

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

El nogal (*Juglans* sp) es un árbol con un factor económico muy importante ya que se puede obtener muchos sub productos de este árbol como ser: madera dura homogénea, se puede extraer aceite del fruto, de la hojas se obtiene vermífugos los cuales sirven para la industria farmacéutica, se puede extraer del nogal sustancias químicas que sirven para la elaboración de fungicidas como también se obtienen tintes de color pardo oscuro. (Bleisser 2008)

A nivel mundial se producían 770.000 Tn, en 1986, en la actualidad se produce un aproximado de 1.230.000 Tn, donde China es el primer país productor con 330.000 Tn, como segundo tenemos a los Estados Unidos con una producción de 254.000Tn, y el tercer país productor es el Estado Islámico de Irán con una producción de 128.000 Tn. En los países de Latinoamérica los principales productores son Argentina y Chile. (FAO 2012)

Según información proporcionada por el INIAF, en Tarija, se proyecta como el segundo rubro productivo económico, después de la uva es la nuez (nogalicultura), que a futuro se proyecta como uno de los cultivos agroindustriales más sostenibles. Esta temática fue expuesta en el primer Simposio Internacional de la Nogalicultura, orientado a ser un aporte y potenciar el cultivo de nuez en la macroregión de los valles de Bolivia. (INIAF 2015)

En estos últimos tiempos se vio al nogal como una alternativa en la producción agrícola en los valles de Paicho y Sella, ubicados en el departamento de Tarija, estos se constituyen en los principales productores de nuez en Bolivia. Por ello, este producto

es proyectado como la segunda actividad productiva económica en este departamento, después de la uva, es así como se le está buscando nuevos métodos, experiencias para la producción de platines. (INIAF 2015)

Las variedades que se conocen en Tarija son el nogal criollo (*Juglans Regia*) como una variedad de pie franco que se reproduce por semilla, según datos el INIAF. La fructificación se produce a partir de los 10 años, con un rendimiento promedio de 22 Kg/planta. Se estima que la producción de nuez en Bolivia apenas cubre un 30% de la demanda; es decir, un 70% se importa de los países de Chile y Argentina. (INIAF 2015)

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción del nogal es limitada a ciertas zonas en el departamento, cultivo que no cuenta con información tanto en el ámbito regional como en el universitario, y esto hace que se tengan reservas para la producción de la nuez.

El nogal fue un cultivo olvidado hasta el presente, ya que su plantación no es habitual por el tiempo en el que demora en desarrollar su fruto y en algunos casos su escasas.

En Departamento de Tarija cuenta con variedades criollas, las cuales tienen sus propias características; estas tardan en producir fruto como así también un problema muy importante es la multiplicación, pues en este medio se realiza por semilla, presentando una serie de problemas para los agricultores, lo cual es un limitante en la producción, ya que obtener una planta por semilla demora alrededor de dos años, motivo por el cual muchos productores importan plantines de los países vecinos.

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

1.2 JUSTIFICACIÓN

Este trabajo de investigación busca una alternativa para la multiplicación, por medio de la técnica de cultivo *in vitro*, para la producción de plantines a partir de embriones, sin seleccionar semilla ya que nogal es una especie forestal importante dentro de los bosques húmedos de Bolivia, misma que en los últimos tiempos se la está tomando en cuenta como una especie para la producción de nuez ya que esta tiene muchas ventajas nutritivas.

La semilla de esta especie tiene una cubierta endurecida, lo cual dificulta la germinación y la propagación.

Una técnica que ha revolucionado la producción agrícola en los últimos años es la realizada *in vitro*, que incluye un conjunto de técnicas que permiten el cultivo de las células y tejidos vegetales en condiciones asepticas y el aprovechamiento de su totipotencia, así como de su aptitud para la variación y capacidad de modificación genética 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. (IBMCP 2005)

Al mismo tiempo, la técnica del cultivo *in vitro* permite producir plantas durante todo el año, independientemente del factor climático, puesto que las condiciones de laboratorio consiguen ser controladas según la necesidad del cultivo. Este procedimiento, del mismo modo, permite obtener plantas libres de enfermedades y patógenos, incluso libres de virus y de esta forma obtener material genético de alta calidad, cumpliendo con todas las normas fitosanitarias demandadas.

De este modo hacer un análisis en tiempo de producción de plantines en laboratorio.

1.4 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Para el presente trabajo se plantea la siguiente hipótesis:

1.4.1 Hipótesis Alternativa

- El método de cultivo *in vitro* acelera el proceso de germinación de los embriones de la planta del nogal.
- La aplicación de cloroformo como método de desinfección de los embriones muestra un bajo porcentaje de contaminación de las muestras.
- La aplicación de diferentes concentraciones de fitorreguladores presenta mayor germinación.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

Evaluar la efectividad de la técnica del cultivo *in vitro* para la producción de plantines de nogal (*Juglans* sp) a partir de embriones, como alternativa para la multiplicación masiva.

1.5.2 Objetivos específicos

- Evaluar cuatro medios de cultivo, con diferentes concentraciones de fitohormonas BAP 6- Bencilanimopurina en (1.5 mg/L, 2 mg/L 2.5 mg/L y 3 mg/L) e IBA (Ácido indolbutírico) (0.15 mg/L, 0.2 mg/L ,0.25 mg/L y 0.3 mg/L) en la fase de establecimiento *in vitro*.
- Evaluar el porcentaje de germinación de los embriones en la fase de establecimiento del nogal *in vitro*.

- Evaluar dos métodos de desinfección con alcohol etílico al 70%, hipoclorito de sodio al 4% y cloroformo 5 ml, usados en la fase de establecimiento in vitro del nogal.

CAPÍTULO II

MARCO TEORICO

2.1 ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS

Procedente de Persia (región del Himalaya), según unos autores, o de China y Japón, según otros; fue transportado a Grecia y luego a Italia y a los demás países de Europa. Existen evidencias fósiles de la presencia del Nogal *J. Regia*, en la Península Ibérica, que se remontan al Paleolítico. (Infoagro.com, 2016)

El nogal se encuentra vegetando en estado silvestre en la Europa oriental y Asia Menor, asimismo en Norteamérica, formando un cierto número de especies más o menos cultivadas.

El nombre del género deriva del latín *juglans*, nombre romano del nogal y de la nuez, que es una abreviatura de *lovis glans*; bellota de Júpiter, a su vez versión latina del griego Dios bálanos, nombre de la nuez y de la castaña, que significaba literalmente: bellota o castaña de Zeus. (Antunez P, 2002)

Fue introducido a Sudamérica en la época de la colonia durante el imperio incaico, por los españoles y los jesuitas, desde entonces se conoce las bondades de este frutal, que desde la antigüedad fue utilizado por su madera y por lo nutritivos que son sus frutos (semillas); desde la época de la colonia, se viene cultivando este frutal pero no en gran escala debido a la poca difusión del mismo. (Wikipedia.com, 2016)

En la actualidad es nuestro país recién este cultivo en Bolivia recién está tomando importancia; en Tarija se vienen introduciendo nuevas variedades desde hace unas décadas atrás.

2.2 TAXONOMÍA DEL NOGAL

Reino	Vegetal
Phylum	Telemophytae
División	Tracheophyta
Subdivisión	Anthopyta
	Angiospermae
Clase	
Subclase	Dicotyledoneae
Grado Evolutivo	Archichlamydeae
Grupo de ordenes	Sepaloideanos
Orden	Juglandales
Familia	Juglandaceae
Nombre científico	Juglans sp
Nombre común	Nogal cultivado

(Herbario Universitario. Ismael Acosta 2016)

2.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

Es un árbol de gran importancia económica, tanto por la producción de los frutos como por el leño, siendo una de las especies frutales más rentable actualmente. La mayoría de los países productores de nueces han aumentado su escala operativa para reducir el coste en la adquisición de los insumos, así como para el procesamiento de la nuez, donde se ha logrado avanzar tanto en la presentación del producto como en la diversificación de usos para lograr un producto diferenciado. En general, la mejora de la competitividad en el cultivo del nogal, ha reflejado el aumento de la superficie cultivada. (Infoagro.com, 2016)

2.3.1 Estadística del Cultivo a Nivel Mundial

Cuadro Nº 1

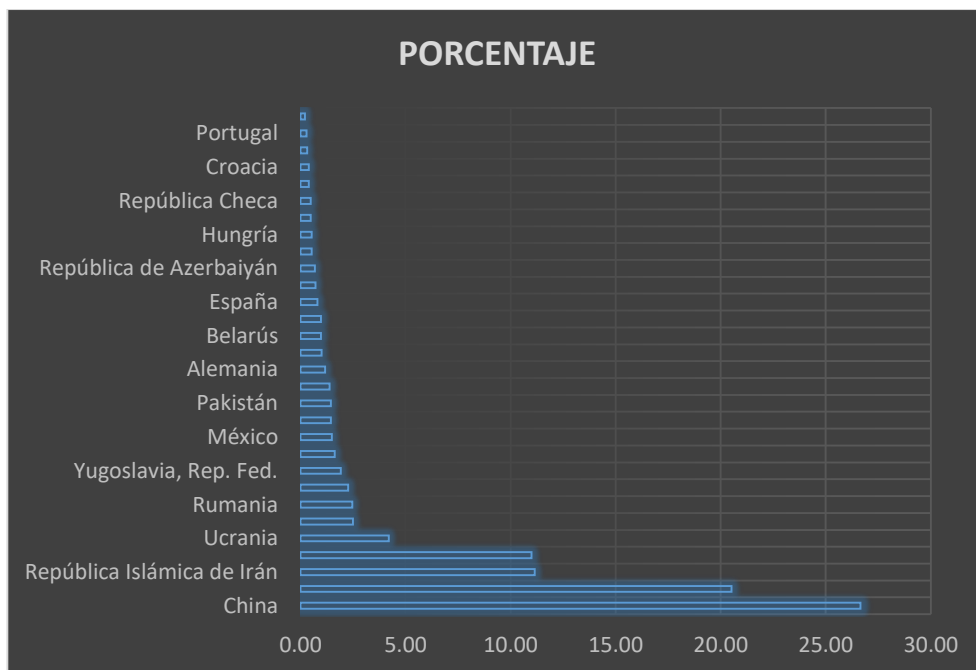
Producción a nivel mundial

Escala en producción	Nombre Del País	Producción promedio de nueces Año (Tonelada/Año)
1	China	330.000
2	Estados Unidos	254.000
3	República Islámica de Irán	138.000
4	Turquía	136.000
5	Ucrania	52.000
6	India	31.000
7	Rumania	30.000
8	Francia	28.000
9	Yugoslavia, Rep. Fed.	23.776
10	Grecia	20.000
11	México	18.500
12	Georgia	18.000
13	Pakistán	18.000
14	Austria	17.082
15	Alemania	14.500
16	Chile	12.500
17	Belarús	12.000
18	Federación de Rusia	12.000
19	España	10.000
20	Argentina	8.900
21	República de Azerbaiyán	8.600
22	República de Moldova	6.530
23	Hungría	6.500
24	Bulgaria	6.000
25	República Checa	6.000
26	Eslovaquia	5.000
27	Croacia	4.770
28	Suiza	4.000
29	Portugal	3.500
30	Brasil	2.650

En el cuadro Nº1 se puede observar que existe un gran número de países que se dedican a la producción de Nuez, a comparación del año 2005, que solo eran 26 países, se aumentaron en estos últimos años 4 países más como ser México, Argentina, Chile y Portugal; pero esos países también explotan los subproductos y derivados de ese cultivo, como ser las testa, madera, cáscara en verde del fruto y hojas. (FAO, 2012)

Gráfica Nº 1

Porcentaje de la Producción de Nuez Año a Nivel Mundial



Como se puede ver en el Gráfico Nº 1, los países con mayor producción de nuez son: China (26.66%) a nivel mundial, seguida por los Estados Unidos (20.52%), ocupando el tercer lugar Rumania con 11.15% y en el último lugar Croacia con 0.21% a nivel mundial. Los Países Sudamericanos están empezando con la producción masiva de la nuez.

2.3.2 Estadística del Cultivo a nivel Departamental

Cuadro Nº 2

Producción a nivel Departamental

Escala en producción	Nombre de la Provincia Producción	Producción promedio de superficie sembrada (Hac)	Estimado de producción de nueces Año (Tonelada/Año)
1	Méndez	20	24
2	Avilés	15	18
3	Cercado	13	15.2
4	O`connor	5	6
5	Arce	5	6
6	Gran Chaco	0	0

En el cuadro Nº1 se observa que existe una pequeña cantidad de producción en el Departamento de Tarija. Hasta el 2015 la provincia con mayor producción de nueces es Méndez, con un promedio de superficie de 20 hectáreas sembradas a lo largo de la provincia y una producción de nueces de 24 toneladas por hectárea; luego esta a la provincia Avilés con un promedio de superficie de 15 hectáreas sembradas a lo largo de la provincia y una producción de nueces de 18 toneladas por hectárea y en tercer lugar está la provincia de Cercado con 13 hectáreas sembradas y un promedio de producción de nuez de 15 toneladas por hectárea (INE.com, 2014)

2.4 IMPORTANCIA DEL NOGAL EN BOLIVIA

El sector forestal, por su parte, incluyendo la industria, emplea a algo más de 85 mil personas. De acuerdo a datos del Instituto de Recursos Mundiales, los bosques bolivianos ocupan el octavo lugar en el mundo por su extensión y poseen más de 1.730 especies arbóreas, las más variadas del mundo. Se debe resaltar que los bosques abarcan un área de 53 millones de hectáreas, aproximadamente 48% de la superficie

territorial. Cerca del 70% de la producción de madera es caoba y un 8%, roble. En el país se explotan, además, alrededor de 175 variedades de maderas finas y exóticas entre las que se destacan el bibosí, el nogal, el quebracho y el tajibo.

Al nogal se le dio una importancia forestal productiva; sin embargo, en estas últimas épocas se le quiere dar importancia agroindustrial.

El nogal produce una sustancia tóxica para otras plantas, llamada **juglona** que interfiere su desarrollo normal, causando el amarilleamiento y marchitamiento del follaje (como el tomate). Esto ha creado la creencia de que nada puede crecer bajo él. Sin embargo, hay muchas variedades de plantas que sí prosperan.

El extracto concentrado de su cáscara se usa como desparasitante en medicina biológica. (Camara.com.bo, 2013)

2.5 IMPOTANCIA DEL NOGAL EN TARIJA

El Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (INIAF) sede Tarija tiene el objetivo de aumentar la producción y acortar el ciclo productivo del nogal. Promueve el cultivo en tres comunidades de Méndez; dichas zonas consideradas potenciales para la actividad son: Paicho, Sella y Calama, donde alrededor de 60 productores participan en el proyecto piloto para mejorar el cultivo.

La producción de la nuez se proyecta como la actividad agropecuaria más destacada económicamente en el Valle Central de Tarija después de la vid, por eso la iniciativa de este cultivo en las familias campesinas. (INIAF, 2015)

Mapa N° 1

Mapa del Departamento de Tarija con la ubicación de algunas zonas de producción de Nogal



(Fuente propia)

Ubicación de las zonas en las que se produce nogal

- Nogalitos
- Paicho
- Churquiz
- La Victoria
- Canasmoro
- Sella
- Calama
- Rio San Juan de Oro

2.6 REQUERIMIENTOS EDAFOCLIMÁTICOS

2.6.1 Clima

El nogal Prefiere climas templados, sufriendo tanto por los fríos intensos como también de los grandes calores. (Robert Soler, 2000)

2.6.2 Agua

A pesar de su rusticidad, es muy sensible a la sequía, siendo impropio para ser cultivado en las tierras de secano y de naturaleza seca.

