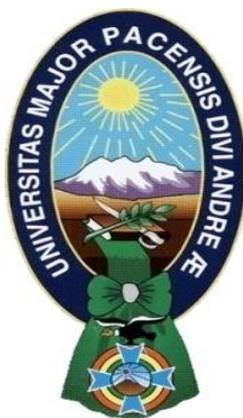


UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE AGRONOMÍA

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA



TESIS DE GRADO

EFFECTO DE LA ILUMINACIÓN CON LUCES LEDs DE DIFERENTE LONGITUD DE ONDA SOBRE DOS TIPOS DE EXPLANTE IN VITRO DE GERBERA (*Gerbera Jamesonii.L*) EN EL LABORATORIO DE FITOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

PRESENTADO POR:

FERNANDO NAHIR PEREZ CRUZ

LA PAZ – BOLIVIA

2020

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE AGRONOMÍA

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**EFFECTO DE LA ILUMINACIÓN CON LUCES LEDs DE DIFERENTE LONGITUD DE ONDA
SOBRE DOS TIPOS DE EXPLANTE IN VITRO DE GERBERA (*Gerbera Jamesonii.L*) EN
EL LABORATORIO DE FITOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA**

TESIS DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO

FERNANDO NAHIR PEREZ CRUZ

Asesor (es):

Ing. Freddy Cadena Miranda

Tribunal Examinador:

Ing. Ph.D. José Yákov Arteaga García

Ing. Ph.D. David Cruz Choque

Ing. M.Sc. Marco Antonio Echenique Quezada

Aprobado:

Presidente Tribunal Examinador:

LA PAZ - BOLIVIA
2020



Desde aquel tiempo en el que un admirable viaje comenzó, el tiempo disimulo tener un común denominador llamado días, a quienes de forma elocuente decidió hacer una epifanía, demostrándonos así, una limerencia que existía, y a pesar de mucho hoy tengo la dicha de tenerte aunque para ti esté ausente, con un destino imprevisible eh aquí mi ser inmarcesible.

Dedicado para ti...

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento:

A Dios, por permitirme tener la dicha de una vida y una familia unida.

A mis padres Gil Perez Delgado y Teresa Cruz Cruz quienes a pesar de las muchas dificultades en sus vidas, supieron enaltecer los valores que los unieron para formar una familia.

A mis queridos hermanos Patricia, Marco, Joanna que representaron el pleno ejemplo a seguir en mi profesión, a Evelyn y Valentina quienes son también mi familia.

Al Decano de la Facultad de Agronomía Ing. M.Sc. Fernando Manzaneda Delgado, al Vicedecano Ing. Ph.D. José Yakov Arteaga García, por sus enseñanzas como docentes y autoridades universitarias.

Al Ing. Freddy Cadena Miranda, por su asesoría y dirección en mi trabajo de investigación.

Al Ing. Ph.D. David Cruz Choque, por brindarme el espacio y herramientas necesarias y adecuadas para la realización de mi tesis, así también al Ing. M.Sc. Marco Antonio Echenique Quezada, quienes me brindaron sus correcciones oportunas.

Al plantel docente y administrativo, quienes a lo largo de este tiempo aportaron en mi formación académica.

Y a todas las personas quienes formaron parte de este trayecto llamado profesión, y me brindaron su amistad, apoyo, consejos, valores y sobre todo su cariño y tiempo, a todos ellos tengan la plena seguridad que siempre los llevare en mis mejores recuerdos, a las personas que hoy tengo en mis días y escogí como mi segunda familia sepan que forman parte de mi presente y que sin ustedes no podría llamarse Felicidad.

A todos ellos Dios siempre los bendiga.

SUMMARY

The present research work entitled effect of illumination with LED lights of different wavelength on two types of in vitro explant of gerbera (*gerbera jamesonii.L*), was carried out in the plant pathology laboratory of the Faculty of Agronomy; where the objectives were: to analyze the effect of light LEDs of different wavelengths; white, blue and red in the phases of: in vitro establishment in the gerbera culture (*gerbera jamesonii.L*), evaluation of the different types of gerbera explanation for introduction to in vitro conditions, establishing a disinfection protocol. The vegetative material used for the explanations was leaf and rhizome. The treatments were distributed in a completely randomized design with arrangement in divided plots, with four treatments and four repetitions, where each treatment consisted of a different wavelength and a different type of explanation. Likewise, for the establishment of a disinfection protocol, a completely randomized design was established with a factorial arrangement, with 6 treatments and 3 repetitions. The immersion time in sodium hypochlorite for the disinfection of 15 minutes was determined to have an average contamination of medium of 6.67% and an average explant survival per experimental unit of 3.17. It was also determined for the light effect that the best interaction between wavelengths and explants was the blue and red length with the sheet explainer, presenting an average of 42.75 days at the beginning of callus formation, as well as the length of red and blue wave obtained 27.50% contamination and an average survival of 3 explants per experimental unit.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación titulado efecto de la iluminación con luces LEDs de diferente longitud de onda sobre dos tipos de explante in vitro de gerbera (*gerbera jamesonii.L*), fue realizado en el laboratorio de fitopatología de la facultad de Agronomía; donde los objetivos fueron: analizar el efecto de luz LEDs de diferentes longitudes de onda; blanca, azul y roja en la fase de establecimiento a in vitro en el cultivo de gerbera (*gerbera jamesonii.L*), evaluar los distintos tipos de explante de gerbera para la introducción a condiciones in vitro, establecer un protocolo de desinfección. El material vegetativo utilizado para los explantes fueron de hoja y rizoma. Los tratamientos fueron distribuidos en un diseño completamente al azar con arreglo en parcelas divididas, con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones, cada tratamiento fue conformado por una diferente longitud de onda y tipo de explante. Así mismo para el establecimiento de un protocolo de desinfección se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial, contando el mismo con 6 tratamientos y 3 repeticiones. Se determinó que el tiempo de 15 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio, para la desinfección, presentó un promedio de contaminación de 6,67% y un promedio de sobrevivencia de explantes por unidad experimental de 3,17. Se determinó para el efecto de luz que la mejor interacción entre longitudes de onda y explantes fue la longitud azul y roja con explante de hoja presentando un promedio de 42,75 días al inicio de formación de callo, así mismo la longitud de onda roja y azul obtuvieron un 27,50 % de contaminación y una sobrevivencia media de 3 explantes por unidad experimental.

INDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN.....	9
1.1	Antecedentes	3
1.2	Planteamiento del problema.....	4
1.3	Justificación.....	4
1.3.1	Justificación económica.....	4
1.3.2	Justificación Científica	5
2	OBJETIVOS.....	6
2.1	Objetivo General	6
2.2	Objetivos Específicos	6
3	REVISIÒN BIBLIOGRÁFICA	7
3.1	Origen del cultivo de Gerbera	7
3.2	Descripción del cultivo de Gerbera	7
3.3	Clasificación Taxonómica.....	9
3.4	Importancia del Cultivo.....	9
3.5	Formas de reproducción	12
3.5.1	Propagación por semilla	12
3.5.2	Propagación vegetativa	13
3.5.3	Cultivo de Tejidos	13
3.5.3.1	La micropropagación o propagación clonal	15
3.5.3.2	Fases del cultivo de tejidos	16
3.5.3.3	Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia	16
3.5.3.4	Cultivo in vitro de callo.....	17
3.5.3.5	Multiplicación de los brotes	18
3.6	Explantos	18
3.7	Medios de Cultivo.....	20
3.7.1	Composición del medio de cultivo	22
3.7.1.1	Sales inorgánicas o minerales.....	23
3.7.1.2	Compuestos orgánicos.....	24
3.7.1.3	Reguladores de crecimiento.....	26

3.7.1.3.1 Auxinas.....	27
3.7.1.3.2 Citocininas.....	28
3.7.1.3.3 Vitaminas y aminoácidos.....	29
3.7.1.3.4 Materiales inertes de soporte	30
3.7.1.3.5 Giberelinas	31
3.8 Iluminación	32
3.8.1 Luces LED`S.....	33
3.8.2 Fotoreceptores.....	35
4 LOCALIZACIÓN	36
4.1 Ubicación Geográfica	36
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
5.1 Materiales.....	37
5.1.1 Material vegetal	37
5.1.2 Material de iluminación	38
5.1.3 Materiales y equipos de Laboratorio.....	38
5.1.4 Material de gabinete	41
5.2 Metodología	41
5.2.1 Preparación de plantas madre.....	41
5.2.2 Esterilización del material de laboratorio	42
5.2.3 Elaboración del medio de cultivo	44
5.2.4 Protocolo de desinfección de los explantes.....	45
5.2.5 Evaluación de longitud de onda y explantes de Gerbera.....	48
5.2.6 Diseño Experimental.....	49
5.2.6.1 Protocolo de desinfección	49
5.2.6.2 Evaluación de longitud de onda y explantes de Gerbera.....	51
5.2.7 Variables de Respuesta.....	54
5.2.7.1 Protocolo de desinfección	54
5.2.7.2 Evaluación longitud de onda y tipos de explantes.....	55
5.2.8 Análisis estadístico	56
6 RESULTADOS Y DISCUSION	57
6.1 Protocolo de desinfección	57

6.1.1	Contaminación de medios	57
6.1.2	Sobrevivencia de explante.....	60
6.2	Evaluación longitud de onda y tipos de explantes.....	63
6.2.1	Días al inicio de formación de callo y brote.	63
6.2.2	Contaminación de medio	66
6.2.3	Sobrevivencia de explantes.....	68
7	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	70
7.1	Conclusiones.....	70
7.2	Recomendaciones.....	72
8	BIBLIOGRAFÍA.....	74

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.Tratamientos para desinfección de explantes de <i>G. jamesonii</i> .L con hipoclorito de sodio al 0,5%.....	46
Tabla 2.Análisis de varianza (A.N.V.A.) para la variable contaminación de medios%	57
Tabla 3.Comparación múltiple de medias Duncan al 5 %, para el factor Tiempos....	58
Tabla 4.Comparación múltiple de medias Duncan al 5 %, para el factor Explantes..	58
Tabla 5.Análisis de varianza para la variable sobrevivencia de explante	61
Tabla 6.Comparación múltiple de medias, factor tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio.....	61
Tabla 7Análisis de datos, variable días al inicio de formación de callo y brote	63
Tabla 8.Comparación múltiple de medias Duncan para el factor longitudes de luz. .	64
Tabla 9.Comparación Duncan para el factor tipo de explante.....	64
Tabla 10.Prueba de efectos simples para la interacción longitudes de onda y tipos de explantes	64
Tabla 11.Análisis de varianza contaminación de medio	67
Tabla 12.Comparación múltiple de medias para Longitud de onda.....	67
Tabla 13.Análisis de varianza sobrevivencia de explantes	68
Tabla 14.Comparación múltiple de medias Duncan para longitud de onda	69
Tabla 15.Comparación de medias para tipo de explante	69

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plantas madre de Gerbera jamesonii.L	37
Figura 2. Luces LEDs en cinta	38
Figura 3. Autoclave tipo horizontal	39
Figura 4. Cámara de flujo laminar de aire	39
Figura 5. pH-metro	40
Figura 6. Lavado materiales de vidrio	43
Figura 7. Materiales envueltos en papel mache.....	43
Figura 8. Irradiación con rayos U.V. cámara de flujo laminar.....	44
Figura 9. Dispensación en medios con micro pipeta.....	45
Figura 10.Diagrama unidad experimental vasos cocteleros.....	52
Figura 11.Croquis de evaluación protocolo de desinfección	53
Figura 12.Croquis evaluación de explantes y medios	53
Figura 13. Contaminación medio de cultivo explantes de hoja.....	54
Figura 14. Contaminación medio de cultivo.	55

INDICE ANEXOS

Anexo 1. Puesto de venta plantines florales mercado villa fatima.....	79
Anexo 2 Plantas madre de Gerbera jamesonii.L	79
Anexo 3. Irradiación con U.V. materiales	80
Anexo 4. Autoclavado de materiales	80
Anexo 5. Pesaje de Sacarosa. (Preparación medio de cultivo).....	81
Anexo 6. Cámara de flujo laminar con materiales listos para la siembra.	81
Anexo 7. Siembra de explantes.....	82
Anexo 8. Medios de cultivo.....	82
Anexo 9. Análisis de varianza y pruebas de medias por variable de respuesta.....	83

1 INTRODUCCIÓN

Las flores constituyen unas de las manifestaciones más valiosas de la madre naturaleza, ellas captan y embellecen los sentidos tanto racionales como irracionales, poseen la capacidad de suavizar el carácter, purifican el aire, se convierten en sedantes para el ser humano y simbolizan la fecundidad y la renovación de la vida, valiéndose para ello de los más simples recursos: la belleza, el color y el aroma (Cuba, 2002 y González, 2003).

Dentro de todas las flores enaltece una de ellas; La gerbera, margarita africana o del Japón (*Gerbera Jamesonii.L*) es una planta de la familia compositae y fue bautizada con este nombre en homenaje al naturalista Alemán Traug Gerber, quien la descubrió en la provincia de Transval en África del sur (Blanco, 2003).

El cultivo de la Gerbera puede ser reproducida por medio de semillas pero los cultivares obtenidos pueden ser extremadamente heterocigotos, con flores de poca calidad y necesitan mucho tiempo para llegar a la etapa de floración, por lo cual dicho método de propagación es problemático y poco efectivo (Karnataka, 2008). En igual forma, los métodos de propagación a través de la división de tallos posee una data de división muy lenta (Shagufta et al., 2012).

