) son, de aspecto intermedio entre las de almendro y duraznero. En primavera tiene un color rojo que durante el verano vira a verde bronceado. Los brotes en crecimiento tienen las hojas terminales con ese color rojo que van virando de color a medida que maduran. El árbol es de vigor grande. Porte erguido, poco ramificado (Cotevisa, 2010).

2.1.5.4 Flores fruto y semilla

Las flores son grandes, de color rosa pálido. Frutos: pequeños, redondeados, de color verde oscuro con tonalidades rojizas. Indehiscentes y con hueso libre. Los brotes del año son largos, rectos y erguido, con muy pocos de ellos anticipados, de color verde

claro teñidos de rojo antociánico en la cara superior, que viran a rojo intenso durante la parada vegetativa (Cotevisa, 2015).

El patrón fecunda frutos poco vistosos, el fruto es una drupa con las siguientes características epicarpio membranoso, mesocarpio pulposo, endocarpio leñoso, con una semilla con embrión y genes recesivos Hebert (2008); (Laime, 2015).

2.2 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

En su acepción amplia, el cultivo de tejidos vegetales se define como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante, o sea, unas partes separadas del vegetal, tales como protoplastos, células, tejidos u órganos se cultivan asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuban en condiciones ambientales controladas. Cada fragmento origina una planta idéntica a aquella de donde se tomó el fragmento, aunque, también puede ser modificada genéticamente para tener variedades artificiales Mroginski et al. (2010); (Ramos, 2014).

La ciencia del cultivo de tejidos vegetales debe su origen a la investigación sobre hormonas que controlan el crecimiento y el desarrollo vegetal. Este conocimiento se combinó con las técnicas básicas de microbiología por las cuales los microorganismos se hacen crecer en medios estériles para su producción e identificación (Salazar, 2010).

Estas técnicas pueden ser utilizadas en vegetales como herramientas para la micro propagación rápida de clones, eliminación de virus y enfermedades, producción de haploides, aislamiento y utilización de protoplastos, cultivo de embriones, producción de fitoquímicos, ingeniería genética, mutación y selección celular, producción de semillas sintéticas y estudios básicos de anatomía, desarrollo, fisiología y nutrición vegetal Mroginski et al., (2010); (Ramos, 2014).

2.3 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

2.3.1 Célula totipotencial

Del latín *totuspotens*: *totus* (todo) y *potens* (poder o habilidad), el término célula totipotencial, es utilizado en biología para referirse a células que poseen la capacidad de dar origen a diferentes tipos células, incluso pudiendo una sola de estas células dar origen a millones de células, tejidos, órganos e incluso embriones.

Una planta al crecer va aumentando su población de células las cuales se especializan en sus funciones. El aumento de la población de células se realiza por medio de la división celular. Antes que una célula madre se divida en dos células hijas, hace una copia exacta de su primer genoma. Como resultado, las dos células hijas generalmente tienen exactamente la misma composición genética como la de su célula madre. Cada célula viva de la planta debe contener todos los genes y por lo tanto tiene la capacidad de generar una planta completa. Esto se llama: célula totipotencial (Tobar, 2011).

2.3.2 Células autosuficientes

Las células son autosuficientes y, que, en principio son capaces de regenerar una planta completa, lo anterior constituye el núcleo central del cual nace el cultivo de tejidos. Los primeros intentos fueron realizados por Haberlandt en 1902; más tarde otros ensayos fueron realizados por Harrison, Burrows y Carrel entre 1907 y 1909. Nobécourt, Gautheret y White, consiguieron el primer cultivo de tejido auténtico en el año de 1939 (Despommier, 2009).

2.3.3 Cultivo de tejidos aislados

Gottlieb Haberlandt (1854-1945), botánico austríaco, fue el primero en señalar la posibilidad del cultivo de tejidos aislados. Desde las primeras afirmaciones de Haberlandt, los métodos de cultivo de células y tejidos se han desarrollado, dando lugar a importantes descubrimientos en Biología y Medicina (Despommier, 2009).

2.3.4 Callo tisular

Se puede definir al callo como un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una desdiferenciación celular, presentando estas células una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido. Esta masa celular puede presentar diferentes tipos morfológicos, los cuales varían según la apariencia externa, textura y composición celular. Algunos callos son masas celulares compactas y duras, con células íntimamente unidas, mientras otras forman tejidos esponjosos con una gran cantidad de espacios intercelulares. La coloración de este tejido también varía, aun derivando de la misma especie. El tipo y grado de pigmentación esta marcadamente influenciado por factores nutricionales y ambientales, y se manifiesta por la presencia de clorofila, carotenos, antocianinas, etc. Por si mismos, los vegetales tienen un potencial endógeno para la formación del callo, pues en su medio natural, al sufrir una lesión en un órgano, esta es reparada por este tejido. De especie a especie se presenta una variación en esta capacidad, misma que se refleja en la respuesta *in vitro* a la inducción del callo, encontrándose así tejidos para los que, el inducirlos al callo es requisito el suplemento de una auxina o un regulador del crecimiento relacionado; otros requieren solo una citocinina o un suplemento, tanto de auxina como de citocinina, o bien, solo responden en presencia de extractos de complejos naturales en el medio (Cardone et al., 2010).

2.3.5 Cultivo de tejido en especie leñosas

La regeneración de plantas a partir de cultivo *in vitro* de ciertas especies leñosas, exige la búsqueda de técnicas complejas. La multiplicación *in vitro* de especies agroforestales puede lograrse por tres rutas diferentes: 1) por desarrollo de brotes preexistentes, 2) por formación de meristemas adventicios, y, 3) por diferenciación de embriones somáticos (Aguilar et al., 2010).

Las especies leñosas se caracterizan por tener un tejido lignificado (latín: *lignun*, madera), que proporciona rigidez a la pared celular y, además, resistencia al ataque de

los microorganismos, porque impide la penetración de las enzimas destructivas en la pared celular. Las plantas leñosas son de crecimiento lento, de ciclo vegetativo largo. El mejor medio para el desarrollo de brotes es WPM (*Wood Plant Medium*), suplementado con sacarosa (30 g/l); el medio WPM es bajo en concentración de sales, esta combinación favorece notablemente el enraizamiento de los explantes (Aguilar et al., 2010).

Otros medios utilizados con frecuencia en el cultivo *in vitro* de plantas leñosas son los de sales basales MS con agar y el medio orgánico mínimo Murashige con agar y sacarosa (López, 2010).

2.4 MICROPROPAGACIÓN IN VITRO

En la micropropagación *in vitro* se utiliza la cámara de cultivo que es un receptáculo diseñado para permitir el control de algunas variables del ambiente físico. Se pueden controlar la temperatura, la iluminación y el fotoperiodo y en algunos casos la humedad del aire y su composición Griffiths, (2008); (Ramos, 2014).

En las cámaras de cultivo, la temperatura de incubación oscila entre 20° C y 28° C. El fotoperiodo es importante. Como el cultivo *in vitro* tiene sacarosa, necesita menos luz que el cultivo *in vivo*. La luz es necesaria en los procesos fisiológicos como el fototropismo, la germinación, la floración y otros (Pedroza, 2008).

En la cámara de cultivo, es importante conocer cuál es el espectro que emiten las fuentes de luz y en qué medida se adapta este a las necesidades del cultivo. La irradiación *in vitro* es un 10% menor que el valor de plena insolación. Se utilizan diferentes lámparas entre ellas las lámparas incandescentes y fluorescentes, hay también lámparas de vapor de Hg (mercurio) y Na (sodio) (Morgan, 2011).

Para la propagación de leñosas, se pueden emplear diferentes fuentes de explantes. Se recomiendan nudos de 0.5 a 1.5 centímetros, provenientes de plantas jóvenes germinadas bajo condiciones controladas, plantas de 15 a 40 centímetros, también

árboles adultos provenientes de viveros o de zonas cercanas al sitio donde se sembrarán (Barba, 2001).

2.4.1 Métodos de la propagación in vitro

Los métodos de propagación vegetativa en función del tejido que se siembre en el cultivo, se pueden clasificar en:

- Cultivo de plantas intactas: siembra de una semilla *in vitro*, obteniéndose primero una plántula y finalmente una planta.
- Cultivo de embriones: cultivo de embriones aislados después de retirar el resto de los tejidos de la semilla.
- Cultivo de meristemos y yemas terminales o laterales.
- Cultivo de órganos aislados: raíces, anteras o bien porciones de tejidos u órganos aislados de la planta (explantes).
- Cultivo de callo: cultivo de tejido desdiferenciado *in vitro* formándose órganos adventicios o embriones somáticos.
- Cultivo de células aisladas de un tejido, un callo o un tejido en suspensión, obtenidas con la ayuda de enzimas o mecánicamente.
- Cultivo de protoplastos que se obtienen por digestión enzimática de la pared celular. Explante

Alva et al., (2010); (Nuñez, 2016).

2.4.2 Diferenciación In Vitro

La diferenciación *in vitro* puede producirse de forma organizada o mediante organogénesis. La organogénesis puede ser directa si se forma directamente del explante o indirecta si existe una etapa intermedia y se forma a partir de callos. Los métodos de propagación vegetativa que se seleccionan en la multiplicación *in vitro* dependen de la planta que se vaya a multiplicar y de los objetivos finales del esquema

de micropropagación. Se debe elegir el tejido del que se quiere partir para la micropropagación, así como la forma de diferenciación y de regeneración de órganos.

En este contexto, los métodos que dan lugar a plantas pasando por una fase de callo no se consideran ideales, ya que habitualmente se cree que se producen alteraciones genómicas en los regenerantes, durante la formación de los callos. La acumulación de las variaciones en las células cultivadas parece ser directamente proporcional a la duración del cultivo Rojas et al., (2004); (Ramos, 2014).

Existen dos vías para la obtención de brotes lo cuales se describen a continuación:

En la **organogénesis directa**, las células de un órgano o tejido aislado se diferencian en otro tipo de tejidos. A partir de estos se forman rápidamente órganos (raíces o brotes) o individuos completos (proembriones o embriones). Se produce de esta forma la regeneración de brotes a partir de explantes o bien embriogénesis directa.

En la **organogénesis indirecta**, las células y/o los tejidos que se aíslan de una porción organizada de la planta, se des diferencian en forma de callo. Si el callo se disgrega, se originan grupos de células (agregados), y/o células aisladas (cultivos en suspensión). Se puede producir así la regeneración de brotes adventicios a partir de callos morfogénicos o bien embriogénesis indirecta de callos embriogénicos o suspensiones celulares Alva et al., (2010); (Nuñez, 2016).

2.4.3 Aplicaciones Del Cultivo In Vitro

Las aplicaciones del cultivo in vitro de plantas son:

- Multiplicación masiva de plantas para especies de difícil propagación por otros métodos.
- Rescate de especies en vías de extinción.
- Clonación de individuos de características agronómicas especiales.
- Producción de semillas sintéticas.
- Producción de plantas libres de enfermedades.

- Producción de nuevos híbridos.
- Germinación de semillas.
- Generación de variabilidad en mejora genética.
- Conservación de germoplasma (conjunto de individuos que representan la variabilidad genética de una población vegetal).
- Selección, cruzamiento, control de enfermedades y producción en masa de cultivos de cosecha e involucra diferentes plantas en agricultura, horticultura, forestales y frutales.
- Estudios fisiológicos diversos.
- Sistema modelo para estudios de fisiología vegetal.
- Lucha contra enfermedades.

(Salazar, 2010).

2.4.4 Fases del proceso de micropropagación in vitro

La micropropagación de cualquier especie vegetal es un proceso en el que podemos distinguir generalmente 5 fases o etapas:

Dentro del proceso de micro propagación se pueden diferenciar varias fases o etapas:

1: **Fase (0)** Preparación de la planta madre.

2: **Fase (1)** Introducción del material seleccionado in vitro.

3: **Fase (2)** Multiplicación de brotes.

4: **Fase (3)** Enraizamiento.

5: **Fase (4)** Aclimatación.

Esta secuencia de etapas abarca el ciclo completo de la multiplicación de plantas in vitro y puede ser aplicada a diferentes especies vegetales (Castillo, 2009).

2.4.5 Fase (0) Selección de la planta madre

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, es recomendable garantizar que la planta madre; es decir la planta donante, esté en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

2.4.6 Fase (1) Introducción del material vegetal selección in vitro

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo in vitro

2.4.7 Fase (2) Multiplicación de brotes

Durante esta fase, se espera que los embriones que sobrevivieron las fases anteriores originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente, estos nuevos brotes se deben su cultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que permitan mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas. El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados (Castillo, 2009).

2.4.8 Fase (3) Enraizamiento

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente esquejes individuales de un tamaño aproximado de 2 cm de los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación

se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo de las auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas; por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurre en forma simultánea.

2.4.9 Fase (5) Aclimatación del explantes

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrirán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales. En el momento en que se extraen los explantes o plantines enraizados de los frascos están poco adaptados a crecer en un invernáculo, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del ex plante.

Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta. Los plantines enraizados deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz. Estos plantines se plantarán en contenedores (almacigueras) cubiertos por un plástico, para mantener la humedad relativa elevada. La elección de un sustrato con buenas características físicas es clave para el éxito de esta etapa. Para el trasplante, se elige un sustrato suelto, poroso, con mezcla de arena turba, cáscara de arroz quemado para permitir un desarrollo y crecimiento de raíces muy rápido.