Si la lluvia es insuficiente o está irregularmente repartida, habrá que recurrir al riego para conseguir un desarrollo normal de los árboles y una buena producción de nuez. (El monte frutal casero. (Isaac P. Grumberg, 1990))

2.6.3 Suelo

Los nogales requieren tierras profundas permeables, siendo las más apropiados los calizos, arenosos, silíceos, arcillo- calizos, pero secos, aunque también se desarrolla arenosos frescos, pedregosos profundos pero ricos. Los suelos arcillosos, muy compactos, le son perjudiciales siendo el agua estancada uno de los peores enemigos de esta especie. (Robert Soler, 2000)

2.7. DESCRIPCION DE LA PLANTA

2.7.1 Planta

Árbol vigoroso de 24 a 30 m de alto y cuyo tronco puede alcanzar de 3 a 4 m de diámetro. Copa ramosa, extendida, de forma esférica comprimida. Tronco derecho, cubierto con una corteza cenicienta y gruesa, en las ramas jóvenes lisa y de color rojo oscuro y en las viejas agrietada y parda. (Agronomia.uchile.cl, 2015)

2.7.2 Sistema radicular

Sistema radicular muy desarrollado, formado por una raíz principal pivotante y un sistema secundario de raíces someras y robustas. Raíces notablemente extendidas, tanto en sentido horizontal como vertical. (Infoagro.com, 2016)

2.7.3 Hojas

Grandes, imparipinnadas, de color verde opaco, glabras, de olor agudo y desagradable, bastante ricas en taninos como todas las demás partes de la planta. Las hojuelas, de cinco a nueve, son ovales, en general enteras, con los nervios inferiormente salientes, de peciolo corto, opuestas o casi opuestas, de 6 a 12 cm. de largo y de 3 a 6 cm. de ancho. (Agronomia.uchile.cl, 2015)

2.7.4. Yemas

De tamaño variable, ovales redondeadas, finamente tomentosas y cubiertas exteriormente por dos escamas que envuelven más o menos completamente a las más tiernas. Las yemas terminales son erguidas, las laterales patentes y todas colocadas sobre una ancha cicatriz foliar elevada. (Infoagro.com, 2016)

2.7.5 Flores

Monoicas por aborto. Flores masculinas dispuestas en amentos largos, de 6 a 8 cm. casi siempre solitarios, de color verde parduzco e insertas en la parte superior de las ramillas nacidas el año anterior, que en la floración están desprovistas de hojas. Las flores femeninas son solitarias o agrupadas en un número de una a cinco, en espigas terminales encima de los ramillos del año corriente, y son llevadas por un pedúnculo corto y grueso. El receptáculo floral lleva un pequeño perigonio con tres o cuatro dientecitos; ovario ínfero adherente, con un óvulo, terminado por dos estilos cortísimos. Florece en primavera. (Agronomia.uchile.cl, 2015)

2.7.6 Fruto

Nuez grande, drupácea, con mesocarpio carnoso y endocarpio duro, arrugado en dos valvas, y el interior dividido incompletamente en dos o cuatro celdas; semilla con dos o cuatro lóbulos y muchos hoyos. (Agronomia.uchile.cl, 2015)

2.8 PROPAGACIÓN

2.8.1 Propagación Vegetativa

Los nogales se propagan en los viveros por injerto de púa y por yemas. El injerto por yema sobre el nogal negro se hace para que quede una corta sección de tronco en éste, lo que disminuye el peligro de quemaduras por el sol y la entrada de hongos de raíz.

Cuando el tronco tiene unos 2,5 cm de altura, se descalza con una azada de unos 5 a 10 cm y la púa se injerta en el pie debajo del nivel del terreno. Se ata bien, se cubre con emulsión asfáltica y se vuelve a cubrir con tierra esta región. Las plantas así injertadas en el vivero se mantienen un año más formando un eje central, sin laterales, que se ata a una estaca de 2,5 a 5 cm por 2,4 m de alto.

El injerto de parche puede emplearse en plantas de vivero de crecimiento rápido de un año de edad. Conviene premadurar las yemas, quitando las hojas a la rama, dejando el raquis adherido, 10 días antes de sacar las yemas. Pueden usarse bandas plásticas o de goma para atar la yema firmemente al pie. (Muncharaz P, 2000)

2.8.2 Propagación por semilla

Aunque no es muy empleado se eligen las nueces de un árbol bien conocido por su adaptabilidad a la región en la cual se cultiva y por la calidad de su producto. De las nueces se eligen las que han madurado las primeras y una vez despojadas del cocón se estratifican en arena, para más tarde macerarlas y que se abra la cáscara. Se

colocarán de dos a tres semillas por hoyo en viveros durante dos años hasta la aparición del pie. (Muncharaz P, 2000)

2.9 ELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

2.9.1 Elección de los cultivares

En cuanto al árbol:

Brotación y floración adecuadas a la climatología de la zona, procurando que la variedad brote y florezca fuera del período de posibles heladas tardías. Debe presentar una dicogamia lo más atenuada posible.

Si son variedades protandras habrá que colocar unos cuantos árboles que sirvan de polinizadores a la variedad base de la plantación.

- Recolección precoz, lo que favorece el proceso de comercialización.
- Buena producción que haga rentable la plantación.
- Resistencia a las plagas y enfermedades más comunes.

En cuanto al fruto:

- La forma debe ser aquella que corresponda a un índice medio de redondez comprendido entre 0,7 y 0,9.
- El tamaño debe ser tal que los diámetros ventral y sutural sean mayores o iguales a 30 mm.
- El rendimiento debe ser del 40% como mínimo.
- Debe ser una nuez poco rugosa, sin rincones interiores y de mediana resistencia a la rotura.

- Interesa que el color de la cáscara sea lo más blanco posible y que el de la almendra sea marrón claro.

(Infoagro.com, 2016)

2.9.2. Elección de portainjertos.

Con el empleo de portainjertos es posible extender las variedades más interesantes sobre porta injertos adaptados y conseguir precocidad en la entrada en fructificación. Como portainjertos se emplean dos grandes grupos dentro del género *Juglans*

Nogal común: *Juglans Regia L.*

Nogales europeos: *Juglans Nigra L.*

Las plantas del nogal europeo se emplean como pies en el sur de California, son vigorosas, pero susceptibles a los suelos alcalinos; se injertan bien, formando una unión perfecta; son más resistentes a la podredumbre del pie y de las raíces; pero más susceptibles de ser dañadas por las lesiones de nematodos a las raíces que el nogal negro del norte de California. (Infoagro.com, 2016)

2.10 PARTICULARIDADES DEL CULTIVO.

2.10.1 Fertilización

Se realizará un abonado de fondo antes de la plantación en función del análisis de suelo realizado previamente para determinar la composición y carencia de nutrientes del mismo. El nogal es muy exigente en nitrógeno y más moderado en cuanto a fósforo y potasio. En suelos muy ácidos se añadirá cal en dosis moderadas con el fin de evitar el bloqueo de otros elementos, en función del pH y textura del suelo. En general, en una plantación adulta, la fertilización con un abono de proporción 100-80-100 podría ser un estándar.

Además del abonado de fondo, es preciso fertilizar con regularidad para obtener una buena producción de nueces. En la tabla siguiente se resumen las cantidades recomendadas de fertilizante para una explotación intensiva de nogal:

Cuadro Nº 3
Cantidad de fertilizantes para la producción de nogal.

Abonado de fondo	Abonado de fondo	Fertilización
Nitrato	500 U.F./ha	1,80 Kg/árbol y año
P ₂ O ₅	200 - 250 U.F./ha	0,495 Kg/árbol y año
K ₂ O	300 - 350 U.F./ha	0,440 Kg/árbol y año
Estiércol	40 -60 Tm/ha	-

(Manual de buenas Prácticas agrícolas (BPA), 2014)

2.10.2 Poda

Los objetivos de la poda del nogal son controlar el tamaño de los árboles, mantener el vigor y la producción en ramos fructíferos, sustituir las ramas viejas menos productivas por otras de renuevo y eliminar las ramas agotadas, secas o mal situadas con el fin de que la luz llegue a todas las partes del árbol. La mejor época de poda es el periodo que transcurre desde la recolección de la nuez hasta la caída de las hojas. En general, la actuación de la poda en el nogal, no tiene la finalidad de obtener frutos de mayor calibre, sino el propósito de lograr producciones de mayor volumen total y el mantenimiento de éstas en el tiempo. (Grumberg I, 1990)

2.11 PLAGAS Y ENFERMEDADES

2.11.1 Plagas

2.11.1.1 Carpocapsa o gusano de la nuez (*Cydia pomonella*)

La larva, una vez ha transcurrido el invierno debajo de las arrugas del tronco o bajo otra protección, forma la crisálida en primavera para pasar a mariposa en mayo-junio. Durante la noche, las hembras ponen de 50-80 huevos sobre los pequeños frutos o sobre el peciolo, en un intervalo de tiempo de 2-3 semanas; a los 18 días de la puesta se avivan. Las larvas penetran en el fruto atravesando su parte basal o a través de la línea de sutura cuando la cubierta verde aún es tierna. En 3-4 semanas la larva alcanza su madurez y deja al fruto para instalarse en el tronco. Una segunda generación aparece entre julio y agosto.

Los frutos surcados por las galerías de las larvas pueden ser del 40-50%, por tanto la cosecha se ve muy afectada.

Control.

- Para establecer el momento oportuno de los tratamientos se colocan trampas con feromonas.
- Para que el control químico tenga éxito, debe realizarse en el momento en que la larva sale del huevo para penetrar en el fruto, en tratamientos a mediados de junio y hasta que la cáscara de la nuez esté lignificada.

(Infoagro.com, 2016)

2.11.1.2 Zeuzera (*Zeuzera pyrina*).

Las orugas de este lepidóptero nocturno realizan galerías en la madera de los árboles jóvenes. Los primeros ataques se centran en las hojas y en la madera de las ramas jóvenes. Pueden provocar la muerte del árbol y la rotura de las ramas afectadas.

Control

- Un adecuado seguimiento de los vuelos, acompañado de la lucha química, proporciona un buen control.

Nota.: Si la oruga ya ha realizado la galería se puede emplear un alambre o taponar la entrada con algodón empapado en Sulfuro de Carbono.

(Infoagro.com, 2016)

2.11.2 Enfermedades

2.11.2.1 Tinta del nogal o mal negro (*Phytophthora cinnamomi*)

Provocada por el hongo *Phytophthora cinnamoni* se presenta en suelos ácidos. El hongo se instala en las raíces sanas provocando lesiones e incluso su destrucción. Estas lesiones pueden alcanzar la zona del cuello y extenderse alrededor del tronco, ocasionando la muerte del árbol.

Las partes atacadas se pudren apareciendo una tinta en la base del tronco. La debilidad en el vigor de los árboles, el secado de la punta de las ramas y la caída prematura de hojas, son síntomas indicadores de que el árbol está atacado por este hongo. Los frutos pueden deteriorarse y, a menudo, quedan pequeños y deformados. La temperatura ideal para el desarrollo del hongo es de 25-26°C.

Control

Si se evidencia una amarillez en las hojas es preciso socavar las raíces inmediatamente: si éstas presentan manchas negras, se separan todos los tejidos enfermos desinfectando después la herida. Los árboles gravemente atacados, deberán arrancarse y en su lugar no es conveniente volver a plantar otro nogal. (Producciones de nueces del nogal, 2010)

2.11.2.2 Podredumbre (*Armillaria mellea*)

El micelio de este hongo penetra bajo la corteza de la raíz del nogal produciendo un líquido amarillento. Ocasiona la muerte de los tejidos de las raíces, apareciendo bajo su corteza un micelio blanco. Los síntomas de esta enfermedad son un amarilleamiento de las hojas, baja producción de fruto y de pequeño calibre y secado de las ramas.

Control

- El tratamiento de las enfermedades del sistema radicular en el nogal es difícil; pudiéndose emplear productos como Captan y Maneb .
- También se pueden emplear patrones resistentes a estas enfermedades como J. Regia o J. Nigra, pero no otorgan una protección completa.
- Es eficaz la lucha biológica empleando *Trichoderma Viride* debido a sus propiedades antagonistas respecto a *A. Mellea*, ya que reducen el inicio y crecimiento de los rizomorfos subterráneos pero éste método de lucha está ligado al pH del suelo y a la persistencia de sustratos orgánicos que permitan un desarrollo de otros organismos competidores ya instalados.
- Otro método de control es descubrir las raíces afectadas, rascar las partes enfermas y enterrarlas, aplicando a su vez un fungicida o antichancro.

(Infoagro.com, 2016)

2.11.2.3 Bacteriosis o mal seco del nogal (*Xanthomonas juglandis*).

El nogal es una especie sensible a la bacteriosis y se manifiesta en condiciones de precipitaciones abundantes y temperaturas de suaves a elevadas (por encima de los 15°C). Afecta a hojas, yemas y frutos, pudiendo reducir la cosecha a la mitad. Los momentos más propicios para su ataque son los comprendidos entre la floración y la fecundación, además del período de máxima actividad vegetativa (mayo-junio). Los frutos afectados presentan unas manchas oscuras que pueden alcanzar algunos

centímetros cuadrados de superficie y que tienen un centro agrietado. Sobre las hojas aparecen unas manchas negras que se sitúan en los brotes, dándole a la hoja forma de cuchara. Los brotes atacados presentan unos chancros agrietados, en donde invernan las bacterias, pudiendo rodear y secar la rama. Estos chancros serán fuente de inóculo de futuras infecciones.

La enfermedad se propaga a través de la lluvia, mediante insectos vectores de la enfermedad y del polen infectado. La incubación de la enfermedad dura de 12 a 20 días según las condiciones ambientales.

Control.

Eliminar las yemas infectadas por medio de podas.

- Al inicio de la primavera se realizará un tratamiento a base de materias activas ricas en cobre y se repetirá después de la floración; pues el cobre resulta tóxico para las flores (Infoagro.com, 2016).

2.11.2.4 Antracnosis del nogal (*Gnomonia Leptostyla*)

La produce el hongo *Gnomonia leptostyla* y su desarrollo es favorecido por un tiempo húmedo y fresco. En las hojas produce manchas circulares de color oscuro, rodeadas de un halo amarillo. Las manchas van creciendo hasta invadir todo el limbo, provocando el secado y la caída de la hoja. En la corteza del árbol produce unas manchas de color intenso que solo afectan a la superficie.

El patógeno se conserva, durante el invierno, sobre las hojas caídas al suelo y se difunde, en primavera y verano, por medio de esporas conídicas.

Control

- Eliminar las partes atacadas por medio de podas.
- Destruir las hojas y los frutos caídos al suelo.

- El control químico de esta enfermedad se realizará aplicando tratamientos en el momento de la apertura de las yemas e inmediatamente después de la cosecha y la poda (Infoagro.com, 2016).

2.12 CULTIVO IN VITRO.

El cultivo in vitro (término que literalmente significa en vidrio), incluye muchas técnicas destinadas a introducir, multiplicar y regenerar, entre otros recursos, materiales vegetal o animal en condiciones controladas y asépticas. El cultivo in vitro, constituye un paso fundamental en la obtención y regeneración de plantas genéticamente modificadas, o transgénicas, mediante técnicas de ingeniería genética.

El cultivo in vitro es una herramienta para el mejoramiento, ya que se producen plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada.

Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales, esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a estímulos adecuados.

Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posean y al estímulo que reciban.

Otros conceptos de los cultivos in vitro:

- Cultivo de tejidos vegetales como una herramienta de la Biotecnología Vegetal que aísla partes de una planta y las hace crecer en medios de cultivo artificial *in vitro* en condiciones de asepsia para obtener metabolitos, tejidos, órganos o plantas completas (Ovando, 2004).
- In vitro, plantas o partes de una planta cultivada dentro de un contenedor de vidrio

Totipotencia

Capacidad de regeneración de una planta entera a partir de una célula o un grupo de células.

Explante:

Porción de tejido de planta con el que, a través de técnicas *in vitro*, se puede regenerar la planta entera.

Desdiferenciación:

Consiste en la transformación y pérdida de las características de especialización de un tipo celular para dar lugar a las células de tipo meristemático.

El siguiente paso involucrado en la regeneración de una planta es la **rediferenciación** de las células previamente desdiferenciadas

Todo proceso de diferenciación está regulado por el balance entre diferentes tipos de reguladores de crecimiento, fundamentalmente de auxinas y citocininas (Litz RE & Jarret RL, 1991).

2.12.1 Características generales de los cultivos *in vitro*

- Ocupa pequeña superficie
- Control de las condiciones de cultivo. Ambientales (temperatura, humedad, luz), nutricionales (minerales, otros compuestos).
- Cultivo “aislado” biótica (ausencia de otros organismos) y abióticamente (viento, etc.)
- Alteraciones de las fases de desarrollo (indiferenciación y diferenciación, plantas carentes de sistema radical, etc.)
- Posibilita manipulaciones

- Necesidad de reestablecer el equilibrio del explanto (requerimientos exigentes). (Murashige, T. y F. Skoog. 1962)

2.12.2 Ventajas, desventajas y aplicaciones de la técnica de cultivo in vitro.

2.12.2.1 Ventajas

- Permite obtener plantas libres de enfermedades (hongos, bacterias, micro plasmas, virus y tiroides).
- La micropropagación vegetal permite propagar masivamente material vegetal en cualquier época del año y en corto tiempo, conservando su potencial genético y calidad sanitaria.
- Permite optimizar el uso de factores ambientales y nutricionales.
- Facilita el cultivo de un gran número de plantas en una superficie pequeña.
- Puede conservar material biológico por periodos de tiempo prolongados.
- Además, mediante este método de propagación se puede incluir aspectos de fitomejoramiento.

2.12.2.2 Desventajas

El cultivo in vitro es muy caro, entre otras cosas porque no se puede mecanizar. Sólo son rentables aquellos laboratorios muy grandes y con mucho mercado.

2.12.3 Aplicaciones prácticas

- Propagación vegetativa. Esto es lo más práctico. Existen dos técnicas: Micropropagación de estaquillas y Organogénesis de callos.
- Producción de plantas libres de virus mediante dos técnicas: Cultivo de meristemos y Microinjerto in vitro.