Por tal motivo a través del uso de la biotecnología, la micropropagación ha sido ampliamente desarrollada a partir de ápices meristemáticos (Murashige et al., 1974), hojas (Jerzy y Lubomsky, 1991) y de trozos de capítulos florales (Laliberté et al., 1985). Los explantes de hojas pueden llegar a producir de entre 12 a 15 brotes por callo en el 75% de los mismos, siendo una cantidad importante de plantas producidas (Hussein et al., 2008 a; Hussein et al., 2008 b). Sin embargo, la inducción de yemas vegetativas a partir de capítulos florales con brácteas involucrales, que no destruyen a las plantas madres, es la técnica de propagación masiva de esta especie mayormente empleada en los laboratorios de propagación comerciales (Huang y Chu, 1985). Por otra parte cabe señalar que para tener éxito en la micropropagación, el ambiente deberá ser controlado destacándose entre las condiciones el tipo de luz a usar para el desarrollo de las vitroplantas.

La luz, además de ser una fuente indispensable de energía para la fotosíntesis de las plantas, es también un factor importante para su crecimiento y desarrollo (Ding et al., 2010). Las plantas son capaces de responder a la intensidad y al color de la luz (Zhang y Folta, 2012) por medio de sus fotorreceptores: fitocromos, criptocromos y fototropinas, los cuales se activan bajo longitudes de onda específicas (Liu, 2012).

El presente trabajo fue orientado a la introducción a condiciones *in vitro* de explantes de gerbera determinando el efecto que tendrá las luces LEDs de diferentes longitudes de onda; blanca, roja y azul, sobre dos tipos de explante en *Gerbera jamesonii.L.*

1.1 Antecedentes

Cochabamba es muy conocida como tierra de flores dentro de nuestro país debido a la diversidad de ornamentales producidas y que al mismo tiempo son exportadas a diferentes países de América del sur y Europa , estas son también producidas en distintos departamentos del país, entre ellos el departamento de La Paz.

La gerbera (*Gerbera jamesonii.L*) es un cultivo exótico, la misma ha ganado espacio en el mercado de las flores de corte y ornamentales, por la altura del tallo, el diámetro de flor, y por su larga duración en floreros además de la intensidad del color de sus flores que las distinguen de las demás. La gerbera es un cultivo que se vuelve complicado para su exportación ya que los métodos de producción convencional no permiten la producción de estas en grandes cantidades (Morgan, 2009).

En la actualidad las técnicas de multiplicación masiva como la micropropagación in vitro representa, una alternativa para mejorar la producción de cultivos.

La técnica de micropropagación de cultivos in vitro está siendo implementada en diferentes países de América Latina, especialmente en zonas donde la pérdida de la producción del cultivo de flores por causa de enfermedades y plagas disminuyen el rendimiento de dichos cultivos, este método es considerado como un sistema de

producción agrícola apto para la producción de plantas libres de problemas fitopatológicos logrando mejorar los rendimientos hasta un cincuenta por ciento.

1.2 Planteamiento del problema

No hace muchos años se ha estudiado la producción de cultivos de interior con la técnica de luz suplementaria, así mismo se fue descubriendo que esta técnica podría aplicarse en otro tipo de cultivos como las flores de corte y más aún en la micropropagación de plantas que nos permitan obtener la mayor eficiencia en la propagación, crecimiento y aclimatación del cultivo.

El trabajo de investigación evaluó el efecto de las luces LEDs de diferente longitud de onda sobre dos tipos de explante en el cultivo de Gerbera.

1.3 Justificación

1.3.1 Justificación económica

Nuestros agricultores consientes del crecimiento que viene manifestando el mercado de las flores cortadas, demandan cada día más de un incremento en el nivel tecnológico a utilizar en la producción de las mismas, que satisfagan las necesidades y exigencias de los consumidores (Gallegos, 2010).



Así mismo los mercados de la ciudad de La paz y El Alto se ven desabastecidos de estas flores en épocas de mayor demanda y en invierno, por lo que la producción *in vitro* de plantas en un menor tiempo y el abastecimiento de las mismas a los productores nos permitirá aumentar la producción de flores de Gerbera y así solucionar la gran demanda de flores de corte en los mercados de dichas ciudades.

1.3.2 Justificación Científica

Para lograr mayor eficiencia en los cultivares se realizaron investigaciones sobre el efecto de diferentes longitudes de onda de luz suplementaria destacándose el uso de la luz LEDs quien además de generar menor consumo de energía eléctrica hace que la respuesta fisiológica de los cultivos sea totalmente diferente dependiendo el objetivo que se quiere lograr. Muy aparte de aquello también está la necesidad de producir en menor tiempo ya que lo contrario representa un mayor costo en la producción *in vitro* de plantas, en especial de flores.

La baja producción de las mismas se debe a varios factores entre las razones que explican esta situación, están las condiciones en las que se cultiva, con falta de riego, suelos pobres en materia orgánica, variedades con bajo potencial de rendimiento, semilla de baja calidad producto del ataque de plagas y enfermedades falta de mecanización, falta de créditos y políticas de producción.

Por consiguiente es importante contar con plantas libres de virus y enfermedades, que puedan producir mejor, de esta manera mejorar las condiciones de vida del agricultor.

La técnica de cultivo de tejidos vegetales in vitro permite la eliminación de virus, acompañada de la micropropagación que permite la multiplicación masiva de plantas de esta manera incrementar los volúmenes de producción, además de producir alimentos de buena calidad la rentabilidad del sistema podría convertirse en un atractivo estimulando la participación de agricultores de la región.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la iluminación con luces LEDs de diferente longitud de onda sobre dos tipos de explante in vitro de gerbera (*Gerbera jamesonii.L*) en el laboratorio de fitopatología de la facultad de Agronomía.

2.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la iluminación con luces LEDs de diferente longitud de onda sobre dos explantes de gerbera.
- Establecer un protocolo de desinfección para explantes de *G. Jamesonii.L*



- Determinar la mejor longitud de onda sobre los explantes.
- Determinar el porcentaje de sobrevivencia de explantes y contaminación de medios.

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Origen del cultivo de Gerbera

La Gerbera es originaria de Transvaal (África del Sur); también se conoce como margarita del Transvaal. La Gerbera lleva el nombre de Traug Gerber, un médico alemán que coleccionó muchas plantas, sobre todo en la península danesa de Jutlandia (abcAgro, 2002). Las variedades de cultivo comercial proceden de hibridaciones con especies del sur de África (*Gerbera jamesonii*.L y *G. viridifolia*), donde el clima es tropical de montaña. El nombre científico viene dado por un coleccionador de plantas llamado Jameson, quien descubrió la gerbera en Transvaal (abcAgro, 2002).

3.2 Descripción del cultivo de Gerbera

La Gerbera (*Gerbera jamesonii*.L) pertenece a la familia Asteraceae. Es una planta herbácea, en roseta, cuyo cultivo puede durar varios años, aunque comercialmente

solo se mantiene por dos o tres años el sistema radicular es pivotante de origen, pero a medida que se desarrolla, se convierte en fasciculado y está compuesto por gruesas raíces (González, 2009).

Las hojas tienen forma de roseta, son alargadas de unos 40 cm y ligeramente hendidas en los bordes; del pecíolo de algunas de ellas evolucionan los brotes florales, que van a desarrollar unos vástagos o pedúnculos con una inflorescencia terminal en capítulo. El pedúnculo puede ser de distintos grosores, y su longitud depende del cultivar y de las condiciones medioambientales existentes (González, 2009).

El tallo forma una “corona” superficialmente enterrada, ramificada con rizomas breves, de crecimiento definido, simpodial. La yema apical del tallo subterráneo origina una inflorescencia y el rizoma continúa creciendo en forma dicotómica por la acción de yemas laterales. En las yemas apicales se forman tallos aéreos, muy compactos, con hojas en rosetas cuyo ápice termina en una inflorescencia. Las yemas de otras hojas del tallo también dan inflorescencias. Luego continúa la brotación de yemas laterales, de los nudos del rizoma, dando brotes similares al de la yema apical (Salomón, 1978).

La raíz presenta un sistema fasciculado compuesto por numerosas raíces gruesas de las que parten finas raicillas. De los rizomas nacen numerosas raíces adventicias. Estas son fasciculadas (dispuestas en haz o manojo) (González, 2009).

El capítulo floral está formado, desde el exterior hacia el interior, por varias filas concéntricas de flores femeninas liguladas, normalmente una fila de flores

hermafroditas no funcionales, y colocándose en el centro, las flores 4 masculinas. Las flores liguladas son de forma y espesor variables y amplia gama de colores (González, 2009).

3.3 Clasificación Taxonómica

REINO:	Plantae
SUBREINO:	Tracheobionta
DIVISIÓN:	Magnoliophyta
CLASE:	Magnoliopsida
SUBCLASE:	Asteridae
ORDEN:	Asterales
FAMILIA:	Asteraceae
SUBFAMILIA:	Mutisioideae
TRIBU:	Mutisieae
GÉNERO:	Gerbera
NOMBRE CIENTÍFICO:	Gerbera Jamesonii.L

3.4 Importancia del Cultivo

La importancia de la gerbera radica en que representa una flor ideal para bouquets por la existencia de variedades de diferentes colores. También hay que mencionar la

importancia del cultivo industrial de la gerbera en maceta en los últimos años (abcAgro, 2002).

A nivel mundial, los colores de las flores de gerbera más demandadas son: rosa (incluye tonos fucsia, 40%), rojo (20%), amarillo (10%), blanco (10%), naranja (10%) y otros. En función del tipo de inflorescencia, un 20 a 40 % de los consumidores prefiere flores dobles, 20-40% prefiere las semidobles y del 30-60% las sencillas. Respecto al color de la parte central de la inflorescencia, la demanda es del 20-30% para las flores de corazón negro y del 70-80% para las de corazón verde (abcAgro, 2002).

Para comercializar las flores se emplean paneles especiales de cartón o cálices de material plástico que impiden el roce de las lígulas entre ellas y con las cajas que los contienen. El empaquetado de la flor es delicado y se recomienda que se realice en la misma explotación para aquellas variedades sensibles al roce.

El envasado se realiza en cajas de cartón de 12 cm de altura con capacidad para 40 a 60 flores colocadas en dos paneles de cartón, con 20 a 30 flores cada uno. También se comercializa en ramos de 10 flores, protegidos con cálices de plástico (Cabrera, 2002).

Las cajas deben ser almacenadas boca abajo para evitar que los tallos se tuerzan. La temperatura óptima de almacenamiento es de 2 a 8 °C (Cabrera, 2002).

En el transporte de gerberas está el embalaje tipo "raqueta"; se trata de una construcción de cartón con agujeros, por los cuales se meten los tallos, teniendo su

similitud con la de una raqueta. En una raqueta entran siete gerberas; de esta manera las flores no se dañan. Este tipo de embalaje solo se emplea en gerberas de primera categoría, las cuales se transportan en este embalaje en agua. De este modo la calidad no se ve alterada.

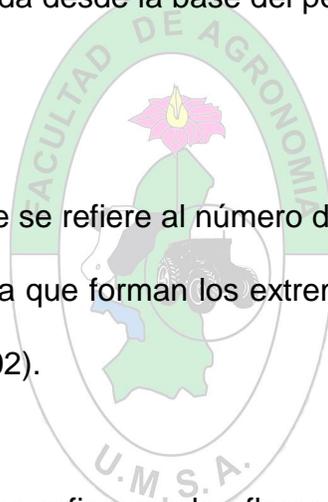
En cuanto a los parámetros de calidad que sirven para la clasificación de la flor, existen diversos criterios, aunque los más empleados son:

a) La longitud de la vara, medida desde la base del pedúnculo hasta la parte superior del capítulo (abcAgro, 2002).

b) El diámetro del capítulo, que se refiere al número de centímetros correspondientes al diámetro de la circunferencia que forman los extremos exteriores de las lígulas de la inflorescencia (abcAgro, 2002).

c) Las especificaciones, que se refieren a las flores y a los tallos que deben estar exentos de daños producidos por plagas y enfermedades que alteren su aspecto y color, manchas o quemaduras producidas por productos fitosanitarios, residuos visibles de tratamientos y magulladuras, defectos de vegetación (lígulas torcidas), etc (abcAgro, 2002).

d) La tolerancia de calidad, que expresa el porcentaje de varas que pueden presentar ligeros defectos, a condición de que la homogeneidad de la presentación no se vea afectada (abcAgro, 2002).



e) La presentación de las flores en los envases descritos anteriormente, que define las categorías extra, primera y segunda en función de la conservación de los capítulos (abcAgro, 2002).

3.5 Formas de reproducción

3.5.1 Propagación por semilla

Este método de propagación se realiza para la mejora de esta planta, pero también se emplea para la obtención de cultivares de gerbera para maceta. Mediante este método se obtiene una disminución del vigor en la autofecundación de esta especie por lo que hay que recurrir a retrocruzamientos entre individuos bastantes alejados genotípicamente para conseguir una gran cantidad de semilla y descendientes vigorosos (Cabrera, 2002).

Las condiciones climáticas son más favorables para el desarrollo del cultivo ya que las condiciones son más controladas y se cuenta con una temperatura ligeramente elevadas, de 22-24°C y una humedad relativa entre el 40 y 50%. Desde la polinización hasta la maduración de la semilla transcurren de 4 a 8 semanas, obteniéndose de 40 a 100 semillas por capítulo. El poder germinativo se reduce al 50% después de tres meses a partir de la polinización y al 5% después de seis meses (Cabrera, 2002).

