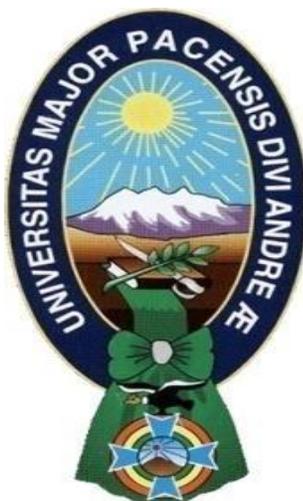


**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



**TESIS DE GRADO**

**EVALUACIÓN DE LA DESINFECCIÓN DE EXPLANTES CON TRES  
REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA LA GENERACIÓN IN VITRO DE  
GERBERA (*Gerbera jamesonii*) EN EL LABORATORIO DE FITOPATOLOGÍA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

PRESENTADO POR:

**WAYRA ALCON HERRERA**

**La Paz – Bolivia**

**2021**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**EVALUACIÓN DE LA DESINFECCIÓN DE EXPLANTES CON TRES  
REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA LA GENERACIÓN IN VITRO DE  
GERBERA (*Gerbera jamesonii*) EN EL LABORATORIO DE FITOPATOLOGÍA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

*Tesis de Grado presentado como requisito parcial  
para optar el Título de Ingeniero Agrónomo*

**WAYRA ALCON HERRERA**

**Asesor:**

Ing. M.Sc Freddy Antonio Cadena Miranda

.....

**Revisores:**

Ing. Ph. D. Jose Yakov Arteaga Garcia

.....

Ing. Ph. D. David Cruz Choque

.....

Ing. M.Sc. Marco Antonio Echenique Quezada

.....

Aprobado:

Presidente Tribunal Examinador:

.....

LA PAZ - BOLIVIA

2021

## DEDICATORIA

*A mi padre Lic. Msc. Abigael Alcon Torrez (Q.E.P.D.) que cuyo ejemplo de  
responsabilidad jamás hubiera logrado mi meta.*

*A quien le debo todo, por sus consejos y sacrificios, por que supo inculcarme sanos  
principios y constante anhelo de superación.*

*Siempre en mente y corazón papito.*

*Te extraño...*

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a ti mi querido Dios y a la Virgen de Copacabana por todas las bendiciones, y por ayudarme a lograr la meta más anhelada, hay mucho aun por recorrer, pero sé que cada paso que dé será de acuerdo a tu voluntad.

Agradecer a la Universidad Mayor de San Andrés, y sobre todo a la Facultad de Agronomía por la formación Académica brindada durante mi vida Universitaria.

Dar gracias a mis Asesor Ing. M.Sc. Freddy Antonio Cadena Miranda por todo el apoyo y conocimientos prestados para la culminación de mis tesis de grado.

Agradecer a mis Revisores, Ph. D. Jose Yakov Arteaga García, Ph. D. David Cruz Choque, Ing. M.Sc. Marco Antonio Echenique Quezada por su recomendación acertada y su tiempo brindado.

A mi familia, a mi Padre Abigael Alcon Torrez (Q.E.P.D.) y a mí Madre Soledad Herrera Martinez, quienes con mucho cariño y dedicación estuvieron presentes a lo largo de mi formación personal enseñándome el valor de la humildad y honestidad.

A mis hermanos Emma Alejandra Alcon Herrera, Sumaya Alcon Herrera, Huascar Alcon Herrera, Wara Alcon Herrera, Yawar Alcon Herrera y mi sobrina Selena por la paciencia y comprensión.

A todos mis amigos que siempre me alentaron y de forma desinteresada proporcionaron su apoyo en todo momento, mis más sinceros agradecimientos.

“La amistad no solo permite sobreponerse al resentimiento o a la depresión y caminar a un cielo despejado también aleja a los pensamientos oscuros y siempre te hace pensar con luces y razón”.

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Fitopatología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés. El cual tuvo como objetivo evaluar la desinfección de explantes de Gerbera con dos concentraciones de hipoclorito de sodio al 0.5% y 1% y tres diferentes reguladores de crecimiento para el desarrollo y generación *invitro* de gerbera (*Gerbera jamesonii*). Para el trabajo se hizo un diseño completamente al azar con un arreglo Bifactorial, la desinfección de explantes se realizó con 4 tratamientos y 4 repeticiones habiendo en total de 16 unidades experimentales y cada unidad experimental con 4 explantes. Para los reguladores de crecimiento fueron 6 tratamientos y 4 repeticiones habiendo un total de 24 unidades experimentales y con 4 muestras de explantes por unidad experimental. Los resultados de la desinfección de explantes muestra que la mejor concentración de hipoclorito fue 1% obteniendo el 23,25 % de contaminación, donde la variable sobrevivencia muestra una media de 2.50 de explantes. En la evaluación de reguladores de crecimiento se obtuvo que el mejor R2 Medio Murashige & Skoog y Giberelina 3 (MS + G3) y R3 Medio Murashige & Skoog y Agua de coco MS+ Acc con unan cantidad de 3 y 2,88 de explantes en la generación de callo y brote (explante ápice de hoja y rizoma) No se observaron diferencias significativas en la sobrevivencia de los explantes entre los tratamientos. EL método más efectivo de desinfección fue sumergir en hipoclorito de sodio al 1% durante 15 minutos espaciados en tres intervalos (5, 10 y 5 minutos), después de cada intervalo se debe lavar tres veces con agua destilada como parte del proceso de desinfección; En cuanto se refiere al medio de cultivo más adecuado para el establecimiento *in vitro* del Gerbera (*Gerbera jamesonii*); respecto a la formación de callos y cantidad de brotes en los medios que obtuvieron mejores resultados fueron R2 Medio Murashige & Skoog y Giberelina 3 (MS + G3) y R3 Medio Murashige & Skoog y Agua de coco MS+ Acc.

## SUMMARY

The present work is carried out in the laboratory of Vegetative Phytopathology of the Faculty of Agronomy of the Mayor of San Andrés. The two as an objective evaluate the disinfection of gerbera explants with sodium hypochlorite concentrations of 0.5% and 1% and three different growth regulators for gerbera development and generation of gerbera (*Gerbera jamesonii*). For this work, a complete design is made with a Bifactorial rule, the disinfection of plants is carried out with 4 treatments and 4 repetitions having a total of 16 experimental units and each experimental unit with 4 explants. For the crime regulators there were 6 treatments and 4 repetitions having a total of 24 experimental units and with 4 sample samples per experimental unit. The results of the disinfection of samples show that the best concentration of hypochlorite is 1% obtaining the 23.25% of contamination, while the variable sovereignty shows a media of 2.50 of explants. In the evaluation of crime regulators, it was found that the best R2 Medio Murashige & Skoog and Giberelina 3 (MS + G3) and R3 Medio Murashige & Skoog and Agua de coco MS + Acc with an amount of 3 and 2.88 of explants in the Generation of callo and brote (explant hoja y rhizome) No significant differences are observed in the sobriety of the plants between the treats. The most effective method of disinfection is to summer in hydocolitous sodi to 1% during 15 minutes specified in three intervals (5, 10 and 5 minutes), after each interval, there should be three way with distilled with the part of the disinfection process; When referring to the most suitable cultivation medium for the in vitro establishment of the Gerbera (*Gerbera jamesonii*); respect to the formation of calls and the amount of breaks in the media that obtovieron best results fueron R2 Medio Murashige & Skoog y Giberelina 3 (MS + G3) y R3 Medio Murashige & Skoog y Agua de coco MS + Acc.

## ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Antecedentes.....	2
1.2	Planteamiento del problema .....	3
1.3	Justificación .....	4
2	OBJETIVOS .....	6
2.1	Objetivo General.....	6
2.2	Objetivos Específicos.....	6
3	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1	Características botánicas del cultivo de gerbera .....	6
3.2	Importancia del Cultivo .....	8
3.3	Origen del cultivo de gerbera.....	9
3.4	Clasificación Taxonómica de Gerbera .....	10
3.5	Formas de reproducción.....	10
3.5.1	Propagación por semilla .....	10
3.5.2	Propagación vegetativa .....	11
3.5.3	Cultivo de Tejidos .....	11
3.5.3.1	Micropropagación <i>in vitro</i> .....	13
3.5.3.1.1	Ventajas de la Micropropagación.....	14
3.5.3.2	Fases de la Micropropagación .....	16
3.5.3.3	Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia.....	17
3.5.3.4	Cultivo in vitro de callo .....	17
3.5.3.5	Multiplicación de los brotes .....	18
3.6	Explante.....	18
3.7	Medios de Cultivo .....	19
3.7.1	Composición del Medio de Cultivo.....	20
3.7.1.1	Sales Inorgánicas.....	21
3.7.1.2	Fuentes de carbono .....	21
3.7.2	Reguladores de crecimiento .....	22