- Permite germinar semillas, lo que es muy difícil de hacer en condiciones normales. Ejemplo: algunos campos de Orquideas tienen parásitos y en viveros no se pueden reproducir; se inoculan in vitro esos parásitos.
- Eliminar la inhibición de germinación de las semillas. El cultivo in vitro es lo más eficaz porque tiene determinados inhibidores, algunos huesos de frutales no son capaces de germinar ya que no tiene desarrollado el embrión.
- Prevención del aborto embrionario como resultado de incompatibilidad. Se da en cruces de interés científico o intergenéticos, sobre todo en plantas herbáceas. Los cruces incompatibles dan abortos.
- Aplicación en mejora genética para obtener híbridos, para introducir material genético, etc.
- Acortar los ciclos de mejora genética. No hay que esperar que pase el periodo juvenil del árbol para ver resultados.
- Producción de haploides. Cruzamientos o cultivo de polen (anteras).
Ventajas:- Obtención rápida de homocigotos.- Producción de híbridos (frutos puros) (Litz RE & Jarret RL. 1991)

2.12.4. Medios de cultivo

Constituyen un elemento fundamental para el cultivo in vitro de células, tejidos y órganos para lograr el desarrollo de los mismos in vitro. Los medios de cultivo tienen una serie de componentes generales y específicos cuya presencia y concentración estará en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización. Los medios de cultivo están constituidos por sustancias minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares, reguladores del crecimiento y otros elementos.

El cultivo de células, tejidos y órganos de la plantas in vitro se realiza en medios de cultivos artificiales, lo cuales proporcionan los nutrientes necesario que la planta toma

de la tierra en su habidad natural y precisamente el éxito de este tipo de cultivo está influenciado grandemente por la naturaleza del medio de cultivo utilizado y otros factores ambientales. (Murashige, T. y F. Skoog, 1962)

Nota: el tipo de medio de cultivo se prepara en base al cultivo que se desea trabajar; en el trabajo realizado se utilizó el medio de WPM (Woody Plant Medium); medio de cultivo para plantas leñosas.

Cuadro Nº 4

Composición del medio de Cultivo Woody Plant Medium (1981)

Macro Elementos	Compuesto	(mg/L)
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	400.000
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	96.000
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio	170.000
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	Nitrato de calcio tetrahidratado	556.000
K ₂ SO ₄	Sulfato de potasio	990.000
Micro Elementos	Compuesto	(mg/L)
H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
MnSO ₄ .H ₂ O	Sulfato de manganeso hidratado	22.300
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.025
Quelatos	Compuesto	(mg/L)
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato ferroso heptahidratado	27.800
Na ₂ EDTA	Sal de sodio del ácido etilendiamino tetra acético	37.300
Vitaminas	Compuesto	(mg/L)
	Tiamina	100.00
	Inositol	1.000
	Ácido nicotínico	0.500
	Piridoxina	0.500

2.12.4.1 Composición General

Compuestos inorgánicos

- Macronutrientes: NO₃⁻, PO₄³⁻, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, SO₄²⁻

- Micronutrientes: Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{+} , Mn^{2+} , Mo^{2+} , Co^{2+} , I

Carbohidratos

- Sacarosa, glucosa, mio-inositol

Vitaminas

- Tiamina (B1)
- Piridoxina
- Ácido nicotínico (C)
- Biotina

Aminoácidos

- Glicina
- Reguladores del crecimiento
- Auxinas
- Citocininas
- Giberelinas

Soporte inerte (medios semisólidos)

- Agar (0,7 a 1%)
- Gelrite®
- pH 5,6 – 5,8

(Ewind G., Hall M. and Klerk D, 2008)

2.12.4.1.1 Compuestos inorgánicos

Los medios de cultivo están constituidos por componentes inorgánicos, los cuales son suministrados en cantidades relativamente grandes (macronutrientes) y otros añadidos en menor cantidad (micronutrientes). Dentro de los macronutrientes, se encuentran iones; de nitrógeno (N), potasio (K), calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg) y azufre (S).

El nitrógeno se adiciona al medio de cultivo en forma de nitrato o iones amonio, o la combinación de ambos iones, el sulfato de magnesio ($Mg\ SO_4\ 7H_2O$) satisface tanto el requerimiento de magnesio como el de azufre; el fósforo puede adicionarse en cualquiera de las formas $NaH_2PO_4\cdot H_2O$ o KH_2PO_4 ; el potasio es un catión que se agrega en forma de KCl, KNO_3 o KH_2PO_4 ; el calcio se adiciona con $Ca\ Cl_2\cdot 2H_2O$, $Ca(NO_3)_2\cdot 4H_2O$ o la forma anhidra de cualquier sal y el cloro se presenta en forma de KCl o $CaCl_2$.

Los micronutrientes, que son añadidos a los medios de cultivo son hierro (Fe), níquel (Ni), cloro (Cl), manganeso (Mn), cinc (Zn), boro (B), cobre (Cu), y molibdeno (Mo). Estos elementos junto con el carbono (el C), oxígeno (O) e hidrógeno (H) constituyen los 17 elementos esenciales. Estos micronutrientes aunque son requeridos en menor cantidad son necesarios para una adecuada actividad metabólica de las células vegetales. (Ewind G., Hall M. and Klerk D, 2008)

2.12.4.1.2 Carbohidratos

La nutrición que es desarrollada en las condiciones in vitro, a partir en los diferentes órganos y tejidos, son ampliamente heterótrofos con respecto al carbono debido a la ausencia o insuficiencia de asimilación clorofílica, por lo cual resulta indispensable añadir azúcares a los medios de cultivo como fuente de energía y reguladores osmóticos. La sacarosa es el azúcar empleado universalmente. Le siguen en importancia glucosa, maltosa, rafinosa, fructosa y galactosa entre otros. (Ewind G., Hall M. and Klerk D, 2008)

2.12.4.1.3 Vitaminas

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades. Las vitaminas más empleadas son:

Tiamina (Vitamina B1): se añade como hidrocloreuro de tiamina y constituye una vitamina esencial para el crecimiento de células vegetales. Es un coenzima de la descarboxilación de los cetoácidos piruvato y α -cetoglutarato y es esencial para el crecimiento radical pues interviene en la síntesis de citocininas.

Ácido Nicotínico: forma parte de las coenzimas NAD y NADP que intervienen en la transferencia de hidrógeno; además de ser precursor el triptófano tiene un efecto sinérgico con el AIA en la producción de raíces y ejerce acción inhibitoria en el desarrollo de yemas axilares.

Piridoxina (Vitamina B6): Es añadida como hidrocloreuro de Piridoxina (Piridoxina-HCl). Participa como coenzima en el metabolismo de los aminoácidos, entre ellos el triptófano, precursor de AIA y ácido nicotínico, además de favorecer la formación de raíces.

Myo-inositol: No es propiamente una vitamina, sino un azúcar-alcohol. Tiene un efecto sobre la proliferación de tejidos y sobre la activación de la organogénesis.

Ácido ascórbico y ácido cítrico: Son añadidos a los medios de cultivo en ocasiones no como vitaminas, sino como antioxidantes para evitar el oscurecimiento de determinados tejidos. (Murashige, T. y F. Skoog, 1962)

2.12.4.1.4 Aminoácidos

Los aminoácidos favorecen la proliferación de callos y la organogénesis. Los efectos obtenidos mediante el aporte de aminoácidos parecen muy variables según la especie y el tipo de morfogénesis estudiada. Dentro de ellos se encuentran la glutamina, L-arginina, L-cisteína entre otros. Los extractos naturales estimulantes son numerosos

productos de composición variable y no bien definida. Dentro de ellos se encuentran extracto de levadura, hidrolizado de caseína, peptona y agua de coco (más utilizado) entre otros. (Murashige, T. y F. Skoog, 1962)

Reguladores del crecimiento vegetal

Los reguladores del crecimiento vegetal se agrupan en cinco categorías: auxinas, citokininas, giberelinas. Además de estas sustancias naturales de la planta existen otros productos que pueden utilizarse como reguladores del crecimiento para el cultivo in vitro. (Gino, A. et al. 2010).

Principales reguladores del crecimiento empleados en cultivo de tejidos.

AUXINAS

AIA: Ac. Indol 3 – acético

ANA: Ac. Naftalenacético

AIB: Ac indol 3-butírico

2,4 D: Ac. 2,4 diclorofenoxiacético

CITOKININAS

BAP: 6 - bencilaminopurina

KINETINA: 6 - furfurilaminopurina

Z: Zeatina

TDZ: Thidiazuron

GIBERELINAS

GA3: Ac. giberélico

GA1, GA4, GA7: (giberelinas)

2.12.4.1.5 Soporte inerte (medios semisólidos).

El agar se ha convertido en el material de soporte más ampliamente usado, pues provee el medio de un excelente gel húmedo que sirve como soporte al explante. También es utilizado el gelrite o fitagel. (Hurtado, D. et al, 1987).

2.12.5. Fases del proceso de micropropagación de cultivo in vitro

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

- 1: Preparación de la planta madre.
- 2: Introducción del material seleccionado in vitro.
- 3: Multiplicación de brotes.
- 4: Enraizamiento.
- 5: 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.A, 2004)

2.12.5.1 Selección de la planta madre

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener embriones que no presenten daño físico o pudrición. Para obtener estos embriones 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. (Castillo.A, 2004)

2.12.5.2 Introducción o del material 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. (Castillo.A, 2004)

2.12.5.3 Multiplicación de los 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 subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar 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 A., 2004).

2.12.5.4 Elección de un medio de enraizamiento de los explantos

Para enraizar los explantos se utilizan principalmente plantines individuales de un tamaño aproximado de 2 cm. 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. (Castillo, A., 2004)

2.12.5.5 Aclimatación de los explantes enraizados

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso depende 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 explante.

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.

Se está mezclas son diferentes y muy variadas de acuerdo a la especie con la que estamos trabajando. 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 A., 2004)

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN

El presente trabajo de estudio se realizó en el laboratorio de Fitopatología y Cultivos in vitro dependiente de la Universidad Autónoma Juan Misael Saracho, ubicado en la zona de El Tejar que encuentra en la Ciudad de Tarija, Provincia Cercado a 21°33 de latitud Sur y 64°48 de longitud Oeste, a una altura de 1859 m.s.n.m.

3.2 MATERIALES

3.2.1 Material vegetal

3.2.1.1 Procedencia del material vegetal

El material vegetal (embriones) procede de la Comunidad de Tojo, Tarija

3.2.1.2 Ubicación

La Comunidad de Tojo se encuentra ubicada geográficamente entre las siguientes coordenadas: 21°28' de latitud sur y 65°25 de longitud Oeste, a una altura 2.458 m.s.n.m. del Municipio de Yunchara, Provincia Avilés del Departamento de Tarija.

3.2.1.3 Clima

La temperatura media anual se da en los meses calurosos de octubre a marzo y la mínima en los meses de invierno abril y septiembre que corresponden también a la época seca. Los promedios mensuales de temperatura varían de acuerdo con las estaciones siendo los meses más fríos junio y julio y los más cálidos de noviembre a febrero. En cuanto a las características de precipitación 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

3.2.1.4 Vegetación

Tojo 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 palqui, algarrobo, molle, jarca.

3.2.1.5 Aspecto Socioeconómico.

El Municipio de Yunchará tiene una demografía de 300 familias que equivale al 24.65 % de la población, con un total de 558 mujeres y 521 varones. Es una comunidad que se dedica a la agricultura y a la ganadería (vicuñas y bovinos). El índice de migración de la población es elevado.

(Equipo de consultores Silvi Srl. Plan de Desarrollo Municipal del Gobierno Municipal de Yunchara, 2007)

3.2.2. Material de Laboratorio

Equipos

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- pH-metro
- Balanzas de precisión
- Microscopio
- Agitador

Material

- Cajas Petri

- Vasos de vidrio
- Pipeta
- Probeta
- Tubos de ensayo
- Canastillas
- Pinzas
- Bisturí
- Mechero
- Papel Filtro
- Frascos de vidrio
- Regala de 20 Cm
- Rompenueces

Insumos

- Sales con un alto porcentaje de pureza
- Fitorreguladores (BAP- bencilaminopurina, IBA-Ácido indolbutírico).
- Ácido ascórbico
- Ácido cítrico
- Agar
- Sacarosa
- Mio inositol
- Vitaminas

3.3. METODOLOGÍA

El diseño completamente al azar, es un diseño en el cual los tratamientos son asignados aleatoriamente a todas las unidades experimentales. Este diseño es usado ampliamente pero su uso se limita a casos en los que se dispone de unidades experimentales homogéneas. En investigaciones donde se emplea la técnica de cultivo de tejidos vegetales, generalmente se usa el diseño completamente al azar, puesto que el material experimental es homogéneo. (Hurtado. D, 1994)

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

Diseño: Completamente al azar con arreglo bifactorial dos por cuatro.

Factor A: Dos métodos de desinfección (Cloroformo y alcohol con hipoclorito de sodio).

Factor B: 4 medios de cultivo (Medio base WPM Woody Medium Plant, con variación en Fitorreguladores)

Nº de repeticiones: 3

Nº de tratamientos: 8

Unidad experimental: 4 tubos de ensayo (un embrión por tubo)."

La metodología de investigación que se utilizó es la investigación " Experimental y Descriptiva", pues se evaluó el porcentaje de contaminación, el porcentaje de regeneración y la concentración de Fitorreguladores.

Se busca establecer el mejor método de desinfección con cloroformo y alcohol con hipoclorito de sodio (lavandina) y la mejor concentración de fitorreguladores.

La investigación de las concentraciones de los fitoreguladores se realizó por separado con concentraciones de BAP 6 Bencilanimopurina (1.5 mg/L) - IBA Ácido indolbutírico (0.15 mg/L), BAP 6 Bencilanimopurina (2 mg/L) - IBA Ácido indolbutírico (0.2 mg/L), BAP 6 Bencilanimopurina (2.5 mg/L), - IBA Ácido

indolbutírico (0.25 mg/L) y BAP 6 Bencilanimopurina (3 mg/L) - IBA Ácido indolbutírico (0.3 mg/L) y se los trato con los dos métodos de desinfección, los cuales consistieron en sumergir los embriones en alcohol etílico al 75% por 30 segundos, luego en hipoclorito de sodio al 4% durante 10 minutos y se realizaron tres enjuagues con agua destilada; en el otro método se pusieron los embriones 5 ml de cloroformo en un frasco de vidrio herméticamente cerrado durante 10 minutos.

3.3.1 Variables a estudiar

3.3.1.1 Porcentaje de contaminación

La técnica de cultivo in vitro es muy propensa a la contaminación, por lo que se requiere un alto grado 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 70 días de forma visual y con ayuda del microscopio para así comprobar si se contaminaron dichas muestras.

3.3.1.2 Porcentaje de germinación

El embrión de la planta germina si se le da las condiciones adecuadas es así como se evaluaron consecutivamente las muestras hasta a los 70 días de forma visual y con ayuda del microscopio para así comprobar la germinación de los embriones.

3.3.1.3 Crecimiento embrionario

Los embriones germinados van creciendo a lo largo del tiempo después de la introducción in vitro, los mismos que se van midiendo consecutivamente con ayuda de una regla para evaluarlos.

3.3.1.4. Tiempo de germinación

Se evaluó los embriones al inicio de la germinación para determinar el tiempo que demora.

3.4. PROCEDIMIENTO

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

Se llevaron las semillas al laboratorio, donde se comenzó el trabajo realizando el protocolo de laboratorio para el establecimiento in vitro de los embriones del nogal.

Para la técnica de establecimiento in vitro se siguieron los siguientes pasos:

1. Se recolecto las semillas en el mes de enero, en la Comunidad de Tojo de una sola finca familiar.
2. Medir las sales para la preparación del medio de cultivo WPM.
3. Preparación del medio de cultivo WPM
4. Quitar la cáscara y pelar las nueces.
5. Esterilización del material de laboratorio.
6. Preparación del medio de cultivo (1 Litro).

El medio de cultivo está constituido de la siguiente manera:

- ✓ M1: Macro elementos
 - ✓ M2: Micro elementos
 - ✓ M3: Vitaminas
 - ✓ M4: Fuentes de hierro
 - ✓ Sacarosa
6. Dividir en cuatro (Cada vaso con 250ml).
 7. Colocar en cada vaso por separado los fitoreguladores para los diferentes medios de cultivo.
 - ✓ Reguladores de crecimiento.