Luego de retirar cuidadosamente el agar de las raíces para evitar dañarlas, los plantines se enjuagan y se colocan en almacigueras con la mezcla de sustratos seleccionada y

cubiertos con nylon. Todos los días se debe controlar el nivel de humedad en las almacigueras. Si es necesario, se aplica un riego con una pulverizadora manual, para mantener un ambiente húmedo a nivel del sustrato. A los 15 días del trasplante, se puede comenzar a levantar la cobertura de nylon en las horas de menor calor (temprano en la mañana o en la última hora de la tarde). Al comienzo las plantas se dejan media hora por día destapadas. A la semana siguiente se dejan destapadas durante una hora. Al mes del trasplante, se dejan tapadas durante la noche y si hay crecimiento de nuevas hojas, las plantas pueden permanecer destapadas. Las condiciones del cultivo in vitro, generan cambios en algunos aspectos anatómicos y fisiológicos de las plantas, por esta causa, durante la aclimatación, los cambios deben ser muy graduales, para minimizar el estrés y tener mayor tasa de sobrevivencia (Castillo, 2009).

2.5 CONDICIONES DEL CULTIVO IN VITRO

En la cámara de flujo laminar no puede entrar material contaminado. El problema más importante en todo el proceso del cultivo in vitro son las contaminaciones. En la autoclave no se pueden meter determinadas sustancias, como vitaminas, antibióticos, ácido giberélico, sacarosa, encimas, extractos vegetales, etc., ni tampoco recipientes que no soporten altas temperaturas. El vidrio ha de ser de muy buena calidad para que no suministre al medio, sustancias contaminantes para la planta. Normalmente se prepara el medio y se filtra directamente. El problema es que se absorben en el filtro determinadas sustancias. El éxito de esta técnica de propagación también influye determinadas características de la planta, como el tipo, genética e incluso el tipo de implante, parte más juvenil o más adulta (Morales, 2002).

2.5.1 Técnicas de propagación a partir de ápices y laterales

2.5.1.1 Cultivo de meristemos

Técnica muy importante para la reproducción masiva de clones y de material vegetal genéticamente estable y para la reproducción de plantas libres de virus. También se utiliza la quimioterapia aplicando sustancias específicas para alterar el mecanismo de síntesis de los virus. La técnica se complementa y da mejores resultados si se aplica en

plantas que van a ser cultivadas en viveros donde hay un mejor control de las condiciones ambientales, lo que disminuye el riesgo de re contaminación Gutirrés et al.,(2003); (Ramos, 2014).

2.5.1.2 Meristemas apicales y laterales

En el caso del alargamiento de las yemas axilares, este método utiliza ápices principales, brotes laterales y segmentos nodales, e involucra la multiplicación de brotes preformados, generalmente sin la formación de algún callo, produciendo en general, cultivos genéticamente estables. Este método genera el menor número de plantas, ya que el número de brotes producido es limitado por el número de brotes axilares sembrados en el medio de cultivo (Muñoz, 2003).

2.5.2 Problemas con la micropropagación

En el cultivo de tejidos *in vitro* pueden presentarse algunos problemas dependiendo del cultivo o de la variedad con la que se trabaje. Uno de los principales problemas cuando se trata de establecer los cultivos es la contaminación de los mismos con diversos tipos de microorganismos Mroginski et al., (2010); (Ramos, 2014)

2.5.3 Contaminación

Las principales causas de contaminación son: microorganismos presentes en el interior o en el exterior de los explantes y las fallas en los procedimientos de cultivo en el laboratorio; Se denominan “vitropatogenos” a los contaminantes más frecuentes que aparecen en condiciones *in vitro*. El término “vitropatogeno” es empleado para aquellos organismos que no son necesariamente patógenos para las plantas a campo, pero sí lo son para las células, tejidos u órganos cultivados *in vitro*. Estos contaminantes son los responsables de ocasionar la muerte del tejido debido a que pueden modificar el pH, competir por los nutrientes y modificar el medio de cultivo Cassells, (2012); (Extrada, 2017).

2.5.4 Oxidación

La oxidación se manifiesta como un oscurecimiento del tejido vegetal y se puede definir como la oxidación por radicales libres de diferentes componentes celulares, generando daño, inhibición del crecimiento y en los casos graves incluso la necrosis y muerte del tejido. Este problema es común en varias especies, especialmente en las leñosas. La oxidación está estrechamente relacionada con el estrés oxidativo y nitrosativo que sufren las células cultivadas *in vitro* provocando la estimulación del metabolismo de los compuestos fenólicos (Azofeifa, 2009).

Los estresores en los cultivos *in vitro* se relacionan principalmente con el efecto abrasivo causado por los agentes desinfectantes en la asepsia del explante, los cortes del explante, los cambios en el pH, la composición del medio de cultivo, como así también el volumen y la calidad del frasco de cultivo. En la práctica existen varias estrategias para eludir los procesos de oxidación, cabe aclarar que un único método no siempre es suficiente, todo depende de la complejidad del problema. Entre las mismas podemos enumerar las siguientes: 1) usar explantes en estado juvenil o en crecimiento activo; 2) disminuir la intensidad de la luz de cultivo; 3) disminuir la temperatura de cultivo; 4) realizar subcultivos con frecuencia; 5) cultivar el explante en medio líquido; 6) agregar antioxidantes al medio de cultivo; 7) disminuir el pH del medio de cultivo; 8) agregar adsorbentes como carbón activado al medio de cultivo; 9) disminuir la duración de la esterilización del explante o cambiar el agente desinfectante; 10) incrementar las sales de calcio; 11) reducir los niveles de nitrato Mroginski et al.,(2010);(Ramos, 2014).

2.5.5 Vitricación o Hiperhidricidad

Es otro de los inconvenientes con el que nos podemos encontrar cuando realizamos la técnica de cultivo de tejidos *in vitro*, es el fenómeno por el cual los brotes toman aspecto vítreo y transparente, observándose turgencia y fragilidad en hojas y tallos. Se caracteriza por ser un proceso de morfogénesis anormal con desordenes fisiológicos (mayor absorción de agua, menor contenido de clorofila, menor capacidad

fotosintética, hipolignificación), anatómicos (epidermis y cutículas delgadas, grandes espacios intercelulares, menor desarrollo del sistema vascular, estomas anormales y escasos, ausencia de parénquima en empalizada) y morfológicos (entrenudos cortos, color anormal, arrosetamiento, hojas más gruesas elongadas y arrugadas, tallos de mayor diámetro) en condiciones de cultivo *in vitro*. Este fenómeno está regulado principalmente por dos factores que son la humedad relativa y el potencial de agua afectando a la fotosíntesis y a la transpiración.

Las causas por las que se produce la vitrificación se deben a las condiciones adversas bajo las cuales se desarrollan los cultivos, ya sea excesiva humedad, factores nutricionales, baja intensidad lumínica, uso de recipientes herméticos que afectan el intercambio gaseoso, altas concentraciones de citocininas, carbohidratos y minerales. Por otra parte, la consecuencia principal de este fenómeno es la baja supervivencia de las plántulas obtenida durante la aclimatación *ex vitro*. (Olmos et al.,2010).

2.5.6 Fenolización

Durante el cultivo *in vitro* el explante sufre en mayor o menor medida situaciones de estrés, ocasionadas por daños mecánicos o por las condiciones del cultivo *in vitro*. Esta situación estimula el metabolismo de los compuestos fenólicos. La síntesis de fenoles va produciendo una serie de reacciones de hipersensibilidad, tales como la exudación al medio del contenido de las células deterioradas. De igual forma, las células vecinas de las que inicialmente fueron lesionadas se ven afectadas, incluso aunque esas células no parezcan estarlo, llevando finalmente a una muerte prematura. En general los fenoles son sustancias lábiles y fáciles de oxidar. Los productos generados por la oxidación tienen carácter fitotóxico y/o de crecimiento y desarrollo, potenciando en otras ocasiones otros procesos de oxidación, puesto que se convierte en potentes oxidaciones Afanador, (2005); (Ramos,2014).

Una de las mayores limitantes en el desarrollo de las plantas leñosas, es la dificultad para erradicar las enfermedades endógenas y la excreción de sustancias como los

polifenoles y taninos que en la etapa de adaptación *in vitro* crean oxidación. El establecimiento de cultivos *in vitro* de tejidos procedentes de plantas leñosas, se verá impedido por la aparición de oscurecimiento y necrosis de los tejidos. El fenómeno de ennegrecimiento ocurre por la acción de enzimas tipo polifenoloxidasas y tirosinasas que liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren lesiones o heridas. Estas actúan sobre los polifenoles y la tirosina, oxidándolos a quinonas que son fitotóxicas, sustancias que a su vez pueden polimerizarse, afectar las proteínas y en consecuencia inhibir el crecimiento y la viabilidad de los explantes.

La adición de sustancias antioxidantes, es otro de los métodos que suelen aplicarse, aunque es necesario tener mucho cuidado, ya que se pueden convertir en oxidantes muy potentes, invirtiéndose su efecto positivo en el control de los fenoles Hernández et al., (2010); (Extrada 2017)

2.6 FUENTE DE EXPLANTES

Los explantes más utilizados para iniciar la propagación clonal *in vitro* de una planta son las yemas apicales del vástago, estacas uninodales portando yemas axilares, discos de hoja, secciones de raíz y meristemas. Los explantes provenientes de vegetales que crecen en invernáculo o en cuartos climatizados son relativamente más fáciles de desinfectar que los provenientes de plantas que crecen en el campo. También es más fácil la desinfección de explantes o de órganos jóvenes que la de explantes provenientes de material adulto. La desinfección superficial incluye varios pasos: el lavado de los explantes con agua corriente, el empleo de etanol al 70%, seguido de concentraciones variables de hipoclorito de sodio con gotas de tensoactivos para favorecer su penetración y actividad (Olmos et al., 2010).

También se puede realizar la germinación *in vitro* de las semillas seleccionadas, pero teniendo cuidado en el cumplimiento estricto de los protocolos de asepsia; además, es recomendable mantener estas plantas madres, es decir, las plantas donadoras, durante un tiempo que puede oscilar entre varias semanas a varios meses, en un invernadero bajo condiciones controladas. En este ambiente se cultiva la planta en un medio

sanitario óptimo y con un control de nutrición y riego adecuados, que le van a permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Castillo, 2009).

Los explantes que mejores resultados dan son los tomados de las plantas jóvenes, debido a que el desarrollo de la morfogénesis (capacidad de regenerar órganos y tejidos a partir de un explante inicial) es más rápido, la extracción de explantes se debe realizar en cabinas de flujo laminar para garantizar la asepsia.

La propagación *in vitro* de la mayoría de las plantas leñosas requiere de la utilización de explantes provenientes de materiales juveniles. Es importante, por lo tanto, formar un banco de plántulas *ex vitro* utilizando semillas recolectadas de árboles sanos y vigorosos preferentemente cercanos al sitio donde se van a plantar los futuros árboles; los explantes se toman de plantas jóvenes (López, 2010).

La temperatura a la que está expuesto el explante cultivado *in vitro* afecta a la mayoría de los procesos fisiológicos y por lo tanto es un factor fundamental que se debe controlar. Cada especie tiene un intervalo de temperaturas en el que se produce el crecimiento óptimo (20°C-28°C). Este intervalo puede variar de acuerdo con el genotipo, tipo de explante, época del año, edad de la planta madre, fotoperiodo, etc. La humedad relativa debe estar entre 80% y 90%. El ciclo de luz oscuridad generalmente es de 16/8 horas. La luz es uno de los factores determinantes del desarrollo de los organismos autótrofos, por ello es importante controlar el factor luz en los cultivos *in vitro*. La luz proporciona la energía para la fotosíntesis. Las necesidades de luz *in vitro* son menores que *in vivo*, dado que el medio de cultivo tiene cantidades importantes de sacarosa, los cultivos *in vitro* se portan parcialmente como autótrofos (Rossi, 2003).

2.7 MATERIALES PARA EL CULTIVO IN VITRO

La micropropagación *in vitro*, es el conjunto de técnicas y métodos del cultivo de tejidos utilizados para obtener plantas asexualmente en forma rápida, eficiente, libres de enfermedades y en grandes cantidades. El laboratorio de micropropagación de tejidos vegetales debe contar con las instalaciones, el equipo y los reactivos necesarios

para realizar investigaciones en diferentes tipos de plantas, permitiendo generar nuevos protocolos de micropropagación de plantas in vitro, que logren una propagación masiva, libre de enfermedades.

Las instalaciones del laboratorio deben contar con: Área de oficinas, área de observación y examen, área de preparación de medios de cultivos (material de vidrio e instrumentos como la balanza de precisión, autoclave, guantes, máscara, reactivos como sales minerales, agar, sacarosa, antioxidantes, fitohormonas, desinfectantes como ácido hipocloroso, alcohol etílico, soluciones jabonosas, agitador magnético, criba vibradora, cámara de flujo laminar, vidriería como), área de lavado y esterilización, almacén, área de incubación o de crecimiento in vivo, área de flujos laminares o de transferencia, invernadero (Ramos, 2014).

2.7.1 Autoclave

Una autoclave es un recipiente de presión metálico de paredes gruesas con un cierre hermético que permite trabajar a alta presión para realizar una reacción industrial, una cocción o una esterilización con vapor de agua. Su construcción debe ser tal que resista la presión y temperatura desarrollada en su interior.

El calor húmedo es más penetrante que el calor seco. Existen 3 formas para aplicar este método:

- Agua hirviendo
- Vapor fluyendo libremente
- Vapor bajo presión

El último método es el más eficiente en cuanto a costo y tiempo se refiere. Por cuanto el vapor de agua sometido a presión por sobre la atmosférica, afecta a los microorganismos, provocando una coagulación o solidificación de su masa protoplásmica, deteniendo sus procesos vitales. La forma de vapor de agua bajo presión es el mejor medio para el aniquilamiento o destrucción de materias infecciosas. Las

otras 2 formas, son menos eficientes debido a que sólo pueden mantener una temperatura máxima de 100°C lo que conlleva a que los procesos sean más largos en comparación con el método de vapor bajo presión. Sin embargo, estos procesos son buenos microbicidas, y debe considerarse dejar su utilización solo para casos de emergencias.