3.7.2.1	Auxinas .....	22
3.7.2.2	Citoquininas .....	24
3.7.2.3	Giberalinas .....	25
3.7.3	Complejos Naturales .....	25
3.7.3.1	Características del agua de coco .....	26
3.7.3.2	Composición del agua de coco .....	28
3.7.4	Agentes Gelificantes.....	31
3.7.5	Acidez del Medio de Cultivo .....	32
3.7.6	Asepsia.....	32
4	LOCALIZACIÓN .....	33
4.1.1	Ubicación del laboratorio .....	33
5	MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
5.1	Materiales .....	34
5.1.1	Material Vegetal.....	34
5.1.2	Materiales para la Desinfección de laboratorio.....	34
5.1.3	Materiales de laboratorio y equipos .....	35
5.1.4	Materiales para Desinfección de explantes .....	35
5.1.5	Insumos para la Preparación de Medio de Cultivo .....	35
5.1.6	Insumos para la Introducción de Explantes .....	36
5.1.7	Indumentaria y materiales de asepsia: .....	36
5.1.8	Materiales de gabinete .....	36
5.2	METODOLOGÍA.....	37
5.2.1	Desinfección y establecimiento a condiciones <i>in vitro</i> del material:.....	37
5.2.2	Preparación del Medio de Cultivo.....	37
5.2.3	Preparación del Material Vegetal.....	42
5.2.4	Desinfección del material vegetal .....	44
5.2.4.1	Desinfección de explantes .....	44
5.2.5	Introducción del Material Vegetal.....	46
5.2.6	Toma de Datos .....	48
5.2.7	Diseño Experimental.....	48

5.2.7.1	Desinfección con dos concentraciones de hipoclorito (ETAPA 1)...	48
5.2.7.1.1	Factor de Estudio.....	49
5.2.7.2	Evaluación de reguladores de crecimiento al medio de cultivo (ETAPA 2)	51
5.2.7.2.1	Diseño experimental .....	51
5.2.8	Variables de respuesta .....	54
5.2.8.1	Desinfección con dos concentraciones de hipoclorito .....	54
5.2.8.2	Evaluación de tipo de explante y tipo de reguladores en el medio de cultivo	55
5.2.9	Análisis estadístico .....	57
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	57
6.1	Desinfección de explantes con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (ETAPA 1) .....	57
6.1.1	Sobrevivencia de explantes .....	57
6.1.2	Contaminación de medios .....	60
6.2	Evaluación de reguladores de crecimiento (ETAPA 2) .....	63
6.2.1	Formación de callo y brote. ....	63
6.2.2	Contaminación de medio .....	66
6.2.3	Sobrevivencia de explantes .....	67
7	CONCLUSIONES.....	70
8	RECOMENDACIONES .....	71
9	BIBLIOGRAFIA .....	73

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición del agua de coco por 100 g. ....	29
Tabla 3 Factores de estudio (Etapa 1) .....	49
Tabla 4 Factores de estudio (Etapa 2) .....	52
Tabla 5 Tratamientos en Estudio de los reguladores de crecimiento. ....	53
Tabla 6 Análisis de varianza para la variable sobrevivencia de explante .....	58
Tabla 7 Análisis de varianza (A.N.V.A.) para la variable contaminación de medios % .....	61
Tabla 8 Análisis de datos, variable días al inicio de formación de callo y brote .....	63
Tabla 9 Análisis de varianza contaminación de medio .....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ubicación referencial de la Facultad de Agronomía UMSA.....	33
Figura 3 Material ya esterilizado.....	37
Figura 4 Pesado de los Reactivos que compone el Medio de Cultivo.....	38
Figura 5 Adición del medio de cultivo y Reguladores de Crecimiento.....	38
Figura 6 Estabilización del pH.....	39
Figura 7 Adición del agente gelificante Agar Agar.....	40
Figura 8 Dispensación de medios de cultivo.....	41
Figura 9. Esterilizado de Medios de Cultivo.....	42
Figura 10 Muestras de planta madre para el establecimiento <i>In Vitro</i> .....	43
Figura 11 Desinfección de hojas para el establecimiento <i>In Vitro</i> .....	43
Figura 12 Corte de los explantes para el establecimiento <i>In Vitro</i> .....	44
Figura 13 Concentraciones de hipoclorito de sodio 0.5-1%.....	45
Figura 14 Sumersión de muestras de gerbera en Alcohol e Hipoclorito de Sodio.....	46
Figura 15 Siembra de explantes de Gerbera al Medio de Cultivo correspondiente...	47
Figura 16 Diagrama de la unidad experimental vaso.....	50
Figura 17 Croquis de evaluación de desinfección.....	50
Figura 18 Croquis reguladores de crecimiento en el medio de cultivo.....	53
Figura 19 Supervivencia de explante.....	54
Figura 20 Contaminación medio de cultivo de explantes.....	55
Figura 21 Formación de callo y brote.....	56
Figura 22 Contaminación de medio con el tipo de regulador de m crecimiento. .	56
Figura 23 Comparación múltiple de medias Duncan 5%, factor concentración de hipoclorito de sodio.....	58

Figura 24 Comparación múltiple de medias Duncan al 5 %, para el factor Explantes .....	59
Figura 25 Comparación múltiple de medias Duncan al 5 %, para el factor concentración de hipoclorito (%) .....	61
Figura 26 Comparación Duncan para el factor tipo de explante.....	64
Figura 27 Comparación múltiple de medias Duncan para el factor tipo de regulador de crecimiento .....	64
Figura 28 Comparación múltiple de medias Duncan para el factor tipo de regulador de crecimiento. ....	66
Figura 29 Comparación Duncan para el factor tipo de explante.....	68
Figura 30 Comparación múltiple de medias Duncan para el factor tipo de regulador de crecimiento. ....	68

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Plantas madre de Gerbera jamesonii .....	83
Anexo 2 Autoclavado de materiales .....	83
Anexo 3 Cámara de flujo (Irradiación con Rayos U.V.) .....	84
Anexo 4 Materiales para el proceso de desinfección .....	84
Anexo 5 Medio de cultivo Murashige Skoog .....	85
Anexo 6 Regulador de crecimiento AIA.....	85
Anexo 7 Regulador de crecimiento G3.....	85
Anexo 8 Agua de coco (Cocos nucifera) .....	86
Anexo 9 Sacarosa .....	86
Anexo 10 Agente gelificante Agar agar .....	86
Anexo 11 Siembra de explantes.....	87
Anexo 12 Medios de cultivo con diferentes tipos de explante y reguladores .....	88
Anexo 13 Análisis de varianza y pruebas de medias por variable de respuesta .....	88

## 1 INTRODUCCIÓN

Las flores son generosamente extravagantes por su belleza y fragancia; esto es posible porque su función en la naturaleza es atraer a los agentes polinizadores, las flores de corte constituyen cerca de la mitad del mercado de los productos hortícolas, donde los países desarrollados consumen más del 90 %, muchos de los países consumidores no tienen condiciones climáticas ideales para producir flores de corte, por lo que en muchos de estos países las flores crecen en ambientes protegidos, lo cual encarece más la producción. (John Nadgauda, R. S. y Mascararehas, *et al.*, 1998)

La Gerbera (*Gerbera jamesonii* L. Bolus) En 1717 fue descrita por primera vez en forma científica por el botánico Gronovius, y en 1737 el género recibió el nombre gerbera en homenaje al doctor Traugott Gerber, un botánico alemán que se dedicó al estudio de la flora sudafricana es un cultivo exótico, se cuenta con 40 variedades, las cuales han 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. (Mur *et al.*, 2003; Mascarini, 2005.

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica de micropropagación por las cuales los microorganismos se ponen a crecer en medios estériles para reproducirlos e identificarlos. Por medio de esta técnica las plantas u órganos de plantas se pueden multiplicar en gran número, teniendo un crecimiento individual controlado, a través del cultivo de pequeños trozos de tejido vegetal sobre un medio específico con nutrientes en un recipiente estéril. La Gerbera es un cultivo que se vuelve complicado para

exportar ya que los métodos de producción convencional no permiten la producción de éstas en grandes cantidades (Morgan, 2009).

Con el presente trabajo pretende desarrollar la evaluación de la desinfección de ex planes así como también evaluar tres reguladores de crecimiento para generación in vitro del cultivo de Gerbera (*Gerbera jamesonii* L. Bolus)

## **1.1 Antecedentes**

La floricultura ha encontrado un importante aliciente para su crecimiento a partir de los años 1970 cuando comenzó a crecer en términos mundiales. Un conjunto de tecnologías como la creación de plásticos para cubiertas de invernaderos, el riego de precisión como el goteo, la incorporación de abundante y diverso equipamiento, instrumental, logística de movimientos de la mercadería, el transporte por vehículos refrigerados de gran tamaño y el avión, la llevaron a ser una actividad de alcance mundial.

La actividad florícola en el Bolivia nació hace más de 35 años por iniciativa de las familias, en especial en la ciudad de Cochabamba. El cultivo se halla concentrado en tres regiones cochabambinas: Valle Alto, Valle Bajo y el Trópico; se producen principalmente claveles, gladiolos, rosas y crisantemos.

La Gerbera (*Gerbera jamesonii* L. Bolus) 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 reproducción convencional no permiten la producción de estas grandes cantidades (Morgan ,2009).

En la actualidad las técnicas de multiplicación masivas como la micro propagación *in vitro* representa, una alternativa para mejorar la producción de cultivos.

## **1.2 Planteamiento del problema**

Bolivia aún no está preparada para generar calidad y cantidad en flores, no precisamente por falta de tierras productivas, o un clima adecuado para producirlas, sino más bien porque falta desarrollar investigaciones para mejorar las variedades y combatir las plagas que atacan los cultivos.