M1	BAP (1.5 mg/L)	IBA (0.15 mg/L)
M2	BAP (2 mg/L)	IBA (0.2 mg/L)
M3	BAP (2.5 mg/L)	IBA (0.25 mg/L)
M4	BAP (3 mg/L)	IBA (0.3 mg/L)

8. Medir el pH. pH=5.7
9. Colocar el agar (1.5 g) en los cuatro vasos y calentar con ayuda del microondas.
10. Retirar del microondas los vasos y mezclar con una varilla de vidrio.
11. Colocar en los tubos de ensayo los cuatro medios de cultivo previamente preparados y marcar para evitar que se confundan.
12. Cubrir los tubos de ensayos con sus respectivas tapas.
13. Se esterilizan los tubos de ensayo durante 20 minutos mediante la aplicación de calor húmedo, bajo una presión interna de 1.2 atmósferas y una temperatura de 121°C.
14. Cortar las partes de la semilla para así dejar más libre el embrión.
15. Limpiar la cámara de flujo laminar e introducir los materiales con los cuales se va a trabajar.
16. Desinfección de los embriones con los dos métodos.
17. El método de desinfección con cloroformo se realiza en un frasco herméticamente cerrado durante 10 minutos
18. Método de desinfección con cloroformo se realiza en un frasco herméticamente cerrado durante 10 minutos
19. Método de desinfección con alcohol al 70% durante 30 segundos, luego se lo pasa al hipoclorito de sodio al 4% durante 10 minutos posteriormente se lo enjuaga tres veces y cada enjuague debe durar 3 minutos

Alcohol concentración 96%

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

Hipoclorito de sodio concentración 5.5%

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

20. Para evitar la oxidación, se debe colocar los embriones en una solución con ácido cítrico (1.5 gramos de ácido cítrico y de ácido ascórbico 1.1 gramos diluidos en agua destilada) antes de la siembra.
21. Flamear los instrumentos antes de utilizarlos.
22. Introducción de los embriones a los tubos de ensayo.
23. Evaluación de los embriones de nogal introducidos en laboratorio.

3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental es bifactorial ya que se estudia dos métodos de desinfección y cuatro medios de cultivo diferentes, lo que hace un total de ocho tratamientos

3.5.1 Tratamiento I

El primer tratamiento es el medio de cultivo con la concentración de fitohormonas (C1) y la desinfección con cloroformo.

Cuadro 5
Tratamiento I

Hormonas		Método de desinfección
BAP (1.5 mg/L)	IBA (0.15 mg/L)	Cloroformo

3.5.2 Tratamiento II

El segundo tratamiento es el medio de cultivo con la concentración de fitohormonas (C2) y la desinfección con cloroformo.

Cuadro 6
Tratamiento II

Hormonas		Método de desinfección
BAP (2 mg/L)	IBA (0.2 mg/L)	Cloroformo

3.5.3 Tratamiento III

El tercer tratamiento es el medio de cultivo con la concentración de fitohormonas (C3) y la desinfección con cloroformo.

Cuadro 7
Tratamiento III

Hormonas		Método de desinfección
BAP (2.5 mg/L)	IBA (0.25 mg/L)	Cloroformo

3.5.4 Tratamiento IV

El cuarto tratamiento es el medio de cultivo con la concentración de fitohormonas (C4) y la desinfección con cloroformo

Cuadro 8
Tratamiento IV

Hormonas		Método de desinfección
BAP (3 mg/L)	IBA (0.3 mg/L)	Cloroformo

3.5.5 Tratamiento V

El quinto tratamiento es el medio de cultivo con la concentración de fitohormonas (C1) y la desinfección con Alcohol y hipoclorito de sodio.

Cuadro 9
Tratamiento V

Hormonas		Método de desinfección
BAP (1.5 mg/L)	IBA (0.15 mg/L)	Alcohol y hipoclorito de sodio (lavandina)

3.5.6. Tratamiento VI.

El sexto tratamiento es el medio de cultivo con la concentración de fitohormonas (C2) y la desinfección con Alcohol y hipoclorito de sodio.

Cuadro 10
Tratamiento VI

Hormonas		Método de desinfección
BAP (2 mg/L)	IBA (0.2 mg/L)	Alcohol y hipoclorito de sodio (lavandina)

3.5.7 Tratamiento VII

El séptimo tratamiento es el medio de cultivo con la concentración de fitohormonas (C3) y la desinfección con Alcohol y hipoclorito de sodio

Cuadro 11
Tratamiento VII

Hormonas		Método de desinfección
BAP (2.5 mg/L)	IBA (0.25 mg/L)	Alcohol y hipoclorito de sodio (lavandina)

3.5.8 Tratamiento VIII.

El octavo tratamiento es el medio de cultivo con la concentración de fitohormonas (C4) y la desinfección con Alcohol y hipoclorito de sodio.

Cuadro 12
Tratamiento VIII

Hormonas		Método de desinfección
BAP (3 mg/L)	IBA (0.3 mg/L)	Alcohol y hipoclorito de sodio (lavandina)

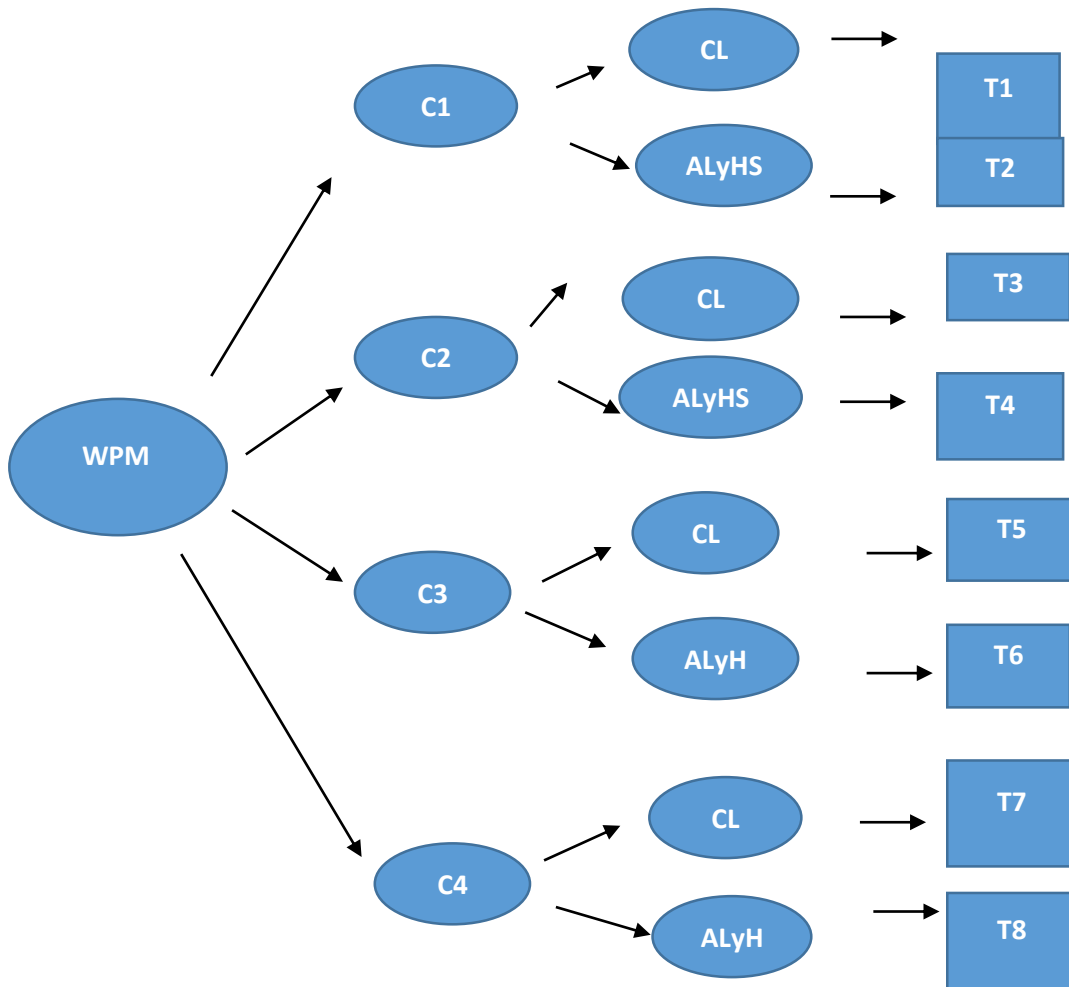
3.6. DISEÑO DEL TRABAJO EN LABORATORIO.

WPM= medio de cultivo para plantas leñosas

M1	BAP (1.5 mg/L)	IBA (0.15 mg/L)
M2	BAP (2 mg/L)	IBA (0.2 mg/L)
M3	BAP (2.5 mg/L)	IBA (0.25 mg/L)
M4	BAP (3 mg/L)	IBA (0.3 mg/L)

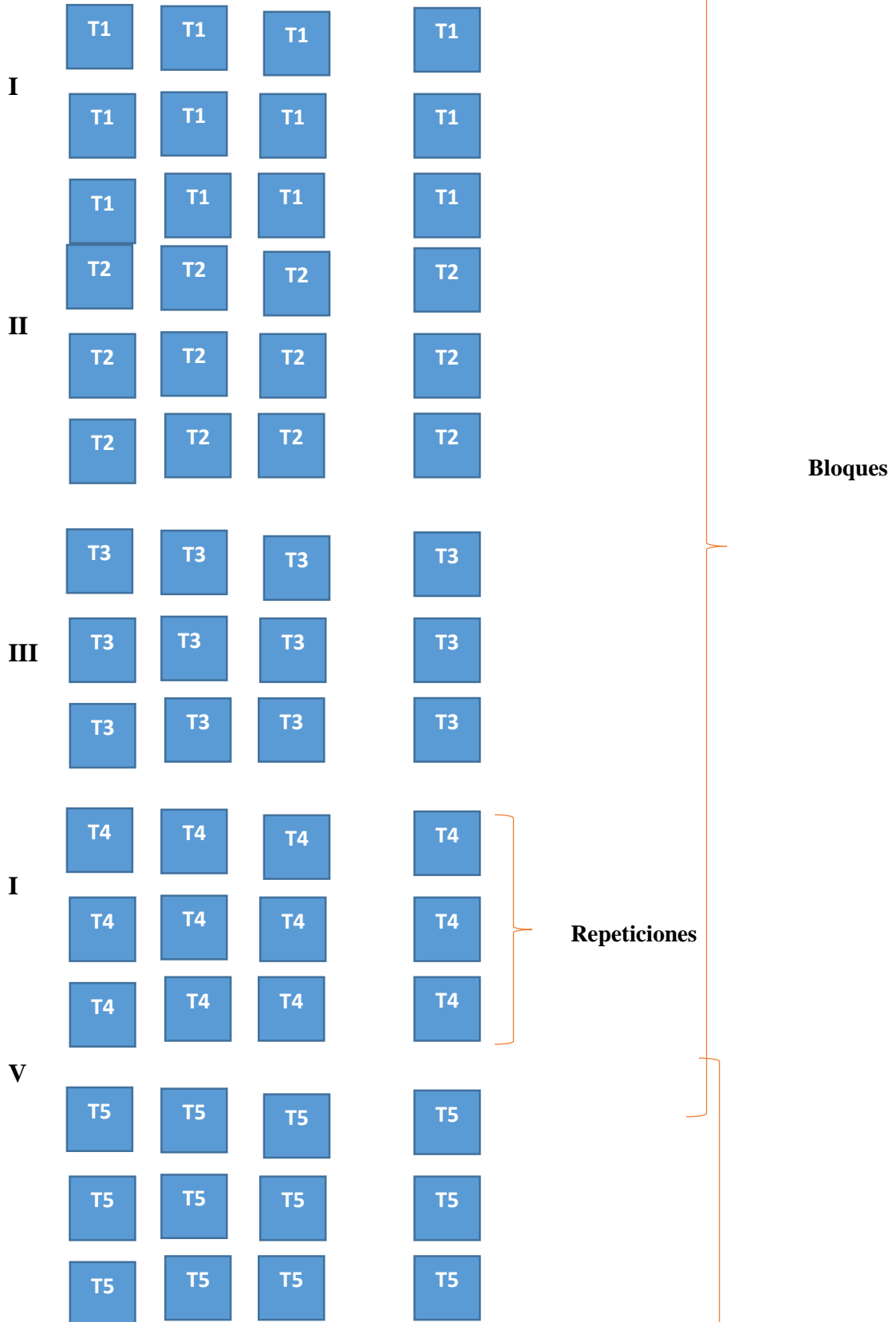
CL= Desinfección con cloroformo

ALyHS= Desinfección con alcohol - hipoclorito de sodio (lavandina)



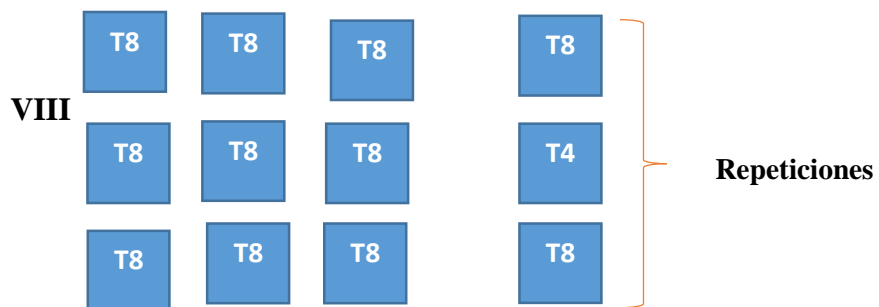
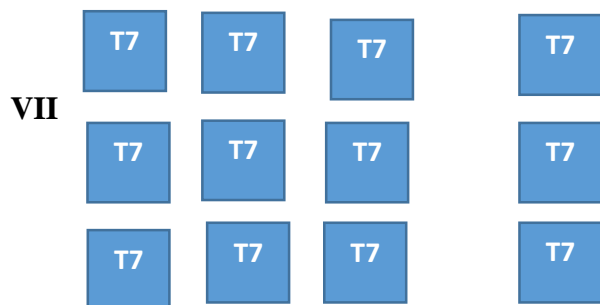
(Elaboración fuente propia)

DISEÑO EN LABORATORIO





Bloques



(Elaboración fuente propia)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ENSAYOS

En esta investigación se realizaron varios ensayos en los cuales se evaluó: el porcentaje de contaminación, el porcentaje de germinación, el desarrollo embrionario y el tiempo de germinación.

4.1.1 Primer ensayo

El primer ensayo se realizó el 22 de febrero de 2016 hasta el 4 de marzo de 2016.

Cuadro 13.

Porcentaje de germinación

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
3 días	0	0	0	0	0	0	0	0
6 días	0	0	0	0	0	0	0	0
11 días	0	0	0	0	0	0	0	0

No se presentó germinación de ningún embrión durante los 11 días.

Cuadro 14.

Método de desinfección con cloroformo

	Tiempo			Porcentaje			
	3 Días	6 Días	11 Días	3 Días	6 Días	11 Días	Total
CONTAMINACIÓN	6	15	27	12.5%	31.25%	56.25%	100%
OXIDACIÓN	15	25	8	31.25%	52.08%	16.67%	100%

En la primera evaluación, a los tres días, solo se contaminaron 6 muestras con un porcentaje de 12.5%; a los 6 días se aumentan 9 muestras más, lo cual hace un total de 15 muestras y a los 11 días se contaminó el total, llegando a un 100% de contaminación.

La oxidación de las muestras aumentó consecuentemente hasta su totalidad.

Cuadro 15.

Método de desinfección con alcohol - hipoclorito de sodio

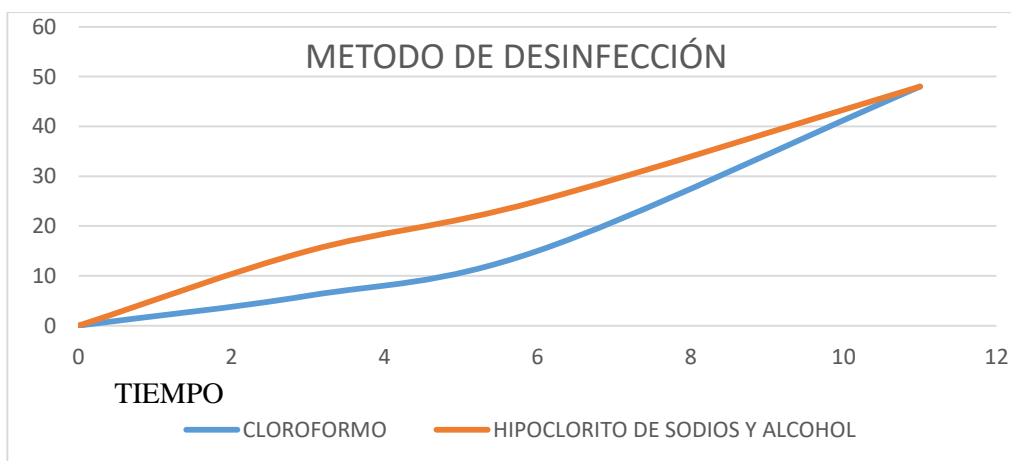
	Tiempo			Porcentaje			
	3 Días	6 Días	11 Días	3 Días	6 Días	11 Días	Total
CONTAMINACIÓN	15	25	8	31.25%	52.08%	16.67%	100%
OXIDACIÓN	11	22	15	22.91%	45.83%	31.26%	100%

En la primera evaluación, a los tres días, solo se contaminaron 15 muestras con un porcentaje 31.25%; a los 6 días se aumentaron 10 muestras más, lo cual hace un total de 25 muestras con un 52.08% y a los 11 días se contaminó el total, llegando a un 100% de contaminación.