Otro beneficio del vapor bajo presión es el gran poder de penetración que posee el agua en su estado gaseoso a través de los poros de los artículos, este proceso es más efectivo, y menos tóxico, que el realizado con otros gases. Las desventajas que presenta este método es la posibilidad de que el vapor recalentado disminuya su poder microbicida si el Autoclave es mal operado y además es un método inapropiado para esterilización aceites, anhídros, grasas o talcos. La desventaja/error más común en la operación ocurre cuando no se ha eliminado todo el aire de la cámara. Pues, cuando el vapor de agua comienza a generarse, por convección, este tiende a ocupar la parte superior de la cámara, lo que provoca el desplazamiento de aire (más frío) a la parte inferior de la misma, esto dificulta su mezcla, la que termina por producirse en un periodo prolongado, lo que da un resultado incierto al proceso de esterilización. Para evitar esto, es necesario que los materiales tengan un mayor tiempo de exposición con el vapor. La eliminación de bacterias esporuladas más resistentes se produce en menor tiempo si se compara con otros medios de esterilización. El agua como agente esterilizador, y la fácil introducción de métodos de control de calidad; selecciona por lejos al vapor de agua bajo presión como el más eficiente método de esterilización. La eliminación de los agentes infecciosos se efectúa por la coagulación de su masa protoplasmática, la que normalmente ocurre a bajas temperaturas, pero al existir humedad esta debe aumentar para lograr el objetivo de la eliminación de contaminantes biológicos (Camus, 2010).

2.7.2 Cámara de flujo laminar

Una cabina de flujo laminar, cámara de flujo laminar o campana de flujo laminar, es un recinto que emplea un ventilador para forzar el paso de aire a través de un filtro de

aire y que proporciona aire limpio a la zona de trabajo, libre de partículas de hasta 0.1 micras. Este tipo de equipos se fabrican en forma generalmente prismática con una única cara libre (la frontal) que da acceso al interior, donde se localiza la superficie de trabajo, que normalmente permanece limpia y estéril

2.7.3 Las cámaras de cultivo

En este tipo de cámaras, no solo se pueden simular condiciones ambientales variables de temperatura y humedad, sino también de radiaciones solares y atmósferas gaseosas modificadas (ozono, CO₂, etc.) en función de los entornos de investigación que se pretendan estudiar. Los nuevos sistemas de iluminación fotosintéticamente activa, basados en la tecnología optoelectrónica, se seleccionan en base a clorofilas, carotenoides, etc., con controles precisos del espectro de la radiación y la intensidad, fotoperiodo y localización geográfica.

2.7.4 La pipeta

Es un instrumento volumétrico de laboratorio que permite medir la alícuota de líquido con bastante precisión. Suele ser de vidrio. Está formada por un tubo transparente que termina en una de sus puntas de forma cónica, y tiene una graduación (una serie de marcas grabadas) indicando distintos volúmenes.

2.7.5 La Probeta

Es un instrumento de laboratorio que se utiliza, sobre todo en análisis químicos, para contener o medir volúmenes de líquidos de una forma aproximada. Es un recipiente cilíndrico de vidrio con una base ancha, que generalmente lleva en la parte superior un pico para verter el líquido con mayor facilidad.

2.7.6 La placa de Petri, o cápsula de Petri

Es un recipiente redondo, de cristal o plástico, con una cubierta de la misma forma que la placa, pero algo más grande de diámetro, para que se pueda colocar encima y cerrar

el recipiente, aunque no de forma hermética. Es parte de la colección conocida como «material de vidrio». Tiene uso en microbiología (Ramos, 2014).

2.8 DESINFECCIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

La cámara presurizada utilizada generalmente en los laboratorios es la autoclave. Una vez los medios de cultivo han estado el tiempo suficiente en la autoclave, se tienen que dejar enfriar hasta alcanzar unos 60°C. Esta temperatura permite coger los matraces con la mano. Cuando se ha alcanzado la temperatura adecuada, se procede a la adición de los componentes termolábiles que han sido esterilizados previamente por filtración (Del Campo et al., (2007); (Extrada, 2017)).

Para establecer cultivos asépticos será necesario trabajar en ambientes adecuados, esterilizando los medios de cultivos en una autoclave a una presión de 15 libras (aproximadamente una atmósfera), durante 15 a 20 minutos. A esta presión la temperatura del vapor de agua será de 121°C, suficiente para eliminar eficazmente todas las formas microbianas (Azofeifa A., 2009).

2.9 DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

2.9.1 Plantas madres

Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Los explantes pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. Antes de extraer los explantes se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia (Olmos et al., 2010).

2.9.2 Explantes

La desinfección superficial de los explantes se puede realizar mediante el uso de compuestos químicos con el objeto de eliminar los microorganismos con el menor daño

posible para el explante. El procedimiento más utilizado consiste en una doble desinfección mediante la inmersión de los explantes en etanol (70% v/v) durante 20-60 segundos seguido de hipoclorito de sodio 1-3%, durante 3-30 minutos, dependiendo de la naturaleza del explante. Algunos procedimientos se basan en el empleo de únicamente etanol o de hipoclorito de sodio. Finalmente, es necesario eliminar los restos de estos productos mediante varios lavados con agua destilada estéril. Es importante la eliminación de los microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) que se encuentran en la superficie del explante y que en el momento de la siembra y del desarrollo establecen competencia con él, disminuyendo los nutrientes que este requiere para su desarrollo, y que producen metabolitos tóxicos que afectan su crecimiento y su enraizamiento. Este procedimiento puede realizarse lavando el explante con desinfectantes como hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, peróxido de hidrógeno, nitrato de plata o cloro comercial, estos agentes desinfectantes pueden actuar como bactericidas y/o bacteriostáticos.

En los casos en los cuales no se utilice etanol, la adición de agentes tensoactivos junto con el desinfectante es lo recomendado. El más utilizado es Tween-20. El proceso de desinfección superficial con hipoclorito de sodio es de fácil manejo y no es tóxico para el material de siembra utilizado. Se sumergen los explantes en una solución al 5% (p/v), con dos gotas de Tween 20, durante diez minutos y se enjuagan cuatro veces con agua destilada estéril. Con esta desinfección se obtiene una contaminación cero en todos los explantes utilizados (Ramos, 2012).

Un lavado previo de los explantes con agua corriente y detergentes, ayuda a una mejor desinfección. Luego de la desinfección superficial, los explantes (partes de la planta o de semillas) se colocan en un medio de cultivo estéril. En un período de una o dos semanas se inicia el proceso de germinación o regeneración de los nuevos tejidos vegetales. Durante esta fase se espera que los explantes originen brotes con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con un medio de cultivo estéril. Periódicamente estos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en recipientes

adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que permita mantener las condiciones de asepsia. De esta manera se aumentará el número de plantas en cada repique o división de las plantas, que dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados (Castillo, 2009).

Los explantes se deberán desinfectar, para liberarlos de bacterias y hongos y poder realizar posteriormente los cultivos, ya que existe una gama de productos o compuestos químicos que es posible utilizar como desinfectantes, pero en la actualidad, se ha generalizado el empleo de etanol (70% v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1% al 5% (p/v), con menor frecuencia se utilizan el hipoclorito de calcio [Ca (OCl)₂] del 6% al 12% y el cloruro de mercurio (HgCl₂) del 0.1% al 1.5% que es muy tóxico y difícil de remover del explante, en algunos casos, resulta útil emplear un agente tenso activo, por ejemplo Tween-20 del 0.01% al 0.1%. Después de usar los desinfectantes será necesario remover los restos de estos por medio de lavados con agua destilada estéril, haciendo un mínimo de tres enjuagues sucesivos durante mínimo 5 minutos cada uno Villamizar, (2005); (Ramos, 2014).

Hay soluciones biocidas que matan bacterias y hongos, previenen la germinación de esporas y a altas concentraciones pueden eliminar contaminaciones de microorganismos endófitos, uno de estos compuestos es el PPM (Plant preservative Mixture).

Los tejidos adultos de especies leñosas, particularmente de angiospermas, liberan al medio de cultivo pigmentos constituidos principalmente por polifenoles y taninos; es por eso que la oxidación fenólica es un problema grave en el cultivo *in vitro* de las especies leñosas. Se recomienda no utilizar tejidos adultos y utilizar sombra para disminuir la oxidación, y la incubación en condiciones de oscuridad como método para evitar la síntesis de fenoles, porque los productos de la oxidación fenólica se forman

bajo condiciones de iluminación, que se manifiestan en la zona basal del corte del nudo, y en las lesiones que dejaron las hojas al ser retiradas de los nudos).

La oxidación en plantas leñosas, puede ser controlada por los niveles de irradiación recibidos por las plantas madres, debido a que la actividad de muchos sistemas enzimáticos que participan en la síntesis y oxidación de los fenoles, es inducida por la luz. Por lo tanto, es conveniente, que los explantes permanezcan en la oscuridad unos días, antes de pasarlos a una intensidad lumínica baja (Hernández et al 2010).

2.10 ESTABLECIMIENTO ASEPTICO

Para que el establecimiento sea exitoso, es necesario prevenir y controlar la contaminación microbiana y la oxidación fenólica, siendo uno de los problemas más graves que se debe enfrentar durante la micropropagación de frutales.

Existen 4 fuentes de infección: la planta madre (en la superficie exterior e interior), el medio nutritivo (insuficientemente esterilizado), el aire y el operador. Siendo la más importante la planta misma, de forma que el material vegetal deberá ser desinfectado antes de su aislamiento y puesto in vitro se recomienda adoptar algunas precauciones en el establecimiento y manipulación de los cultivos como:

Antes de comenzar, desinfectar la mesa y las paredes de la cámara con etanol 70%. Igualmente es conveniente desinfectar la parte externa de los recipientes que contienen los medios de cultivo, antes de introducirlos en la cámara. Es necesario que las manos y eventualmente, los antebrazos del cultivador sean desinfectados con etanol 70%. Los instrumentos metálicos empleados se deben flamear previamente con etanol al 95%. Realizar las operaciones de transferencia y disección lo más cerca posible a la llama de un mechero. Los frascos, tubos de ensayo y matraces necesitan ser cerrados para impedir sudeshidratación e infección, por otro lado, tiene que ser posible el intercambio gaseoso con el exterior, para evitar una falta de oxígeno o el exceso de gases producidos como el CO₂ y el etileno (Vargas, 2010).

2.11 MEDIO DE CULTIVO

Es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua. Usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina medio basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y ocasionalmente con otras sustancias varias. Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta, sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir ni *in vitro* ni *in vivo*. También se debe añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas o sus fragmentos no son completamente autotróficos cuando se desarrollan en estas condiciones (Suárez, 2011).

Los medios de cultivo son soluciones acuosas donde se desarrollan microorganismos células o tejidos vegetales y/o animales. El desarrollo de éstos solo ocurre en presencia de los nutrientes requeridos (que dependen del microorganismo o tipo de células o tejido en particular). La composición del medio de cultivo garantiza que se le suministren los nutrientes al tejido vegetal "*in vitro*" y debe ser muy parecido a las condiciones nutricionales que ofrece el suelo a las plantas en su estado natural. Los componentes principales del medio son: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agentes gelificantes y hormonas o reguladores de crecimiento (Perea et al, 2011).

No existe un medio universal para todos los propósitos ni para todas las especies que se trabajan *in vitro*, sin embargo, se puede utilizar el medio básico o de Murashige y Skoog (M&S). Actualmente se encuentran más de 80 medios comerciales que se venden listos para micropropagación y la literatura menciona alrededor de 2000 formulaciones diferentes Mroginski et al., (2010); (Ramos, 2014).

Para lograr un buen crecimiento de las plantas *in vitro*, es necesario suplir el medio con una o más vitaminas. La más utilizada es la B1 (Tiamina) y se la considera un ingrediente esencial. Otras vitaminas han demostrado tener un efecto positivo en el crecimiento *in vitro* tales como: B2 (Riboflavina), B3 (ácido nicotínico), B5 (Ácido pantoténico), B6 (Piridoxina), B9 (ácido fólico), vitamina H (Biotina), vitamina E (α -

tocoferol), vitamina C (Ácido ascórbico), con un rango de concentración de 1-100 mg/l. Después de agregar todos los componentes del medio de cultivo, se procede a ajustar el pH final, añadiendo NaOH 0.1N, para obtener un pH de 5.8. Los valores bajos, inferiores a 3.5 impiden la solidificación de los agentes gelificantes añadidos a los medios sólidos (Rossi, 2003).

2.12 CONDICIONES DE CULTIVO

Los explantes se colocarán en una cámara de crecimiento controlado, para su desarrollo y crecimiento. Las condiciones ambientales durante el período de incubación deberán ser mantenidas en el fotoperiodo de 14:10 (luz/oscuridad), temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, lámparas fluorescentes de luz blanca de una intensidad de 3000 Lux, Humedad Relativa del 70% y pH de 5.8. Contando con total esterilidad (Castillo, 2009).

2.12.1 Composición del medio de cultivo

La composición del medio de cultivo es uno de los principales factores a tener en cuenta para lograr una respuesta morfológica deseada, estimular la diferenciación y conducir el crecimiento de tejidos vegetales *in vitro*. Todos los medios contienen como componentes principales: agua, sustancias orgánicas y sustancias inorgánicas. Los medios de cultivo sólidos llevan además un agente solidificante. Los medios de cultivo poseen una serie de componentes generales y específicos cuya presencia, combinación y concentración dependerá de los objetivos que se persigan en su utilización. Este debe tener los nutrientes esenciales para la planta, sustancias minerales (macro y micronutrientes), vitaminas, aminoácidos, azúcares agentes reguladores del crecimiento, agua y otros. Las composiciones químicas de los medios de cultivo resultan esenciales para las plantas porque forman parte de los requerimientos para el crecimiento, de productos y suministran energía para la síntesis de metabolitos y el mantenimiento celular. Si bien existen premezclas en el mercado, los laboratorios frecuentemente realizan sus propios medios de cultivo. Esto no solo permite modificar las formulaciones estándares ajustándolo a las necesidades fisiológicas y requerimientos nutricionales de cada cultivo, sino también comprender detalladamente

el rol que los diferentes elementos químicos tienen en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los requerimientos nutricionales están determinados por el tipo de metabolismo celular: autotrófico o heterotrófico Mazorra et al., (2008);(Extrada, 2017).