3.5.2 Propagación vegetativa

Es el método más sencillo, pero comercialmente no se emplea por su baja tasa de propagación. Para ello se arranca la planta adulta de más de un año, podándose las raíces a una longitud de 10-12 cm, y seleccionando varias hojas adultas cuyos limbos se recortan dejando un tercio de ellas. Posteriormente se divide el rizoma en pequeñas porciones que contendrán raíces y parte aérea. Estas porciones se desinfectan con un caldo fungicida antes de su plantación y se colocan a continuación bajo mist-system a 25°C o bajo pequeños túneles de polietileno y se toman para el esquejado los brotes que se desarrollen cuando tienen 2 a 3 hojas, los cuales se colocan en mesas de multiplicación a 25°C y humedad relativa del 80%. Se obtienen entre 4 y 10 plantas por cada planta madre. El enraizamiento se efectúa a los 15-20 días (abcAgro, 2002).

3.5.3 Cultivo de Tejidos

Con la micropropagación se obtiene de una sola planta un gran número de plántulas anualmente, comparándolo con el bajo número de plántulas que permite obtener el método de propagación vegetativa mencionado anteriormente. Se cultivan primero en tubos de ensayo y luego en frascos o cajas de polipropileno, fragmentos de capítulos muy jóvenes o meristemas. Se obtienen plantas a los 3 o 4 meses (Arévalo, 1995).

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

los factores que afectan el crecimiento. El avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este principio general se aplica también al cultivo in vitro de plantas. Haberlandt, un científico alemán, postuló a principios del siglo pasado que las plantas eran capaces de reproducir su crecimiento a partir de células aisladas, originando la hipótesis de la totipotencia celular en plantas. Sin embargo, este investigador no pudo demostrar en forma práctica su hipótesis, debido a que la mayoría de los componentes complejos que integran los medios de cultivo actuales todavía no habían sido descubiertos. Sería recién en la década de los '50 cuando se determina la importancia del balance hormonal en las plantas, con el descubrimiento de las hormonas vegetales más usadas en la actualidad (Hurtado y Merino, 1988).

Reproducir en condiciones de laboratorio todos los factores que conforman el ambiente de la planta en la naturaleza es técnicamente muy complejo. Por esa razón se realiza una simplificación de la realidad escogiendo aquellos factores que se puedan mantener controlados. Cuando no se realiza el estudio con todo el ser vivo sino con solamente una parte del mismo, se utiliza el término explante para indicar la parte del órgano o tejido vegetal que se cultiva in vitro (Arévalo, 1995).

A la dificultad de reproducir las condiciones naturales en condiciones de laboratorio, se debe añadir en este caso la dificultad de suministrar al explante todo aquello que antes obtenía del sistema completo. En resumen, el cultivo in vitro de plantas es una

técnica que exige un control específico del ambiente, tanto físico como químico, en el que se sitúa al explante (Arévalo, 1995).

3.5.3.1 La micropropagación o propagación clonal

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo in vitro, a través de la micro propagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. El explante más usado para los procesos de propagación in vitro son las yemas vegetativas de las plantas. Los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 25 y 28°C, además de controlar la cantidad de horas de luz. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar. La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación (Arévalo, 1995).

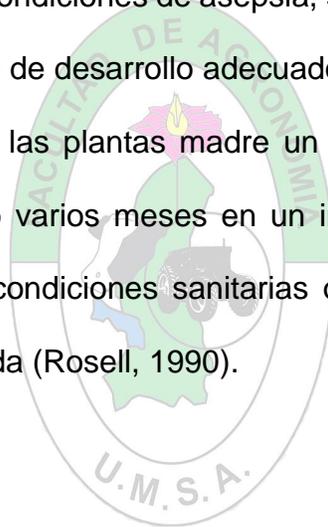
Con finalidad descriptiva se puede clasificar los principales factores no biológicos que afectaran al desarrollo del cultivo in vitro, así:

- Ambiente químico
- Composición del medio de cultivo
- pH

- Ambiente físico
- Temperatura
- Luz y fotoperiodo
- Humedad (Arévalo, 1995).

3.5.3.2 Fases del cultivo de tejidos

Para establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre un período de tiempo, que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero, en el que se va a intentar cultivar la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición de la radiación recibida (Rosell, 1990).



3.5.3.3 Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia

Una vez escogida la planta madre, se extraen los fragmentos a partir de los cuales se obtendrá los explantes. Antes de extraer los explantes se hace una desinfección de los fragmentos de la planta madre para eliminar los contaminantes externos. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia. Ya en condiciones de asepsia se extraen los explantes del material vegetal y se colocan en

cultivo dentro de un medio de iniciación dentro de un tubo de cultivo, para poder controlar la sanidad y la viabilidad de los explantes (Rosell, 1990).

3.5.3.4 Cultivo in vitro de callo

Se parte de un trozo de hoja o de tallo; bien de una planta madre de maceta o de una planta que viene de cultivo in vitro. El medio puede ser sólido o líquido. Se forma entonces una estructura de callo, de la que parten brotes, o también por embriones, que al unirse forman una estructura similar al embrión las células vegetales que se desarrollan en condiciones asépticas sobre medios de cultivo adicionados con hormonas vegetales, pueden dividirse dando como respuesta una dediferenciación celular acompañada por un crecimiento tumoral que da lugar a células indiferenciadas denominadas callo (Rosell, 1990).

Un callo consiste en una masa amorfa surgida de la proliferación de células del parénquima frecuentemente como resultado de una herida en el corte de un tallo o raíz. Los callos no tienen patrones predecibles de organización, están presentes en centros localizados de actividad meristemática. Una de las características importantes de este, desde un punto de vista funcional, es su irregular crecimiento, teniendo el potencial para desarrollar raíces normales, brotes y embriones que formarán plántulas (Billard, 1995).

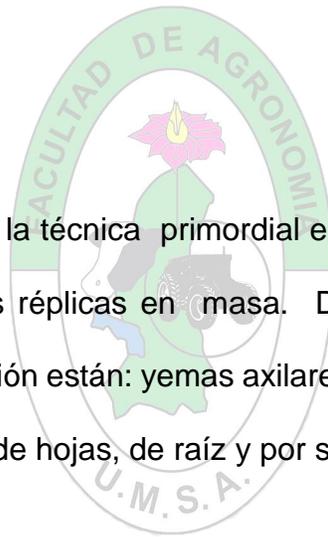
3.5.3.5 Multiplicación de los brotes

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron de la fase I originen brotes con varios entrenudos. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo. Esto se realiza en las camas de flujo laminar (Rosell, 1990).

3.6 Explantes

La utilización de explantes es la técnica primordial en la micropropagación ya que a raíz de éstos se producen las réplicas en masa. Dentro de los explantes que se utilizan para la micro propagación están: yemas axilares, ápices meristemáticos, micro esquejes, meristemas, partes de hojas, de raíz y por semilla (Arévalo, 1995).

Según (Roca y Mroginski, 1991), en los años 60, el desarrollo de procedimientos para multiplicar y mantener plantas en cultivos asépticos, recibió un impulso dramático; ello se debió al descubrimiento de la capacidad que tienen las puntas de los brotes y los meristemas de la orquídea *Cymbidium* sp.



Desde entonces se han usado los cultivos de puntas de brotes y de meristemos de muchas otras plantas para obtener, mantener y multiplicar los materiales genéticos; de un explante, que en algunos casos se puede regenerar una planta y en otros casos se puede estimular la formación de brotes múltiples (Styer y Chin, 1983).

Según (Roca y Mroginski, 1991), se puede definir como un explante una porción separada de un vegetal, esta porción puede ser muy pequeña (5 – 10 mm), abarcando una porción de tejido u órgano. Cualquier explante que contenga células nucleadas vivas, se puede emplear potencialmente para la obtención directa de plantas o para la obtención indirecta de grupos celulares amorfos. Puede ser tejido vivo de hoja, raíz, tallo, flores e inclusive semillas o granos de polen.

El tipo de explante se seleccionará por razones prácticas como: disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad, baja contaminación con microorganismos y rápida respuesta al cultivo in vitro; es probable que en estos casos se opte por explantes provenientes de plantas jóvenes que crecen en el campo. Algunos estudios demuestran que los tejidos más jóvenes se desdiferencian más rápido y producen mejores resultados en menor tiempo, que tejidos más viejos (Roca y Mroginski, 1991).

En relación con la especie vegetal utilizada, es importante tener en cuenta la variabilidad asociada con el genotipo de las plantas. Es muy frecuente que en

condiciones idénticas de medio de cultivo y ambiente, las respuestas in vitro de un determinado explante de una especie dependen del cultivar empleado.

Las respuestas de los explantes cultivados in vitro pueden variar notablemente, con el estado de desarrollo y edad ontogénica de los mismos. Se debe tener en cuenta la incidencia de otros factores que a menudo pueden afectar las respuestas de los explantes cultivados; como son; la época del año en que se realizan los cultivos, las condiciones de crecimiento de las plantas donantes y los pre tratamientos que se realizan a los explantes (Kuan y Ospina, 1990).

A partir de cualquiera de estos tratamientos, se pueden obtener una planta completa debido a la totipotencia de las células vegetales. Es decir a la capacidad de diferenciarse y retornar a un estado embriogénico que le permite formar un individuo nuevo. En el caso de los ápices y yemas, estos no se des diferencian, solo se les estimula para que se desarrollen y formen una planta completa (Kuan y Ospina, 1990).

3.7 Medios de Cultivo

Una vez definido el objetivo perseguido con el cultivo in vitro de un determinado explante, es necesario elegir un medio apropiado de cultivo, en el cual hay que considerar no sólo sus componentes sino también su preparación, pH, tipo de agua e

inocuidad. Actualmente existen innumerables formulaciones, cada una de las cuales contienen entre 15 y 32 compuestos químicos que suministran: carbono, nutrientes, minerales, vitaminas, sustancias reguladoras del crecimiento, compuestos orgánicos naturales y agentes gelificantes. Todos ellos en las dosis adecuadas proveen al explante de todos los requerimientos para crecer y desarrollarse adecuadamente (Aguirre, 2003).

Los medios están constituidos en su mayor parte por agua, por tanto es recomendable utilizar agua destilada para su intercambio catiónico ya que el agua natural puede incluir microorganismos que dañen el desarrollo del cultivo de tejidos. Para el desarrollo de la planta se necesitan componentes químicos o inorgánicos dentro de los que se pueden mencionar se encuentran: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro y micro elementos teniendo cada uno de ellos una función específica (Usui, 1996).

Por otro lado también un medio contiene componentes orgánicos como vitaminas, mioinositol y aminoácidos. En conjunto con componentes naturales que dentro de ellos se encuentran caseína hidrolizada, agua de coco y extracto de malta. Por último un medio contiene fitohormonas que pueden ser utilizadas como reguladores de crecimiento tomando en cuenta su proporción y cantidad (Usui, 1996).

Los medios de cultivo deben ser preparados con sumo cuidado, ya que los diversos productos que lo conforman intervienen en cantidades pequeñas. Un adecuado medio de cultivo debe tener sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, aminoácidos y otros elementos inorgánicos los que varían ampliamente respecto a su composición y concentración. Los ingredientes del medio de cultivo se pueden clasificar en: Sales inorgánicas, Compuestos orgánicos, Complejos naturales y Materiales inertes de soporte. (Murillo, 2014).

3.7.1 Composición del medio de cultivo

El medio de cultivo más utilizado para la multiplicación de explantes sencillo, se denomina MS dado que fue desarrollado por (Murashige y Skoog en 1962). Una vez establecido el explante, ápices inician rápidamente la brotación y en dos a cuatro semanas se obtiene una planta in vitro con seis o siete nudos. Las plántulas in vitro son seccionadas en micro estacas con una o dos yemas para ser transferidas nuevamente a recipientes con medio de cultivo MS estéril y así sucesivamente para incrementar la cantidad de plantas in vitro hasta obtener un total preestablecido (Escalan, 2002).

3.7.1.1 Sales inorgánicas o minerales

(Barba, 2001), indica que se dividen en macro y micronutrientes, esta división se basa en la cantidad que absorben las plantas ciertos elementos: calcio, magnesio, potasio, nitrógeno, fósforo y azufre son requeridos por la planta en grandes cantidades (g/l) y se les llama macronutrientes. Otros como el hierro, manganeso, boro, cobre, zinc, 18 molibdeno y cloro, se requieren en pequeñas cantidades en pequeñas cantidades (mg/l o ppm) y se llaman elementos traza o micronutriente.

Los nutrientes inorgánicos utilizados en el cultivo in vitro son los mismos requeridos normalmente por las plantas, unos son requeridos en mayores concentraciones conocidos como macronutrientes y el otro grupo son los micronutrientes aquellos requeridos en concentraciones más bajas. (Espinoza, 2013).

Para un rápido y vigoroso crecimiento, las plantas necesitan tomar del medio de cultivo cantidades relativamente grandes de algunos iones inorgánicos llamados macronutrientes y cantidades pequeñas o trazas de otros llamados micronutrientes. (Murillo, 2014).

Los macronutrientes son indispensables para el crecimiento de la planta y están constituidos por seis principales elementos: N, P, Ca, K, Mg, y S; también es

considerado dentro de este grupo iones de Cl. Los micronutrientes generalmente se usan como sales de Na, I, Fe, Mn, Zn, B, Cu, Mo, y Co. Se ha llevado a cabo muchas investigaciones con el fin de optimizar las necesidades de plantas específicas, lo cual ha traído como consecuencia la formulación de varias muestras salinas. (Murillo, 2014).

La fórmula de Murashige y Skoog (1962), es la que se utiliza con mayor frecuencia, pues ha demostrado que es medio adecuado para una gran variedad de especies así como para diferentes partes de una planta. (Murillo, 2014).

3.7.1.2 Compuestos orgánicos

Según (Hurtado y Merino, 1997), se clasifica en tres grupos: carbohidratos, sustancias hormonales y vitaminas. Frecuentemente se han obtenido buenos resultados cuando se emplean también ciertos aminoácidos y/o amidas, algunas purinas, pirimidinas, hexitoles y ácidos orgánicos. Los compuestos orgánicos se clasifican en cuatro grupos importantes: Carbohidratos o fuentes de energía, Sustancias hormonales, Vitaminas, Aminoácidos amidas. (Espinoza, 2013).