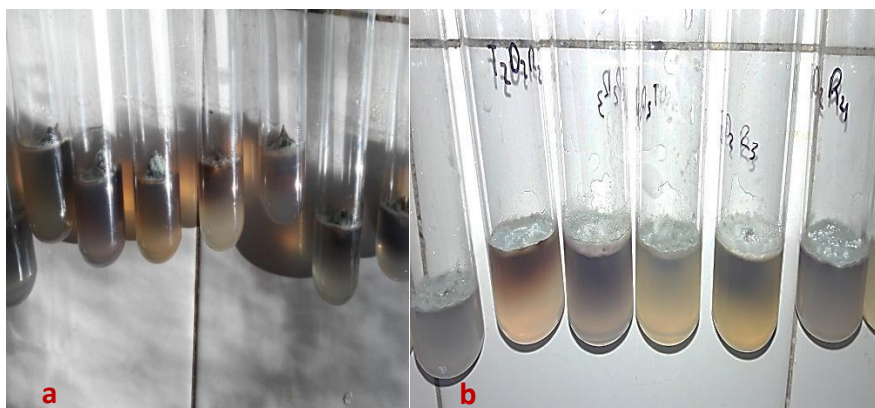
La oxidación de las muestras aumentó consecuentemente hasta su totalidad.

Gráfica 2.

Comparación de los métodos de desinfección



Comparando desde los 3 y 6 días se observó que el método de desinfección con cloroformo tiene menor contaminación que con el método de desinfección con hipoclorito de sodio – alcohol, hasta los 11 días cuando ambos métodos se contaminaron en su totalidad.



a) Muestras contaminadas y oxidadas a los 11 días después de la desinfección con cloroformo.

b) Muestras contaminadas y oxidadas a los 11 días después de la desinfección con hipoclorito de sodio – alcohol.

4.1.2 Segundo ensayo

La prueba de laboratorio del segundo ensayo se realizó desde el 29 hasta 31 de marzo de 2016.

Cuadro 16.

Porcentaje de germinación

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
2 días	0	0	0	0	0	0	0	0

No se presentó germinación de ningún embrión durante los 2 días.

Cuadro 17.

Método de desinfección con cloroformo

	Tiempo	Porcentaje
	2 Días	2 Días
CONTAMINACIÓN	48	100%
OXIDACIÓN	4	8.3%

La evaluación se realizó a los 2 días de la introducción; pudiéndose evidenciar un 100% de contaminación. Esto se puede deber a un mal protocolo en laboratorio.

La oxidación disminuyó en comparación al primer ensayo, ya que las muestras fueron enjuagadas en ácido cítrico y ácido ascórbico.

Cuadro 18.

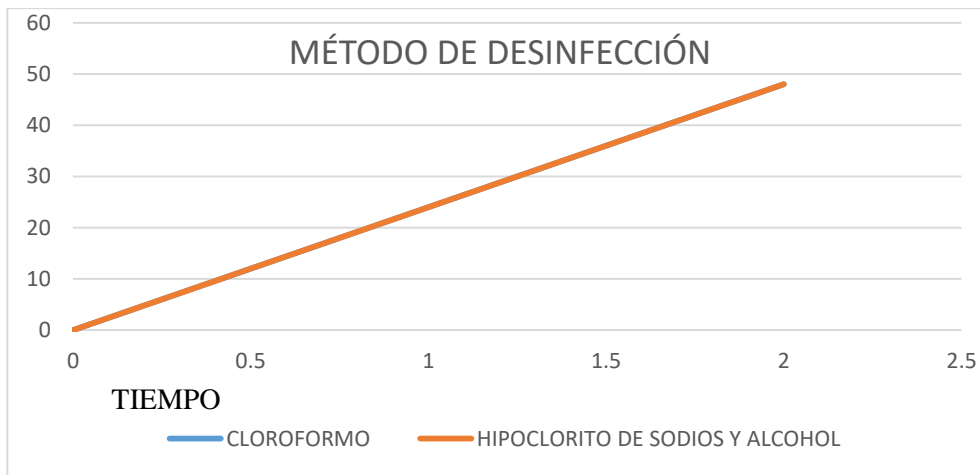
Método de desinfección con alcohol - hipoclorito de sodio

	Tiempo	Porcentaje
	2 Días	2 Días
CONTAMINACIÓN	48	100%
OXIDACIÓN	2	4.16%

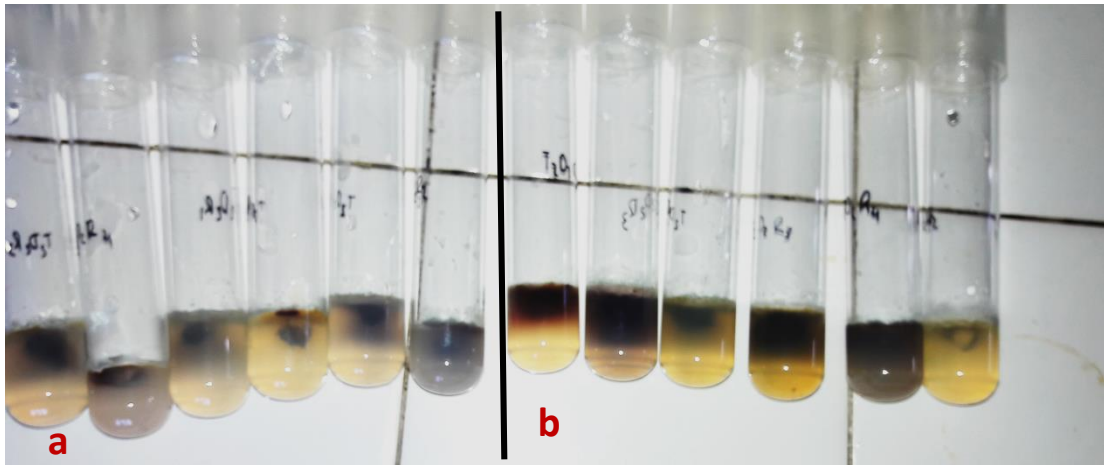
La evaluación se realizó a los 2 días de la introducción, cuando se observó una contaminación del 100%. Esto se puede deber a un mal proceso en laboratorio.

La oxidación disminuyó en comparación al primer ensayo ya que las muestras fueron enjuagadas en ácido cítrico y ácido ascórbico, lo que quiere decir que estos ácidos evidentemente disminuyen la oxidación.

Gráfica 3.
Comparación de los métodos de desinfección



Comparando los dos medios de desinfección, se observa en la gráfica a los dos días la contaminación un mismo nivel, esto se debe a la falta de limpieza de la cámara de flujo laminar antes de colocar los materiales.



a) Muestras sometidas al método de desinfección con alcohol - hipoclorito de sodio y que se contaminaron en su totalidad.

b) La fotografía muestra el método de desinfección con cloroformo donde se ve que la oxidación se presentó en 4 muestras y la contaminación al 100%.

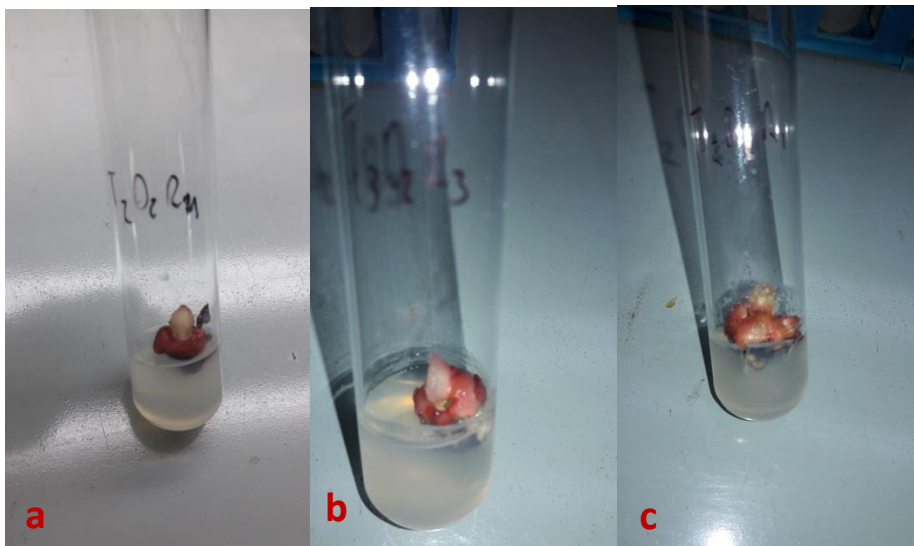
4.1.3 Tercer ensayo

La prueba en laboratorio de los embriones del tercer ensayo se realizó desde el 6 hasta 22 de abril de 2016.

Cuadro 19.
Porcentaje de germinación

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
2 días	0	0	0	0	0	0	0	0
5 días	0	0	0	0	0	0	0	0
7 días	0	0	0	0	0	0	0	0
12 días	0	0	0	0	0	0	0	0
16 días	0	0	0	0	0	0	0	0

En este ensayo se presentó formación de callos a los 12 días en alrededor de 25 muestras. El callo es una formación de masa celular vegetativa no diferenciada.



La formación de callos en los siguientes tratamientos:

- a) Tratamiento 6, Medio de cultivo 2, desinfección con alcohol –hipoclorito de sodio
- b) Tratamiento 7, Medio de cultivo 3, desinfección con alcohol –hipoclorito de sodio
- c) Tratamiento 1, Medio de cultivo 1, desinfección con cloroformo.

4.1.3.1. Porcentaje de contaminación en el tercer ensayo

TRATAM./REP			I	II	III	Σ	X
T1	D1	C1	50	50	25	125	41.67
T2		C2	50	50	50	150	50.00
T3		C3	25	0	50	75	25.00
T4		C4	0	25	25	50	16.67
T5	D2	C1	25	25	50	100	33.33
T6		C2	0	50	50	100	50.00
T7		C3	0	0	0	0	0.00
T8		C4	25	25	75	125	41.67
Σ		ΣBlog.	175	225	325	725	258.33
x							32.29

4.1.3.1.1. Rutina de Cálculo

$$F_c = \frac{(GT)^2}{N} = \frac{(725)^2}{24} = 21901.04$$

SUMA DE CUADRADOS.

Suma de Cuadrados Totales.

$$SCT = \sum(y)^2 - F_c = (50)^2 + (50)^2 + \dots \dots \dots (75)^2 - F_c = 11223.96$$

Suma de cuadrados de tratamientos.

$$SCt = \sum \frac{(t)^2}{r} - F_c = \frac{(125)^2}{3} + \frac{(150)^2}{3} + \frac{(75)^2}{3} + \frac{(125)^2}{3} + \dots \dots \dots \frac{(125)^2}{3} - F_c = 5390.63$$

Suma de cuadrados del error.

$$SC_e = SCT - SC_t = 5833.33$$

GRADOS DE LIBERTAD.

Grados de Libertad para un total.

$$-GL_T = n - 1 = 24 - 1 = 23$$

Grados de Libertad para tratamientos.

$$-GL_t = t - 1 = 8 - 1 = 7$$

Grados de Libertad para el error.

$$-GL_e = -GL_T - GL_t = 23 - 7 = 16$$

CUADRADO MEDIO DE LOS TRATAMIENTOS.

Cuadrado medio de los tratamientos.

$$-CM_t = \frac{SC_t}{GL_t} = \frac{5390.63}{7} = 770.09$$

Cuadrado medio del error.

$$-CM_e = \frac{SC_e}{GL_e} = \frac{5833.33}{16} = 364.58$$

“F” Calculada.

$$FC = \frac{CM_t}{CM_e} = \frac{770.09}{364.58} = 2.11$$

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

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

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

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

Cuadro 20.

Análisis de Varianza (ANOVA)

Fv	gl	SC	CM	F _c	F _T 5%	F _T 1%
TOTAL	23	11224.0				
Trata	7	5390.6	770.1	2.1	2.66	4.03
Error	16	5833.3	364.6			

De acuerdo con el cuadro 20, F_c es menor que la F_t al 5%. (No existen diferencias significativas) entre los métodos de desinfección, debido a esto se acepta la hipótesis nula, donde los métodos de desinfección no reflejan significancia.

Coefficiente de variación.

$$CMe = 364.6$$

$$X = 32.29$$

$$Cv = \frac{\sqrt{CMe}}{X} * 100 = \frac{\sqrt{364.6}}{32.29} * 100 = 59.13$$

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

Se tiene un coeficiente de variación de 59.13, lo que significa que existe un alto grado de variabilidad entre los tratamientos.

4.1.3.1.2. Prueba de comparación de medias.

Cálculo De MDS (Diferencia Mínima Significativa).

$$CMe = 364.6$$

$$Nr = 3$$

t constant en la tabla = 2.31

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

$$MDS = \sqrt{\frac{2*364.6}{3}} * 2.31 = 36.01$$

Cuadro 21

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

MDS=36.01	T2	T6	T1	T8	T5	T3	T4	
		50.00	50.00	41.67	41.67	33.33	25.00	16.67
T7	0.00	50.00	50.00	41.67	41.67	33.33	25.00	16.67
T4	16.67	33.33	33.33	25.00	25.00	16.66	8.33	
T3	25.00	25.00	25.00	16.67	16.67	8.33		
T5	33.33	16.67	16.67	8.34	8.34			
T8	41.67	8.33	8.33					
T1	41.67	8.33	8.33					
T1	50.00							

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

N°	TRAT.	DESCRIPCION	CM	RANGO
1	T7	Desinfección con hipoclorito de sodio y alcohol y BAP 2.5 mg/L, IBA 0.25 mg/L	0	a
2	T4	Desinfección con cloroformo y BAP 3 mg/L, IBA 0.3 mg/L	16.67	a
3	T3	Desinfección con cloroformo y BAP 2.5 mg/L, IBA 0.25 mg/L	25	a
4	T5	Desinfección con hipoclorito de sodio y alcohol y BAP 1.5 mg/L, IBA 0.15 mg/L	33.33	a
5	T8	Desinfección con hipoclorito de sodio y alcohol y BAP 3 mg/L, IBA 0.3 mg/L	41.67	ab
6	T1	Desinfección con cloroformo y BAP 1.5 mg/L, IBA 0.15 mg/L	41.67	ab
7	T6	Desinfección con hipoclorito de sodio y alcohol y BAP 2 mg/L, IBA 0.2 mg/L	50	ab
8	T2	Desinfección con cloroformo y BAP 2 mg/L, IBA 0.2 mg/L	50	ab

De acuerdo con los resultados de la prueba de MDS, existe diferencia significativa entre los tratamientos analizados; es decir, el mejor tratamiento es el 7 (desinfección con hipoclorito de sodio – alcohol), por presentar 0% de contaminación mientras que los tratamientos con más alta contaminación son los tratamientos 2 y 6 que tienen un promedio del 50% de contaminación.

Cuadro 22.

Método de desinfección con cloroformo

	Tiempo						Porcentaje					
	2 Días	5 Días	7 Días	12 Días	16 Días	Tota l	2 Días	5 Días	7 Días	12 Días	16 Días	Tot al
Contaminación	0	4	6	4	2	16	0%	8.33 %	12.5 %	8.33 %	4.16 %	33.3 %
Oxidación	4	0	1	0	0	5	8.33 %	0%	2.04 %	0%	0%	10.3 %

En la primera evaluación, a los dos días, no se presentó contaminación alguna; a los 5 días, se contaminaron 4 muestras; a los 7 días, se contaminaron 6 más con un total de 10 muestras; a los 12 días, se aumentaron 4 más con una total de 14 muestras

contaminadas y a los 16 días se presentaron 2 muestras más, haciendo un total de 16 muestras contaminadas con un porcentaje del 33.33% hasta la última evaluación.

La oxidación disminuyó en este ensayo llegando un total de 5 muestras oxidadas; esto se debe a que se sumergió los embriones en ácido cítrico y ácido ascórbico antes de la introducción.

Cuadro 23.

Método de desinfección con alcohol - hipoclorito de sodio

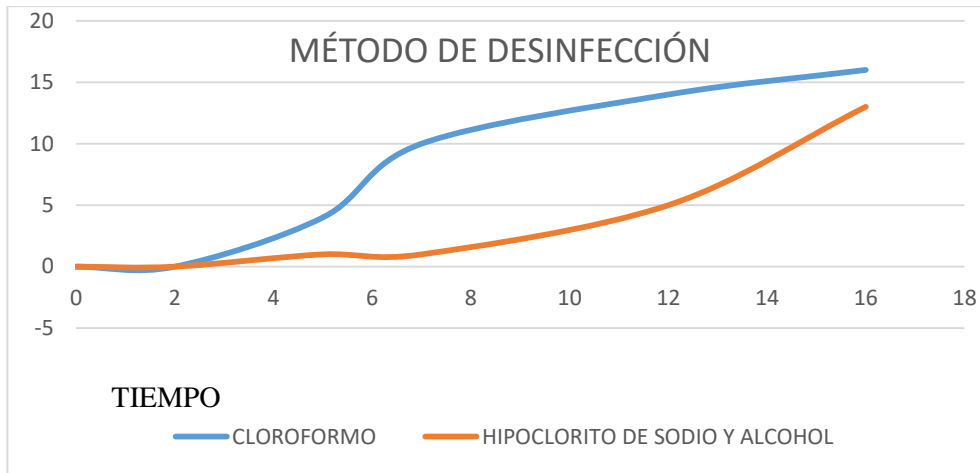
	Tiempo					Porcentaje					
	2 Días	5 Días	7 Días	12 Días	16 Días	2 Días	5 Días	7 Días	12 Días	16 Días	Total
Contaminación	0	1	0	4	9	0%	2.08 %	0%	8.33 %	18.75 %	29.16 %
Oxidación	2	0	0	0	0	4.16 %	0%	0%	0%	0%	0%

En la primera evaluación del tercer ensayo, a los dos días, no se presentó contaminación alguna; a los 5 días se contaminó una muestra; a los 7 días, solo se presentó una contaminada; a los 12 días, se contaminaron 4 muestras y a los 16 días, se contaminaron 9 muestras haciendo un total de 13 muestras con un 29.16% de contaminación.