2.12.1.1 Compuestos indefinidos:

Agua de coco

Extractos de levadura

Caseína hidrolizada

Agentes solidificantes

Carbón activado

2.12.1.2 Agua

Suele utilizarse agua destilada. En ocasiones específicas puede utilizarse agua corriente, pero debe evitarse porque la presencia de ciertas iones (como Ca^{2+} o Mg^{2+}) puede formar sales insolubles con otros componentes del medio (como los fosfatos) sobre todo, durante el proceso de esterilización.

2.12.1.3 Compuestos orgánicos:

Suplementos macroorgánicos: Carbohidratos

Suplementos microorgánicos: Vitaminas, Aminoácidos, Reguladores de crecimiento (hormonas): auxinas, citocininas, giberelinas, brasinoesteroides, etileno, ancymidol
Antibióticos (Perea et al, 2011)

2.12.1.4 Suplementos macroorgánicos:

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

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

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

Suplementos microorgánicos: Incluye compuestos orgánicos que benefician el crecimiento y morfogénesis del material vegetal. Entre ellos, podemos mencionar: vitaminas, aminoácidos, complejos naturales de composición química indefinida y reguladores de crecimiento. (Perea, 2011)

Vitaminas: Los complejos vitamínicos contienen elementos esenciales para las plantas. Aunque las vitaminas normalmente son sintetizadas por ellas, son también requeridas para su crecimiento y diferenciación cumpliendo un rol catalítico en el metabolismo celular. Cuando las células de plantas superiores son cultivadas *in vitro*, la ausencia de vitaminas constituye un factor limitante del crecimiento. No obstante, estas necesidades dependen de la especie considerada. Las vitaminas que son adicionadas más usualmente en medios de cultivo son: tiamina-HCl, ácido nicotínico, piridoxina-HCl, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, riboflavina. Generalmente, los requerimientos biológicos de vitaminas, son cubiertos con la adición externa, aunque algunos tejidos pueden obtenerlas a partir de complejos orgánicos de composición indefinida como en agua de coco, extracto de levadura, jugos de frutas, etc. (Perea, 2011).

Tiamina (también llamada vitamina B1): Es un componente esencial de las coenzimas que catalizan la oxidación del ácido pirúvico en el ciclo respiratorio. Por eso, su presencia es necesaria para que las células puedan realizar sus funciones vitales.

Durante el ciclo vital normal de las plantas verdes, la tiamina se sintetiza en las hojas y se almacena en los cotiledones de la semilla. Es fotoestable, pero durante la esterilización por autoclave se descompone en pirimidina y tiazol; sin embargo, la mayoría de los tejidos son capaces de sintetizar tiamina a partir de los productos de su descomposición. En la naturaleza, especialmente en los cereales, aparecen libres y en concentraciones relativamente elevadas. Se utiliza en concentraciones cercanas a 0.4mg/L.

La Riboflavina (vitamina B2): Forma parte de las vitaminas del complejo B. Ayuda en la metabolización de carbohidratos y en la respiración celular. Es termoestable y fotosensible.

Ácido nicotínico (niacina o vitamina B3): Estimula el crecimiento de la planta a través de su participación como componente de co-enzimas que actúan en las reacciones de energía. Es foto y termoestable. Por lo general, se agrega al medio entre 0.1 a 10mg/L

Adenina (vitamina B4): Es parte integral de los ácidos nucleicos. Actúa débilmente como citocinina. Se utiliza como sulfato de adenina para promover la formación de brotes.

Ácido pantoténico (vitamina B5): Es termoestable, por lo que puede ser autoclavado junto con el medio nutritivo. Se encuentra en la naturaleza como componente de la coenzima A. Actúa en el metabolismo de las grasas. No es una vitamina esencial. Se incorpora al medio en forma de pantotenato de calcio.

Piridoxina (vitamina B6): Es termo y fotoestable. Aunque no es considerada esencial en el cultivo de tejidos, participa en la síntesis de purinas y pirimidinas y por lo tanto, en el metabolismo de los ácidos nucleicos. Estimula el crecimiento vegetal interviniendo en las reacciones de energía.

Acido Ascórbico (vitamina C): Interviene en los sistemas de oxidación de la célula y establece potenciales favorables de oxidación – reducción. Por ello se lo utiliza como antioxidante para prevenir la oxidación de compuestos fenólicos.

Inositol o myo-inositol: es un azúcar alcohol que está incluido dentro del complejo de la vitamina B. se agrega en casi todos los medios de cultivo a razón de 100 mg/L y como suplemento de la sacarosa. Es parte integral de varios tipos de membranas de algunas organelas como los cloroplastos. (Pérez et al., 2011).

Aminoácidos: Los aminoácidos representan, para las células, una fuente efectiva e inmediata de nitrógeno, puesto que se pueden incorporar al metabolismo mucho más rápido que el nitrógeno inorgánico, aun cuando ambas fuentes se encuentran en el mismo medio (Thom y *otros.*, 1981), sin embargo, su incorporación al medio de cultivo es bastante discutida. Es conocido que su empleo está en función del balance adecuado de la relación NH_4/NO_3 que es usualmente suministrado como NO_3^- , NH_4 , NO_3 , NH_4Cl , etc. Generalmente la inclusión de estos compuestos nitrogenados orgánicos es necesaria solamente cuando se inicia la formación de callo, ya que se consideran estimulantes de la proliferación celular (Gamborg y Jhylum, 1981). Tienen efecto notable sobre el desarrollo de tejidos vegetales cuando son usados en combinación. Algunos tienen efecto antagónico entre ellos, así es el caso de la fenilalamina y tirosina. Los aminoácidos son usados como constituyentes de compuestos de composición química indefinida o bien por adición directa.

Reguladores de Crecimiento- Hormonas (PGR): Las hormonas reguladoras del crecimiento son los compuestos más importantes que se incluyen en un medio de cultivo. Del propósito del medio decultivo que se está preparando depende el tipo y la dosis de hormona que se utilizará. Los reguladores de crecimiento se dividen en auxinas, citocininas, giberelinas y retardantes e inhibidores del crecimiento. Son naturales (hormonas) o sintéticas (reguladores de crecimiento) (Perea, 2011).

Auxinas: Las auxinas estimulan el agrandamiento y alargamiento celular y promueven la división celular en cultivos de tejidos. Se adicionan combinadas con citocininas

durante la etapa de multiplicación o sin ellas, en la etapa de enraizamiento. Se transporta polarmente, a través del floema, desde los ápices (caulinales y radiculares). Junto con las citocininas, son esenciales para la viabilidad de las plantas. Su estructura química es muy variable, pueden acumularse en formas inactivas conjugadas a oligosacáridos y aminoácidos. Para preparar soluciones stock de auxinas, se deben disolver con unas gotas de solución 1M de Hidróxido de Sodio (NaOH) o de Hidróxido de Potasio (KOH).

Auxinas naturales: El *ácido indolacético (AIA)* es la única auxina natural que se localiza en las zonas de crecimiento. Es fotosensible, por lo que no es conveniente utilizarlo en cultivo en suspensión. Por ser hormona natural, su desaparición del tejido es muy rápido ya que en las plantas se encuentran las enzimas oxidasas de la que hidrolizan a la hormona de manera que su efecto es suave y de poca duración.

Auxinas sintetizadas químicamente: Son auxinas sintéticas del *ácido naftalenacético (ANA)*, *ácido 2,4 diclorofenoxiacético* y *ácido indolbutírico (AIB)*. Resultan esenciales para el cultivo de meristemas, en los procesos de morfogénesis directa e indirecta, en la inducción de embriogénesis somática, en el enraizamiento de microesquejes y actúan promoviendo el crecimiento de ápices caulinales.

Citocininas: Son utilizadas para estimular la división celular, especialmente al combinarlas con auxinas. A altas concentraciones inducen la formación de brotes adventicios e inhiben la formación de raíces, promueven la multiplicación de tallos y proliferación de yemas laterales, a través de la disminución de la dominancia apical. Por otra parte, las citocininas permiten retardar el proceso de envejecimiento celular e influyen en el transporte de auxinas. Sin embargo, aunque algunos tipos de tejidos requieren esencialmente citocininas para el fenómeno de la organogénesis, éstas no son esenciales. Para preparar soluciones stock, se deben disolver con unas gotas de una solución 1M de ácido clorhídrico (HCl).

Giberelinas: Se encuentran naturalmente en las plantas y produce un alargamiento de las células, elongación de los entrenudos y el crecimiento meristemático. También

inducen la ruptura de dormancia de embriones aislados o semillas. En general, inhiben la formación de tallos y raíces adventicias. De todas las giberelinas, es el Ácido giberélico (AG3) el más utilizado en propagación *in vitro*.

Etileno: Es un gas producido naturalmente por las plantas que afecta el crecimiento del cultivo.

Ancymidol: es un retardante del crecimiento, de efectos similares a las citocininas. (Cardone et al., 2010).

2.12.2 Efecto de los principales reguladores de crecimiento.

2.12.1.5 Auxinas

- Induce la división celular.
- Induce elongación de la pared celular.

2.12.1.6 Giberelinas

- Inhibe la formación de tallos y raíces.
- Participa en el desarrollo de órganos preformados.

2.12.1.7 Citoquinina

- Estimula la división celular.
- Rompe el estado de dormancia en yemas laterales.

2.12.1.8 Ácido abscísico

- Ayuda a la maduración y crecimiento de embriones somáticos.
- Ayuda a la tolerancia de bajas temperaturas.

2.12.1.9 Etileno

- Promotor de la maduración de frutos.
- Promotor de senescencia y abscisión de hojas.

- Efectos negativos en la elongación de tallos y raíces.
- Efectos negativos en la formación de yemas axilares y adventicias.
- Afecta la embriogénesis y en enraizamiento.

(Cardone et al., 2010).

2.12.3 Agentes solidificantes (agar)

Se añaden para preparar medios de cultivo sólidos y semisólidos. El agar-agar es el agente solidificante más utilizado. El agar-agar es un polisacárido de galactosa y galactomanano que se obtiene de las algas rojas (*Echema*, *Gelidium*, *Gracilaria*). Contiene un 70% de agarosa y un 30% de agarpectina. Su composición química es indefinida y solidifica con mayor dificultad a medida que desciende el pH. Es insoluble en agua fría, pero se funde y solubiliza en agua hirviendo y solidifica a 45 oC. Forma geles transparentes muy estables y es degradado por muy pocas bacterias. Hay diferentes tipos de agares, Romberger y Tabor (1971) consideraron que, a menor pureza, se pueden encontrar iones, polisacáridos sulfanados, ácidos grasos de cadena larga. La concentración de agar en los medios de cultivo sólidos es variable y depende de la calidad, pero usualmente es de 0.7-1.5%.

2.12.4 El pH

Es necesario ajustar el pH de la solución con el fin de lograr una correcta gelificación del medio y considerando que el pH también incide en la capacidad de absorción de sales minerales. En general el pH no debe ser inferior a 5,8 y es ajustado con ClH o NaOH 1N, luego de agregar todos los ingredientes excluido el agente gelificante. En ocasiones se agrega soluciones tampón (MES), debido a que la capacidad tamponante de los medios de cultivo es baja y los valores de pH decrecen con el autoclavado y, en muchos casos, se altera por la absorción de iones durante el cultivo y con la excreción de metabolitos del explanto (Perea et al, 2011).

2.12.5 Diseño, formulación y optimización de medios de cultivo

Diseño: Es la elección de los componentes necesarios para lograr el crecimiento y la formación de productos.

Formulación: Corresponde a los aspectos cuantitativos de los medios de cultivo. Establecer las combinaciones, proporciones o concentraciones de cada componente a ser utilizadas.

Optimización: Consiste en encontrar la mejor formulación para lograr el objetivo propuesto (maximizar biomasa, producto metabólico, etc). Existen situaciones que requieren la optimización de los medios de cultivo como: limitaciones nutricionales, exceso de alguno de los componentes que pudieran inhibir el crecimiento, aplicación de fuentes nutricionales no convencionales, etc. (Olmos et al., 2010).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

3.1.1 Localización

El presente trabajo de investigación se desarrolló en la zona el Tejar Provincia Cercado departamento de Tarija, específicamente en las instalaciones del laboratorio de Fitopatología y Cultivo In Vitro de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma “Juan Misael Saracho.

3.1.2 Ubicación del ensayo

Ubicado geográficamente entre los paralelos 21°31`17`` de latitud sur y los meridianos 64°43`41`` y 65° 05` de longitud Oeste, con una altura promedio de 1876 m.s.n.m.

3.1.3 Característica del área del ensayo

3.1.3.1 Clima

La temperatura máxima oscila entre 30°C y 39°C se da en los meses calurosos de octubre a marzo y la mínima 1°C y 8°C en los meses de abril a septiembre que corresponden también a la época seca.

Las precipitaciones se presentan en una marcada estacionalidad entre octubre y marzo con una precipitación anual de 596 mm aproximadamente, enero es el mes con mayor precipitación con un promedio de 155mm aproximadamente. Los vientos oscilan entre 9,7km/h y 11,7km/h aproximadamente.

3.1.3.2 Vegetación

La zona el Tejar tiene una vegetación urbana diversa como lapachos (*Tabebuia impetiginosa Standley*), toborochis (*Chorisia insignis HBK*), molles (*Shinus molle L.*), casuarinas (*Casuarina cunninghamiana Miq.*), eucalipto (*Eucalyptus sp.*), sauces (*Salix humboldtiana Willd*).