La floricultura una de las problemáticas que existe con la gerbera es la poca disposición de espacio y tecnología que cuentan los sistemas de producción lo que hace ineficiente el proceso, además la planta ornamental de gerbera presenta considerables dificultades para su propagación por métodos convencionales, ya que las condiciones climáticas favorecen al desarrollo de enfermedades que disminuyen el rendimiento de la planta, por lo que se hace muy necesaria la evaluación de técnicas que puedan usarse como alternativas para su propagación eficiente (AGEXPRONT, *et al.*, 2000).

Otras desventajas para la propagación de flores en Bolivia y que nos restan competitividad en mercados internacionales son: la innovación en los sistemas de riego, el grado de tecnología utilizada, causa por la cual se sigan produciendo flores a campo abierto.

La mano de obra calificada para la producción de flores también es otro problema con el que se debe luchar por la falta de capacitación.

Esta investigación pretende contribuir en parte al desarrollo de una metodología de desinfección con el uso de hipoclorito de sodio al 0.5-1% y reguladores de crecimiento al medio MS y así proponer un protocolo de desinfección que no sea costoso y de reactivos que son recurrentes de uso en los laboratorios. Busca evaluar los reguladores de crecimiento al medio MS como parte de proceso de propagación de plantas de gerbera utilizando segmentos de hoja y raíz.

### **1.3 Justificación**

La biotecnología, como el caso del cultivo de tejidos, ofrece ventajas en la propagación de plantas. Como ejemplo la propagación de muchos individuos en relativamente poco tiempo y espacio. Sin embargo, es necesario generar información que permita implementar estas técnicas para luego comparar sus ventajas. En Bolivia aún no se ha intensificado el uso de la técnica de cultivo de tejidos vegetales para la producción masiva de gerbera (*Gerbera jamesonii* L. Bolus).

El desarrollo de técnicas de propagación in vitro ha contribuido significativamente en la producción, conservación, saneamiento y establecimiento de algunas especies agrícolas y forestales. Estas técnicas son igualmente indispensables en mejoramiento biotecnológico, para lo cual se debe disponer de un sistema de regeneración in vitro eficiente y reproducible que, por medio de organogénesis y posterior enraizamiento de los brotes, permita la obtención de plántulas completas enraizadas a partir de células transformadas. (Suarez et al, 2006; Acosta, 2012).

De acuerdo a lo que indican Murashige Skoog la interacción entre hormonas de crecimiento principalmente auxinas y citoquininas ayudan al desarrollo de los explantes en condiciones *in vitro*, por la misma razón se llega a realizar el trabajo de investigación usando reguladores de crecimiento para un mejor desarrollo y crecimiento de vitroplantas.

Se establece que una forma común de adicionar citocinina natural al medio de cultivo, es con suplemento orgánico como el agua de coco, en el que se encuentran citocininas naturales como la zeatina, aminoácidos, ácidos orgánicos, purinas, vitaminas, azúcares y minerales (Mejía, 1988).

Ante esta problemática se plantea la aplicación de nuevas alternativas biotecnológicas, para abaratar y estimular el uso de vitroplantas en los campos, como una posibilidad de aumentar la producción, incrementando los índices de multiplicación y disminuyendo los costos de los medios de cultivo, mediante el uso de medios líquidos, y substitutos de sustancias químicas por el agua de coco.

Por estos problemas mencionados el productor no llega a cubrir la demanda, ni las exigencias del mercado, por tanto opta por importar flores de otros países presentando mejor calidad floral, de esta manera llegan a satisfacer las exigencias y demandas del mercado interno, por tanto se plantea el cultivo *in vitro* como una alternativa para la propagación de flores, donde las técnicas de cultivo de tejidos ofrecen muchas facilidades para la producción intensiva de material vegetal, libre de enfermedades sistémicas y no sistémicas. Asegurando así una homogeneidad en la producción y alta calidad de flor ya que de estos factores depende la aceptación del mercado.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

Evaluar la desinfección de explantes con tres reguladores de crecimiento para generación *in vitro* de Gerbera (*Gerbera jamesonii*) en el laboratorio de Fitopatología Facultad de Agronomía.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Determinar las diferentes concentraciones para explantes en hipoclorito de sodio al (0.5 Y 1 %) que menor contaminación tenga en el medio de cultivo.

Evaluar la mejor concentración de hipoclorito de sodio (0.5 y 1%) para la desinfección en explantes de gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus).

Evaluar el regulador de crecimiento que mejor favorezca el desarrollo los explantes de gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus).

Evaluar la contaminación y sobrevivencia de explantes de gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) en los diferentes medios de cultivo.

## **3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 Características botánicas del cultivo de gerbera**

La Gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) pertenece a la familia (Asteraceae). Se trata de una planta herbácea, vivaz, de crecimiento en roseta, cuyo cultivo a la intemperie no soporta temperaturas bajas, pero que por arriba de éstas puede durar varios años, aunque comercialmente solo interesa cultivarla durante dos o tres, según las variedades y las técnicas de cultivo empleadas (Soroa, 2005).

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). (Cultivo de Gerbera, Florist de Kwakel B.V. 2004).

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).

Las hojas tienen forma de roseta, son alargadas, de unos 40 cm, y ligeramente hendidas en los bordes; del pecíolo de algunas de ellas evolucionarán 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 (Infoagro, 2003).

Las flores de gerbera forman inflorescencias llamadas capítulos, colocadas individualmente sobre largos pedúnculos de 24 a 45 cm elevados casi verticalmente en su base parcialmente leñosas, a veces aterciopelados y en la parte superior vacíos por dentro. Los capítulos asemejan a grandes margaritas solitarias de 5 a 12 cm de diámetro, estos pueden ser simples, semidobles, o dobles, encontrándose en una gran

diversidad de colores: blanco, crema, amarillo, amarillo-limón, rosa, salmón, anaranjado, rojo, etc. Según sea el cultivar, el color del centro del capítulo (flores masculinas) también varía, se pueden presentar diferentes tonos como: amarillo, rosa, verde, negro. Las inflorescencias dobles pueden ser bicolors (Armendáriz, 1987, citado por Ramírez, 2000). En ocasiones los capítulos llegan a presentar mal formaciones como dos capítulos unidos por un extremo entre sí, pero eso ocurre rara vez (Vergara, 1993; citado por Ramírez, 2000).

Se considera a la gerbera una especie insensible al fotoperiodo, lo que hace que con dos o tres hojas emitidas pueda comenzar a generar inflorescencias. Esto se toma como perjudicial para un ciclo de cultivo normal de esta especie (18–24 meses de producción), por lo cual se habla de un número mínimo de 6-7 hojas/planta, (completamente expandidas) para comenzar a cosechar. Durante ese período de tiempo en el cual se generan estas hojas, se procede a retirar las inflorescencias que se van generando para formar una planta más fuerte (Pallares, 1989; Rogers y Tjia, 1990, citado por Anónimo, 2010).

### **3.2 Importancia del Cultivo**

En el cultivo de Gerbera para la comercialización de flor cortada, la importancia de la gerbera radica en que representa una flor ideal para bouquets por la existencia de Anónimo, ED. Universidad Autónoma del Litoral. (2010). Efecto de un bioestimulante, a base de humus, en el crecimiento y desarrollo de plantas hortícolas y florícolas. Facultad de Ciencias Agrarias. Cultivos intensivos. 38 variedades de diferentes colores.

El mercado de gerbera se destaca por la diversidad de formas y colores de sus varas florales. Presentan capítulos compuestos por flores dobles, semidobles o simples, con centro de color negro o verde, con diversos diámetros y largos de pedúnculos (Garibaldi & Jona, 1989; Mur et al., 2003; Hatamzadeh & Shafyii Masouleh, 2013). Esta heterogeneidad ha provocado la necesidad de generar información específica para cada cultivar o grupo de cultivares, debido a que se han encontrado diferencias importantes de calidad en las unidades comerciales, según la cultivar, manejo agronómico y de postcosecha implementado (Nowak & Rudnicki, 1990; Mur et al., 2003; Nazari et al., 2011). Actualmente las empresas ofrecen continuamente nuevos materiales, pero con escasa información sobre su comportamiento local.

También hay que mencionar la importancia del cultivo industrial de la gerbera en maceta en los últimos años. A nivel mundial, los colores de las flores de gerbera más demandadas son: rosa (incluye tonos fucsias 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).

### **3.3 Origen del cultivo de Gerbera**

La Gerbera es originaria de Transvaal (Africa del Sur); también se conoce como margarita del Transvaal. La gerbera lleva el nombre de Trangott Gerber, un médico alemán que coleccionó muchas plantas, sobre todo en la península danesa de

Jutlandia. Las variedades de cultivo comercial proceden de hibridaciones con especies del sur de Africa (*Gerbera jamesonii* 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).

### **3.4 Clasificación Taxonómica de Gerbera**

**REINO:** Plantae  
**SUBREINO:** Tracheobionta  
**CLASE:** Magnoliopsida  
**SUBCLASE:** Asteridae  
**ORDEN:** Asterales  
**FAMILIA:** Asteraceae  
**GÉNERO:** Gerbera  
**ESPECIE:** *G. jamesonii* Bolus

### **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 retro cruzamientos entre individuos bastantes alejados genotípicamente para conseguir una gran cantidad de semilla y descendientes vigorosos. 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**

El cultivo de tejidos vegetales es el principal aporte de la Biotecnología en la producción. Representa un verdadero potencial para el desarrollo, con un aporte bastante significativo en el crecimiento de la agricultura y la agroindustria (Aguirre y Villarroel, 1998).