La oxidación disminuyó significativamente en este ensayo haciendo un total de 2 muestras oxidadas esto se debe a que se enjuagaron los embriones en ácido cítrico y ácido ascórbico, esto ocurrió antes de la introducción de embriones.

Gráfica 4.

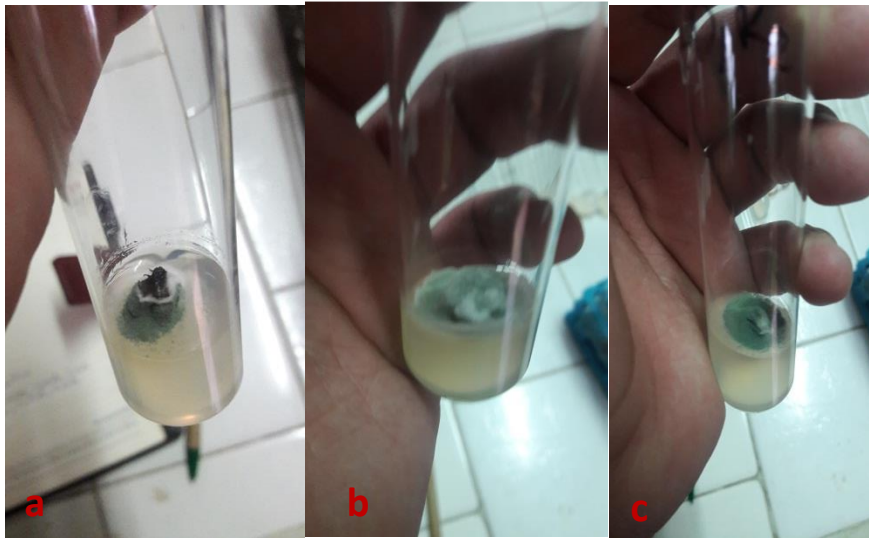
Comparación de los métodos de desinfección en tercer ensayo.



En la primera evaluación, a los dos días, no se presenta contaminación por ambos métodos de desinfección; desde el cuarto día; se van diferenciando, se puede ver en la gráfica que el hipoclorito de sodio y el alcohol presentan una baja contaminación en relación con el método de desinfección con cloroformo; pero, el día 16 solo existió una diferencia de tres muestras, por lo que se pudo evidenciar que el mejor método hasta el momento es el hipoclorito de sodio y alcohol.

Pérez y Quenta (2015), indican que no se presentó contaminación.

El método de desinfección con alcohol al 70% sumergido por 30 segundos e hipoclorito de sodio al 4% por 15 minutos no presenta contaminación; pero, quema los embriones, mientras que la aplicación del hipoclorito de sodio al 4% por 10 minutos presenta contaminación; pero, no quema los embriones



Muestras contaminadas de los distintos tratamientos en el tercer ensayo

a) Tratamiento 1: método de desinfección con cloroformo medio de cultivo 1, repetición 3: contaminado.

b) Tratamiento 2: método de desinfección con cloroformo medio de cultivo 2, repetición 2: contaminado.

c) Tratamiento 8: método de desinfección con alcohol- hipoclorito de sodio medio de cultivo 2; repetición 1: contaminado.

4.1.4. Cuarto ensayo.

La prueba en laboratorio se realizó del 27 de mayo de 2016 hasta el 4 de agosto de 2016

4.1.4.1 Porcentaje de contaminación

TRATAM./REP		I	II	III	Σ	X	
T1	D1	C1	25	100	50	175	58.33
T2		C2	75	25	75	175	58.33
T3		C3	75	25	25	125	41.67
T4		C4	50	75	75	200	66.67
T5	D2	C1	75	0	25	100	33.33
T6		C2	50	50	75	175	58.33
T7		C3	0	0	25	25	8.33
T8		C4	25	75	25	125	41.67
Σ		Σ Blog.	375	350	375	1100	366.67
X						45.83	

4.1.4.1.1 Rutina de Cálculo

$$F_c = \frac{(GT)^2}{N} = \frac{(1100)^2}{24} = 50416.67$$

SUMA DE CUADRADOS

Suma de Cuadrados Totales.

$$SCT = \sum(y)^2 - F_c = (25)^2 + (100)^2 + \dots (25)^2 - F_c = 19583.33$$

Suma de cuadrados de tratamientos.

$$SCt = \sum \frac{(t)^2}{r} - F_c = \frac{(175)^2}{3} + \frac{(175)^2}{3} + \frac{(125)^2}{3} + \frac{(200)^2}{3} + \dots \frac{(125)^2}{1} - F_c = 7500$$

Suma de cuadrados del error.

$$SCe = SCT - SCt = 12083.33$$

GRADOS DE LIBERTAD.

Grados de Libertad para un total.

$$-GL_T = n - 1 = 24 - 1 = 23$$

Grados de Libertad para tratamientos.

$$-GL_t = t - 1 = 8 - 1 = 7$$

Grados de Libertad para el error.

$$-GL_e = -GL_T - GL_t = 23 - 7 = 16$$

CUADRADO MEDIO DE LOS TRATAMIENTOS.

Cuadrado medio de los tratamientos.

$$-CM_t = \frac{SC_t}{GL_t} = \frac{7500}{7} = 1071.4$$

Cuadrado medio del error.

$$-CM_e = \frac{SC_e}{GL_e} = \frac{12083.33}{16} = 755.21$$

“F” Calculada.

$$FC = \frac{CM_t}{CM_e} = \frac{1071.4}{755.21} = 1.42$$

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

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

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

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

Cuadro 24.

Análisis de Varianza (ANOVA)

Fv	gl	SC	CM	F _c	F _T 5%	F _T 1%
TOTAL	23	19583.3				
Trata	7	7500.0	1071.4	1.4	2.66	4.03
Error	16	12083.3	755.2			

De acuerdo con el cuadro 24, F_c es menor que F_t al 5%, (no existen diferencias significativas). Debido a esto se acepta la hipótesis nula, donde los métodos de desinfección no reflejan significancia.

Coefficiente de variación.

$$CMe = 755.2$$

$$X = 45.83$$

$$Cv = \frac{\sqrt{CMe}}{X} * 100 = \frac{\sqrt{755.2}}{45.83} * 100 = 59.96$$

Según el análisis existe un coeficiente de variación de 59.96, lo que hace deducir que los dos métodos de desinfección se comportan de diferentes maneras en los ocho distintos tratamientos que se realizaron en el ensayo.

4.1.4.1.2. Prueba de comparación de medias

Cálculo de MDS (Diferencia Mínima Significativa).

$$CMe = 755.2$$

$$Nr = 3$$

t constante en la tabla = 2.31

$$MDS = \sqrt{\frac{2CMe}{Nr}} * t$$

$$MDS = \sqrt{\frac{2*755.2}{3}} * 2.31 = 51.83$$

Cuadro 25

Cualquier diferencia entre $X_a - X_b > \text{MDS} * \text{Porcentaje de contaminación en el cuarto ensayo}$

MDS=51.83		T4	T1	T2	T6	T3	T8	T5
		66.67	58.33	58.33	58.33	41.67	41.67	33.33
T7	8.33	58.34	50.00	50.00	50.00	33.34	33.34	25.00
T5	33.33	33.34	25.00	25.00	25.00	8.34	8.34	
T8	41.67	25.00	16.66	16.66	16.66	0.00		
T3	41.67	25.00	16.66	16.66	16.66			
T6	58.33	8.34	0.00	0.00				
T2	58.33	8.34	0.00					
T1	58.33	8.34						

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

Nº	TRAT.	DESCRIPCION	CM	RANGO
1	T7	Desinfección con hipoclorito de sodio y alcohol y BAP 2.5 mg/L, IBA 0.25 mg/L	8.33	a
2	T5	Desinfección con hipoclorito de sodio y alcohol y BAP 1.5 mg/L, IBA 0.15 mg/L	33.33	ab
3	T8	Desinfección con hipoclorito de sodio y alcohol y BAP 3 mg/L, IBA 0.3 mg/L	41.67	ab
4	T3	Desinfección con cloroformo y BAP 2.5 mg/L, IBA 0.25 mg/L	41.67	ab
5	T6	Desinfección con hipoclorito de sodio y alcohol y BAP 2 mg/L, IBA 0.2 mg/L	58.33	ab
6	T2	Desinfección con cloroformo y BAP 2 mg/L, IBA 0.2 mg/L	58.33	ab
7	T1	Desinfección con cloroformo y BAP 1.5 mg/L, IBA 0.15 mg/L	58.33	ab
8	T4	Desinfección con cloroformo y BAP 3 mg/L, IBA 0.3 mg/L	66.67	ab

De acuerdo con los resultados de la prueba de MDS, existe diferencia significativa entre los tratamientos analizados; es decir, el tratamiento 7 (desinfecciones con hipoclorito de sodio – alcohol) es el mejor y los tratamientos 5, 8, 3, 6, 2 y 4 son iguales y no presentan significancia.

Cuadro 26.
Método de desinfección con cloroformo
Cuarto ensayo

Tiempo	Contaminación		Oxidación	
	Muestras	Porcentual	Muestras	Porcentual
3 días	16	33.33%	3	6.25%
7 días	0	0%	0	0%
10 días	6	12.5%	0	0%
18 días	5	10.41%	0	0%
24 días	0	0%	0	0%
32 días	0	0%	0	0%
38 días	0	0%	0	0%
46 días	0	0%	0	0%
52 días	0	0%	0	0%
60 días	0	0%	0	0%
66 días	0	0%	0	0%
70 días	0	0%	0	0%
Total	27	56.25	3	6.25%

A los 3 días de la introducción de las muestras, se contaminaron 16 con un porcentaje de 33,33%; a los 7 días, no se presentaron muestras contaminadas; a los 10 días, se contaminaron 6 muestras, haciendo un total de 22 con un porcentaje 47.91%; a los 18 días, se contaminaron 5 muestras, haciendo un total de 27 con un porcentaje de 56,25%; desde el día 18 hasta el 70, no se contaminaron más muestras.

En cuanto a la oxidación, se presentaron 3 muestras oxidadas a los 3 días con un porcentaje de 6.25%; a partir de ahí no se oxidaron más muestras hasta el último día de la evaluación.

Cuadro 27.

Método de desinfección con alcohol hipoclorito de sodio

Cuarto ensayo

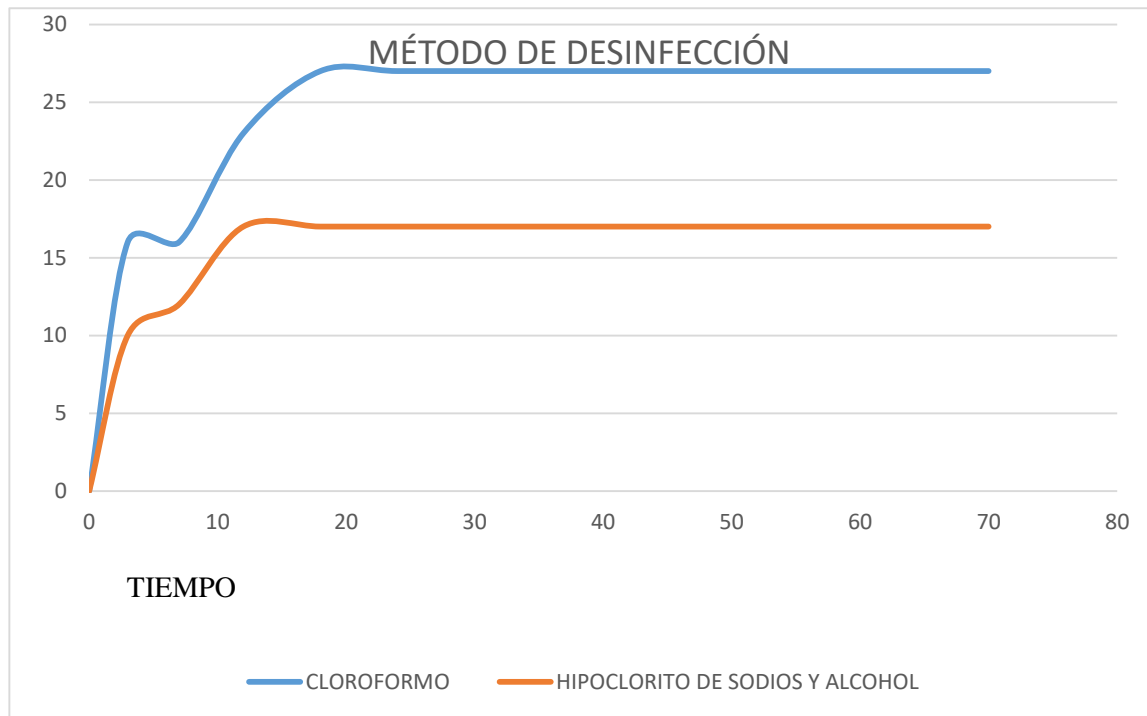
Tiempo	Contaminación		Oxidación	
	Muestras	Porcentual	Muestras	Porcentual
3 días	10	20.83%	2	4.16%
7 días	0	0%	0	0%
10 días	2	4.16%	0	0%
18 días	5	10.41%	0	0%
24 días	0	0%	0	0%
32 días	0	0%	0	0%
38 días	0	0%	0	0%
46 días	0	0%	0	0%
52 días	0	0%	0	0%
60 días	0	0%	0	0%
66 días	0	0%	0	0%
70 días	0	0%	0	0%
Total	17	35.41%	2	4.16%

A los 3 días se contaminaron 10 muestras con un porcentaje de 20,83% , en la segunda evaluación que se realizó a los 7 días no se contaminaron muestras, a los 10 días se contaminaron 2 muestras más haciendo un total de 12 muestras contaminadas con un porcentaje de 25%; en la cuarta evaluación que se realizó a los 18 días, se contaminaron 5 muestras, haciendo un total de 17 muestras contaminadas con un porcentaje de 35,41%; a partir de ahí, hasta la última evaluación no se encontraron más muestras contaminadas.

En cuanto a la oxidación se presentaron 2 muestras oxidadas a los 3 días con un porcentaje de 4,16%; a partir de ahí que no se oxidaron más muestras, hasta el último día de la evaluación.

Gráfica 5.

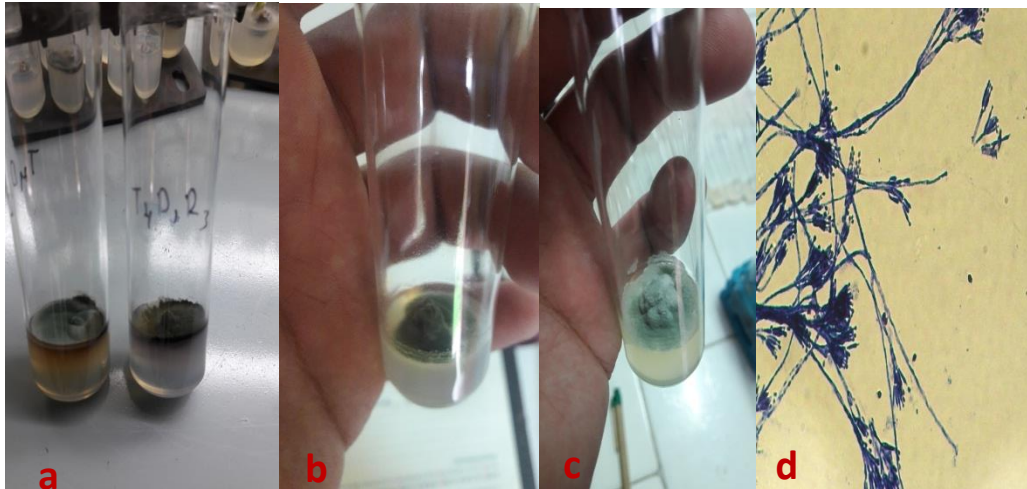
Comparación de los métodos de desinfección cuarto ensayo.