Podemos clasificarlos en tres grupos: a) Fuentes de carbono, b) hormonas, vitaminas, c) aminoácidos y ácidos orgánicos. (Murillo, 2014). (Hurtado y merino, 1997), indica

que la sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente usada, y se emplea a una concentración de 2 a 3 por ciento; sin embargo en ciertas especies se emplean concentraciones muy elevadas (5 a 12 por ciento). Ocasionalmente se emplea la glucosa en cultivo de monocotiledóneas, así como la fructosa y el almidón para otras especies.

(Mendoza, 2007), indica que intervienen en el crecimiento, metabolismo y estructura de los vegetales. El compuesto más usados como fuente de energía es la sacarosa considerado esencial en los medios de cultivo, se puede usar también otros carbohidratos como la glucosa, fructosa, lactosa, maltosa, galactosa, sorbitol y el azúcar común, es recomendable usar azúcar morena porque mientras menos procesada sea el carbohidrato menos contaminación existe en los medios de cultivo. (Espinoza, 2013).

La sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente utilizada y se emplea a una concentración de 2-4 por ciento. Ocasionalmente se utilizan otros carbohidratos como la glucosa en cultivos de monocotiledóneas, así como la fructosa, almidón, lactosa, maltosa, sorbitol, manitol y galactosa en otras especies; pero esos compuestos son inferiores a la sacarosa como fuente de carbono. La sacarosa puede ser sustituida por azúcar refinada que también genera óptimos resultados. (Murillo, 2014).

3.7.1.3 Reguladores de crecimiento

(Hurtado y Merino, 1997), coinciden en que los reguladores de crecimiento son un conjunto de sustancias químicas y orgánicas distinto de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas.

(Pierik, 1990), en el cultivo in vitro de las plantas superiores, los reguladores especialmente las auxinas y citocininas juegan un papel muy importante, se puede decir que el cultivo in vitro es generalmente imposible sin reguladores. De acuerdo con (Hurtado y Merino, 1997), actualmente los reguladores de crecimiento están bien agrupadas y divididas en: promotores de crecimiento (auxinas, citocininas y giberelinas), inhibidores de Crecimiento (ácido abcísico) y etileno.

Las auxinas y las citocininas son las fitohormonas que tienen esencial importancia en el cultivo de tejidos y células de las plantas, sin embargo son consideradas también reguladores de crecimiento las giberelinas y el ácido abcísico. (Espinoza, 2013).

Se utilizan propiamente cuatro grupos de reguladores de crecimiento; Auxina, citocininas, giberelinas y ácido abcísico. En algunos casos se utiliza el etileno. (Murillo, 2014).

3.7.1.3.1 Auxinas

Espinoza (2013), indica que las auxinas ayudan a la elongación de las células, entre ellas tenemos la auxina natural AIA (ácido indolacético) y las auxinas artificiales ANA (ácido naftalenacético), IBA (ácido indolbutírico), PCPA (ácido p-clorofenoxiacético), 2,4-D (Diclofenoxiacético) siendo esta la más importante y mundialmente usado en los medios de cultivo para células y tejidos con finalidad de obtener callos porque ocasiona un crecimiento desorganizado en las células y el más débil es el AIA por que fácilmente es inactivado por la luz, los tejidos con alta actividad y es considerado un compuesto termolábil porque reacciona con temperaturas altas.

Las auxinas también son requeridas para el crecimiento de los nuevos brotes, los ápices vegetativos constituyen zonas activas de biosíntesis de estas. Las yemas y meristemas de tamaños menores a 0.4 mm no producen o retienen suficiente auxinas endógenas, lo que hace necesario la aplicación de auxina exógena a los medios del cultivo. (Espinoza, 2013).

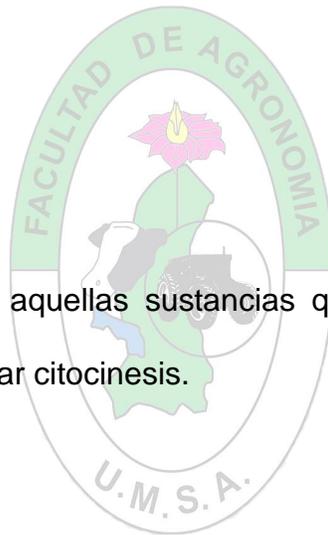
(Murillo, 2014) indica que las auxinas se sintetizan en ápices de tallos jóvenes, por lo tanto tienen efecto en la dominancia apical y formación de órganos. Tienen 21 movimiento basipétalo (descendente), estimula la división celular tanto en yemas

existentes como en la emergencia de yemas adventicias. Promueve el enraizamiento, tiene efecto en la síntesis de enzimas del ARN, de proteínas y en la permeabilidad celular. La actividad de las auxinas en el medio es degradada por las bacterias.

La concentración de las auxinas utilizadas varía desde 0.1-10 mg/l, siendo el rango más empleado el comprendido entre 0.25-3 mg/l. la actividad auxínica en células cultivadas se considera de la siguiente manera: 2,4-D>ANA>AIB>AIA. (Murillo, 2014).

3.7.1.3.2 Citocininas

Son consideradas citocininas aquellas sustancias químicas que pueden estimular principalmente la división celular citocinesis.



(Espinoza, 2013). Casi todas las citocininas son sintéticas y derivadas de la adenina dentro de este grupo se encuentran las kinetina (6-furfuril amino-purina), BAP (6 benzil aminopurina), 2ip (6 dimetil alil purina) y la zeatina (6(hidroxi. 3 metil, 2 bunetil) adenina, esta última es considerada citocinina natural porque es extraída del endospermo del maíz. La citocininas realizan su efecto incrementando la división celular, dicha acción está relacionado con la presencia de auxinas. (Espinoza, 2013).

En la planta, las raíces son el principal centro para la biosíntesis y son traslocadas hacia los brotes y hojas (movimiento acropétalo o ascendente). Son muy importantes porque pueden estimular principalmente la división celular o citocinesis. Son derivados de la adenina y dentro de este grupo están: BAP, 2Ip, Kinetina, Zeatina. (Murillo, 2014).

Las posibles respuestas al tratamiento con citocininas son: División celular, inducción a la formación de tallos y proliferación de yemas axilares, inhibición de la formación de raíces. (Murillo, 2014).

3.7.1.3.3 Vitaminas y aminoácidos

Las vitaminas son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades, las vitaminas más usadas son: la vitamina B1, es la vitamina más usada por ser esencial en los medios de cultivo para la micropropagación de plantas, se añade como Tiamina HCl en cantidades que varían de 0.1 a 30 mg/l. (Espinoza, 2013).

Son esenciales para ciertas funciones catalíticas en el metabolismo celular mejorando el crecimiento celular y son requeridas en pequeñas cantidades. (Murillo, 2014).



(López, 1990), ningún aminoácido es esencial para el crecimiento de tejidos in vitro, los aminoácidos proporcionan una fuente inmediata de nitrógeno al tejido y su asimilación puede ser más rápida que el nitrógeno inorgánico proporcionado por el medio.

Los aminoácidos y amidas son empleados en los medios de cultivo como fuentes de nitrógeno orgánico, pero muchas veces no es necesario porque el medio de cultivo contiene otros elementos de Nitrógeno, resulta beneficiosa su inclusión para favorecer el desarrollo de las vitroplantas. (Espinoza, 2013).

3.7.1.3.4 Materiales inertes de soporte

Desde hace mucho tiempo atrás, los medios de cultivo han sido gelificados con agar, un compuesto extraído de algas marinas del género *Gelidium*. El agar se ha convertido en el material de soporte más ampliamente usado, pues provee al medio un excelente gel húmedo que sirve como explante. Sin embargo fisiológicamente no es inerte puesto que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulantes del crecimiento, la concentración de dichas sustancias está determinada generalmente por la calidad del agar, este añadido al medio de concentraciones de 6 a 9 g/l para medios sólidos y 2 a 4 g/l para medios semisólidos. (Espinoza, 2013).



El agar es el material de soporte más ampliamente utilizado, pues provee al medio de un excelente gel húmedo que sirve como soporte al inóculo, se derrite al calentarlo y se enfría a temperatura ambiente. Fisiológicamente no es inerte puesto que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulantes del crecimiento. (Murillo, 2014).

3.7.1.3.5 Giberelinas

Otro regulador de crecimiento es el Ácido Giberélico (GB_3), aunque no tiene un uso tan amplio pero si es esencial en el cultivo de meristemas en algunas especies de plantas como la micropropagación con medios líquidos de vitroplantas de papa, banano, piña y totora. (Espinoza, 2013).

Este compuesto es recomendado para la regeneración de las plantas. Su principal acción del Ácido Giberélico es ayudar a la elongación de las vitroplantas y reprime la formación de brotes de cualquier clase de tejido organizado. (Espinoza, 2013).

En la planta son sintetizadas en puntos de crecimiento como embriones, meristemas o tejidos en desarrollo. En la naturaleza existen muchas y se las denomina Giberelinas. Muchas se han sintetizado, pero solo dos o tres se encuentran disponibles en el mercado. El Ácido Giberélico (AG_3), es el más frecuente empleado en el cultivo in vitro.

Tienen efectos similares a las auxinas, pero su distribución no es polar como las de estas, además trabajan en los puntos donde las auxinas son inefectivas o inhibidas y viceversa. (Murillo, 2014).

División y elongación celular, crecimiento de longitud de la raíz principal e inhibición de la ramificación radical y promueve germinación de semillas. (INTAGRI, 2017).

La adición de 1,0 mg/L. de ácido giberélico en el medio de cultivo, constituye una formulación hormonal adecuada para inducir el proceso de organogénesis indirecta. (Jiménez, 2009).

Las giberelinas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en las puntas de las raíces, en los frutos, tejidos jóvenes y semillas en desarrollo. Esta 24 hormona induce el crecimiento del tallo, regulación de la transición entre la fase juvenil y el adulto, inducción a la floración y la determinación sexual de la flor, inducción de la germinación además de promover la elongación internodal. (Sandoval, 2001).

3.8 Iluminación

La fuente de luz tradicional usada en cultivo in vitro es de lámparas tubulares fluorescentes (LTFs) (Lin et al., 2011) que emiten un espectro amplio, por lo cual los

efectos fisiológicos en los vegetales son poco específicos (Da Rocha et al., 2010). Su uso en un laboratorio de cultivo de tejidos representa 65 % del costo total de electricidad (Jao y Fang, 2004) y provee las longitudes de onda innecesarias para las plantas. Por lo tanto, se debe buscar fuentes alternativas de energía y formas más eficientes de iluminar los cultivos (Loberant y Altman, 2010).

3.8.1 Luces LEDs

Los diodos emisores de luz (LEDs) tienen un potencial alto para usarse como fuente de luz en la micropropagación (Loberant y Altman, 2010). Sus ventajas son la conversión eficiente de energía, su volumen pequeño, una vida más larga, la emisión de radiación de longitudes de onda específicas, que permiten eficientizar la fotosíntesis (Araujo et al., 2009) y ajustar la intensidad/calidad de luz; además, sus emisiones térmicas y sus costos de mantenimiento son bajos y protegen el ambiente al disminuir las emisiones de CO₂ (Lee et al., 2010).

En la micropropagación, la luz LEDs roja y azul, solas o combinadas, tienen una influencia significativa sobre el desarrollo de las plantas (Dutta y Jatothu, 2013).

La luz LED roja se asocia con el crecimiento de las plantas (alargamiento de entrenudos), como se observó en *Oncidium* (Mengxi et al., 2011) y con la baja

concentración de pigmentos fotosintéticos probada en *Dendrobium officinale* (Lin et al., 2011). Pero hay poca información acerca del efecto de la luz azul sobre la fisiología de plantas superiores; con frecuencia se le relaciona con el crecimiento vigoroso, la diferenciación y los contenidos altos de clorofila y carotenoides en plantas in vitro (Lin et al., 2011; Mengxi et al., 2011).

La luz LED roja aumenta la biomasa húmeda y seca de raíces de plántulas de *Paphiopedilum* en comparación con la luz blanca fluorescente y la azul (Lee et al., 2011), y aumenta el peso fresco y seco de brotes en *Dendrobium officinale* (Lin et al., 2011). Mientras que la combinación con luz azul aumentó la acumulación de biomasa en PLBS de *Oncidium* (Mengxi et al., 2011).

Esto indica que la respuesta de las plantas a la calidad de luz LED cambia entre especies y su etapa de desarrollo, y se necesita estudiar su efecto en cada especie para lograr determinados propósitos: promover o inhibir brotes, raíces, bulbos y controlar floración (Kim et al., 2004; Poudel et al., 2008).

Con base en estas investigaciones, se plantea que es posible sustituir la luz fluorescente por luz LED durante la micropropagación de *O. tigrinum* y *L. autumnalis*; además, las respuestas morfogénicas de las plantas a la calidad de la luz, se pueden usar para el control del desarrollo de los tejidos in vitro.

3.8.2 Fotoreceptores.

Según (Bergareche y Moyseet, 1993), tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, los fitocromos son más abundantes en tejidos jóvenes. Los reguladores de crecimiento son hormonas que intervienen en pequeñas cantidades (Koolman, 2004) y los fotorreceptores moléculas o complejos de molécula, que al activarse por fotones de determinadas longitudes de onda, traducen señales provocando la capacidad del organismo a responder a estímulos lumínicos (Meisel y Pinto, 2011).