3.1.4 Características del Centro experimental de Chocloca (CECH)

3.1.4.1 Ubicación del CECH

El Centro Experimental de Chocloca se encuentra ubicado geográficamente entre las siguientes coordenadas: 21°71'66'' de latitud sur y 64°73'33'' de longitud Oeste, a una altura 1750 m.s.n.m. del Municipio de Uriondo, Provincia Avilés del Departamento de Tarija. A 45 Km. De la ciudad de Tarija.

3.1.4.2 Clima del CECH

En la región se distingue, un valle con ondulaciones surcada por el río Camacho y quebradas. El clima es semiárido fresco, con una temperatura media anual de 17.5 °C debido a la existencia de diversas altitudes, con vientos de mayor intensidad los meses de julio y octubre. En cuanto a las características de precipitación aproximada de 150 mm. la concentración de las lluvias se presenta en los meses de noviembre a marzo.

Los registros pluviométricos diferencian dos épocas, una muy lluviosa que comprende octubre a marzo y una época invernal relativamente seca de abril a septiembre.

3.1.4.3 Vegetación del CECH

El Centro Experimental de Chocloca tiene una vegetación diversa de acuerdo a las estaciones del año se tiene una masa de formación vegetal que se utiliza para el pastoreo extensivo.

Crece un bosque seco templado, compuesto de churqui (*Vachellia caven*), algarrobo (*Prosopis pallida*), molle (*Schinus molle L.*), tarco (*Jacaranda mimosifolia*) jarca (*Acacia visco*).

3.2 MATERIALES

3.2.1 Material vegetal

Para el presente trabajo se utilizó material vegetal de primavera, yemas axilares y yemas apicales de las plantas madres de GxN (*Garfield – Nemared*) obtenidas de la

Estación Experimental de Chocloca, de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma “Juan Misael Saracho.

3.2.2 Material de laboratorio

3.2.2.1 Área de preparación

- Balanza de precisión.
- Pipetas.
- Matraces.
- Agua destilada.
- Erlenmeyer.
- Frascos y tubos de ensayo.

3.2.2.2 Área de esterilización

- Autoclave.
- Estufa de esterilización.

3.2.2.3 Área de siembra

- Cámara de flujo laminar.
- Mechero.
- Alcohol.
- Bisturí.

3.2.2.4 Componentes orgánicos e inorgánicos del medio de cultivo y otros.

- Medio WPM Medio de Cultivo para plantas Leñosas
- Medio Murashige y Skoog.
- Agar.
- Agua destilada.
- Azúcar.
- Vitaminas.
- Papel filtro.
- Soluciones desinfectantes (alcohol e hipoclorito de sodio).

3.2.3 Material y equipo de la cámara de crecimiento.

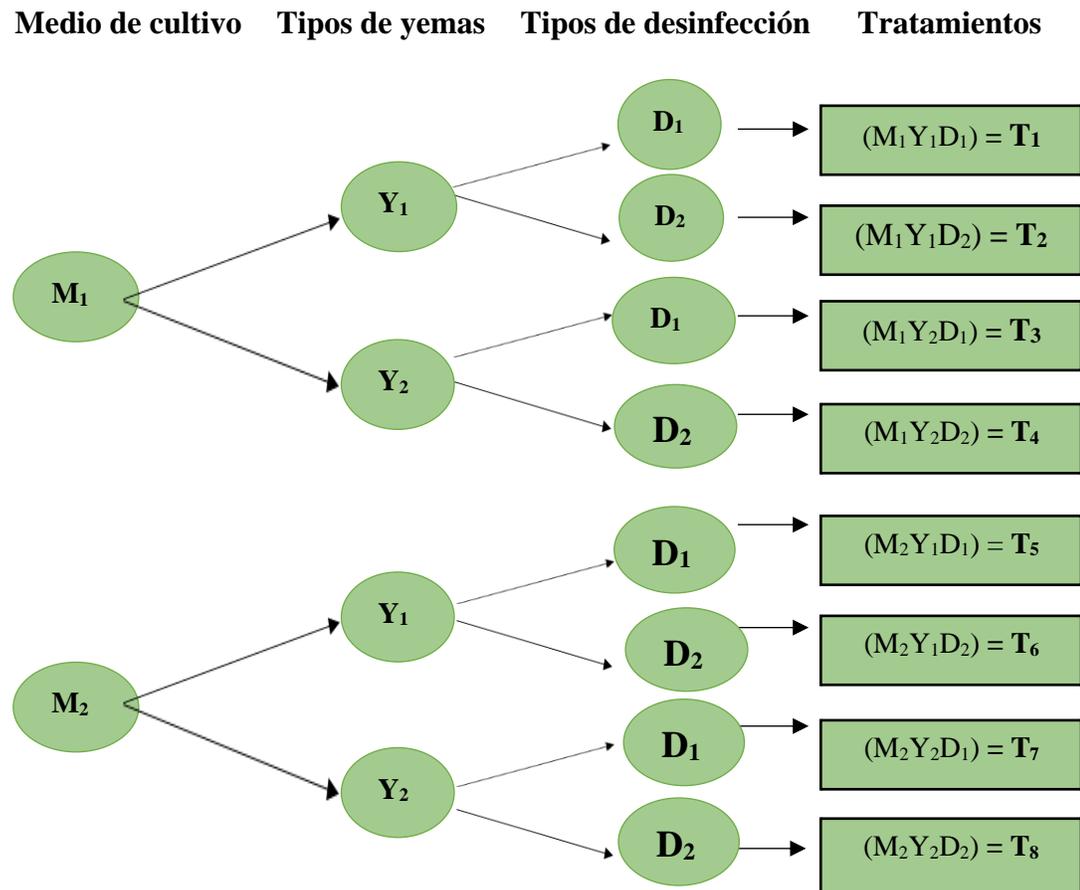
- Termómetros de máximas y mínimas.
- Iluminación fluorescente.

- Calefacción y refrigeración
- Gradillas para tubos de ensayo

3.3 METODOLOGÍA

3.3.1 Diseño experimental

Para realizar el análisis estadístico, se utilizó el diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial ($2 \times 2 \times 2$) con 8 tratamientos y 3 repeticiones con un total de 24 unidades experimentales; cada unidad experimental con 8 tubos de ensayos. La metodología que se usó para esta investigación, es el método de cultivo in vitro en su fase de establecimiento, se comenzó con la preparación de los diferentes medios de cultivo y se utilizó los diferentes métodos de desinfección. El cultivo in vitro estuvo compuesto de 5 fases: Fase 0 elección de la planta madre, fase 1 establecimiento, fase 2 multiplicación, fase 3 enraizamiento, fase 4 aclimatación.



3.3.2 Diseño de laboratorio

R E P E T I C I O N E S	I	T₁	T₂	T₃	T₄	T₅	T₆	T₇	T₈
	II	T₆	T₇	T₈	T₁	T₂	T₃	T₅	T₄
	III	T₄	T₅	T₆	T	T₇	T₈	T₂	T₁

3.4 PROCEDIMINETO

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Fitopatología y cultivo in vitro de la facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales, el procedimiento es el siguiente:

3.4.1 Identificación de las plantas madres en el CECH “Centro Experimental De Chocloca”

La identificación de las plantas madres se llevó a cabo en el Centro Experimental de Chocloca de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma Juan Misael Saracho.

En la identificación de las plantas madre de GxN (*Garfield – Nemared*), Se usó la caracterización botánica de las hojas, estas son de color rojas dando al porta-injerto un aspecto colorido y diferente, ante las demás *Prunus Pérsica* esto es porque viene de la hibridación de un almendro silvestre (*Garfi*) por un duraznero de hoja roja muy utilizado como porta-injerto (*Nemared*).

El híbrido tiene flores, de color rosácea, reunidas o en grupos. Las primeras tienen los pétalos grandes, de color rosa claro, abierto; las segundas tienen los pétalos más pequeños, de color rosa intenso y no se abren completamente.

3.4.2 Tratamiento de las plantas madres en el CECH “Centro Experimental De Chocloca”

Para el tratamiento de las plantas madre, se realizó la aplicación con ram-caf 88WP fungicida sistémico a base de oxiclورو de cobre, 10 días antes de la extracción de segmentos nodales.

Esta aplicación fue realizada para la eliminación de hongos de las plantas madres, esta actividad permitió obtener esquejes con menor porcentaje de hongos.

3.4.3 Fase de establecimiento in vitro

3.4.4.1 Fase de establecimiento in vitro

Preparación del medio de cultivo

Preparamos M&S (Murashige y Skoog.) y WPM: Medio Plantas Leñosas

M1= M&S (Murashige y Skoog.)

M2= WPM: Medio Plantas Leñosas

MEDIO 1 M&S (Murashige y Skoog.) Estuvo compuesto por las sales, vitaminas y fuente de energía propuestas por Murashige y Skoog 1962 MS.

Para preparar 1L de este medio se realiza el siguiente proceso:

Colocar en un agitador magnético un vaso precipitado de 1 L de capacidad con unos 400 ml de agua destilada y añadir

M&S 4,35 gr/L

Myo-Inositol 10ml/L

Sacarosa 30gr/L

Ácido cítrico 150mg/L

Después de añadir los compuestos mencionados aforar a 1 L para posteriormente medir el pH 5,7. Después de realizar la medición del pH procedemos a añadir el agar 7gr/L, y disolverlo en el microondas.

MEDIO 2: WPM: Medio Plantas Leñosas estuvo compuesta por la solución madre 1 (**M₁**), madre 2 (**M₂**), madre 3 (**M₃**), madre 4 (**M₄**), fuente de energía agente gelificante.

Para preparar 1L de este medio se colocó en un agitador magnético un vaso precipitado de 1 L de capacidad con unos 400 ml de agua destilada y añadir

M₁: Macro elementos 100ml/L

M₂: Micro elementos 2ml/L

M₃: Quelatos 5ml/L

M₄: Vitaminas 5ml/L

Myo-Inositol 10ml/L

Sacarosa 30gr/L

Ácido cítrico 150mg/L

Después de añadir los compuestos mencionados aforar a 1 L para posteriormente medir el pH 5,7. Después de realizar la medición del pH se procedió a añadir el agar 7gr/L, y disolverlo en el microondas.

Distribuir 10 ml de **M₁** en 96 tubos de ensayo, 10 ml de **M₂** en 96 tubos de ensayo. Marcar para evitar alguna confusión.

Se esterilizaron los tubos de ensayo que contienen el medio de cultivo durante 20 minutos mediante la aplicación de calor húmedo, bajo una presión interna de 1.2 atmósferas y una temperatura de 121°C.

Esterilización del material para el trabajo en la cámara de flujo laminar

Para la esterilización del material, se envolvió en papel periódico cada material e instrumento de trabajo. Se esterilizo en calor seco, en el horno por 3 horas a 150°C

Los materiales esterilizados fueron los siguientes: 2 vasos de precipitación, 4 cajas Petri, 2 tubos de ensayo, 2 mangos de bisturís, 4 pinzas.

Extracción de esquejes

Se realiza el mismo día del establecimiento. Para la extracción se usó tijeras de podar Felco 2, conservadora, guantes descartables.

Se extrajo esquejes con una longitud aproximadamente de 10 cm para llevar a laboratorio y realizar la desinfección y esterilización de los esquejes (*Garfi – Nemared*), realizar un lavado con agua bajo la pila, individualizar los segmentos nodales con bisturí, lavar con detergente en una solución de 250 ml agregando 5 ml de detergente común, posteriormente realizar el enjuagado con agua destilada, para eliminar el detergente.

Trabajo en la cámara de flujo laminar

Métodos de desinfección de segmentos nodales

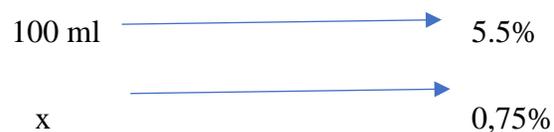
Desinfección 1: Inmersión de los segmentos nodales durante 60 segundos en alcohol 70 % v/v, luego 12 minutos en Hipoclorito de Sodio al 0,75 % de solución comercial, y posteriormente 3 lavados en agua destilada estéril, cada uno de 3 minutos.

Alcohol concentración 96%

$$\begin{array}{ccc} 100 \text{ ml} & \longrightarrow & 96 \\ x & \longrightarrow & 70 \end{array}$$

$$x = 72,91 \text{ ml}$$

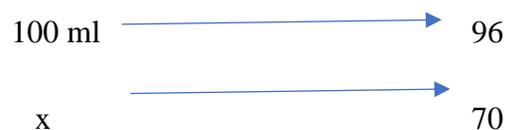
Hipoclorito de sodio concentración 5.5%



$$x = 13,5 \text{ ml}$$

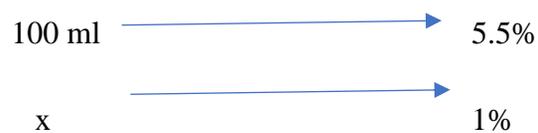
Después se colocaron los segmentos nodales en una solución de ácido cítrico a 150 mg/L.

Desinfección 2: Inmersión de los segmentos nodales durante 60 segundos en alcohol 70 % v/v, luego 12 minutos en Hipoclorito de Sodio al 1 % de solución comercial, y posteriormente 3 lavados en agua destilada estéril, cada uno de 3 minutos. Alcohol concentración 96%



$$x = 72,91 \text{ ml}$$

Hipoclorito de sodio concentración 5.5%



$$x = 18 \text{ ml}$$

Después se colocaron los segmentos nodales en una solución de ácido cítrico a 150 mg/L.

Establecimiento de los esquejes en la cámara de flujo laminar

Para ello se extrae un segmento nodal con la pinza del frasco con ácido cítrico y se coloca en la caja Petri. Flamear la piza utilizada en el mechero.

Se redujo el tamaño del explantes, de 1 a 2 cm, eliminamos ambos extremos del segmento, esto se realiza para la eliminación del daño ocasionado por la desinfección, flamear el bisturí.