En la gráfica 5 se muestra claramente que el mejor método de desinfección es con alcohol - hipoclorito de sodio. En los 3 primeros días como se puede ver, el método de desinfección con cloroformo tiene mayor contaminación que el realizado con hipoclorito de sodio - alcohol, como también se puede decir que los días más críticos en los que se presenta la contaminación son los primeros 18 días ya que de ahí en adelante se mantiene estable por ambos métodos de desinfección.

Bleisser (2008) explica que la contaminación es del 100% con el método de desinfección con alcohol e hipoclorito de sodio. Al 70% sumergidas las yemas en alcohol por 30 segundos y en hipoclorito de sodio a al 2%, sumergidas por 10 minutos.

Esto indica que la concentración al 4% de hipoclorito de sodio sumergiendo el material vegetal por 10 minutos, presenta menor contaminación que la aplicación al 2% de hipoclorito de sodio por 10 minutos.



Como se observa en las fotografías de algunas muestras contaminadas del cuarto ensayo, todas se contaminaron con *Penicilium sp.*

El Penicilium es un hongo que se encuentra en el suelo y en el ambiente el cual se desarrolla con facilidad en lugares húmedos y con una temperatura de 20 grados Celsius.

a) Tratamiento 4, contaminado en dos repeticiones.

b) Tratamiento 2, contaminado en una repetición.

c) Tratamiento 6, contaminado en una repetición.

d) Estructura del *Penicilium* son conidios de forma ramificada; su propagación es por esporas.

4.1.4.2. Porcentaje de germinación

TRATAM./REP		I	II	III	Σ	X	
T1	D1	C1	25	0	50	75	25.00
T2		C2	0	0	50	50	16.67
T3		C3	0	50	50	100	33.33
T4		C4	0	50	25	75	25.00
T5	D2	C1	50	50	25	125	41.67
T6		C2	50	25	50	125	41.67
T7		C3	75	75	50	200	66.67
T8		C4	0	0	50	50	16.67
Σ	ΣBlog.	200	250	350	800	266.67	
X						33.3333333	

4.1.4.2.1. Rutina de Cálculo

$$F_c = \frac{(GT)^2}{N} = \frac{(800)^2}{24} = 26666.67$$

SUMA DE CUADRADOS

Suma de Cuadrados Totales.

$$SCT = \sum(y)^2 - F_c = (25)^2 + ()^2 + \dots (50)^2 - F_c = 14583.33$$

Suma de cuadrados de tratamientos.

$$SCt = \sum \frac{(t)^2}{r} - F_c = \frac{(75)^2}{3} + \frac{(50)^2}{3} + \frac{(100)^2}{3} + \frac{(75)^2}{3} + \dots \frac{(50)^2}{3} - F_c = 5833.33$$

Suma de cuadrados del error.

$$SCe = SCT - SCt = 8750$$

GRADOS DE LIBERTAD.

Grados de Libertad para un total.

$$-GL_T = n - 1 = 24 - 1 = 23$$

Grados de Libertad para tratamientos.

$$-GL_t = t - 1 = 8 - 1 = 7$$

Grados de Libertad para el error.

$$-GL_e = -GL_T - GL_t = 23 - 7 = 16$$

CUADRADO MEDIO DE LOS TRATAMIENTOS.

Cuadrado medio de los tratamientos.

$$-CM_t = \frac{SC_t}{GL_t} = \frac{5833.33}{7} = 833.33$$

Cuadrado medio del error.

$$-CM_e = \frac{SC_e}{GL_e} = \frac{8750}{16} = 546.88$$

“F” Calculada.

$$FC = \frac{CM_t}{CM_e} = \frac{833.33}{546.88} = 1.52$$

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

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

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

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

Cuadro 28.

Análisis de Varianza (ANOVA).

Fv	gl	SC	CM	F _c	F _T 5%	F _T 1%
TOTAL	23	14583.3				
Trata	7	5833.3	833.3	1.5	2.66	4.03
Error	16	8750.0	546.9			

De acuerdo con el cuadro 28, F_c es menor que la F_t al 5% (No existen diferencias significativas), debido a esto se acepta la hipótesis nula, donde los métodos de desinfección no reflejan significancia.

Coefficiente de variación

$$CMe = 546.9$$

$$X = 33.33$$

$$Cv = \frac{\sqrt{CMe}}{X} * 100 = \frac{\sqrt{546.9}}{33.33} * 100 = 70.16$$

El análisis del porcentaje de germinación en los ocho tratamientos lanzó datos heterogéneos los cuales se reflejan claramente en el coeficiente de variación que es 70.16, lo que hace que se tenga una variabilidad de germinación entre los datos obtenidos en cada tratamiento, ya todos son distintos.

4.1.4.2.2. Prueba de comparación de medias

Cálculo De MDS (Diferencia Mínima Significativa).

$$MDS = \sqrt{\frac{2CMe}{Nr}} * t$$

$$MDS = \sqrt{\frac{2*546.9}{3}} * 2.31 = 44.10$$

Cuadro 29

Cualquier diferencia entre $X_a - X_b > \text{MDS}^*$ Porcentaje de germinación cuarto ensayo

MDS=44.10		T7	T5	T6	T3	T1	T4	T2
			75.00	66.67	66.67	58.33	58.33	33.33
T8	25.00	50.00	41.67	41.67	33.33	33.33	8.33	
T2	25.00	50.00	41.67	41.67	33.33	33.33	8.33	
T4	33.33	41.67	33.34	33.34	25.00	25.00		
T1	58.33	16.67	8.34	8.34				
T3	58.33	16.67	8.34	8.34				
T6	66.67	8.33						
T5	66.67	8.33						

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

N°	TRAT.	DESCRIPCIÓN	CM	RANGO
1	T7	Desinfección con hipoclorito de sodio y alcohol y BAP 2.5 mg/L, IBA 0.25 mg/L	66.67	a
2	T5	Desinfección con hipoclorito de sodio y alcohol y BAP 1.5 mg/L, IBA 0.15 mg/L	41.67	a
3	T6	Desinfección con hipoclorito de sodio y alcohol y BAP 2 mg/L, IBA 0.2 mg/L	41.67	ab
4	T3	Desinfección con cloroformo y BAP 2.5 mg/L, IBA 0.25 mg/L	33.33	ab
5	T1	Desinfección con cloroformo y BAP 1.5 mg/L, IBA 0.15 mg/L	25	ab
6	T4	Desinfección con cloroformo y BAP 3 mg/L, IBA 0.3 mg/L	25	ab
7	T2	Desinfección con cloroformo y BAP 2 mg/L, IBA 0.2 mg/L	16.67	ab
8	T8	Desinfección con hipoclorito de sodio y alcohol y BAP 3 mg/L, IBA 0.3 mg/L	16.67	ab

De acuerdo a los resultados de la prueba de MDS, existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos analizados; es decir, el tratamiento 7 es el mejor; los tratamientos 5, 6, 3, 1 y 4 son iguales y no presenta significancia.

Cuadro 30.

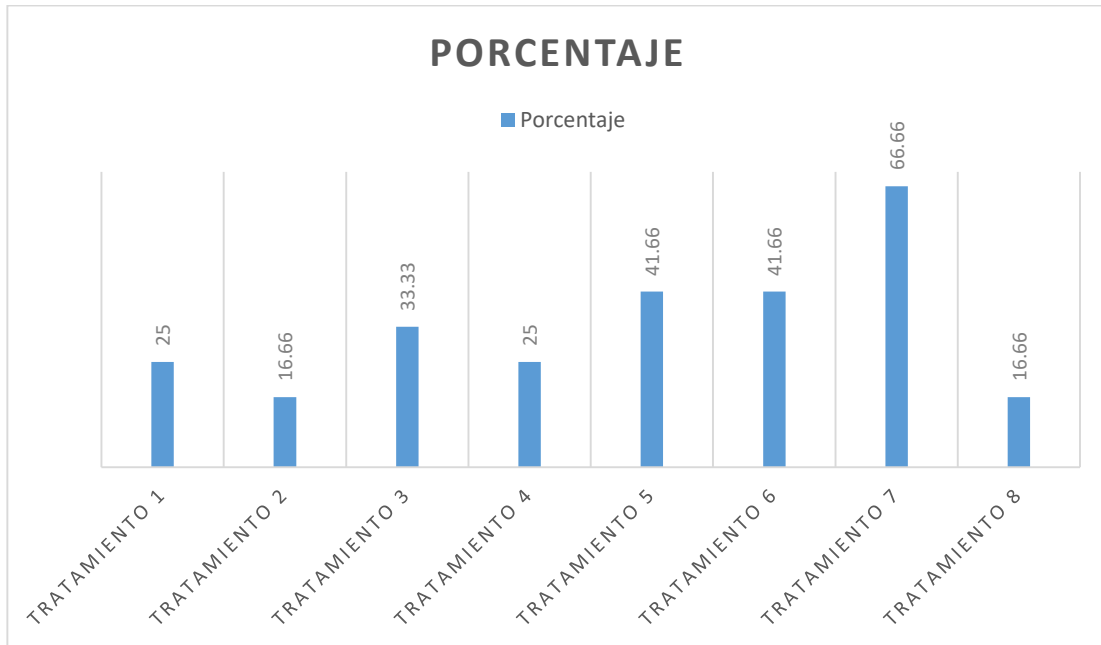
Germinación de los embrionarios en el cuarto ensayo

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
3 días	0	0	0	0	0	0	0	0
7 días	0	0	0	0	0	0	0	0
10 días	0	0	0	0	0	1	0	0
18 días	0	0	0	0	0	1	0	0
24 días	0	0	1	0	0	0	1	0
32 días	0	0	0	0	0	0	0	0
38 días	0	0	0	0	0	2	0	0
46 días	0	0	0	0	0	0	1	0
52 días	0	2	3	1	1	0	1	0
60 días	3	0	0	2	4	1	5	0
66 días	0	0	0	0	0	0	0	2
70 días	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	3	2	4	3	5	5	8	2

En el cuarto ensayo se observó que el porcentaje de germinación más alto fue el del tratamiento 7, con 8 embriones germinados; luego le sigue los tratamientos 5 y 6 con 5 embriones germinados; el tratamiento 3, con 4 embriones germinados; los tratamiento 1 y 4, con tres embriones germinados y por último los tratamientos 2 y 8, con 2 embriones germinados.

Gráfica 6.

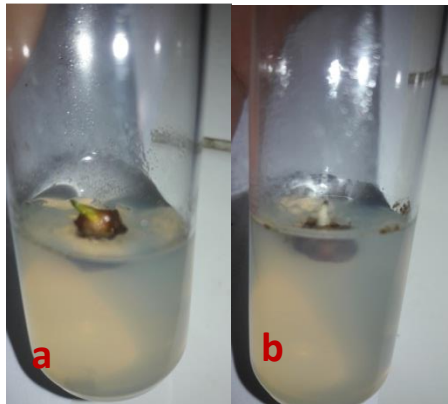
Comparación de los porcentajes de germinación cuarto ensayo.



En el cuarto ensayo se observa la germinación, el porcentaje más alto fue del tratamiento 7 con un 66.66% de germinación, luego le sigue el tratamiento 5 y 6 con un 41.66% y con el más bajo porcentaje de germinación es el tratamiento 2 y 8 con un 16.66% de germinación.

Pérez y Quenta (2015) indican que obtuvieron un 90 % de germinación.

La concentración de fitohormonas que utilizaron Pérez y Quenta es de 0.15 mg de ácido indolbutórico y de 1.5 mg 6 – bencilaninopurina; esta concentración presentó 90% de germinación, en cambio la concentración de 2.5 mg de 6 – bencilanimopurina y 0.25 mg de ácido indolbutirico presentó un 66.66% germinación.



a) Embrión germinado.

b) Embrión no germinado.

4.1.4.3. Crecimiento embrionario

Para evaluar el crecimiento embrionario se evaluó las vitro plantas de forma consecutiva cada tres días después de la germinación, se observó de manera visual las vitro plantas y con ayuda de una regla métrica colocando a lado del tubo de ensayo a la altura del medio de cultivo se fue midiendo véase en el (anexo 11)

TRATAM./REP			I	II	III	Σ	X
T1	D1	C1	0.5	0	0.5	1	0.33
T2		C2	0	0	1	1	0.33
T3		C3	0	0.5	2.25	2.75	0.92
T4		C4	0	0.5	1	1.5	0.50
T5	D2	C1	1	0.85	0.5	2.35	0.78
T6		C2	2.55	5.1	1.1	8.75	2.92
T7		C3	0.93	1.46	2.05	4.44	1.48
T8		C4	0	0	1.1	1.1	0.37
Σ		Σ Blog.	4.98	8.41	9.5	22.89	7.63
X							0.95

4.1.4.3.1. Rutina de Cálculo

$$F_c = \frac{(GT)^2}{N} = \frac{(22.89)^2}{24} = 21.83$$

SUMA DE CUADRADOS

Suma de Cuadrados Totales.

$$SCT = \sum(y)^2 - F_c = (0.5)^2 + (\)^2 + \dots + (1.1)^2 - F_c = 30.34$$

Suma de cuadrados de tratamientos.

$$SC_t = \sum \frac{(t)^2}{r} - F_c = \frac{(1)^2}{3} + \frac{(1)^2}{3} + \frac{(2.75)^2}{3} + \frac{(1.5)^2}{3} + \dots + \frac{(1.1)^2}{3} - F_c = 16.44$$

Suma de cuadrados del error.

$$SC_e = SCT - SC_t = 13.89$$

GRADOS DE LIBERTAD.

Grados de Libertad para un total.

$$-GL_T = n - 1 = 24 - 1 = 23$$

Grados de Libertad para tratamientos.

$$-GL_t = t - 1 = 8 - 1 = 7$$

Grados de Libertad para el error.

$$-GL_e = -GL_T - GL_t = 23 - 7 = 16$$

CUADRADO MEDIO DE LOS TRATAMIENTOS.

Cuadrado medio de los tratamientos.

$$-CM_t = \frac{SC_t}{GL_t} = \frac{16.44}{7} = 2.35$$

Cuadrado medio del error.

$$-CM_e = \frac{SC_e}{GL_e} = \frac{13.89}{16} = 0.87$$

“F” Calculada.

$$FC = \frac{CM_t}{CM_e} = \frac{2.35}{0.87} = 2.71$$

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

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

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

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

Cuadro 31.

Análisis de Varianza (ANOVA)

Fv	gl	SC	CM	F _c	F _T 5%	F _T 1%
TOTAL	23	30.3				
Trata	7	16.4	2.3	1.5	2.66	4.03
Error	16	13.9	0.9			

De acuerdo con cuadro 31, F_c es menor que F_t al 5%, (sí existen diferencias significativas), debido a esto, se acepta la hipótesis alternativa que dice que la concentración de fitohormonas acelera el porcentaje de germinación.

Coefficiente de variación.

$$CMe = 0.87$$

$$X = 0.95$$

$$Cv = \frac{\sqrt{CMe}}{X} * 100 = \frac{\sqrt{0.87}}{0.95} * 100 = 98.18$$

El crecimiento embrionario presento datos desiguales de las 4 concentraciones de fitoreguladores (BAP e IBA) a los que fueron sometidos los embriones. La mayoría de las repeticiones se contaminaron esto hace que se minimice los embriones que lograron germinar para luego crecer, es por eso que se tiene un alto coeficiente de variación (98,18).

4.1.4.3.2. Prueba de comparación de medias.

Cálculo de MDS (Diferencia Mínima Significativa).

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

$$MDS = \sqrt{\frac{2*0.87}{3}} * 2.31 = 1.75$$

Cuadro 32

Cualquier diferencia entre $\chi_a - \chi_b > MDS^*$ desarrollo embrionario cuarto ensayo

MDS=1.75		T6	T7	T3	T5	T4	T8	T1
		2.92	1.48	0.92	0.78	0.50	0.37	0.33
T2	0.33	2.59	1.15	0.59	0.45	0.17	0.04	
T1	0.33	2.59	1.15	0.59	0.45	0.17	0.04	
T8	0.37	2.55	1.11	0.55	0.41	0.13		
T4	0.50	2.42	0.98	0.42	0.28			
T5	0.78	2.14	0.70	0.14				
T3	0.92	2.00	0.56					
T7	1.48	1.44						

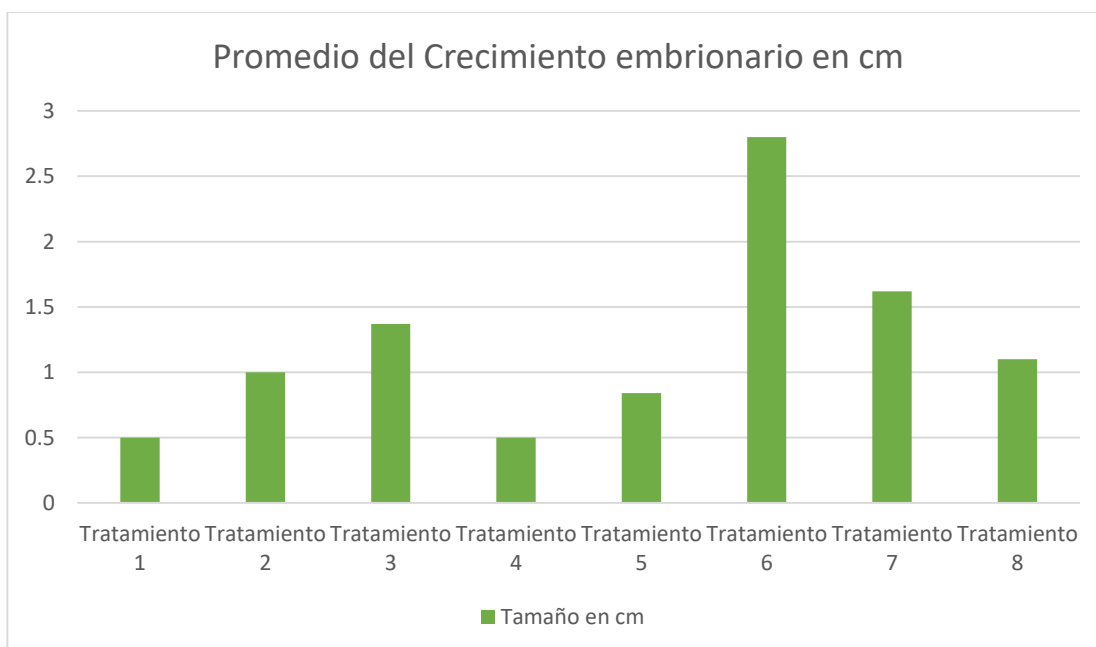
Letras iguales según MDS no difieren a 5% de probabilidad.