Desde hace 120 años aproximadamente, en las investigaciones de fisiología vegetal, se ha utilizado la técnica de cultivo de tejido, órganos y células vegetales. Estas técnicas consistieron en cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y de tallo, primordios de hoja o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo y hoja y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen. (Street, 1991; citado por Hurtado y Merino, 1994).

El cultivo de tejidos vegetales en el área de la Biotecnología vegetal, abarca un conjunto de técnicas que consisten en cultivar en condiciones controladas diferentes partes de la planta. Constituyen estudios básicos aplicados en la Micropropagación de especies, y como modelo para estudios fisiológicos, bioquímicos, genéticos y morfológicos (López, 1990).

El cultivo in vitro consiste en tomar una porción de una planta (a la que se denominará explante, como por ej. el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristema, embrión, nudo, semilla, antera, etc.) y colocarla en un medio nutritivo estéril (usualmente gelificado, semisólido) donde se regenerarán una o muchas plantas. La formulación del medio cambia según se quiera obtener un tejido diferenciado (callo), crecer yemas y raíces, u obtener embriones somáticos para producir semillas artificiales. Uno de los factores más importantes a tener en cuenta para lograr la respuesta morfogenética deseada es la composición del medio de cultivo. No existen dudas que, en todo intento de propagación vegetal, ya sea in vitro o in vivo, el carácter del proceso de diferenciación depende del genoma de la especie, y que está regulado por el balance hormonal propio y por el estado fisiológico del órgano, tejido o célula

puesta en cultivo. Sin embargo, también se sabe que ese balance puede ser modificado por el agregado de compuestos que imiten la acción de las hormonas vegetales. Estos compuestos se denominan reguladores del crecimiento, y se emplean en los medios de cultivo para conseguir la micropropagación de una planta (Muñoz 2006)

### **3.5.3.1 Micropropagación *in vitro***

Se entiende por micropropagación a cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación en plantas, de órganos tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente (Murillo, 2014).

Según Medina (2005), la micropropagación consiste en tomar células o tejidos de la planta, preferiblemente de origen meristemático, que se encuentran en las yemas. Lo que se hace en el laboratorio es programar esas células para que formen tallos, luego se multiplican esos tallos y se aplica un programa de enraizado, es decir, se cambian las condiciones hormonales para que forme raíz. Una vez que la planta está completa y que puede absorber nutrientes por raíz, se lleva a un invernadero.

Carrillo (2004), señala que esta técnica se usa para propagar plantas a partir de plantas madres por lo que las plántulas obtenidas son idénticas a la planta madre.

Hartmann y Hudson (1997), indican que la propagación mediante cultivo *in vitro* se caracteriza por las tasas potencialmente altas para multiplicación de clones que pueden lograrse en un tiempo relativamente corto las tasas teóricas mencionan que de una plantita multiplicada geométricamente se puede predecir llegar a un millón

plantitas en 6 meses (con una tasa de 10 cultivos mensuales). Pero en la práctica se ha obtenido de 1 a 3 millones de plantas de helecho, fresa, lirio y orquídeas.

La micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. El cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tiene las células vegetales; esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados (INTA, 2010).

Espinoza (2013), menciona que la propagación *in vitro*, también denominada micropropagación, es la aplicación más completa de cultivo de tejidos, de mayor impacto y más ampliamente utilizado en todos los laboratorios de biotecnología vegetal. Consiste en producir plantas conformes a la planta madre por las estimulaciones de capacidades naturales de multiplicación vegetativa de la especie por la inducción de una nueva organogénesis de brotes y raíces. La micropropagación aplicación en la multiplicación rápida de variedades nuevas o introducidas recientemente, o en aquellas especies que tienen un bajo porcentaje de reproducción, también es usado ampliamente en programas de mejoramiento genético.

#### **3.5.3.1.1 Ventajas de la Micropropagación**

Murillo (2014), señal las siguientes ventajas que presenta la micropropagación *in vitro*:

a) Mayor rapidez en la introducción de productos. La micropropagación puede introducir un producto en el mercado más rápidamente que los métodos comerciales: selección individual de las plantas elites, altos coeficientes de propagación, uniformidad en las plantas producidas, elevada producción en espacios reducidos.

b) Mayor calidad del producto. El valor del producto se incrementa como consecuencia de: plantas libres de enfermedades, mejoramiento del fenotipo de las plantas.

c) Mayor facilidad en la comercialización. La comercialización de las plantas micro propagadas se facilita debido a: flexibilidad en la forma del producto, facilidades en la transportación y embarque, producción durante todo el año.

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 de la Micropropagación**

Espinoza (2013), menciona que esta fase es de suma importancia para garantizar el éxito del proceso de micropropagación, en esta etapa se selecciona el material vegetal que se utiliza como material de partida o fuente de explante. Debe provenir de plantas sanas y vigorosas, escogiendo aquellas plantas que se destaquen en la población a fin de garantizar la propagación de un material con la mayor calidad desde el punto de vista genético y sanitario.

Inicialmente, esta fase fue concebida para tratar de reducir los problemas de contaminación que presentan comúnmente en la Fase I.

Sin embargo, en la actualidad existe un consenso de que esta etapa es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de micropropagación eficiente y repetible, por lo que cada vez se la va prestando mayor importancia. Tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso tanto desde el punto de vista sanitario, fisiológico como genético (Pérez ,1998; citado por Murillo, 2014).

La iniciación de un proceso de micropropagación solo tiene sentido cuando se emplea un material adecuado. La constitución genética de la planta es el primer factor relacionado con la frecuencia de variantes somaclonales resultante del proceso de propagación.

Pérez (1998), indica que en plantas ornamentales es común que la selección se realice sobre plantas micropropagadas las cuales son cultivadas en condiciones controladas (invernaderos) o áreas aisladas, lo cual evita una serie de riesgos, facilita la

reimplantación in vitro y además mejora el proceso de selección. El estado fisiológico de la planta que dona el explante es de gran influencia en la respuesta de los tejidos en cultivo, reportándose diferencias en los requerimientos nutricionales y hormonales cuando los tejidos provienen de plantas con diferentes edades fisiológicas. Generalmente se utilizan plantas en estado de crecimiento activo que muestran un desarrollo vigoroso y sano.

### **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 Explante**

Moya (2001), menciona que el explante se refiere a cualquier parte vegetal que ha sido separada de la planta, que puede ser un tejido (fragmento de hojas, tallos, raíces completas, etc.), estructuras como las anteras y los ovarios, o bien células individuales (como en el caso de los protoplastos). Con excepción de los óvulos y el polen, los explantes están constituidos por tejidos y/o células somáticas. Los explantes tomados de plantas jóvenes o de zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que

aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo. A medida que es más joven y menos diferenciado del tejido que se va implantar, mejor será la respuesta *in vitro*. El tamaño del explante es un factor importante que influye en la desinfección y regeneración de las plantas, a medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración, mientras que con el aumento del tamaño del explante es mayor el peligro de contaminación y más rápido el crecimiento y la regeneración de la planta (Villalobos y García, 1982). Murillo (2014), indica que la selección de un adecuado explante inicial determina mejores resultados en la regeneración o formación de las plantas *in vitro*. La sección de tejido utilizada varía en dependencia de las características morfológicas de las diferentes especies, como regla general, se toma las yemas del tallo principal y de los brotes axilares de las plantas.

### **3.7 Medios de Cultivo**

Según González (2003), el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) para el normal desarrollo de una planta se ha empleado de una manera muy general para todos los tipos de cultivo "*in vitro*". Además, puede afirmarse que ha sido la utilización del medio MS, junto con el empleo de fitohormonas apropiadas (citoquininas y auxinas), lo que ha permitido el éxito de los trabajos sobre organogénesis en cultivo "*in vitro*".

Generalmente, las células en crecimiento pueden fabricar sus proteínas a partir de fuentes adecuadas de nitrógeno y carbohidratos suministradas por el medio de cultivo; sin embargo, existe además una cantidad de sustancias orgánicas adicionales que se requieren en cantidades mínimas y que son muy activas en el crecimiento (Volker y Lehmann, 2000).

Espinoza (2013), se da el nombre de medio de cultivo al sustrato artificial de composición completa, utilizado para el crecimiento y desarrollo de las vitroplantas. El medio de cultivo permite de forma artificial y bajo condiciones estériles puedan vivir y multiplicarse células, tejidos y órganos separados del tejido que les dio origen. Los medios de cultivo contienen macronutrientes, micronutrientes, además de carbohidratos, usualmente la sacarosa puede remplazar el carbono que la planta normalmente fija en la atmosfera por medio de la fotosíntesis y compuestos orgánicos en pequeñas cantidades como vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento

### **3.7.1 Composición del Medio de Cultivo**

Los medios de cultivo deben ser preparados con sumo cuidado, ya que los diversos productos que los 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).

Los microorganismos requieren una serie de nutrientes para su desarrollo, crecimiento y formación de nueva biomasa. Estos nutrientes pueden ser los macronutrientes, que son requeridos en grandes cantidades, como el C, N y P; y micronutrientes que se requieren en pequeñas cantidades como el K, Cu, Ni y Mo (Atlas y Bartha, 2001).

### **3.7.1.1 Sales Inorgánicas**

Se dividen en macro y micro nutrientes, esta división se basa en la cantidad que absorben las plantas ciertos elementos: calcio, magnesio, potasio, nitrógeno, fósforo y azufre son requeridos por las plantas en grandes cantidades (g/l) y se les llama macronutrientes. Otros como el hierro, magnesio, boro, cobre, zinc, 25 molibdeno y cloro, se requieren en pequeñas cantidades (mg/l o ppm) y se llama elementos traza o micronutrientes (Barba, 2001).