Con la pinza flameada se tomó el segmento nodal para introducirlo en el tubo de ensayo, tapó y flameó la parte superior del tubo de ensayo, en los dos medios a probarse, se selló con filme de plástico de policloruro de vinilo, este procedimiento se realizó con cada tubo de ensayo.

Los tubos de ensayos conteniendo los segmentos nodales son colocados bajo condiciones de oscuridad total a $24\pm 1^\circ\text{C}$ durante 14 días, se ubicaron en cámara de crecimiento con luz artificial con un fotoperiodo de 12 horas luz a $21-23^\circ\text{C}$.

3.4.4 Variables a evaluar

3.4.4.1 Porcentaje de regeneración

Se evaluaron las muestras hasta los 60 días de forma visual.

El porcentaje de regeneración se evaluó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de regeneración} = \frac{\text{NE} - \text{ENR}}{\text{NE}} * 100$$

Dónde:

NE= Número de Esquejes

ENR= Esquejes No Regenerados

3.4.4.1 Porcentaje de contaminación

La técnica de cultivo in vitro es muy propensa a la contaminación, por lo que se requiere un alto grado de asepsia para dicha técnica, es por esto que las muestras se someten a sustancias que pueden eliminar los hongos y bacterias adheridos de forma superficial. Las muestras se evaluaron consecutivamente hasta a los 60 días de forma visual. El porcentaje de contaminación se evaluará de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de contaminación} = \frac{\text{TTE} - \text{TSC}}{\text{TTE}} * 100$$

Dónde:

TTE= Total de Tubos de Ensayo

TSC= Tubos sin Contaminar

3.4.4.1 Longitud de brotes a los 60 días

Las yemas (apicales y axilares), van creciendo a lo largo del tiempo después de la introducción in vitro, los mismos se midieron con ayuda de una regla de manera directa para evaluarlos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

En esta investigación se realizó el 10 de octubre de 2019 en el cual se evaluó: el porcentaje de contaminación, y el porcentaje de regeneración.

Los resultados obtenidos durante la investigación realizada en el laboratorio de fitopatología y cultivo in vitro, respecto a la propagación en su fase de establecimiento in vitro del híbrido (*Garfield – Nemared*), se detallan a continuación:

4.1.1 Evaluación de contaminación

Cuadro N°1 Porcentaje de contaminación

TRATAMIENTO	REPETICIONES			SUMATORIA	MEDIA X
	I	II	III		
T1 (M ₁ Y ₁ D ₁)	0	25	12,5	37,5	12,5
T2 (M ₁ Y ₁ D ₂)	0	0	12,5	12,5	4,2
T3 (M ₁ Y ₂ D ₁)	50	0	37,5	87,5	29,2
T4 (M ₁ Y ₂ D ₂)	37,5	12,5	12,5	62,5	20,8
T5 (M ₂ Y ₁ D ₁)	50	62,5	37,5	150	50,0
T6 (M ₂ Y ₁ D ₂)	12,5	37,5	12,5	62,5	20,8
T7 (M ₂ Y ₂ D ₁)	62,5	62,5	87,5	212,5	70,8
T8 (M ₂ Y ₂ D ₂)	37,5	37,5	25	100	33,3
Σ				725	241,7
	X				30,2

Como se puede observar que en el cuadro N°1 porcentaje de contaminación se tiene datos demasiados dispersos, que van de 4,2% a un 70,8% de contaminación, sin embargo, se puede observar que los tratamientos con el método de desinfección **D₁** registró contaminaciones de **T₁** 12,5%, **T₃** 29,2%, **T₅** 50,0%, **T₇** 70,8% porcentaje de

contaminación. se puede observar que los tratamientos con el método de desinfección **D₂** registró contaminaciones de **T₂** 4,2%, **T₄** 20,8%, **T₆** 20,8%, **T₈** 33,3% porcentaje de contaminación. Se puede mencionar que el método de desinfección **D₂** mostró menos variación en el porcentaje de contaminación.

Cuadro N°2 Interacción de factores Medios de Cultivo y Yemas

	M1	M2	SUMATORIA	MEDIA
Y1	50,0	212,5	262,5	43,8
Y2	150,0	312,5	462,5	77,1
SUMATORIA	200,0	525,0		
MEDIA	33,3	87,5		

En la tabla de interacción de factores se puede apreciar que los promedios de yemas difieren de 33,3%, siendo el promedio mayor el de la Y2 (yemas apicales), con un 77,1% y con el promedio menor el de la Y1 (yemas axilares), con un 43,8%, con relación a los medios de cultivo, se puede apreciar que los promedios difieren de 54,2%, siendo el promedio mayor el M2 (WPM), con un 87,5% y con el promedio menor el M1 (Murashige y Skoog), con un 33,3%.

Cuadro N°3 Interacción de factores Medios de Cultivo y Desinfección

	M1	M2	SUMATORIA	MEDIA
D1	125,0	362,5	487,5	81,3
D2	75,0	162,5	237,5	39,6
SUMATORIA	200,0	525,0		
MEDIA	33,3	87,5		

En la tabla de interacción de factores se puede apreciar que los promedios de desinfección difieren de 41,7%, siendo el promedio mayor el de la D1 (desinfección con NaClO al 0,75%), con un 81,3% y con el promedio menor el de la D2 (desinfección con NaClO al 1%), con un 39,6%, con relación a los medios de cultivo, se puede apreciar que los promedios difieren de 54,2%, siendo el promedio mayor el

M2 (WPM), con un 87,5% y con el promedio menor el M1 (Murashige y Skoog), con un 33,3%

Cuadro N°4 Interacción de factores Yemas y Desinfección

	Y1	Y2	SUMATORIA	MEDIA
D1	187,5	300,0	487,5	81,3
D2	75,0	162,5	237,5	39,6
SUMATORIA	262,5	462,5		
MEDIA	43,8	77,1		

En la tabla de interacción de factores se puede apreciar que los promedios de desinfección difieren de 41,7%, siendo el promedio mayor el de la D1 (desinfección con NaClO al 0,75%), con un 81,3% y con el promedio menor el de la D2 (desinfección con NaClO al 1%), con un 39,6%, con relación a las yemas se puede apreciar que los promedios de yemas difieren de 33,3%, siendo el promedio mayor el de la Y2 (yemas apicales), con un 77,1% y con el promedio menor el de la Y1 (yemas axilares), con un 43,8%,

Cuadro N°5 Análisis de Varianza porcentaje de contaminación (ANOVA)

Fuente de Variación	GL	SC	CM	FC	FT 5%	FT 1%
TOTAL	23	13098,96				
TRATAMIENTO	7	9661,5	1380,2	6,4**	2,66	0,001
ERROR	16	3437,5	214,8			
FACTOR M	1	4401,0	4401,0	20,5**	4,49	0,000
FACTOR Y	1	1666,7	1666,7	7,8**	4,49	0,013
FACTOR D	1	2604,2	2604,2	12,1**	4,49	0,003
M*Y	1	0,000	0,0	0,0 ^{NS}	4,49	1,000
M*D	1	937,5	937,5	4,4*	4,49	0,053
D*Y	1	26,0	26,0	0,1 ^{NS}	4,49	0,732

Cv = 48.53

Según el análisis de varianza realizado con los datos de la contaminación, se observa que, si existe diferencia significativa en los tratamientos al 5% y 1% de la probabilidad de error. También se puede observar que en los factores M (medio de cultivo), Y (yemas) y D (desinfección) que, si existe diferencia significativa en los tratamientos al

5% y 1% de la probabilidad de error. En la interacción de factores M (medio de cultivo) y Y(yemas); y la interacción de factores D(desinfección) y Y(yemas) no se observa diferencia significativa al 5% y al 1% de la probabilidad de error. En la interacción de factor M (medio de cultivo) y factor D (desinfección) existe diferencia significativa al 1% de la probabilidad de error. Con lo observado en el cuadro 5 solo se realizó la prueba de comparación de medias.

Según el análisis de varianza, existen diferencias en los tratamientos en relación a los factores de estudio (método de desinfección con hipoclorito de sodio al 0.75% y método de desinfección con hipoclorito de sodio al 1%). La presencia de hongos fue el principal agente de contaminación.

Se tiene un coeficiente de variación $Cv = 48.53$, lo que significa que existe grado de variabilidad entre los tratamientos.

Prueba de comparación de medias

Cálculo De MDS (Diferencia Mínima Significativa).

$CMe = 214.84$; $Nr = 3$; t constant en la tabla = 2.12

$$MDS = \sqrt{\frac{2CMe}{Nr}} * t; MDS = \sqrt{\frac{2*214.84}{3}} * 2.12 = 25.37$$

Cuadro N°6 Prueba de comparación de medias

Cualquier diferencia entre $X_a - X_b > MDS$ * Porcentaje de contaminación.

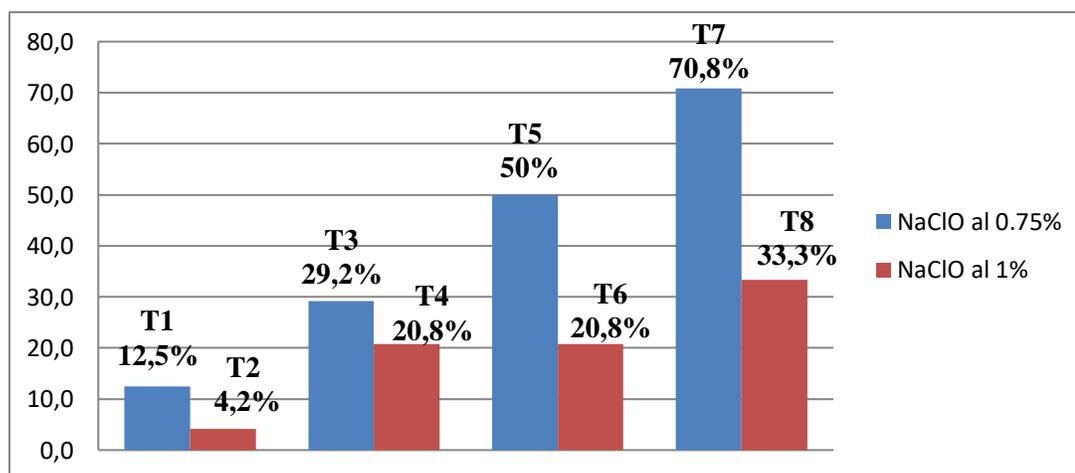
		T7	T5	T8	T3	T6	T4	T1
	MDS=25,37	70,8	50	33,3	29,2	20,8	20,8	12,5
T2	4,2	66,6	45,8	29,1	NS	NS	NS	NS
T1	12,5	58,3	37,5	NS				
T4	20,8	50	29,2					
T6	20,8	50	29,2					
T3	29,2	41,6	NS					
T8	33,3	37,5						
T5	50	NS						

Trat.	Descripción	% De contaminación	Rango
T2	Murashige y Skoog, Yemas Axilares e NaClO al 1%	4,2%	a
T1	Murashige y Skoog, Yemas Axilares e NaClO al 0,75%	12,5%	a
T4	Murashige y Skoog, Yemas Apicales e NaClO al 1%	20,8%	a
T6	WPM, Yemas Axilares e NaClO al 1%	20,8%	a
T3	Murashige y Skoog, Yemas Apicales e NaClO al 0,75%	29,2%	ab
T8	WPM, Yemas Apicales e NaClO al 1%	33,3%	b
T5	WPM, Yemas Axilares e NaClO al 0,75%	50%	b
T7	WPM, Yemas Apicales e NaClO al 0,75%	70,8%	b

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

De acuerdo con los resultados de la prueba de MDS, existe diferencia mínima significativa entre los tratamientos analizados; es decir, el tratamiento T2, T1, T4, T6 y T3 presentan la misma letra según MDS no difieren al 5% de probabilidad siendo los mejores tratamientos presentando un porcentaje de contaminación más baja. Por otra parte, los tratamientos T8, T5 y T7 presentan la misma letra siendo son los tratamientos que presentaron mayor porcentaje de contaminación.

Gráfica N°1 Comparación de los métodos de desinfección



En la gráfica N°1 se puede observar los porcentajes de contaminación y sus diferencias entre los distintos tratamientos, siendo el tratamiento T2 (desinfección con hipoclorito de sodio al 1% y alcohol al 70%), presenta el 4,2% de contaminación, el T7 (desinfección con hipoclorito de sodio al 0.75% y alcohol al 70%), presenta el 70,8% porcentaje de contaminación

4.1.2 Evaluación de regeneración

Cuadro N°7 Porcentaje de regeneración

TRATAMIENTO	REPETICIONES			SUMATORIA	MEDIA
	I	II	III		
T1 (M ₁ Y ₁ D ₁)	0	0	0	0	0,0
T2 (M ₁ Y ₁ D ₂)	0	12,5	0	12,5	4,2
T3 (M ₁ Y ₂ D ₁)	25	12,5	12,5	50	16,7
T4 (M ₁ Y ₂ D ₂)	25	0	12,5	37,5	12,5
T5 (M ₂ Y ₁ D ₁)	37,5	37,5	25	100	33,3
T6 (M ₂ Y ₁ D ₂)	25	12,5	25	62,5	20,8
T7 (M ₂ Y ₂ D ₁)	12,5	25	0	37,5	12,5
T8 (M ₂ Y ₂ D ₂)	12,5	0	12,5	25	8,3
Σ				325	108,3
x					13,5

Podemos observar en el cuadro N°7 porcentaje de regeneración se tiene datos demasiado dispersos, que van de 0% a un 33,3% de regeneración, sin embargo, se puede observar que los tratamientos con mayor porcentaje de regeneración fueron los tratamientos **T5** (M₂Y₁D₁) con 33.3 % y **T6** (M₂Y₁D₂) con 20,8 %, siendo los porcentajes más aceptables, sin embargo, los tratamientos **T1** (M₁Y₁D₁) con 0% y el tratamiento **T2** (M₁Y₁D₂) 4,2% de regeneración, son los porcentajes más bajos en cuanto a regeneración. Se puede mencionar que el tratamiento con mejor comportamiento en cuanto la regeneración es el **T5** (WPM, Yemas Axilares e NaClO al 0,75%) que mostró menos variación en el porcentaje de regeneración.