La germinación, así como el desarrollo y la floración de la planta, están regulados por tres fotorreceptores que perciben longitudes de onda diferentes, fitocromo, criptocromo y fotorreceptores en ultravioleta-B. El primero, es un fotorreceptor que mide los efectos de la luz roja e infrarroja, para esto, absorbe primariamente en el espectro lumínico rojo de 600 a 800 nm (forma Pr), siendo convertido para absorber en la longitud del rojo lejano entre 700-1000 nm (forma Pfr), esta interconversión depende de la proporción de luz roja respecto a la roja lejana. Diversos estudios mostraron que la radiación roja promueve la germinación, además de la fotomorfogénesis (replicación de plastidios y síntesis de clorofila y antocianos), formación de primordios foliares y florales y el crecimiento. Existen dos tipos de fitocromos, tipo I: predominante en plantas etioladas y tipo II: más estable a la luz y abundante en todas las plantas verdes (Jorge, 2006; Meisel y Pinto, 2011), esta presencia indica que las longitudes de onda

entregan información importante que ayuda a la planta en su adaptación al entorno (Jorge, 2006).

El criptocromo absorbe principalmente en la longitud de onda del azul y ultravioleta- A, donde se han identificado dos tipos (CRYI y CRYII). La luz azul se relaciona con la morfogénesis de la planta y diferenciación de órganos, en su presencia se inhibe la elongación del tallo, participa de la síntesis y acumulación de clorofila y regula la apertura del estomato y el crecimiento celular, lo cual permite crecer en función o dirección de la fuente luz (fototropismo) (Meisel y Pinto, 2011).

Los fotorreceptores en ultravioleta-B, se relacionan a respuestas fotométricas que modifican la composición química, la competencia fotosintética, morfogénesis y defensa (Jenkins, 2014).



4 LOCALIZACIÓN

4.1 Ubicación Geográfica

La presente investigación se realizó en ambientes del Laboratorio de fitopatología, de la Facultad de Agronomía dependiente de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), ubicado a una altura aproximada de 3650 msnm, geográficamente situada

entre los paralelos 16°30'00" latitud Sur, y 68°08'00" Longitud Oeste del Meridiano de Greenwich.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Material vegetal

Se utilizaron dos tipos de explantes de gerbera, extraídos de la hoja y el rizoma de treinta plantas madres de gerbera (fig.1), así mismo estas plantas fueron adquiridas del mercado de la zona de villa Fátima, entre las calles Puente Villa y Ocobaya, las mismas que son de procedencia yungueña.



Figura 1. Plantas madre de gerbera jamesonii.L

5.1.2 Material de iluminación

Para el trabajo de investigación se utilizó luces LEDs de diferente longitud de onda: azul, rojo y blanco los mismos que fueron en forma de cinta (fig.2), adquiridos de una tienda de artefactos luminosos.



Figura 2. Luces LEDs en cinta

5.1.3 Materiales y equipos de Laboratorio

- a) Equipos de laboratorio: Autoclave tipo horizontal (fig.3), (vapor bajo presión), balanzas (Analítica y precisión), cámara de flujo laminar de aire (fig.4), cámara

de crecimiento, horno microondas, pH-metro (fig.5), agitador magnético, refrigerador, termómetros de máximas y mínimas, destilador de agua.



Figura 3. Autoclave tipo horizontal



Figura 4. Cámara de flujo laminar de aire



Figura 5. pH-metro

- b) Materiales de vidrio: Pipetas graduadas (10,25 ml), probetas (250 ml), vasitos de vidrio cocteleros (40x80mm), placas petrí, vaso de precipitación (1000 ml), varilla de vidrio.
- c) Instrumental de disección e implementos de laboratorio: Hojas de bisturí (N°20), mangos para bisturí, pinzas largas, tijeras, mechero de alcohol, bandeja de metal, papel aluminio, papel toalla, plastifilm.
- d) Indumentaria y materiales de asepsia: Guardapolvos, barbijos, detergente, jabón desinfectante antibacterial, algodón, guantes de látex desechables, gorro quirúrgico, cubrezapatos desechable.

5.1.4 Material de gabinete

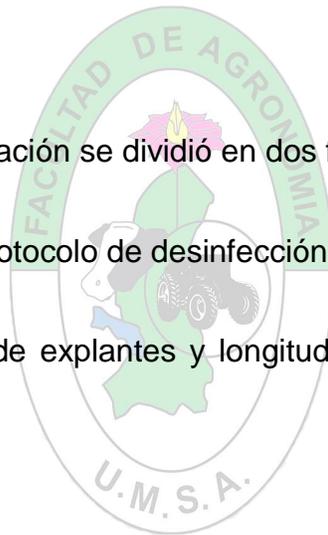
Cuadernos	cámara fotográfica	impresora
Bolígrafos	computadora	paquete de hojas carta

5.2 Metodología

El presente trabajo de investigación se dividió en dos fases siendo las siguientes:

Fase 1: Establecimiento del protocolo de desinfección.

Fase 2: Evaluación de tipos de explantes y longitud de onda de luz (investigación propiamente dicha).



5.2.1 Preparación de plantas madre

Antes de iniciar el experimento fue necesario aislar las 30 plantas que fueron utilizadas durante el estudio, estas tuvieron un proceso de 15 días de aclimatación, en dicho tiempo se realizó la suplementación de riego cada tres días, lo que permitió que se les hicieran aplicaciones de fungicidas y bactericidas cada 7 días, previo a la extracción de tejido foliar.

5.2.2 Esterilización del material de laboratorio

a) Equipos de laboratorio: todos los equipos de laboratorio fueron desinfectados en dos fases:

- Fase 1: se realizó la limpieza de todo el laboratorio en general con detergente líquido realizando un primer enjuague con agua de grifo, posteriormente se limpió con lavandina líquida y alcohol.
- Fase 2: equipos como ser autoclave, balanzas, cámara de flujo laminar de aire, cámara de crecimiento, horno microondas, pH-metro, agitador magnético, fueron desinfectados con una solución de lavandina al 3% y alcohol al 70%.

b) Materiales de vidrio: todos los materiales de vidrio fueron desinfectados de la siguiente manera:

- Se dispuso una olla con agua y detergente todos los materiales a hervir.
- Retirados los mismos, se dejaron enfriar en recipientes de plástico para posteriormente ser lavados con una solución de lavandina al 3% y alcohol al 70% (fig.6).

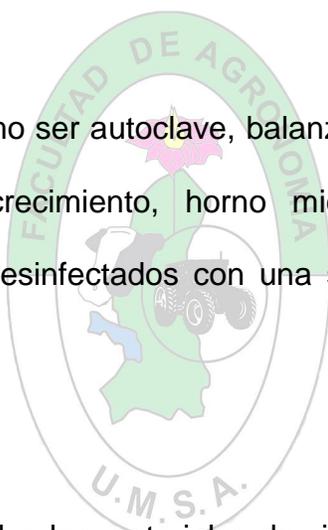




Figura 6. Lavado materiales de vidrio

- Se dejaron secar por 24 horas en el área limpia de laboratorio.
- Una vez secos todos los materiales se envolvieron en papel mache (fig.7) y se colocaron dentro del autoclave. Se esterilizó por 20 minutos a 121°C y 1 atmósfera de presión.



Figura 7. Materiales envueltos en papel mache

- c) Instrumental de disección: los instrumentos de disección fueron envueltos en papel mache para ser autoclavados en conjunto con los materiales de vidrio.

d) Indumentaria: La indumentaria anteriormente mencionada se esterilizó de manera paulatina con rayos U.V. (fig.9)



Figura 8. Irradiación con rayos U.V. cámara de flujo laminar.

5.2.3 Elaboración del medio de cultivo

Tanto para establecer el protocolo de desinfección como para la evaluación de los explantes y longitudes de onda de luz, se elaboró el medio de cultivo MS (Murashige & Skoog) al que se agregaron reguladores de crecimiento, para los explantes de rizoma el medio fue compuesto por 4,33 g/L MS + 1 mg/L de AG₃ (ácido giberélico) , para los explantes de hoja el medio estuvo compuesto por 4.33 g/L MS+

2,5 ml/L de 2,4D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético); el medio se dispensó en frascos de vidrio cocteleros (fig.8), a los cuales se les vertió 3 ml de medio, sellándolos con parafilm para luego autoclavar (20 minutos a 121°C y 1 Atmósfera de presión). A todos los medios se les ajustó el pH a 5.7.



Figura 9. Dispensación de medios con micro pipeta.

5.2.4 Protocolo de desinfección de los explantes

Los tratamientos que se utilizaron para establecer el protocolo de desinfección de explantes de *G. jamesonii*.L a cultivo in vitro se detallan en el cuadro 1

Tabla 1. Tratamientos para desinfección de explantes de *G. jamesonii*.L con hipoclorito de sodio al 0,5%

TRATAMIENTO	DESCRIPCION
T1	5 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio al 0,5%, explante del ápice de la hoja
T2	5 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio al 0,5%, explante del rizoma
T3	10 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio al 0,5%, explante del ápice de la hoja
T4	10 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio al 0,5%, explante del rizoma
T5	15 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio al 0,5%, explante del ápice de la hoja
T6	15 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio al 0,5%, explante del rizoma

Para la totalidad de tratamientos se realizó la desinfección exterior de la siguiente forma: Sumergir el material (explante de hoja y rizoma) durante 5 minutos en una solución de agua estéril, lavar 3 veces c/u agitar por 3 min y reposar.

Tratamiento 1 y 2: Protocolo de desinfección para el tiempo de inmersión de 5 minutos
(explante de hoja, rizoma)

En el laboratorio (dentro de la cámara de flujo laminar):

- Sumergir el material vegetal en cloro al 0,5% durante 2 minutos
- Lavar el material con agua estéril 2 veces (3 minutos c/u)
- Sumergir el material en cloro al 0,5% durante 2 minutos
- Lavar el material con agua estéril 2 veces (3 minutos c/u)
- Sumergir el material en cloro al 0,5% durante 1 minutos
- Lavar el material con agua estéril 2 veces (3 minutos c/u)
- Sumergir el material vegetal en alcohol al 70% durante 30 segundos
- Lavar el material con agua estéril 3 veces (3 minutos c/u)
- Dejar reposando en agua estéril mientras se siembra.

Tratamiento 3 y 4: Protocolo de desinfección para el tiempo de inmersión de 10 minutos

En el laboratorio (dentro de la cámara de flujo laminar):

- Sumergir el material vegetal en cloro al 0,5% durante 4 minutos
- Lavar el material con agua estéril 2 veces (3 minutos c/u)
- Sumergir el material en cloro al 0,5% durante 4 minutos
- Lavar el material con agua estéril 2 veces (3 minutos c/u)
- Sumergir el material en cloro al 0,5% durante 2 minutos
- Lavar el material con agua estéril 2 veces (3 minutos c/u)

- Sumergir el material vegetal en alcohol al 70% durante 30 segundos
- Lavar el material con agua estéril 3 veces (3 minutos c/u)
- Dejar reposando en agua estéril mientras se siembra.

Tratamiento 5 y 6: Protocolo de desinfección para el tiempo de inmersión de 15 minutos

En el laboratorio (dentro de la cámara de flujo laminar):

- Sumergir el material vegetal en cloro al 0,5% durante 5 minutos
- Lavar el material con agua estéril 2 veces (3 minutos c/u)
- Sumergir el material en cloro al 0,5% durante 5 minutos
- Lavar el material con agua estéril 2 veces (3 minutos c/u)
- Sumergir el material en cloro al 0,5% durante 5 minutos
- Lavar el material con agua estéril 2 veces (3 minutos c/u)
- Sumergir el material vegetal en alcohol al 70% durante 30 segundos
- Lavar el material con agua estéril 3 veces (3 minutos c/u)
- Dejar reposando en agua estéril mientras se siembra

5.2.5 Evaluación de longitud de onda y explantes de Gerbera

Los factores estudiados en esta fase fueron el tipo de explante y longitud de onda de luz (investigación principal), la luz en la cámara de crecimiento en uno de sus niveles fue cambiada a luces de cinta led con longitudes de onda color Azul y rojo, además se

procedió a su medición con luxómetro y calibración, la onda de luz blanca fue de tubo fluorescente comúnmente utilizado en cámaras de crecimiento.

Una vez establecido el protocolo de desinfección con un tiempo de inmersión de 15 minutos se procedió a esterilizar el material de vidrio y preparar el medio de cultivo para sembrar los explantes y evaluarlos en la cámara de crecimiento, dicha área tenía condiciones controladas donde la temperatura oscilaba entre 18 – 23 °C para evitar la evaporación del medio y muerte de los explantes, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y una intensidad lumínica de 3,500 lux en ambos tipos de longitud para el desarrollo de los explantes.

5.2.6 Diseño Experimental

El presente estudio de investigación en sus dos fases utilizó el método cuantitativo (Hernández Sampieri et al., 2014).



5.2.6.1 Protocolo de desinfección

Para el mismo se empleó el tipo de investigación experimental cuantitativa bajo un diseño completamente aleatorio (DCA) con un arreglo bifactorial (Arteaga, 2016), aplicable a variables cuantitativas con distribución normal:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha*\beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dónde: Y_{ijk} = Cualquier observación.

μ = Media general.

α_i = Es el efecto fijo debido al i-ésimo tiempo de inmersión (i= 5,10,15 minutos).

β_j = Es el efecto fijo debido al j-ésimo tipo de explante (j =ápice de la hoja, del rizoma).

$\alpha*\beta_{ij}$ = efecto de la interacción tiempos de inmersión (i) por explante(j).

ϵ_{ijk} = Error experimental.

Esta fase de investigación tuvo 6 tratamientos con 3 repeticiones, 18 unidades experimentales y cada unidad con 4 explantes.