Murillo (2014), 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 traza de otros llamados micronutrientes. 3.12.2 Compuestos Orgánicos Los compuestos orgánicos se clasifican en cuatro grupos importantes: carbohidratos o fuentes de energía, sustancias hormonales, vitaminas y aminoácidos (Espinoza, 2013).

Hurtado y Merino (1962), indican que se clasifican en tres grupos: carbohidratos, sustancias hormonales y vitaminas. Frecuentemente se ha obtenido buenos resultados cuando se emplean también ciertos aminoácidos y /o amidas, algunas purinas, pirimidinas, hexitoles y ácidos orgánicos.

### **3.7.1.2 Fuentes de carbono**

La sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente utilizada y se emplea a una concentración de 2-4%. 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).

Según Espinoza (2013), el compuesto más usado como fuente de energía es la sacarosa considerada esencial en los medios de cultivo, se puede usar también otros carbohidratos como la glucosa, fructosa, lactosa, sorbitol y el azúcar común, 26 es recomendable usar azúcar morena porque mientras menos procesada sea el carbohidrato menos contaminación existe en los medios de cultivo.

### **3.7.2 Reguladores de crecimiento**

Según IBTEN (2002), menciona que los compuestos orgánicos se clasifican en tres grupos: fuentes de carbono, hormonas, vitaminas, aminoácidos y ácidos orgánicos.

Los reguladores o hormonas de crecimiento: se utilizan propiamente cuatro grupos de reguladores de crecimiento; auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscísico. En algunos casos se utiliza el etileno.

#### **3.7.2.1 Auxinas**

Soberón et al., (2005), afirma que las auxinas promueven el crecimiento en tallos, causan la formación de raíces adventicias, inhiben el crecimiento en raíces en concentraciones bajas. Promueven la dominancia apical, favorecen la floración, inducen la diferenciación vascular, retardan la abscisión de hojas, flores y frutos jóvenes, estimulan la formación de raíces adventicias de tallos y hojas.

Espinoza (2013), menciona 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 pchlorofenoxiacético), 2,4-D (Diclorofenoxiacético) siendo esta la más importante y mundialmente usada en los medios de cultivo para las células y tejidos con finalidad de obtener callos porque ocasionan 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.

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 auxinica en células cultivadas se considera de la siguiente manera 2,4-D>ANA>AIB>AIA (Murillo, 2014).

Las más conocidas son:

- Acido 3-indolacético..... AIA (Muy termolábil)
- Acido 3-indolbutírico..... AIB
- Acido naftalenacético..... ANA
- Acido 4-clorofenoxiacético..... CPA
- Acido 2,4-diclorofenoxiacético..... 2,4-D
- Acido 3,6-dicloro-2-metoxibenzóico..... Dicamba
- Acido 2,4,5 triclorofenoxiacético..... 2,4,5-T
- Acido 4 amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico. Picloram

### 3.7.2.2 Citoquininas

Soberón et al., (2005), menciona que las citoquininas son un grupo de hormonas que regulan la división celular. Derivan de la adenina o de aminopurinas. Las diferentes cadenas laterales se unen al nitrógeno del carbono 6. Pueden presentarse como: bases libres (que constituyen las formas activas de las citoquininas), o bien ribonucleósidos, ribonucleótidos y glicósidos. La primera citocinina natural aislada fue la zeatina [N-(4-hidroxi-3-metil-2butenil) aminopurina].

Son consideradas citoquininas aquellas sustancias químicas que pueden estimular principalmente la división celular citocinesis (Espinoza, 2013).

Murillo (2014), indica que las posibles respuestas con citocininas son: división celular, inducción a la formación de tallos y proliferación de yemas axilares, inhibición de la formación de raíces.

Espinoza (2013), casi todas las citoquininas son sintéticas y derivadas de la adenina dentro de este grupo se encuentra la kinetina (6-furturil amino-purina), BAP (6 benzil amino-purina), 2ip (6 dimetil alil purina), y la zeatina (6 hidroxil 3 metil, 2 butenil) adenina, esta última es considerada citoquinina natural porque es extraída del endospermo del maíz. Las citoquininas realizan su efecto incrementando la división celular, dicha acción está relacionada con la presencia de auxinas.

Portillo (1999), menciona que las citoquininas son utilizadas en concentraciones que varían según la especie, pero generalmente se usan en concentraciones de 0,03 a 30 mg/l. Son derivadas de la adenina y dentro de este grupo están:

N <sup>6</sup> Bencil aminopurina.....	BAP
N <sup>6</sup> Dimetilalil aminopurina.....	2iP
N <sup>6</sup> Furfuril aminopurina.....	Kinetina
N <sup>6</sup> (4-hidroxi, 3-metil, 2-butenil) adenina.....	Zeatina

### 3.7.2.3 Giberalinas

Otro regulador de crecimiento es el Ácido Giberélico (AG3), aunque no tiene un uso muy 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 y totora. (Espinoza, 2013).

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

### 3.7.3 Complejos Naturales

Abdelnour y Vincent (1994), menciona que una gran variedad de sustancias de composición indefinida ha sido utilizada para enriquecer los medios de cultivo. Entre ellos se mencionan: extracto de malta, agua de coco, extracto de levadura, caseína hidrolizada, jugo de naranja y tomate.

Los resultados acumulados de los estudios realizados en esta temática, se resumen de la siguiente forma: en un total de 166 pruebas (con preparaciones de fuentes naturales) con 63 compuestos, 123 dieron una respuesta positiva, mientras que 40 no dieron respuesta o fueron negativos. El análisis de los resultados de estas pruebas, refuerza el hecho de que diversos tejidos responden diferentemente a varios suplementos (García, 2000).

### **3.7.3.1 Características del agua de coco**

En 1942, Van Overbeek, Conklin y Blackeslee (citados por Ball, 1946). mostraron que los embriones en desarrollo de *Datura* se podían cultivar *in vitro* hasta su madurez, utilizando el endospermo líquido de coco (Coco nucífera) como suplemento. Rápidamente aparecieron otros usos de agua de coco.

Caplin y Steward (1948), se dieron cuenta del potencial del agua de coco para inducir la división celular en tejidos diferenciados; lo observaron por primera vez en el parénquima del floema secundario de la raíz de la zanahoria cultivada, se sabía que el agua de coco al ser nutritivo para los embriones inmaduros, podía producir el mismo efecto en tejidos y en células explantadas.

Según IBTEN (2002), indica que se han empleado varios materiales de composición desconocida para establecer cultivos, cuando no se ha logrado hacerlo con sustancias conocidas; en ocasiones, esos materiales estimulan un crecimiento extra. Frecuentemente se ha empleado como última alternativa después de que todos los ingredientes definidos del medio han fallado en el establecimiento de cultivos de

células y órganos. Ejemplo de estas preparaciones son las siguientes: endospermo de coco (10% – 20% v/v), extracto de malta, pulpa de plátano, etc.

Existe una lógica bien documentada tras el uso de sustancias líquidas como el caso del agua de coco que se encuentran en forma natural, con el uso individual de esta sustancia se obtiene poco efecto por encima del esperado, parece que las sustancias de esta naturaleza pueden desempeñar un papel pequeño pero significativo en la estimulación del crecimiento en los tejidos de explantes, mediante la división celular.

Roca y Mroginski (1991), menciona que un paso importante en el desarrollo de las técnicas actuales para estimular la división celular de explantes fue la observación de que el agua de coco, a niveles relativamente bajos (5% – 10% v/v), podía interactuar con los hormonas (auxinas, citocininas) y promover el crecimiento, en situaciones en que por sí sola era ineficiente, un medio de cultivo general (preparado con reactivos analíticos), con un suplemento de agua de coco, muy raras veces resulta tóxico o deficiente a causa de los microelementos.

Se establece que una forma común de adicionar citocinina natural al medio de cultivo, es con suplemento orgánico como el agua de coco en el que se encuentran entre otras citocininas naturales como la zeatina, aminoácidos, ácidos orgánicos, purinas, vitaminas, azúcares y minerales (Mejía, 1988).

Se ha demostrado que el agua de coco es útil para estimular la proliferación de retoños en muchas especies de plantas. El agua de coco debe ser preparado de los cocos seleccionados filtrados y esterilizados para su utilización, Debe usarse agua de coco a una concentración de (5% – 20% v/v) (Mejía, 1988).

Una gran parte de los trabajos realizados sobre cultivo de tejidos ha girado alrededor del uso del agua de coco (AC) en presencia o ausencia de AIA, ANA ó 2,4-D. En caso de los tejidos recalcitrantes, se debería ensayar también una amplia gama de otros compuestos conocidos por sus propiedades estimuladoras de crecimiento (Pérez y Col., 1998). El agua de coco tiene un amplio uso en medios de cultivo de caña de azúcar, en esta sustancia se ha encontrado reguladores de crecimiento: auxinas y giberelinas, las cuales están en menor concentración que las citoquininas (Margar, 1988).