Cuadro N°8 Interacción de factores Medios de Cultivo y Yemas

	M1	M2	SUMATORIA	MEDIA
Y1	12,5	162,5	175,0	29,2
Y2	87,5	62,5	150,0	25
SUMATORIA	100,0	225,0		
MEDIA	16,7	37,5		

En el cuadro de interacción de factores se puede apreciar que los promedios de yemas difieren de 4,2%, siendo el promedio mayor el de la Y1 (yemas axilares), con un 29,2% y con el promedio menor el de la Y2 (yemas apicales), con un 25%, con relación a los medios de cultivo, se puede apreciar que los promedios difieren de 20,8%, siendo el promedio mayor el M2 (WPM), con un 37,5% y con el promedio menor el M1 (Murashige y Skoog), con un 16,7%

Cuadro N°9 Interacción de factores Medios de Cultivo y Desinfección

	M1	M2	SUMATORIA	MEDIA
D1	50,0	137,5	187,5	31,3
D2	50,0	87,5	137,5	22,9
SUMATORIA	100,0	225,0		
MEDIA	16,7	37,5		

En la tabla de interacción de factores se puede apreciar que los promedios de desinfección difieren de 8,4%, siendo el promedio mayor el de la D1 (desinfección con NaClO al 0,75%), con un 31,3% y con el promedio menor el de la D2 (desinfección con NaClO al 1%), con un 22,9%, con relación a los medios de cultivo, se puede apreciar que los promedios difieren de 20,8%, siendo el promedio mayor el M2 (WPM), con un 37,5% y con el promedio menor el M1 (Murashige y Skoog), con un 16,7%.

Cuadro N°10 Interacción de factores Yemas y Desinfección

	Y1	Y2	SUMATORIA	MEDIA
D1	100,0	87,5	187,5	31,3
D2	75,0	62,5	137,5	22,9
SUMATORIA	175,0	150,0		
MEDIA	29,2	25		

En la tabla de interacción de factores se puede apreciar que los promedios de desinfección difieren de 8,4%, siendo el promedio mayor el de la D1 (desinfección con NaClO al 0,75%), con un 31,3% y con el promedio menor el de la D2 (desinfección con NaClO al 1%), con un 22,4%, con relación a las yemas se puede apreciar que los promedios de yemas difieren de 4,2%, siendo el promedio mayor el de la Y1 (yemas axilares), con un 29,2% y con el promedio menor el de la Y2 (yemas apicales), con un 25%.

Cuadro N°11 Análisis de Varianza porcentaje de regeneración (ANOVA)

FV	GL	SC	CM	FC	FT 5%	FT 1%
TOTAL	23	3411,46				
TRATAMIENTO	7	2265,63	323,7	4,52**	2,66	0,006
ERROR	16	1145,83	71,6			
FACTOR M	1	651,04	651,0	9,09**	4,49	0,008
FACTOR Y	1	26,04	26,0	0,36 ^{NS}	4,49	0,555
FACTOR D	1	104,17	104,2	1,45*	4,49	0,245
M*Y	1	1276,042	1276,0	17,82**	4,49	0,001
M*D	1	104,167	104,2	1,45*	4,49	0,245
Y*D	1	0,000	0,0	0,00 ^{NS}	4,49	1,000

Cv = 54,5

Según el análisis de varianza realizado con los datos de la regeneración, se observa que, si existe diferencia significativa en los tratamientos al 5% y 1% de la probabilidad de error. También se puede observar que en el factor M (medio de cultivo), si existe diferencia significativa en los tratamientos al 5% y 1% de la probabilidad de error, en los factores Y (yemas) y D(desinfección) no existe diferencia significativa al 5% y 1% de la probabilidad de error.

En la interacción de factores entre factor M (medios de cultivo) y factor Y (yemas) se observa diferencia significativa al 5% y 1% de la probabilidad de error. Se puede observar que en la interacción de factor M (medio de cultivo) con el factor D (desinfección) no existe diferencia significativa al 5% y 1% de la probabilidad de error al igual que la interacción entre el factor Y (yemas) con el factor D (desinfección). Con lo observado en el cuadro 11 solo se realizó la prueba de comparación de medias.

Según el análisis existe un coeficiente de variación de 54,5 lo que hace deducir que los tratamientos se comportan de diferentes maneras en los ensayos. Según el análisis de varianza, existen diferencias en los tratamientos en relación a los factores de estudio.

Prueba de comparación de medias

Cálculo De MDS (Diferencia Mínima Significativa).

$CMe = 71.6$; $Nr = 3$; t constant en la tabla = 2.12

$$MDS = \sqrt{\frac{2CMe}{Nr}} * t; MDS = \sqrt{\frac{2*71.6}{3}} * 2.12; MDS = 14.64$$

Cuadro N°12 Prueba de comparación de medias
Cualquier diferencia entre $X_a - X_b > MDS * \text{Porcentaje de regeneración}$

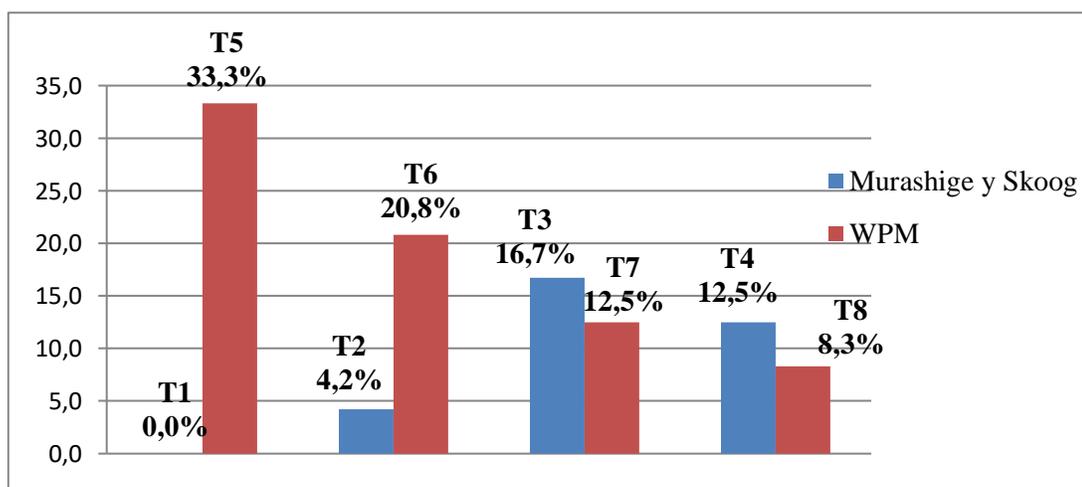
		T5	T6	T3	T4	T7	T8	T2
	MDS=14,64	33,3	20,8	16,7	12,5	12,5	8,3	4,2
T1	0	33,3	20,8	16,7	NS	NS	NS	NS
T2	4,2	29,1	16,6	NS				
T8	8,3	25	NS					
T7	12,5	20,8						
T4	12,5	20,8						
T3	16,7	16,6						
T6	20,8	NS						

Trat.	Descripción	% De regeneración	Rango
T5	WPM, Yemas Axilares e NaClO al 0,75%	33,3	a
T6	WPM, Yemas Axilares e NaClO al 1%	20,8	ab
T3	Murashige y Skoog, Yemas Apicales e NaClO al 0,75%	16,7	b
T4	Murashige y Skoog, Yemas Apicales e NaClO al 1%	12,5	b
T7	WPM, Yemas Apicales e NaClO al 0,75%	12,5	b
T8	WPM, Yemas Apicales e NaClO al 1%	8,3	bc
T2	Murashige y Skoog, Yemas Axilares e NaClO al 1%	4,2	c
T1	Murashige y Skoog, Yemas Axilares e NaClO al 0,75%	0	c

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

De acuerdo con los resultados de la prueba de MDS, existe diferencia mínima significativa entre los tratamientos analizados; es decir, el tratamiento T5 y T6 presentando letras iguales según MDS no difieren al 5% de probabilidad siendo los mejores tratamientos en cuanto a la regeneración. Por otra parte, los tratamientos T8, T2 y T1 presentando letras iguales son los tratamientos que presentaron menor porcentaje de regeneración.

Gráfica N°2 Comparación de la regeneración



En la gráfica N°2 se puede observar los porcentajes de regeneración y sus diferencias entre los distintos tratamientos, siendo el tratamiento T5 (WPM, yemas axilares y desinfección con hipoclorito de sodio al 0.75% y alcohol al 70%), presenta el mejor porcentaje de regeneración, el T1 (Murashige y Skoog yemas axilares y desinfección con hipoclorito de sodio al 0.75% y alcohol al 70%), presenta un porcentaje de regeneración nulo

4.1.3 Evaluación de la longitud de los brotes a los 60 días

Cuadro N°13 Longitud de brotes (cm)

TRATAMIENTO	REPETICIONES			SUMATORIA	MEDIA
	I	II	III		
T1 (M ₁ Y ₁ D ₁)	0	0	0	0	0,0
T2 (M ₁ Y ₁ D ₂)	0	0,3	0	0,3	0,1
T3 (M ₁ Y ₂ D ₁)	0,4	0,2	0,2	0,8	0,3
T4 (M ₁ Y ₂ D ₂)	0,5	0	0,2	0,7	0,2
T5 (M ₂ Y ₁ D ₁)	0,9	0,6	0,6	2,1	0,7
T6 (M ₂ Y ₁ D ₂)	0,6	0,3	0,6	1,5	0,5
T7 (M ₂ Y ₂ D ₁)	0,3	0,6	0	0,9	0,3
T8 (M ₂ Y ₂ D ₂)	0,3	0	0,3	0,6	0,2
Σ				6,9	2,3
x					0,3

Como se puede observar en la tabla de longitud de brotes se tiene datos demasiados dispersos, que van de 0 cm a 0,7 cm de longitud de brotes, sin embargo, se puede observar que el tratamiento que se registró con mayor longitud de brotes fue el tratamiento **T5 (M₂Y₁D₁)** replica I con 0,7 cm, **T6 (M₂Y₁D₂)** con 0,5 cm, siendo un porcentaje aceptable, sin embargo, en el tratamiento **T1 (M₁Y₁D₁)**, 0,0cm el tratamiento **T2 (M₁Y₁D₂)**, con 0,1cm el tratamiento **T4 (M₁Y₂D₂)** con 0,2 cm, el tratamiento **T8 (M₂Y₂D₂)** 0,2cm, siendo los tratamientos no aceptable en cuanto a longitud de los brotes. Se puede mencionar que el tratamiento con mejor comportamiento en cuanto a la longitud de los brotes es el **T5 (WPM, Yemas Axilares e NaClO al 0,75%)** que mostro menos variación.

Cuadro N°14 Interacción de factores Medios de Cultivo y Yemas

	M1	M2	SUMATORIA	MEDIA
Y1	0,3	3,6	3,9	0,7
Y2	1,5	1,5	3,0	0,5
SUMATORIA	1,8	5,1		
MEDIA	0,3	0,9		

En la tabla de interacción de factores se puede apreciar que los promedios de yemas difieren de 0,2cm de longitud de brotes, siendo el promedio mayor el factor Y1 (yemas axilares), con 0,7 cm de longitud de brotes y con el promedio menor el factor Y2 (yemas apicales), con 0,5 cm de longitud de brotes, con relación a los medios de cultivo, se puede apreciar que los promedios difieren de 0,6 cm de longitud de brotes, siendo el promedio mayor el factor M2 (WPM), con 0,9 cm de longitud de brotes y con el promedio menor el factor M1 (Murashige y Skoog), con un 0,3 cm longitud de brotes.

Cuadro N°15 Interacción de factores Medios de Cultivo y Desinfección

	M1	M2	SUMATORIA	MEDIA
D1	0,8	3,0	3,8	0,6
D2	1,0	2,1	3,1	0,5
SUMATORIA	1,8	5,1		
MEDIA	0,3	0,9		

En la tabla de interacción de factores se puede apreciar que los promedios de desinfección difieren de 0,1 cm de longitud de brotes, siendo el promedio mayor el factor D1 (desinfección con NaClO al 0,75%), con 0,6 cm de longitud de brotes y con el promedio menor el factor D2 (desinfección con NaClO al 1%), con 0,5cm de longitud brotes, con relación a los medios de cultivo, se puede apreciar que los promedios difieren de 0,6 cm de longitud de brotes, siendo el promedio mayor el factor M2 (WPM), con 0,9 cm de longitud de brotes y con el promedio menor el M1 (Murashige y Skoog), con 0,3 cm de longitud de brotes.

Cuadro N°16 Interacción de factores Yemas y Desinfección

	Y1	Y2	SUMATORIA	MEDIA
D1	2,1	1,7	3,8	0,6
D2	1,8	1,3	3,1	0,5
SUMATORIA	3,9	3,0		
MEDIA	0,7	0,5		

En la tabla de interacción de factores se puede apreciar que los promedios de desinfección difieren de 0,1 cm de longitud de brotes, siendo el promedio mayor el factor D1 (desinfección con NaClO al 0,75%), con 0,6 cm de longitud de brotes y con el promedio menor el factor D2 (desinfección con NaClO al 1%), con 0,5 cm de longitud de brotes. se puede apreciar que los promedios del factor yemas difieren de 0,2 cm de longitud de brotes, siendo el promedio mayor el factor Y1 (yemas axilares), con 0,7 cm de longitud de brotes y con el promedio menor el factor Y2 (yemas apicales), con 0,5cm de longitud de brotes.