Factores estudiados:

FA (Tiempos de inmersión)

5 minutos

10 minutos

15 minutos

FB(Tipos de Explante)

Explante ápice de hoja

Explante de rizoma

5.2.6.2 Evaluación de longitud de onda y explantes de Gerbera

En esta fase se empleó el tipo de investigación experimental cuantitativa bajo un diseño completamente aleatorio (DCA) con un arreglo bifactorial en parcelas divididas (Arteaga, 2016), aplicable a variables cuantitativas con distribución normal:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{\alpha i} + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde: Y_{ijk} = Cualquier observación.

μ = Media general.

α_i = Es el efecto fijo debido al i-ésimo longitud de onda (i= blanco, rojo y azul).

$\varepsilon_{\alpha i}$ = Error del primer factor (parcela mayor).

β_j = Es el efecto fijo debido al j-ésimo tipo de explante (j =ápice de la hoja, rizoma).

$\alpha\beta_{ij}$ = efecto de la interacción longitud de onda (i) por explante (j).

ε_{ijk} = Error experimental.

El experimento en esta fase conto con 4 tratamientos y 4 repeticiones.



Factores de estudiados:

Factor A	Factor B
Longitud de onda	Tipo de explante
L1= Luz blanca	E1= explante de la hoja
L2= Luz Azul y rojo	E2= explante del rizoma

Unidad Experimental: La unidad experimental para ambos estudios fue cada vaso conteniendo 4 explantes de hoja y rizoma de *G. jamesonii*.L (figura 10)

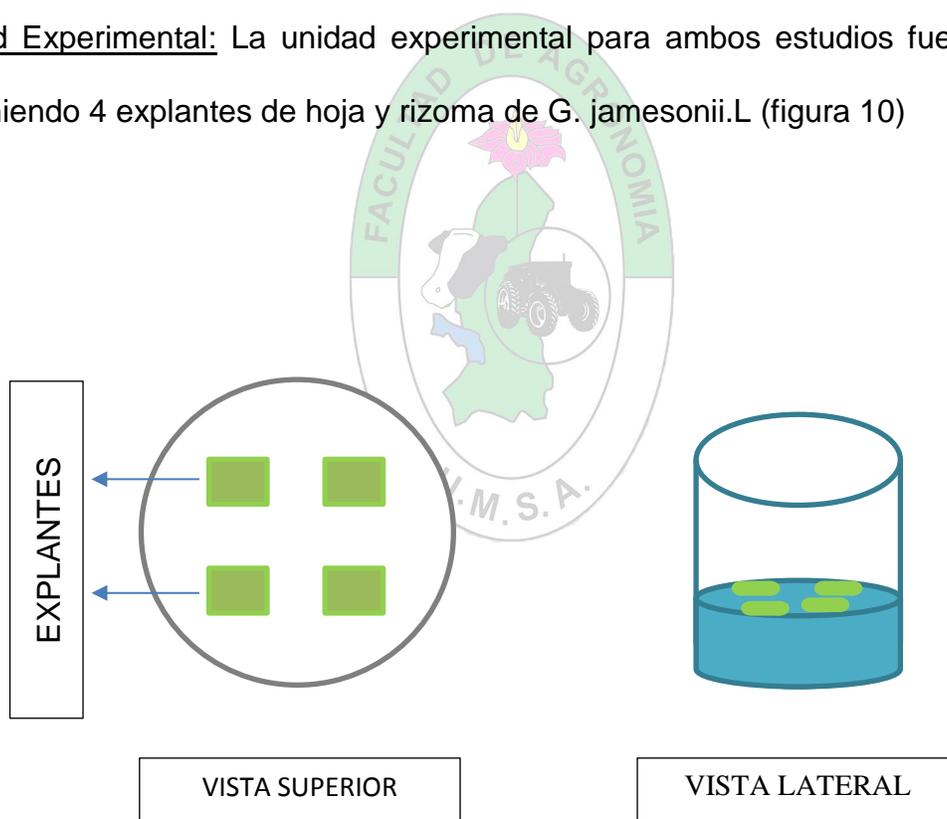


Figura 10. Diagrama unidad experimental vasos cocteleros

Croquis experimental: El croquis experimental para el protocolo de desinfección ejemplificado en la figura 11 y la evaluación de tipos de longitud de onda y explante de gerbera en la figura 12.

T1 R1	T6R3	T5R2	T2R2	T4R1	T5R1
T5R3	T3R1	T1R2	T3R2	T2R1	T6R2
T2R3	T4R3	T4R2	T6R1	T3R3	T1R3

Figura 11. Croquis de evaluación protocolo de desinfección

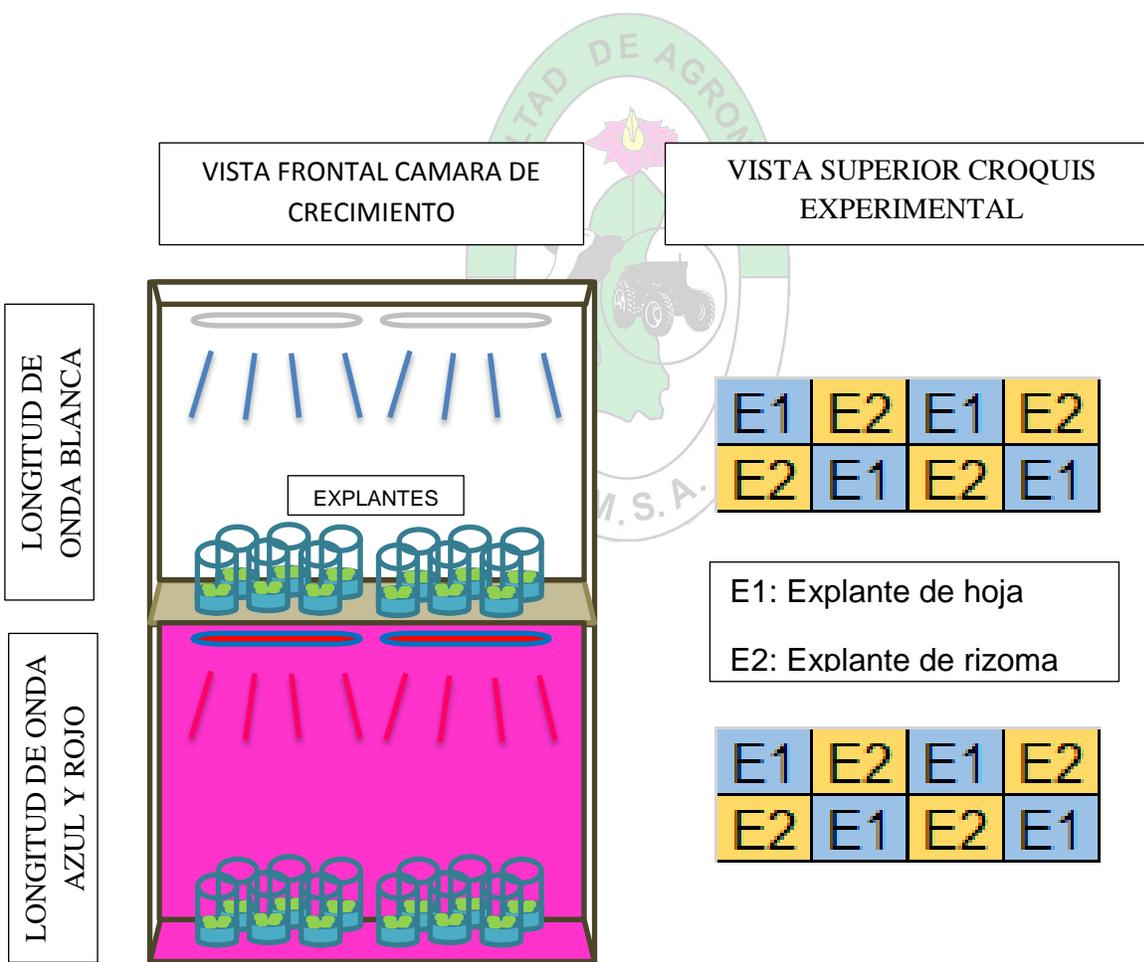


Figura 12. Croquis evaluación de explantes y medios

5.2.7 Variables de Respuesta

5.2.7.1 Protocolo de desinfección

Para efecto de establecer el protocolo de desinfección se tomaron lecturas a los 3, 8, 10 y 15 días después de la siembra tomando en cuenta el 100% de los frascos en cada variable; las variables estudiadas fueron las siguientes:

Contaminación de medio: De cada frasco con explante se consideró que el medio estuvo contaminado cuando hubo presencia de bacterias u hongos (fig.13), el mismo que por observación directa se determinó en porcentaje%.



Figura 13. Contaminación medio de cultivo explantes de hoja

Sobrevivencia de explante: De cada frasco se anotó el número de explantes que sobrevivieron, sin considerar la contaminación en el frasco, así mismo los resultados fueron expresados como variables cuantitativas discretas.

5.2.7.2 Evaluación longitud de onda y tipos de explantes

Para las lecturas de inicio de formación de callo y brote se estableció como tiempo 50 días al inicio del experimento, la toma de datos fue la siguiente:

Inicio de formación de callo y brote: se evaluó el tiempo (días) en el cual comenzó la formación de callo y brote considerándose esta variable como cuantitativa discreta, esta observación fue medida una vez que el 50% del total de explantes de hoja y rizoma en cada unidad experimental presentase el inicio de formación, así mismo la observación se realizó con lupa.

Contaminación de medio: en cada frasco con explantes se consideró que el medio estaba contaminado cuando hubo presencia de bacterias u hongos, se expresó en porcentaje (fig.14).



Figura 14. Contaminación medio de cultivo.

Sobrevivencia: de cada frasco se anotó si el explante sobrevivió, tomando como el 100% 4 explantes cada uno representando el 25%.

5.2.8 Análisis estadístico

Para cada variable en estudio se realizó una prueba de ajuste Shapiro Wilks para determinar la normalidad de los datos. Se utilizó la transformación angular para datos expresados en porcentajes de tercer tipo que no se ajustan a la distribución normal además se aplicó la transformación por la raíz cuadrada para datos expresados por conteos (Arteaga, 2016).

Posteriormente se realizó un análisis de varianza para determinar significancia entre tratamientos, se realizó también una prueba de medias de Duncan al 5% de significancia con ayuda del software estadístico INFOSTAT. Se graficaron y se realizaron tablas resumen de los resultados obtenidos para analizar de una mejor manera lo obtenido.

6 RESULTADOS Y DISCUSION

De acuerdo a los objetivos planteados para la investigación, se muestra a continuación los resultados obtenidos a través del análisis de variancia y pruebas Duncan con nivel de significancia de 5% para cada variable de respuesta en conformidad a cada fase del trabajo.

6.1 Protocolo de desinfección

6.1.1 Contaminación de medios

Se realizó el análisis de los distintos tiempos de hipoclorito de sodio al 0.5% (5, 10,15 minutos) a los 10 días de observación se obtuvieron los siguientes resultados en las variables. En la tabla 2 se presentan los datos obtenidos a través del A.N.V.A. para las variables en estudio.

Tabla 2. Análisis de varianza (A.N.V.A.) para la variable contaminación de medios%

F.V	G.L	S.C	C.M.	FC	FC		Nivel de sig.
					0,05	0,01	
TIEMPOS	2	0,37	0,18	12,13	3,88	6,93	**
TIPO DE EXPLANTE	1	0,11	0,11	7,63	4,75	9,33	*
TIEMPO*EXPLANTE	2	0,03	0,02	1,02	3,88	6,93	N.S
ERROR EXPERIMENTAL	12	0,18	0,02				
TOTAL	17	0,69					
C.V.%	10,47%						

** Altamente significativo

* significativo

N.S. no sig.

El coeficiente de variabilidad C.V. para la variable contaminación de medios fue de 10,47 % el mismo nos hace referencia a la confiabilidad de los datos de dicha variable, así mismo al buen manejo de las unidades experimentales.

Tabla 3.Comparación múltiple de medias Duncan al 5 %, para el factor Tiempos

TIEMPO (Min.)	MEDIAS	AGRUPACION DE MEDIAS
5	28,33	A
10	18,33	AB
15	6,67	B

Tabla 4.Comparación múltiple de medias Duncan al 5 %, para el factor Explantes

EXPLANTE	MEDIAS	AGRUPACION DE MEDIAS
RIZOMA	22,22	A
HOJA	13,33	B

En la tabla 2 se puede observar el análisis de varianza, el mismo nos muestra que el factor tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio fue altamente significativo, presentándose así una diferencia estadística entre los diferentes tiempos de inmersión. El factor tipo de explante presenta la significancia esto nos indica que hubo una diferencia estadística entre el explante de hoja y el explante de rizoma, la interacción

entre ambos factores posee la no significancia, habiéndose demostrado que no existe diferencia estadística entre los tiempos de inmersión y los tipos de explantes.

La tabla 3 muestra la diferencia estadística existente del tiempo de inmersión de 15 minutos entre los tiempos 10 y 5 quienes presentan una media de contaminación de 18,33 y 28,33% respectivamente, a diferencia del primero de 6,67% , esto nos indica que 15 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio nos permitirá tener la menor contaminación.

Según López et al, (2004), el hipoclorito de sodio provoca la oxidación de las proteínas de la pared celular de las bacterias, de la membrana citoplasmática y del citoplasma. En sentido general se puede decir que las paredes celulares 31 de las esporas bacterianas son igualmente atacadas ya que este compuesto también tiene actividad esporicida, por lo cual no deben ser aplicadas durante períodos excesivamente largos.

La representación en la tabla 4 (comparación de medias Duncan al 5% para el tipo de explante) denota que el explante de hoja tuvo una diferencia estadística con el explante de rizoma presentando una media de contaminación de 13,33% y 22,22% respectivamente.