### **3.7.3.2 Composición del agua de coco**

El agua de coco es un medio muy complejo, con una amplia gama de componentes orgánicos e inorgánicos; tiene buena capacidad de amortiguación (buffer) y no es raro encontrar sales en ella, rica en magnesio y fosfato, el contenido de azúcar, de alrededor de 2,5%, adicionalmente, nitrógeno no proteico soluble en forma de aminoácidos, auxinas, giberelinas, y citocininas. En Bolivia existen dos variedades de *Cocos nucifera* L.: la criolla cocotero de porte alto, coco de forma ovoide y consistencia más carnosa; y la híbrida de porte bajo, coco de forma redonda con más contenido líquido ó agua de coco, las propiedades físicas - químicas que presentan se muestra en el siguiente cuadro:

**Tabla 1 Composición del agua de coco por 100 g.**

<b>Composición por 100 g</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidad</b>
Humedad	93,0	%
Proteína	0,3	g
Azúcares totales	5,0	%
Hidratos de carbono	0,28	%
Grasa	0,50	%
Calcio	20,0	mg
Fósforo	13,0	mg
Hierro	0,3	mg
Vitamina C	2,0	mg

Fuente: CIAT – JICA, 1994

Aunque todavía no se conocen completamente todas las fracciones del agua de coco, se sabe bastante sobre ellas. Llegará el día en que este líquido nutritivo sea remplazado por un medio completamente identificado; mientras tanto, su uso se justifica, no sólo por su excelente capacidad amortiguadora sino también porque sus cualidades promotoras de crecimiento frecuentemente son superiores en su totalidad a las de otros medios conocidos.

Además, en aquellas áreas donde crece el coco es significativamente más barato que compuestos purificados ó sintéticos tales como la zeatina o el inositol (Roca y Mroginski, 1991).

**Tabla 2 Algunos componentes del agua de coco**

<b>Componentes</b>	<b>Sustancias</b>
Aminoácidos	Aspártico, Glutámico, Serina, Aminobutírico, Asparagina, Glicina, Treonina, Histidina, Lisina, Valina, Metionina, Arginina, Fenilalanina, Tirosina, Prolina, Homoserina, Hidroxiprolina, $\beta$ – Alanina.
Vitaminas	Acido nicotínico, Acido pantoténico, Biotina, Riboflavina, Acido fólico, Tiamina, Piridoxina, Acido ascórbico.
Azucares	Glucosa, Sacarosa, fructosa.
Sustancias de crecimiento	Auxina, Giberelina, 1,3 – Difenilurea, Citocinina, Zeatina, Glucósido de zeatina, Ribósido de zeatina.
Ácidos orgánicos	Shikímicos, Pirrolidona-carboxílico, Succínico, málico, cítricos y desconocidos.
Otros compuestos nitrogenados	Amonio, Etanolamina, Dihidroxifenilalanina

Fuente: Roca *et. al.* (1991)

Del agua de coco se han aislado purinas (por ejemplo: adenina y uracilo) y hay fracciones que muestran la presencia de compuestos polifenólicos como las leucoantocianinas, que pueden promover la división celular. Se han identificado, pero no aislado: las adenilcitocininas, ZEA y ribosido de zeatina (Letham, 1974; Van Staden

*et al.*, 1974); la zeatina es la citoquinina natural más activa, siendo diez veces más potente que la cinetina.

Desde hace mucho tiempo se sabe que se puede obtener un efecto sinérgico entre una auxina y los factores de crecimiento como los encontrados en el agua de coco.

Por lo tanto, en la práctica sería deseable, por lo menos al principio cuando se está tratando de iniciar nuevos cultivos, contar con una serie de tratamientos con agua de coco y otros sin esta sustancia (Roca y Mroginski, 1991).

El cuadro 3 suministra un análisis representativo de ciertos compuestos de nitrógeno libre en el agua de coco de nueces provenientes de Puerto Rico, particularmente es rica en alanina y ácido aminobutírico.

#### **3.7.4 Agentes Gelificantes**

La mayoría de los medios utilizados incluye un gelificante que impida que el explante se sumerja en el medio. Generalmente se utiliza Agar- Agar en concentraciones de 6-8 g/l o Gelrite en concentraciones de 1,5-3 g/l (Seemann, 1993). En general las sustancias nutritivas empleadas en los medios de cultivo, son gelificantes con agar, el cual forma un complejo coloidal con débil poder de retención iónica (Mangara, 1988; citado por Weldt, 2008). Según Ibrahim (1994), el Agar- Agar es el agente gelificante más utilizado en los cultivos *in vitro*, ya que presenta numerosas características deseables, las cuales son, claridad, estabilidad y ser un agente inerte. Espinoza (2013) indica que, 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 soporte. La concentración de dichas sustancias está determinada generalmente por la calidad del agar, este añadido al medio de concentración de 6 a 9 g/l para medios sólidos y 2 a 4 g/l para medios semisólidos.

### **3.7.5 Acidez del Medio de Cultivo**

SEEMANN (1993), indica que el pH se debe regular antes de adicionar el gelificante y debe estar entre los valores 5 y 6,5, debido a que los valores menores o mayores pueden detener el crecimiento del explante. Una vez ajustado el pH del medio, este sufrirá una ligera acidificación progresiva como el resultado de la absorción de algunos componentes del medio, así como de la excreción de exudados por parte del explante, pudiendo producir así la licuación del medio de cultivo (George y Sherrington 1984).

### **3.7.6 Asepsia.**

La asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito. Para establecer cultivos asépticos es necesario: a) trabajar en ambientes adecuados; b) esterilizar los medios de cultivo; c) desinfectar superficialmente los explantes, para liberarlos de microorganismos exógenos y d) Manejar adecuadamente las normas de asepsia. Es generalizado el uso de etanol (70 % v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1 al 3 %. Con menor frecuencia se usan

el hipoclorito de calcio  $[Ca(OCl)]_2$ , del 6 al 12 % y el cloruro de mercurio ( $HgCl_2$ ) del 0.1 al 1.5 %. En algunos casos es útil agregar algún agente tensoactivo (por ejemplo, Tween-20, del 0.01 al 0.1 %). No es necesario cuando se incluye un primer lavado con etanol. Posteriormente es necesario dar varios lavados con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar. Por último, vale tomar en cuenta que la desinfección debe eliminar los microorganismos con el menor daño al explante (Perla 2007).

## 4 LOCALIZACIÓN

### 4.1.1 Ubicación del laboratorio

El trabajo de investigación se realizó en dependencias del laboratorio de Fitopatología de la Carrera de Ingeniería Agronómica, Facultad de Agronomía perteneciente a la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), ubicada en la Zona San Pedro, Calle Héroes del Acre N° 1543 del Departamento de La Paz, Provincia Murillo una altitud de 3650 m.s.n.m, a  $16^{\circ} 30' 00''$  latitud Sur y  $68^{\circ} 08' 00''$  longitud Oeste del Meridiano de Greenwich.



**Figura 1 Ubicación referencial de la Facultad de Agronomía UMSA.**

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Materiales

#### 5.1.1 Material Vegetal

El material que se utilizó fueron explantes de hojas y raíz de Gerberas (*Gerbera jamesonii* L. Bolus) (planta madre).



**Figura 2. Planta madre de Gerbera (*Gerbera jamesonii*)**

#### 5.1.2 Materiales para la Desinfección de laboratorio

- 150 ml de Alcohol al 70%.
- Alcohol al 96% (puro)
- 150 ml de Hipoclorito de Sodio al 3%.
- Jabón desinfectante
- Agua destilada y autoclavada,
- 3 probetas de 250 ml.
- 4 baldes.

### **5.1.3 Materiales de laboratorio y equipos**

- Autoclave, (vapor bajo presión),
- Balanzas (analítica y precisión)
- Cámara de flujo laminar de aire
- Horno microondas
- pH-metro
- Agitador magnético
- Refrigerador
- Destilador de agua.
- Pipetas
- probetas (250 ml)
- Vasitos de vidrio cocteleros
- Placas petrí
- Vaso de precipitación
- Varilla de vidrio.

### **5.1.4 Materiales para Desinfección de explantes**

- 150 ml de Alcohol al 70%.
- 150 ml de Hipoclorito de Sodio al 3%.
- Alcohol al 96% (puro)
- Jabón desinfectante
- Agua destilada y autoclavada,
- 3 probetas de 250 ml.
- 8 vasos precipitados

### **5.1.5 Insumos para la Preparación de Medio de Cultivo**

- Solución de Murashige y Skoog Basal 4.33 g/l.
- Reguladores de crecimiento AIA (Ácido indolacético, G3 y agua de coco.
- Hidróxido de sodio (NaOH) 1M,

- Sacarosa 30 g/l.
- Agar 6 g/l.
- Microondas
- Papel aluminio

#### **5.1.6 Insumos para la Introducción de Explantes**

- Mechero a alcohol.
- 5 cajas Petri autoclavadas.
- Alcohol desinfectante liquido
- Plastifilm .
- 5 pinzas.
- 10 hojas de bisturí del N° 14.
- 2 vasos precipitados

#### **5.1.7 Indumentaria y materiales de asepsia:**

- Guardapolvos
- Barbijos
- Detergente
- Jabón desinfectante antibacterial,
- Algodón
- Guantes de látex desechables.

#### **5.1.8 Materiales de gabinete**

- Computadora
- Impresora
- Calculadora
- Cámara fotográfica
- Planillas
- Marcador indeleble
- Etiquetas

## 5.2 METODOLOGÍA.

### 5.2.1 Desinfección y establecimiento a condiciones *in vitro* del material:

Todos los instrumentos que se utilizaron fueron desinfectados mediante inmersión en alcohol al 70% (v/v), en una solución de hipoclorito de sodio al 3% (v/v) y posteriormente se realizó tres enjuagues sucesivos con agua destilada.