Cuadro N°17 Análisis de Varianza longitud de brotes a los 60 días (cm) (ANOVA)

FV	GL	SC	CM	FC	FT 5%	FT 1 %
TOTAL	23	1,61				
TRATAMIENTO	7	1,03	0,1	4,12**	2,66	0,009
ERROR	16	0,57	0,04			
FACTOR M	1	0,45	0,5	12,66**	4,49	0,003
FACTOR Y	1	0,03	0,03	0,94*	4,49	0,346
FACTOR D	1	0,02	0,02	0,57*	4,49	0,461
M*Y	1	0,454	0,5	12,66**	4,49	0,003
M*D	1	0,050	0,1	1,41*	4,49	0,253
Y*D	1	0,000	0,00	0,01 ^{NS}	4,49	0,915

Cv = 36,51

Según el análisis de varianza realizado con los datos de longitud de brotes, se observa que, si existe diferencia significativa en los tratamientos al 5% y 1% de la probabilidad de error. También se puede observar que en el factor M (medio de cultivo), si existe diferencia significativa en los tratamientos al 5% y 1% de la probabilidad de error, en

los factores Y (yemas) y D(desinfección) existe diferencia significativa al 1% de la probabilidad de error.

En la interacción de factores entre factor M (medios de cultivo) y factor Y (yemas) se observa diferencia significativa al 5% y 1% de la probabilidad de error. En la interacción de factor M (medio de cultivo) con el factor D (desinfección) existe diferencia significativa al 1% de la probabilidad de error, en la interacción entre el factor Y (yemas) con el factor D (desinfección) no existe diferencia significativa al 5% y 1% de la probabilidad de error

Las diferencias existen por que los datos son un tanto variados y para que exista una dispersión de datos elevada debe existir factores que determinen este caso tales como la ubicación del material vegetal. La diferencia en cuanto a la respuesta, pueden deberse a la distribución hormonal dentro de la misma planta. En consecuencia, la longitud de brotes se debe a la compleja conformación de las distintas células de la madera en combinación con la rigidez propia de las paredes celulares le confiere al tejido leñoso su fortaleza. Las especies leñosas presentan, en su mayoría, resistencia a ser propagadas *in vitro*.

Con lo observado en el cuadro 17 solo se realizó la prueba de comparación de medias.

Según el análisis existe un coeficiente de variación de 36,51, lo que hace deducir que los tratamientos se comportan de diferentes maneras en los ensayos. Según el análisis de varianza, existen diferencias en los tratamientos en relación a los factores de estudio.

Prueba de comparación de medias

Cálculo De MDS (Diferencia Mínima Significativa).

$$CMe = 0,04$$

$$Nr = 3$$

t constant en la tabla = 2.12

$$MDS = \sqrt{\frac{2CMe}{N^{\circ}r}} * t; MDS = \sqrt{\frac{2*0,04}{3}} * 2.12; MDS = 0,3$$

Cuadro N°18 Prueba de comparación de medias
Cualquier diferencia entre $X_a - X_b > \text{MDS} * \text{Porcentaje de contaminación}$.

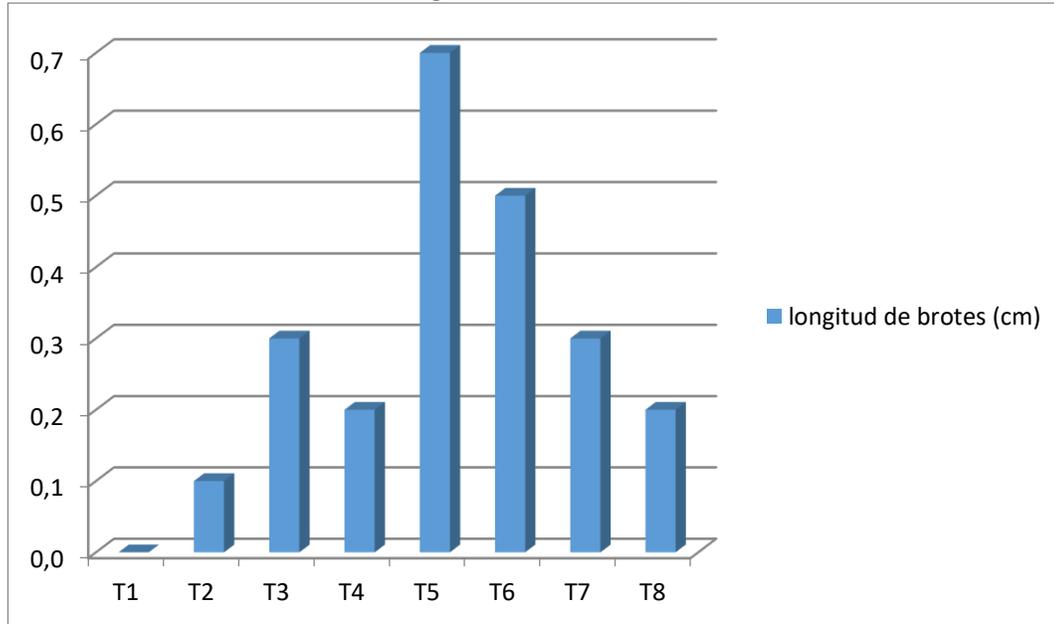
		T5	T6	T3	T7	T4	T8	T2
	MDS = 0,3	0,7	0,5	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1
T1	0	0,7	0,5	0,3	0,3	NS	NS	NS
T2	0,1	0,6	0,4					
T8	0,2	0,5	NS					
T4	0,2	0,5						
T7	0,3	0,4						
T3	0,3	0,4						
T6	0,5	NS						

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

Trat.	Descripción	Longitud	Rango
T5	WPM, Yemas Axilares e NaClO al 0,75%	0,7	a
T6	WPM, Yemas Axilares e NaClO al 1%	0,5	ab
T3	Murashige y Skoog, Yemas Apicales e NaClO al 0,75%	0,3	b
T7	WPM, Yemas Apicales e NaClO al 0,75%	0,3	b
T4	Murashige y Skoog, Yemas Apicales e NaClO al 1%	0,2	bc
T8	WPM, Yemas Apicales e NaClO al 1%	0,2	bc
T2	Murashige y Skoog, Yemas Axilares e NaClO al 1%	0,1	c
T1	Murashige y Skoog, Yemas Axilares e NaClO al 0,75%	0	c

De acuerdo con los resultados de la prueba de MDS, existe diferencia mínima significativa entre los tratamientos analizados; es decir, el tratamiento T5 y T6 no difieren al 5% de probabilidad siendo los mejores tratamientos en cuanto a la longitud de brotes. Por otra parte, los tratamientos T2 y T1 presentan letras iguales son los tratamientos que presentaron menor longitud de brotes.

Gráfica N°3 Longitud de los brotes (cm) a los 60 días



En la gráfica N°3 se puede observar la longitud de brotes y sus diferencias entre los distintos tratamientos, siendo el tratamiento T5 (WPM, yemas axilares y desinfección con hipoclorito de sodio al 0.75% y alcohol al 70%), presenta el mejor resultado en cuanto a la longitud de brotes, el T1 (Murashige y Skoog yemas axilares y desinfección con hipoclorito de sodio al 0.75% y alcohol al 70%), presenta 0 cm de la longitud de brotes.

En los cuadros de ANOVA, del porcentaje de contaminación, porcentaje de regeneración y la longitud de los brotes a los 60 días, presentaron una mínima diferencia significativa, entre los tratamientos en estudio.

Se puede observar que el método de desinfección con hipoclorito de sodio al 0.75% y alcohol al 70% v/v presenta la contaminación más alta con un 70.8% en el tratamiento **T7 (M₂Y₂D₁)**, a comparación del otro método de desinfección con hipoclorito de sodio al 1% y alcohol al 70% que tiene la contaminación más baja con un 4.2% en el tratamiento **T2 (M₁Y₁D₂)**, por lo que se puede decir que el mejor método de desinfección es con hipoclorito de sodio al 1% y alcohol al 70%.

En cuanto a la regeneración el tratamiento **T5** (WPM, yemas axilares y desinfección con hipoclorito de sodio al 0.75% y alcohol al 70%), presentó mejor resultado, con un 33.3% de regeneración, a comparación con otros tratamientos, en tanto el tratamiento **T1** (Murashige y Skoog yemas axilares y desinfección con hipoclorito de sodio al 0.75% y alcohol al 70%), presenta, un 0% de regeneración.

Por otro lado, en la longitud de brotes, el tratamiento **T5** (WPM, yemas axilares y desinfección con hipoclorito de sodio al 0.75% y alcohol al 70%), presentó mejor resultado, con 0,7 cm de longitud de brotes, a comparación con otros tratamientos, en tanto el tratamiento **T1** (Murashige y Skoog yemas axilares y desinfección con hipoclorito de sodio al 0.75% y alcohol al 70%), presenta, 0 cm de longitud de brotes.

El establecimiento de plantas leñosas para su cultivo *in vitro* es un paso difícil. Sin embargo, en el presente trabajo fue posible alcanzar resultados positivos. La desinfección de los explantes es esencial para el éxito del cultivo *in vitro*. La contaminación microbiana puede originarse por contaminantes que vienen adheridos a la superficie del explante o por fallas en los procedimientos de laboratorio. El mantenimiento de plantas donadoras bajo condiciones de invernadero o vivero y con pretratamiento con sustancias antimicrobianas disminuyen las pérdidas. Ello permite lograr el establecimiento de cultivos axénicos y fisiológicamente vigorosos con los cuales iniciar el proceso de multiplicación (Cassells, 2011).

Varios autores se refieren a la importancia del protocolo de desinfección en el establecimiento *in vitro* de especies frutales, lo que hace que varíen los porcentajes de contaminación microbiana. Sin embargo, tratamientos con 0.5- 0.75% de NaClO dependiendo del tipo de la especie frutal han sido encontrados efectivos en el control de microorganismos contaminantes (Gevara et al., 2016). Similares resultados han sido obtenidos en el presente trabajo con 4,2% de contaminación, una regeneración de 33,3%.

El empleo del hipoclorito de sodio como parte final del proceso de desinfección en *Prunus*, ha sido utilizado por diferentes autores. Las concentraciones varían desde 0.25

hasta 5.0% con tiempos entre los 5 a 15 min Cabrera, (2003); Ahmand *et al.*, (2003); Parada y Villegas, (2009); Vaghiar-Azar *et al.*, (2012); Felek *et al.*, (2015); (Guevara et al., 2016). Las concentraciones y tiempos empleados en este trabajo se encontraron entre esos valores.

Los segmentos nodales sometidos previamente a oscuridad durante una semana, tuvieron un porcentaje de regeneración adecuado, respecto a otros resultados informados en la literatura científica internacional, probablemente, debido a un mayor tenor de auxina endógena, ya que estas son sensibles a la luz, lo que modifica de esta forma el balance auxina/citoquinina y favorece la morfogénesis. Además, influyó en el control de la oxidación de los felones, lo que evitó la muerte de los explantes y con ello una mayor brotación. Una de las mayores limitantes en el desarrollo de las plantas leñosas, es la dificultad para erradicar las enfermedades endógenas y la excreción de sustancias como polifenoles y taninos que en la etapa de adaptación *in vitro* crean oxidación.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

En base a los resultados obtenidos y un análisis de resultados, respondiendo a los objetivos planteados, en el presente trabajo de investigación, cabe presentar las siguientes conclusiones:

- El mejor comportamiento de las yemas al medio de cultivo Murashige y Skoog se dio con el tratamiento **T3(M₁Y₂D₁)**, con 16,7% usando las Yemas Axilares e hipoclorito de sodio NaClO al 0,75% y alcohol al 70%
- El mejor comportamiento de las yemas al medio de cultivo WPM (Medio de Planta Leñosas) se dio con el tratamiento **T5 (M₂Y₁D₁)**, con 33,3% usando las Yemas Axilares e hipoclorito de NaClO al 0,75% y alcohol al 70%
- En cuanto al porcentaje de contaminación el mejor resultado se dio con el tratamiento **T2(M₁Y₁D₂)**, con 4,2% tratamiento basado en Murashige y Skoog, e hipoclorito de sodio al 1% y alcohol al 70% aplicados en las yemas axilares del *Garfield – Nemared*.
- Se puede observar que el porcentaje de regeneración con mejor resultado se dio con el tratamiento **T5 (M₂Y₁D₁)**, tratamiento basado en WPM (Medio de Planta Leñosas) e hipoclorito de sodio al 0,75% y alcohol al 70% aplicados en las yemas axilares del *Garfield – Nemared*.
- En cuanto al porcentaje de regeneración y longitud de brotes **T5 (M₂Y₁D₁)**, con 0,7cm. se presenta complicaciones, debido a la compleja conformación de las distintas células de la madera en combinación con la rigidez propia de las paredes celulares le confiere al tejido leñoso su fortaleza. Las especies leñosas presentan, en su mayoría, resistencia a ser propagadas *in vitro*, por su crecimiento lento, de ciclo vegetativo largo.
- El establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales de algunas especies de plantas, especialmente leñosas, está, en gran medida, limitado por la ocurrencia de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo. factores que hicieron que tengamos en el **T7 (M₂Y₂D₁)**, 70,8% de contaminación.

5.2 Recomendaciones

Al finalizar el presente trabajo de investigación, y en base a los resultados obtenidos, se formula las siguientes recomendaciones:

Se recomienda seguir rigurosamente el protocolo de laboratorio durante el trabajo de la investigación para evitar posteriores problemas de contaminación.

Para evitar la oxidación de los segmentos nodales, estos deben ser sumergidos en ácido cítrico (1,5 g/L), diluidos en un vaso de agua destilada por al menos 3 minutos, después de sumergirlos en ácido cítrico colocar los segmentos nodales en agua destilada para su establecimiento en los tubos de ensayos.

Se recomienda seguir con la investigación en las fases posteriores al establecimiento, como ser; multiplicación, enraizamiento y aclimatación para poder evaluar que el método in vitro si es viable y satisface las necesidades de los productores con plantas sanas.

Fomentar el estudio de las técnicas no convencionales para la obtención de plantas, ya que la producción sin tierra es una tendencia futurista debido a los cambios climáticos que ocasiona pérdidas en el agro.