Se observó que al someter altos tiempos en el hipoclorito de sodio, algunos explantes mueren, lo que justifica la evaluación de la sobrevivencia de estos.

Pierik (1990), indica que una de las cuatro fuentes de infección más importante en el establecimiento de cultivo de tejidos, es el operario, si se ha realizado una buena esterilización química del material vegetal, puede existir la tendencia que al momento que el operario manipule los explantes sea fuente de contaminación directa al realizar la siembra respectiva del segmento foliar

Con los resultados obtenidos de dicha siembra para el establecimiento de un protocolo de desinfección, determinamos que la contaminación está presente en todos los procesos involucrados en un cultivo de tejidos, este puede abarcar desde la esterilización de los instrumentos hasta la fumigación de las plantas en el área exterior o que también al momento de la siembra de los explantes puede influir un factor microbiológico que pueda contaminar dichos explantes.

6.1.2 Sobrevivencia de explante

La variable fue registrada realizando un conteo de explantes existentes vivos en cada unidad experimental, independientemente si el medio de cultivo estaría contaminado

o no así mismo se realizó la transformación de datos para su análisis que se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Análisis de varianza para la variable sobrevivencia de explante

F.V	G.L	S.C	C.M.	FC	FC		Nivel de sig.
					0,05	0,01	
TIEMPOS	2	0,43	0,22	6,94	3,88	6,93	**
TIPO DE EXPLANTE	1	0,01	0,01	0,28	4,75	9,33	NS
TIEMPO*EXPLANTE	2	0,23	0,11	3,64	3,88	6,93	NS
ERROR EXPERIMENTAL	12	0,38	0,03				
TOTAL	17	1,05					
C.V.%	9,38%						

El C.V. nos muestra un valor del 9,38% que nos indica la confiabilidad de los datos para esta variable, así mismo el buen manejo de las unidades experimentales.

Tabla 6. Comparación múltiple de medias, factor tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio.

TIEMPO (Min.)	MEDIAS	AGRUPACION DE MEDIAS
15	3,17	A
10	2,83	B
5	1,83	B

Se logra observar en la tabla 5 el análisis de datos realizado para la variable sobrevivencia de explante, donde claramente se demuestra que hubo una alta diferencia estadística en los tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio, en el factor

tipos de explantes los niveles son estadísticamente iguales y la interacción entre los tiempos y tipos de explantes no presentan diferencia estadística.

Para la determinación del tiempo de inmersión efectivo en la sobrevivencia de explantes se realizó una comparación múltiple de medias Duncan que se presenta en la tabla 6, en el mismo se denota el tiempo 5 con una media promedio de sobrevivencia de 1,83 explantes muy por debajo de los tiempos 10 y 15 mismos identificados en el mismo grupo de medias siendo estadísticamente iguales, presentando medias de sobrevivencia de 2,83 y 3,17 respectivamente.

En estudios realizados por Radice y Marconi (1998), donde se hicieron pruebas para reproducir in vitro *Gerbera jamesonii*.L a partir de capítulos florales, se utilizó para desinfectar los explantes una solución de hipoclorito de sodio al 20 % durante 20 minutos y bicloruro de mercurio al 0.1 % (solución acuosa) durante 10 minutos. Con esta metodología alcanzaron una contaminación mínima de 10% y una máxima de 75% en algunos tratamientos. Comparando los resultados del estudio se puede decir que es posible obtener un rango de contaminación que derivara a la sobrevivencia de explantes muy similar obviando el uso del bicloruro de mercurio que puede ser muy costoso y tóxico para el operario.

Con la obtención de estos resultados se propone un protocolo de desinfección de los explantes de *G. jamesonii*.L según la metodología de los tratamiento T5 Y T6, quienes utilizan un tiempo de inmersión de 10 y 15 minutos en hipoclorito de sodio, así mismo no presentan diferencia estadística entre el tipo de explante a utilizar para la sobrevivencia de los mismos de igual forma con la contaminación de medio.

6.2 Evaluación longitud de onda y tipos de explantes

6.2.1 Días al inicio de formación de callo y brote.

La variable se registró cuando el 50 % de los explantes (hoja y rizoma) en cada unidad experimental presentasen el inicio a la formación de callo y brote respectivamente, así también se realizó una transformación logarítmica de datos para conteos de números de gran amplitud (Arteaga, 2016) para el análisis de los mismos que se muestran en la tabla 7 a continuación:

Tabla 7 Análisis de datos, variable días al inicio de formación de callo y brote

F.V	G.L	S.C	C.M.	FC	FC		Nivel de sig.
					0,05	0,01	
LUZ	1	0,0026	0,0026	10,5	5,99	13,74	*
EE LUZ	6	0,0015	0,00024	1,27			
EXPLANTES	1	0,0035	0,0035	18,45	5,99	13,74	**
LUZ*EXPLANTES	1	0,0035	0,0035	18,45	5,99	13,74	**
EE	6	0,0012	0,00019				
TOTAL	15	0,01					
C.V.		0,83 %					

En la tabla 7 nos muestra un C.V. de 0,83% que nos demuestra la confiabilidad de los datos, así mismo el buen manejo de unidades experimentales para esta fase de la investigación.

Tabla 8.Comparación múltiple de medias Duncan para el factor longitudes de luz.

LONGITUD DE ONDA	MEDIAS	AGRUPACION DE MEDIAS	DE
BLANCA	48,5	A	
AZUL Y ROJO	45,88		B

Tabla 9.Comparación Duncan para el factor tipo de explante

TIPO DE EXPLANTE	MEDIAS	AGRUPACION DE MEDIAS
RIZOMA	48,75	A
HOJA	45,63	B

Tabla 10.Prueba de efectos simples para la interacción longitudes de onda y tipos de explantes

F.V	G.L	S.C	C.M.	FC	FC		Nivel de sig.
					0,05	0,01	
LUZ(EXPL.HOJA)	1	6,05E-03	0,0060500	31,524099	5,99	13,74	**
LUZ(EXPL.RIZOMA)	1	4,05E-05	0,0000405	0,211029092	5,99	13,74	N.S.
EXPL.(LUZ BLANCA)	1	6,16E-33	6,16E-33	3,20973E-29	5,99	13,74	N.S.
EXPL(LUZ. AZUL ROJO)	1	7,08E-03	0,0070810	36,89622232	5,99	13,74	**
EE	6	1,15E-03	0,000191917				
TOTAL	15	1,22E-02					

La tabla 7 nos presenta el análisis de datos para la variable días al inicio de formación de callo y brote, este nos indica la diferencia estadística que hubo entre las diferentes longitudes de onda de luz (blanco, azul y rojo), de la misma forma para el factor tipo de explante (explante de hoja y rizoma) se presenta la alta significancia, la interacción entre ambos factores nos muestra una alta significancia indicándonos que las diferentes interacciones de niveles de luz y explante son estadísticamente diferentes por lo que para estas fuentes de variabilidad se realizó una prueba de medias Duncan y efectos simples.

Una vez realizada la comparación de medias que se muestra en la tabla 8, logramos distinguir la diferencia estadística entre los niveles de longitud de onda, que se agrupan por las letras A y B, esto nos indica que el menor promedio de días al inicio de formación de callo y brote se presentó en la longitud de onda azul y rojo con una media de 45,88 días a diferencia de la longitud de onda blanca quien obtuvo una media de 48,5 días.

La tabla 9 nos muestra la comparación múltiple de medias Duncan para el factor tipo de explante, en el mismo podemos observar que se presenta la mayor media de días al inicio de callo y brote del explante de rizoma a diferencia del explante de hoja quien presenta una media de 45,63.

Así mismo una vez realizada la prueba de efectos simples, llegamos a determinar la alta significancia para la interacción longitud de onda y explante de hoja presentando un promedio de días al inicio de formación de callo de 42,75 días.

Lo cual comprueba estudios realizados por Hussein (2007), donde se observó formación de callo a partir de 21-30 días por las condiciones controladas. Además no se observó formación de callo en las primeras dos lecturas (8 y 15 días).

Pierik (1990) explica que la capacidad regenerativa de los órganos o tejidos de una planta disminuye a medida que van estos madurando, siendo los tejidos jóvenes los más apropiados para el cultivo de tejidos. En la evaluación se utilizaron únicamente tejidos jóvenes evitando este error sistemático del estado fisiológico del explante.

Durante la iluminación simultánea con luz azul y roja, ocurre una interacción sinérgica entre criptocromo y fitocromos (fotorreceptores del azul y rojo, respectivamente) y estos pigmentos pueden ser responsables de la percepción y activación del proceso de morfogénesis. Los fitocromos posiblemente regulan el proceso de división celular (Kurilčik et al., 2008)



6.2.2 Contaminación de medio

La variable fue registrada en porcentaje, para efectos de análisis de datos se realizó la transformación angular para datos expresados en porcentajes de tercer tipo (Arteaga, 2016) que se muestra en el tabla 11.

Tabla 11. Análisis de varianza contaminación de medio

F.V	G.L	S.C	C.M.	FC	FC		Nivel de sig.
					0,05	0,01	
LUZ	1	0,070	0,070	8,3	5,99	13,74	*
EE LUZ	6	0,050	0,010	1,05			
EXPLANTES	1	0,050	0,050	5,59	5,99	13,74	N.S.
LUZ*EXPLANTES	1	0,010	0,010	1,29	5,99	13,74	N.S.
EE	6	0,050	0,010				
TOTAL	15	0,22					
C.V.	9,39%						

C.V. 9,39 % que nos indica la confiabilidad de los datos y el manejo de las unidades experimentales.

Tabla 12. Comparación múltiple de medias para Longitud de onda.

LONGITUD DE ONDA	MEDIAS	AGRUPACION DE MEDIAS
BLANCA	40,00	A
AZUL Y ROJO	27,50	B

La tabla 11 nos presenta el análisis de datos realizado para la variable contaminación de medio, en el mismo se puede apreciar el nivel de significancia para los factores en estudio donde se presenta la significancia en las diferentes longitudes de onda, existiendo así una diferencia estadística entre los niveles de este factor, sin embargo tanto los tipos de explantes y la interacción entre las diferentes longitudes de onda y tipos de explantes no presentaron diferencia estadística por lo tanto se ve innecesario realizar una comparación de medias para ambos factores.

Se puede apreciar en la tabla 12 la comparación de medias entre los niveles del factor longitudes de onda, donde se presenta la mayor media de contaminación en la longitud de onda blanca con un 40% a diferencia de la longitud de onda azul y rojo con 27,50%.

6.2.3 Sobrevivencia de explantes

Esta variable fue registrada por conteo de manera independiente si el medio de cultivo se encontraba contaminado, así mismo se realizó una transformación de los datos y el análisis de los mismos que se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Análisis de varianza sobrevivencia de explantes

F.V	G.L	S.C	C.M.	FC	FC		Nivel de sig.
					0,05	0,01	
LUZ	1	0,300	0,300	7,57	5,99	13,74	*
EE LUZ	6	0,240	0,400	3,62			
EXPLANTES	1	0,300	0,300	27,41	5,99	13,74	**
LUZ*EXPLANTES	1	0,002	0,002	0,16	5,99	13,74	N.S.
EE	6	0,070	0,010				
TOTAL	15	0,9					
C.V.		5,61%					

Observamos un coeficiente de variabilidad de 5,61% siendo la representación de la confiabilidad del manejo de los datos y así de las unidades experimentales.

Tabla 14.Comparación múltiple de medias Duncan para longitud de onda

LONGITUD DE ONDA	MEDIAS	AGRUPACION DE MEDIAS
AZUL Y ROJO	3	A
BLANCA	2	B

Tabla 15.Comparación de medias para tipo de explante

TIPO DE EXPLANTE	MEDIAS	AGRUPACION DE MEDIAS
HOJA	3	A
RIZOMA	2	B

Realizado el análisis de los datos logramos denotar en la tabla 13 el nivel de significancia para los factores en estudio, así mismo determinamos la significancia en longitud de onda siendo estadísticamente diferentes ambas longitudes, de igual forma para el factor tipo de explante se presenta la alta significancia indicándonos la existencia de una diferencia estadística entre el explante de hoja y rizoma con respecto a la sobrevivencia.

Las tablas 14 y 15 presentan la comparación múltiple de medias para ambos factores, determinándose así: el mejor promedio de sobrevivencia con respecto al tipo de longitud de onda se presenta en las longitudes azul y rojo presentando una media de 3 explantes vivos a diferencia de la longitud blanca quien presenta 2. Respectivamente

el tipo de explante con mayor promedio de sobrevivencia fue el de hoja quien presenta una media de 3 explantes, a diferencia del explante de rizoma con 2 explantes en promedio.

En Gerbera, se ha demostrado que un incremento del 10 al 15% del hipoclorito de sodio para la desinfección de explantes de hojas redujo la infección en un 44% pero aumentó la sobrevivencia en un 37% (Shabbir et al., 2012).

7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 Conclusiones

En concordancia con los objetivos planteados en este trabajo de investigación llegamos a las siguientes conclusiones.

Se desarrolla un protocolo de desinfección para explantes de gerbera jamesonii.L basado en diferentes tiempos de inmersión (5, 10 y 15 minutos) y tipos de explante de gerbera (explante de hoja y explante de rizoma) como primera fase del trabajo de investigación determinando con las variables de respuesta contaminación de medio y sobrevivencia de explantes que el tiempo que obtuvo menor contaminación fue 15



minutos de inmersión en hipoclorito de sodio con una media de 6,67% y un promedio de sobrevivencia de explantes por unidad experimental de 3,17.