Los instrumentos y la cristalería se envolvieron en papel madera y se colocaron dentro de la autoclave. Se esterilizó por 20 minutos a 121°C y 1 atmósfera de presión.

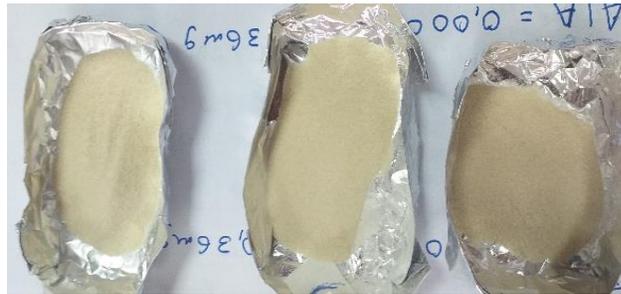


**Figura 3 Material ya esterilizado.**

### 5.2.2 Preparación del Medio de Cultivo.

El medio elegido para la introducción y desarrollo del material vegetal fue el medio basal de Murashige y Skoog (1962) según lo recomendado por (Hurtado en el año 1994).

Para la preparación del medio de cultivo se pesó en una balanza analítica, como se observa en la Figura 6 todos los reactivos requeridos los cuales son: Medio basal Murashige Skoog, más reguladores de crecimiento (AIA, G3 y agua de coco), agente gelificante Agar, Sacarosa, de acuerdo al requerimiento necesario de la cantidad de medio de cultivo a preparar para el trabajo de investigación.



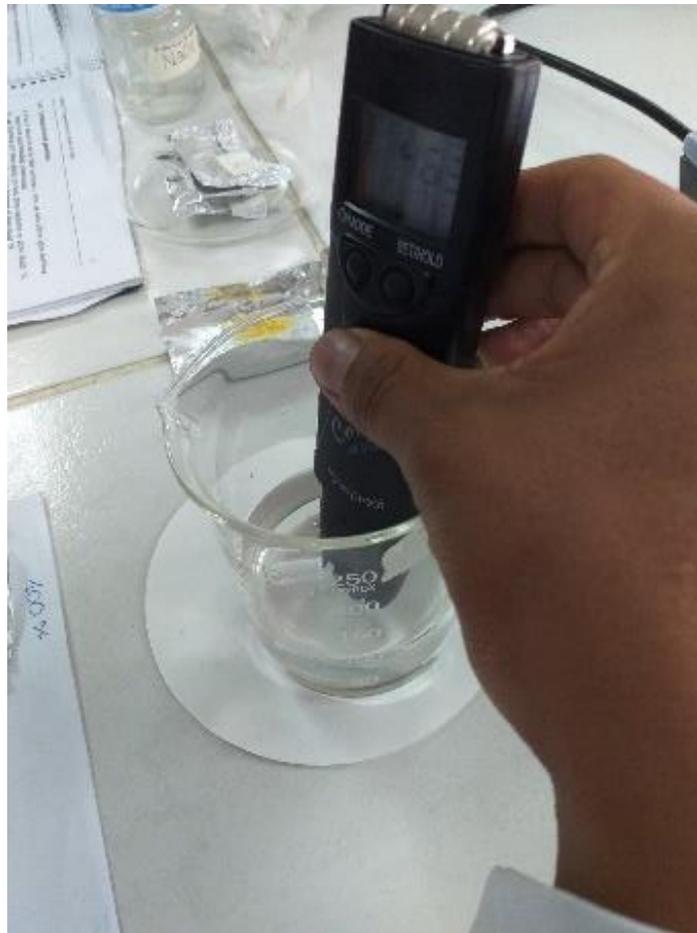
**Figura 3 Pesado de los Reactivos que compone el Medio de Cultivo.**

Una vez pesado los reactivos se introdujieron los mismos a un vaso de precipitado con un contenido de con el 50% ml de agua autoclavada utilizando el agitador magnetico.

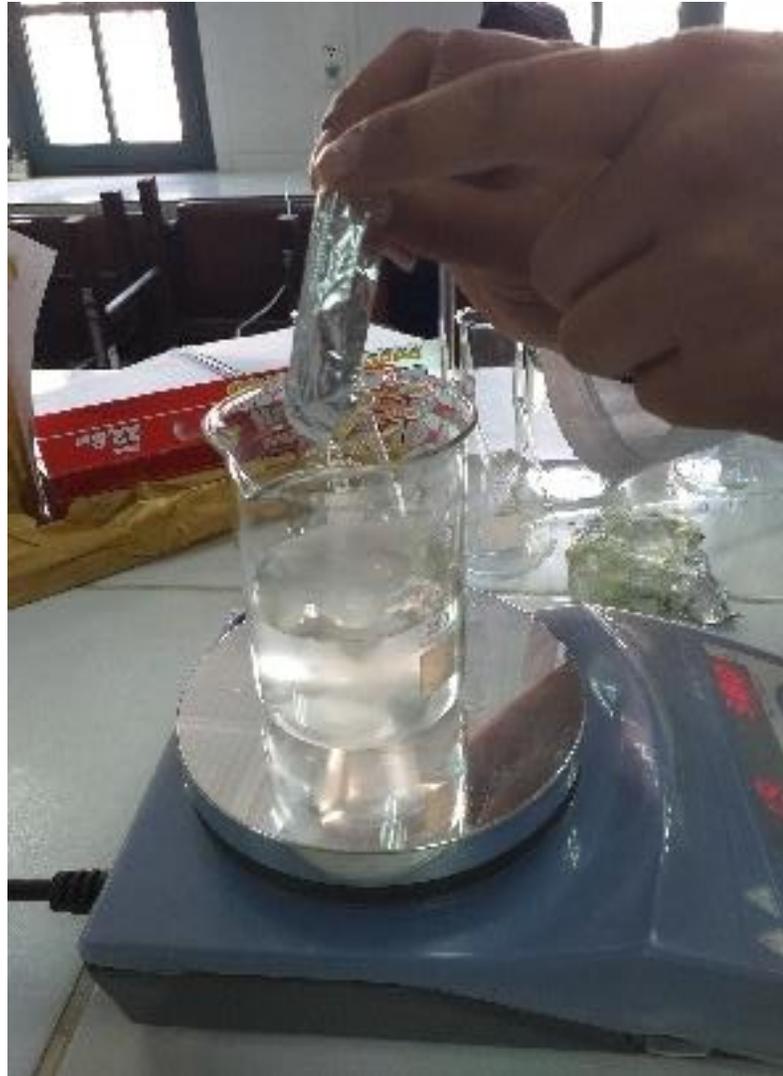


**Figura 5 Adición del medio de cultivo y Reguladores de Crecimiento.**

Posteriormente a la adición del medio de cultivo y reguladores de crecimiento figura 5, se realizó la medición de la acides (pH) del medio de cultivo como se observa en la Figura 6, el mismo debe encontrarse estabilizado en un rango de 5,6 a 5,8. Si el pH se encuentra en un rango menor a 5,6 se le adiciona hidróxido de sodio NaOH en una concentración de 0,1 Normal, si el pH se encuentra en un rango mayor a 5,8 se le adiciona Acido Clorhidrico HCL en una concentración de 0,1 Normal.



**Figura 4 Estabilización del pH.**



**Figura 5 Adición del agente gelificante Agar Agar**

Seguidamente se disolvió el agente gelificante Agar con la ayuda del agitador magnético, disuelto el agar en la solución del medio de cultivo se llevó a un microondas con una potencia de 700 W durante un tiempo de 2 a 3 minutos hasta obtener una solución homogénea, se distribuyó 10 ml de medio de cultivo a cada vaso de vidrio con la ayuda de un dispensador.



**Figura 8** Dispensación de medios de cultivo.

Cada vaso que contenía medio de cultivo se tapó con papel aluminio y se selló todo el borde superior de cada vaso con plastifilm de manera inmediata como se observa en la Figura 7, con la finalidad de evitar cualquier tipo de contaminación fuera y dentro del autoclave.

Posteriormente al sellado de los vasos se realizó la correspondiente identificación de cada uno de ellos de acuerdo a cada tratamiento en estudio.

Después de haber realizado el tapado y sellado e identificación correspondiente de cada vaso de vidrio que contienen medio de cultivo de acuerdo a cada tratamiento de estudio, se llevo al autoclave de presión de vapor como se observa en la Figura 8 a una temperatura de 121°C y 15 libras de depresión durante un tiempo de 10 minutos.



**Figura 9. Esterilizado de Medios de Cultivo.**

### **5.2.3 Preparación del Material Vegetal.**

Para la preparación del material vegetal se seleccionó de la planta madre hojas y raíz que serán desinfectados en varias partes con presencia de una yema lateral para cada muestra, el tamaño de la muestra debe ser de aproximadamente 10 mm como se muestra en la Figura 12, con la finalidad de reducir el riesgo de contaminación, mientras más pequeña sea la muestra menor será el riesgo de contaminación.