N°	TRAT.	DESCRIPCIÓN	CM	RANGO
1	T6	Desinfección con hipoclorito de sodio y alcohol y BAP 2 mg/L, IBA 0.2 mg/L	2.92	a
2	T7	Desinfección con hipoclorito de sodio y alcohol y BAP 2.5 mg/L, IBA 0.25 mg/L	1.48	ab
3	T3	Desinfección con cloroformo y BAP 2.5 mg/L, IBA 0.25 mg/L	0.92	ab
4	T5	Desinfección con hipoclorito de sodio y alcohol y BAP 1.5 mg/L, IBA 0.15 mg/L	0.78	ab
5	T4	Desinfección con cloroformo y BAP 3 mg/L, IBA 0.3 mg/L	0.5	ab
6	T8	Desinfección con hipoclorito de sodio y alcohol y BAP 3 mg/L, IBA 0.3 mg/L	0.37	ab
7	T1	Desinfección con cloroformo y BAP 1.5 mg/L, IBA 0.15 mg/L	0.33	ab
8	T2	Desinfección con cloroformo y BAP 2 mg/L, IBA 0.2 mg/L	0.33	b

De acuerdo con los resultados de la prueba de MDS, existe diferencia significativa entre los tratamientos analizados; es decir, el tratamiento 6 es el mejor y los tratamientos 7, 3, 5, 4 y 8 son iguales, no presentado significancia.

Gráfica 7.

Promedio del Crecimiento embrionario (cm) cuarto ensayo.

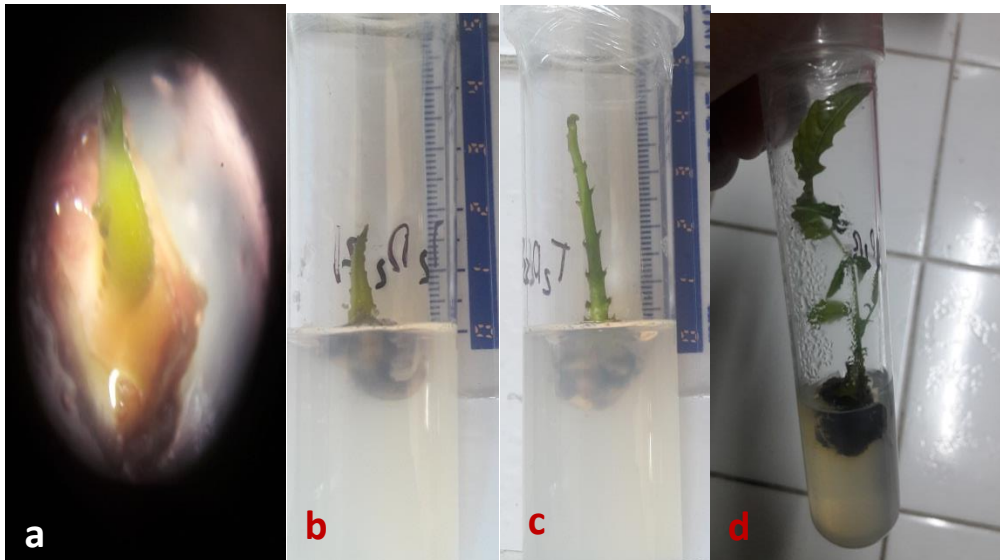


Hasta los 70 días, los embriones, del tratamiento 6 crecieron en un promedio de 2.8 cm como máximo. El tratamiento 7 tiene un promedio de 1.6 cm de desarrollo embrionario,

el tratamiento 3 tiene un promedio de 1.3 cm; el tratamiento 8 alcanzó 1.1 cm; el tratamiento 2 tiene un promedio 1cm; el tratamiento 5 tiene un promedio 0.8 cm y último, el tratamiento 4, tiene un promedio de 0.5 cm.

Perez y Quenta (2015) dicen que a los dos meses se tienen embriones crecidos hasta una altura de 3.5 cm.

La concentración de fitohormonas de Pérez y Quenta es de 0.15 mg de ácido indolbutírico y de 1.5 mg 6-bencilaninopurina; en estas concentraciones, los embriones presentaron un promedio de crecimiento de 3.5 cm, a diferencia de la concentración de 2 mg de 6-bencilanimopurina y 0.20 mg de ácido indolbutírico con un promedio de crecimiento de 2.8 cm.



a) Germinación del embrión vista desde un microscopio a los 10 días.

b) Crecimiento embrionario de 1.8 cm a los 24 días.

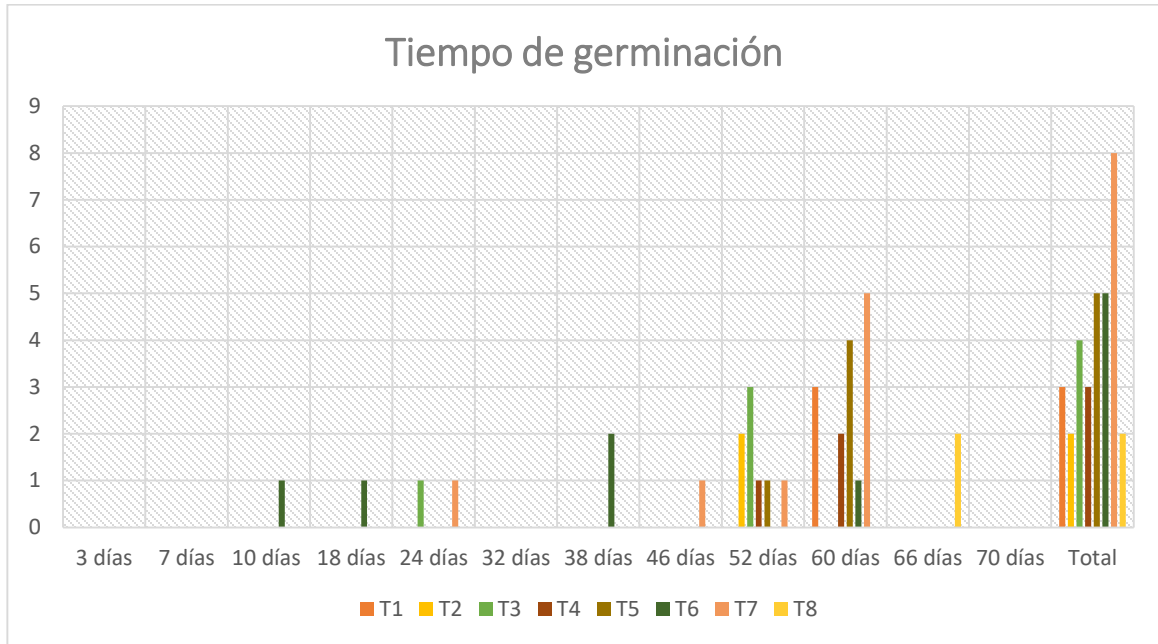
c) Crecimiento embrionario de 4 cm a los 52 días.

d) Crecimiento embrionario de 5 cm formación de hojas a los 80 días.

4.1.4.4. Tiempo de germinación

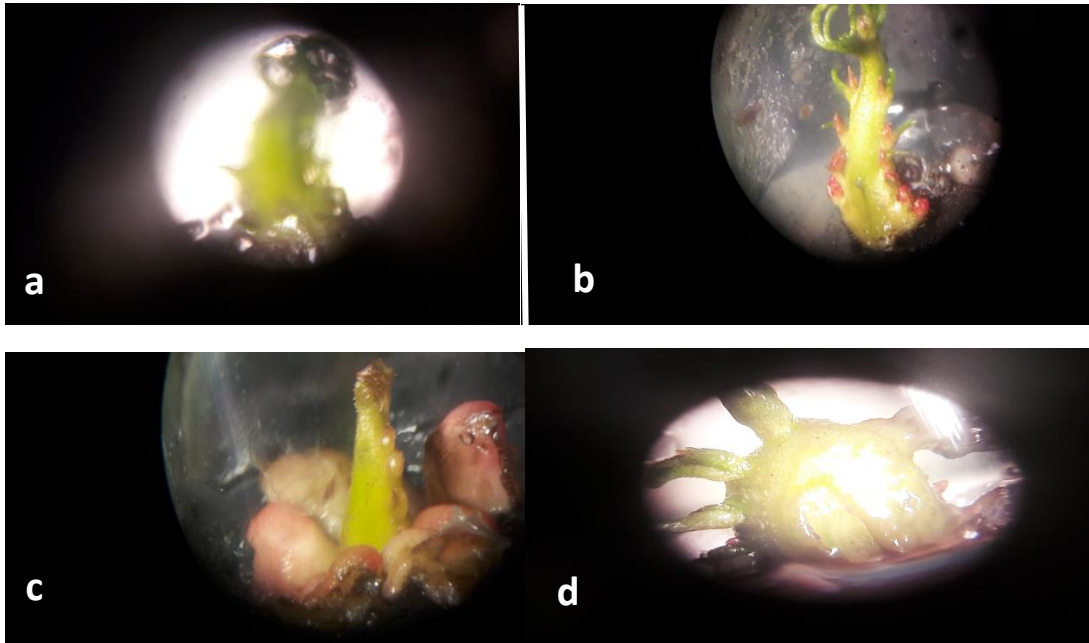
Gráfica 9

Comparación del tiempo de germinación entre los tratamientos



En la Gráfica se puede observar que el tratamiento 6 tiene un embrión germinado a los 10 días. A los 24 días, los tratamientos 3 y 7 tienen un embrión germinado; a los 52 días, se observa que los tratamientos 2, 3 y 5 presentan germinación de los embriones. En conclusión, todos los tratamientos germinaron hasta los 70 días, pero en diferentes fechas. Según Perez y Quenta (2015) indican que la germinación comienza a las dos semanas después del establecimiento en laboratorio, pero el tiempo de germinación de los embriones del nogal *Juglans bolivianita* es homogéneo.

La homogeneidad de la germinación de la semilla se debe a la procedencia del material vegetal, dicha semilla es del Bancos de Germoplasma de Especies Tropicales y Vegetales Agrícolas de la comunidad de Palos Blanco Sud Yungas, mientras que la semilla que se usó para este trabajo proviene de plantas silvestres sin identificar, que se encontraban en una finca familiar en la comunidad de Tojo.



a) Germinación del tratamiento 6, medio de cultivo 2 (BAP 2 mg/L – IBA 0.2 mg/L), observado desde el microscopio.

b) Germinación del tratamiento 7, medio de cultivo 3 (BAP 2.5 mg/L – IBA 0.25 mg/L), observado desde el microscopio.

c) Germinación del tratamiento 4, medio de cultivo 4 (BAP 3 mg/L – IBA 0.3 mg/L), observado desde el microscopio.

d) Germinación del tratamiento 1, medio de cultivo 1 (BAP 1.5 mg/L – IBA 0.15 mg/L), observado desde el microscopio.

4.2. DISCUSIÓN

Se realizaron cuatro ensayos, cada ensayo constaba de ocho tratamientos. En el primer ensayo no germinó ningún embrión, pero sí se presentó contaminación del 100% a los 11 días y con un alto índice de oxidación 100% pese a que a las muestras se colocaron durante 3 días en una cámara oscura para evitar la oxidación; no causó efecto. Este factor se tomó en cuenta para los siguientes ensayos en los que se optó utilizar ácido ascórbico y ácido cítrico para evitar que las muestras se oxiden.

El segundo ensayo presentó una contaminación del 100% a los dos días debido al mal protocolo de laboratorio realizado en este ensayo; sin embargo, no hubo un alto índice de oxidación ya que las muestras fueron tratadas con ácido cítrico y ácido ascórbico antes de la introducción in vitro.

El tercer ensayo presentó mayor avance; a los 10 días se formaron callos en alrededor de 25 muestras. En cuanto a la contaminación, esta aminoró mediante el método de desinfección con cloroformo, con el cual a los 16 días, se presentó un 33.33% de contaminación; por otra parte, el método de desinfección con alcohol - hipoclorito de sodio a los 16 días presentó una contaminación de 27.08% y la oxidación no fue mayor al 11% a comparación del primero ensayo, presentándose la formación de callos que en los dos anteriores ensayos no se presentó.

El cuarto ensayo mostró mejores resultados que los anteriores tres debido que se tomaron en cuenta los errores cometidos en los anteriores ensayos.

En los cuadros de ANOVA, los porcentajes de germinación y de contaminación no presentaron significancia alguna, en comparación porcentual de los dos métodos de desinfección.

Se puede observar que la contaminación con el método de desinfección con cloroformo presenta una contaminación del 56.24%, a comparación del otro método de desinfección con hipoclorito de sodio y alcohol que tiene un 35.4%, por lo que se puede decir que el mejor método de desinfección es con hipoclorito de sodio y alcohol.

En cuanto a la germinación, el tratamiento 7 presentó mejor resultado, con un 66.66% de germinación. En lo referente al crecimiento embrionario, el tratamiento 6 presentó un promedio de 2.8 cm, siendo por otra parte, y el tratamiento 6 el primero que germinó con un embrión a los 10 días.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- La contaminación se presentó de diferente manera en cada ensayo, en los dos primeros ensayos se contaminaron las muestras en un 100%, en el tercer ensayo el mejor tratamiento fue el 7 dando un porcentaje del 0% de contaminación y en el cuarto ensayo el mejor tratamiento también fue el 7 con un porcentaje de 8.33% de contaminación dando como resultado que el mejor método de desinfección es el método con alcohol al 75% e hipoclorito de sodio al 5.5%.

- En cuanto al porcentaje de germinación, el tratamiento 7 dio mejor resultado con un porcentaje del 66.67% mediante el cultivo WPM Woody Plant Medium con la concentración de fitohormonas de BAP 2 mg/L - IBA 0.2mg/L y el método de desinfección con hipoclorito de sodio y alcohol.

- El crecimiento embrionario muestra que el tratamiento 6 tuvo un promedio de desarrollo del 2.8 cm en 70 días y los tratamientos 1 y 4 tuvieron un promedio de desarrollo 1 cm en 70 días.

- Con respecto al tiempo de germinación, el tratamiento 6 fue el primero, comenzando con la germinación a los 10 días; el tratamientos 3 y 7, a los 24 días; los tratamientos 2, 4 y 5, a los 52 días; el tratamiento 6, a los 60 días y el tratamiento 8, a los 66 días.

- En conclusión, los tratamiento con mejores resultados para el establecimiento in vitro del nogal son: primero el tratamiento 7 por medio del cultivo WPM Woody Plant Medium, con la concentración de fitohormonas de BAP 2 mg/L -

IBA 0.2 mg/L y el método de desinfección con hipoclorito de sodio y alcohol; segundo, el tratamiento 6 por medio del cultivo WPM Medium Woody plant con la concentración de fitohormonas de BAP 2.5mg/L - IBA 0.25 mg/L y el método de desinfección con hipoclorito de sodio - alcohol.

5.2 RECOMENDACIONES

- Se recomienda seguir rigurosamente el protocolo de la investigación para evitar posteriores problemas de contaminación.
- Para evitar la oxidación de los embriones, estos deben ser sumergidos al ácido cítrico (1.5g/L) y ácido ascórbico (1.1g/L), diluidos en un vaso de agua destilada por al menos 3 minutos.
- 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 sí 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 o plantines en la universidad, ya que la producción sin tierra es una tendencia futurista debido a los cambios climáticos que ocasiona pérdidas en el agro.
- Se recomienda dar mayor importancia al estudio en laboratorio de cultivo in vitro para la injertación y mejoramiento de caracteres de las plantas para optimizar una mayor producción.