En la evaluación de diferentes longitudes de onda (blanca, azul y rojo) se llegó a determinar a través de sus variables de respuesta días al inicio de formación de callo y brote, contaminación de medio y sobrevivencia de explante lo siguiente: la longitud de onda azul y rojo nos permite obtener un menor promedio de días al inicio de la formación, siendo el mismo 45,88 días, este tipo de longitud de onda tuvo su efecto en los explantes de hoja quienes presentaron un promedio de 45,63 días al inicio de formación de callo.

De igual forma la longitud de onda azul y roja nos permitió obtener el menor porcentaje de contaminación con una media de 27,50 % y un promedio de sobrevivencia de 3 explantes por unidad experimental, la interacción entre estos dos factores en sus diferentes niveles y su análisis de efectos simples nos llega a determinar que la interacción longitud de onda azul y rojo con el explante de hoja obtuvo el menor promedio de días al inicio de formación de callo el mismo fue de 42,75 días después de realizada la siembra.



7.2 Recomendaciones

Al término del trabajo de investigación se recomienda lo siguiente:

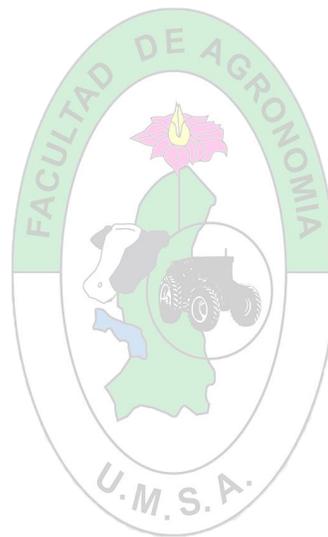
Al momento de realizar la introducción a invitro de explantes de *G. jamesonii*.L se considere como protocolo de desinfección de los mismos un tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio de 15 minutos fragmentados en 5 minutos con un espacio de enjuague en agua destilada 2 veces, cada uno por 3 minutos.

Se recomienda el uso de luces LEDs de longitud azul y rojo en la cámara de crecimiento por el poco gasto energético que representa el mismo y así también por el efecto mostrado en los explantes de hoja y rizoma que causa el mismo, además que se disminuye el porcentaje de contaminación de esta forma se logra mayores promedios de sobrevivencia en los explantes.

Se recomienda evaluar factores asociados a la sobrevivencia de explantes de *G. jamesonii*.L en cultivo in vitro como tamaño del explante, temperatura, oxidación del medio, intensidad lumínica, proporciones del espectro rojo y azul, entre otros. Esto con el fin de evitar la pérdida de explantes que pueden ser potenciales en producción de plantas.

Se recomienda continuar estudios con reguladores de crecimiento al medio MS, evaluando diferentes concentraciones y diferentes tipos de reguladores (auxinas o

citoquininas y giberelinas) para mejorar el porcentaje de formación de callo en explantes de hoja de *G. jamesonii*.L, tomando en cuenta las características morfológicas de los callos (tamaño, tipo de callo, color, etc.). Al momento de realizar evaluaciones con propagación de *G. jamesonii*.L in vitro se sugiere que se realice con la mayor cantidad de réplicas posibles para disminuir la variabilidad de los datos.



8 BIBLIOGRAFÍA

- **Arteaga, J., 2016.** Métodos estadísticos para la investigación. 78pp.
- **Barba Álvarez, A., 2001.** Micropropagación de plantas. Editorial Trillas. 29. Distrito Federal, México.
- **Bergareche, C.; Moysset, L., 1993.** El fitocromo, Fisiología y bioquímica vegetal, Bogotá, McGraw-Hill, 397-417.
- **Blanco, R.** Gerbera. (En línea) Brasil [consulta 3-12-2003] disponible en: <http://www.jardinesdeflores.com.br>
- **Bourget, C. M., 2005.** Una introducción a los diodos emisores de luz, HortScience, 43 (7): 1944-1946.
- **Ding Y.; S. He, J.A. Teixeira da Silva, G. Li, y M. Tanaka, 2010.** "Efectos de una nueva fuente de luz (lámparas fluorescentes de cátodo frío) en el crecimiento de plántulas de árbol peonía in vitro". Scientia Horticulturae, 125: 167-169.
- **DTC Cuba.** Las flores: Mundo de colores en la mayor de las Antillas (en línea) Cuba [consulta 10-4-2002] disponible en: <http://www.vacacionestravel.com>.
- **Gallegos De León, C., 2010.** "Evaluación de la productividad de Gerbera (Jamesonii. L) en el corredor florícola del Estado de México".
- **González, L., 2009** Las flores. Privilegio para difuntos (en línea) Cuba disponible en: <http://www.cuba.org/notiagrarias/flores.com>

- **Hernandez Sampieri, R; Fernadez Collado, C; Baptista, L. 2014**
METODOLOGIA de la investigacion. 6ta ed. México, Editorial Mc Graw Hill
education. 589 pp.
- **Huang M. y C.Y. Chu, 1985.** Un esquema para la multiplicación comercial de
Gerbera (Gerbera hybrida Hort) a través de la cultura de punta de disparar.
Diario Japón sociedad de Ciencias Hortícolas 54:94- 100.
- **Hussein M., A. Ismail, E. Hashim, M. ElMeniawy y N. Abdallah. 2008 a.**
Regeneración in vitro de gerbera. Agricultura y la investigación forestal 58:97-
102.
- **Hussein M., I. Ahmed, E. Mahmoud, M. Salah y N. Adballah. 2008 b.**
Regeneración in vitro de gerbera. Agricultura y la investigación forestal
1/2(58):97-102.
- **Jenkins, G. I., 2014.** El fotorreceptor de UV-B UVR8: de estructura a la
fisiología. La célula de la planta vol., 26, no 1, 21-37.
- **Jerzy, M. y M. Lubomski. 1991.** formación ex vitro derivado de explantes de
hoja de Gerbera jamesonii. Scientia Horticulturae 47:115-124
- **Jorge H. R., 2006.** Fisiología de la Producción de los Cultivos Tropicales. 1ª Ed.
Editorial Universidad de Costa Rica (San Jose). 62 – 65.
- **Karnataka J. 2008.** Efecto de citoquininas con auxina sobre la proliferación de
múltiples cortes en gerbera (Gerbera jamesonii B.) var Sciella. Ciencia de la
agricultura. 21(4).597-599.

- **Koolman, R. 2004.** Bioquímica. 3ª Ed. Editorial Médica Panamericana (Madrid). 370.
- **Kurilčik, A., R. Miklušytė-Čanova, S. Dapkūnienė, S. Žilinskaitė, G. Kurilčik, G. Tamulaitis, P. Duchovskis, and A. Žukauskas. 2008.** In vitro culture of Chrysanthemum plantlets using light-emitting diodes. Cent. Eur. J. Biol. 3(2): 161-167.
- **Laliberté, S., L. Chrétien y J. Vieth. 1985.** Producción de plántulas in vitro de explantes pequeños capítulos de Gerbera jamesonii. Horticultura Science 20 (1): 137-139.
- **Liu, W., 2012.** "Gestión ambiental para la horticultura protegida Artificial de luz". Agrotecnología, 1: 1-4.
- **Meisel, L., Urbina, D., & Pinto, M., 2011.** Fotorreceptores y respuestas de plantas a señales lumínicas. Fisiología vegetal. FA Squeo Cardemil (eds), Ediciones Universidad de La Serena, Chile. Cap, 18, 1-10.
- **Murashige, T., M. Serpa y J. Jones. 1974.** Propagación clonal de Gerbera a través de cultivo de tejidos ciencia de horticultura.9:175-180.
- **Navarro Paz, V., 2013.** Análisis de la utilización de luz emitida por lámparas de diodo LEDs en la producción in vitro para la obtención de semillas prebásicas de Solanum tuberosum. Trabajo final de ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina.



- **Ramos, P., Navas Gracia, L. M., Hernández-Navarro, S., Correa-Guimaraes, A., Martin Gil, J., Martin Bravo, E., & Duran Altisent, J. M., 2010.** Diodos emisores de luz para irradiación de plantas. Scribd.
- **Shagusfta N., N. Fozia, A. Tariq, F. Aslam, A. Ali y M. Athar. 2012.** Efecto de diferentes explantes en propagación in vitro de gerbera (*Gerbera jamesonii*). Diario africano de la biotecnología 11(37).
- **Zhang T., y K.M. Folta, 2012.** “Luz verde señalización adaptativa respuesta, señalización de la planta y su comportamiento, 7(1): 1-4.



ANEXOS





Anexo 1. Puesto de venta plantines florales mercado Villa Fátima



Anexo 2 Plantas madre de Gerbera jamesonii.L



Anexo 3. Irradiación con U.V. materiales



Anexo 4. Autoclavado de materiales



Anexo 5. Pesaje de Sacarosa. (Preparación medio de cultivo)



Anexo 6. Cámara de flujo laminar con materiales listos para la siembra.



Anexo 7. Siembra de explantes



Anexo 8. Medios de cultivo

Anexo 9. Análisis de varianza y pruebas de medias por variable de respuesta

V.R. Supervivencia de explante, protocolo de desinfección

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Supervivencia	18	0,64	0,49	9,38

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.			0,67	5 0,13	4,29 0,0180
Tiempos			0,43	2 0,22	6,94 0,0099
Explantes			0,01	1 0,01	0,28 0,6037
Tiempos*Explantes			0,23	2 0,11	3,64 0,0581
Error			0,38	12 0,03	
Total			1,05	17	

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,4444 gl: 12

Tiempos	Medias	n	E.E.	
1	1,83	6	0,27	A
2	2,83	6	0,27	B
3	3,17	6	0,27	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,4444 gl: 12

Explantes	Medias	n	E.E.	
1	2,56	9	0,22	A
2	2,67	9	0,22	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,4444 gl: 12

Tiempos	Explantes	Medias	n	E.E.	
1	1	1,33	3	0,38	A
1	2	2,33	3	0,38	A B
3	2	2,67	3	0,38	B C
2	1	2,67	3	0,38	B C
2	2	3,00	3	0,38	B C
3	1	3,67	3	0,38	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)



V.R. Contaminación de medios, protocolo de desinfección

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CONTAMINACION	18	0,74	0,63	10,47

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,51	5	0,10	6,79	0,0032
TIEMPOS	0,37	2	0,18	12,13	0,0013
EXPLANTES	0,11	1	0,11	7,63	0,0172
TIEMPOS*EXPLANTES	0,03	2	0,02	1,02	0,3913
Error	0,18	12	0,02		
Total	0,69	17			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 86,1111 gl: 12

tiempo Medias n E.E.

3	6,67	6	3,79	A
2	18,33	6	3,79	A B
1	28,33	6	3,79	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 86,1111 gl: 12

explante Medias n E.E.

1	13,33	9	3,09	A
2	22,22	9	3,09	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)



V.R. Supervivencia de explante. Luces LEDs

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SOBREVIVENCIA	16	0,93	0,82	5,61

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,83	9	0,09	8,52	0,0084
LONG ONDA	0,30	1	0,30	7,57	0,0332
LONG ONDA>REPETICION	0,24	6	0,04	3,62	0,0713
EXPLANTE	0,30	1	0,30	27,41	0,0019
LONG ONDA*EXPLANTE	1,7E-03	1	1,7E-03	0,16	0,7073
Error	0,07	6	0,01		
Total	0,90	15			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,5000 gl: 6

LONG ONDA Medias n E.E.

2,00 3,00 8 0,25 A

1,00 2,00 8 0,25 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,1667 gl: 6

EXPLANTE Medias n E.E.

1,00 3,00 8 0,14 A

2,00 2,00 8 0,14 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

V.R. Contaminación de medios, Luces LEDs

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CONTAMINACION	16	0,78	0,46	9,39

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,18	9	0,02	2,43	0,1459
LONG ONDA	0,07	1	0,07	8,30	0,0280
LONG ONDA>REPETICION	0,05	6	0,01	1,05	0,4775
EXPLANTE	0,05	1	0,05	5,59	0,0559
LONG ONDA*EXPLANTE	0,01	1	0,01	1,29	0,3001
Error	0,05	6	0,01		
Total	0,22	15			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0084 gl: 6

LONG ONDA Medias n E.E.

2,00 1,02 8 0,03 A

1,00 0,89 8 0,03 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0081 gl: 6

EXPLANTE Medias n E.E.

1,00 1,01 8 0,03 A

2,00 0,90 8 0,03 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)



Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0081 gl: 6

LONG ONDA	EXPLANTE	Medias	n	E.E.
2,00	1,00	1,05	4	0,04 A
2,00	2,00	0,99	4	0,04 A
1,00	1,00	0,97	4	0,04 A
1,00	2,00	0,81	4	0,04 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

V.R. Inicio formación brote y callo, Luces LEDs

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DIAS	16	0,91	0,76	0,83

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,01	9	1,2E-03	6,42	0,0173
LONG ONDA	2,6E-03	1	2,6E-03	10,50	0,0177
LONG ONDA>repeticion	1,5E-03	6	2,4E-04	1,27	0,3910
EXPLANTE	3,5E-03	1	3,5E-03	18,45	0,0051
LONG ONDA*EXPLANTE	3,5E-03	1	3,5E-03	18,45	0,0051
Error	1,2E-03	6	1,9E-04		
Total	0,01	15			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 2,7292 gl: 6

long de onda	Medias	n	E.E.
2	45,88	8	0,58 A
1	48,50	8	0,58 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 2,0625 gl: 6

tipo de explante	Medias	n	E.E.
1	45,63	8	0,51 A
2	48,75	8	0,51 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 2,0625 gl: 6

long de onda	tipo de explante	Medias	n	E.E.
2	1	42,75	4	0,72 A
1	2	48,50	4	0,72 B
1	1	48,50	4	0,72 B
2	2	49,00	4	0,72 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)