**Figura 10** Muestras de planta madre para el establecimiento *In Vitro*



**Figura 11** Desinfección de hojas para el establecimiento *In Vitro*



**Figura 12 Corte de los explantes para el establecimiento *In Vitro***

## **5.2.4 Desinfección del material vegetal**

### **5.2.4.1 Desinfección de explantes**

Para la desinfección del material vegetal, las muestras se lavaron con agua, para retirar todas aquellas partículas que se encuentren alojadas en el material vegetal a desinfectar, retiradas las partículas se debe introducir el material vegetal en un frasco donde se agregó detergente concentrado, durante 20 minutos se agito el frasco y posteriormente el enjuague de las muestras. Se realizo la preparación para las concentraciones de hipoclorito de sodio 0.5-1% (v/v)



**Figura 13 Concentraciones de hipoclorito de sodio 0.5-1%**

Se llevo a la cámara de flujo laminar de aire, donde se esterilizaron dentro de un vaso por inmersión, en una solución de alcohol de 150 ml al 70 % de concentración (v/v) durante 10 segundos agitándose de manera constante.

Pasado los segundos establecidos se retiró el alcohol en otro recipiente, retirado el alcohol se añadió agua destilada y autoclavada para enjuagar y retirar los restos de alcohol que habían quedado, seguidamente se llevó a sumergir las muestras de gerbera *Gerbera (Gerbera jamesonii H. Bolus)* durante 10 minutos en la solución de hipoclorito de sodio al 3% (v/v), como se observa en la Figura 14.



**Figura 14 Sumersión de muestras de gerbera en Alcohol e Hipoclorito de Sodio.**

Después del tiempo establecido se enjuaga con agua destilada y autoclavada hasta retirar el hipoclorito de sodio tanto para la concentración 0.5 y 1 por ciento, estos enjuagues con agua destilada y autoclavada, se hizo tres veces por un tiempo de 3 minutos con la finalidad de retirar todo residuo de alcohol e hipoclorito de sodio usado

### **5.2.5 Introducción del Material Vegetal.**

Previamente el material de apoyo a usar para la siembra (mandil, barbijo, guantes, cajas petri, bisturís, mechero, sanitizador, pinzas y otros), fueron llevados a la cámara de flujo laminar donde fueron esterilizado con rayos U.V. durante 10 min.

Terminada la esterilización se procedió a realizar la siembra de los explantes de gerbera con muestras desinfectadas, juntamente con los medios de cultivo, se

realizaron cortes a los extremos basales de las muestras debido al daño que sufrieron los tejidos por los agentes desinfectantes, con la ayuda de las pinzas se introdujeron las muestras a los vasos de vidrio que contienen medio de cultivo con la debida asepsia en el material que se está usando para la siembra, con la finalidad de evitar contaminación, como se muestra en la Figura 15, al finalizar la siembra los vasos de vidrio fueron flameados a lo largo de los bordes superiores y fueron sellados con plastifilm e identificados con los tratamientos correspondientes, los mismos se llevaron a la sala de crecimiento o sala de incubación donde se cuenta con ambientes controlados mínimamente requeridos, con temperaturas de 25-27°C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad regulados por un temporizador analógico.



**Figura 15 Siembra de explantes de Gerbera al Medio de Cultivo correspondiente**

### **5.2.6 Toma de Datos**

La evaluación y análisis de datos fueron realizados para las variables supervivencia a los 15 días después de iniciarse la etapa de establecimiento.

Para las variables contaminación los datos fueron tomados desde el momento de establecimiento hasta la obtención de las vitroplantas. La toma de datos se realizó periódicamente para observar el desarrollo de los explantes.

### **5.2.7 Diseño Experimental**

EL estudio de investigación se realizó en dos etapas utilizo el método cuantitativo (Hernández Sampieri et al., 2014).

#### **5.2.7.1 Desinfección con dos concentraciones de hipoclorito (ETAPA 1)**

El diseño que se utilizó fue completamente al azar con un arreglo Bifactorial, el mismo está dado por el siguiente modelo lineal aditivo (Arteaga J. 2016).

Modelo Lineal Aditivo

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

Dónde:

$Y_{ijk}$  = Cualquier observación.

$\mu$  = Media general.

$\alpha_i$  = Es el efecto fijo debido al i-ésimo concentración de hipoclorito (0.5-1%).

$\beta_j$  = 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 concentración de hipoclorito (i) por explante(j).

$\varepsilon_{ijk}$  = Error experimental.

Esta fase de investigación tuvo 4 tratamientos con 4 repeticiones, 16 unidades experimentales y cada unidad experimental con 4 explantes.

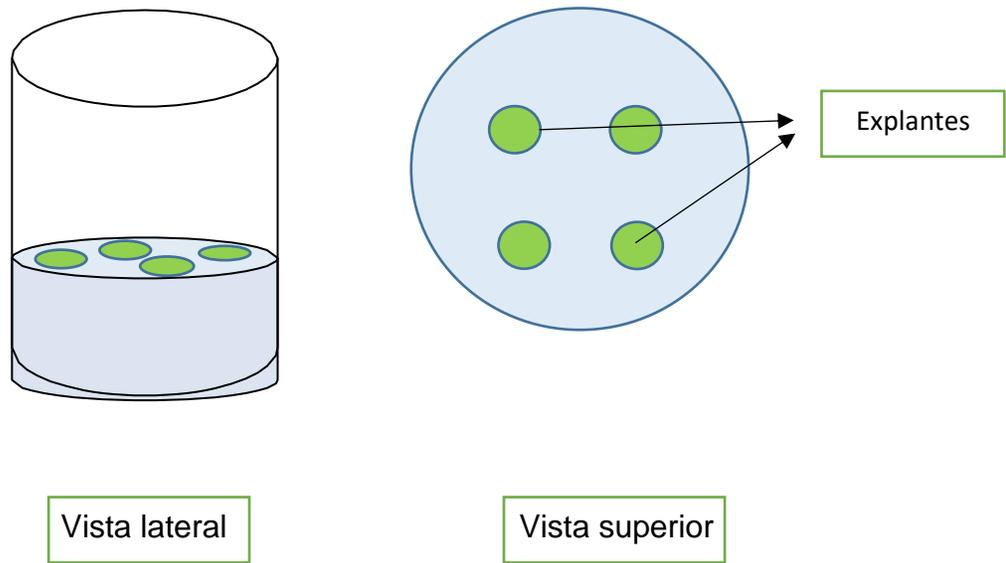
#### 5.2.7.1.1 Factor de Estudio

Los criterios de selección del factor A (concentración de hipoclorito) y factor B (tipo de explante).

**Tabla 3 Factores de estudio (Etapa 1)**

Factor A (% de Hipoclorito)	Factor B (tipo de explante)
0.5	Ápice de hoja
1	Rizoma

Unidad experimental. La unidad experimental para este estudio fue cada frasco conteniendo 4 explantes de hoja de *G. jamesonii* (figura 16).



**Figura 16 Diagrama de la unidad experimental vaso**

Croquis experimental: El croquis experimental para la desinfección con dos concentraciones de hipoclorito ejemplificado en la figura 17.

T1R1	T2R1	T4R4	T3R1
T2R2	T1R2	T3R2	T4R1
T4R3	T3R3	T1R3	T2R3
T3R4	T4R4	T2R4	T1R4

**Figura 17 Croquis de evaluación de desinfección**

## 5.2.7.2 Evaluación de reguladores de crecimiento al medio de cultivo (ETAPA 2)

### 5.2.7.2.1 Diseño experimental

El diseño a utilizar será completamente al azar con un arreglo Bifactorial, el mismo está dado por el siguiente modelo lineal aditivo (Ochoa, 2007).

#### Modelo Lineal Aditivo

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

Dónde:

$Y_{ijk}$  = Cualquier observación.

$\mu$  = Media general.

$\alpha_i$  = Es el efecto fijo debido al i-ésimo tipo de explante (ápice de hoja y rizoma)

$\beta_j$  = Es el efecto fijo debido al j-ésimo tipo de explante j =regulador de crecimiento

$\alpha*\beta_{ij}$ = efecto de la interacción tipo de explante (i) regulador de crecimiento (j).

$\varepsilon_{ijk}$  = Error experimental.

Esta fase de investigación tuvo 6 tratamientos con 4 repeticiones, 24 unidades experimentales y cada unidad experimental con 4 explantes.

Los factores de estudio a evaluar en la investigación se detallan en el Cuadro 1.

**Tabla 4 Factores de estudio (Etapa 2)**

Factor A Tipo de explante (E)	Factor B Reguladores de Crecimiento (R)
E1=Ápice de hoja	R1= Medio Murashige y Skoog (MS) + Acido indolacético (AIA )
	R2= Medio Murashige y Skoog (MS) + Acido giberelico(G3)
E2=Rizoma	R3= Medio Murashige y Skoog (MS) + Agua de coco (Acc)

**Fuente:** Propia, 2021.

En base a los factores establecidos se realizan las siguientes combinaciones para cada tratamiento, los tratamientos se detallan en la tabla 4.

**Tabla 5 Tratamientos en Estudio de los reguladores de crecimiento.**

Tratamiento	Combinación	Descripción
T1	E1R1	Apice - Medio Murashige y Skoog (MS) + Acido indolacético (AIA)
T2	E1R2	Apice - Medio Murashige y Skoog (MS) + Acido giberelico(G3)
T3	E1R3	Apice - Medio Murashige y Skoog (MS) + Agua de coco (Acc)
T4	E2R1	Rizoma - Medio Murashige y Skoog (MS) + Acido indolacético (AIA)
T5	E2R2	Rizoma -Medio Murashige y Skoog (MS) + Acido giberelico(G3)
T6	E2R3	Rizoma -Medio Murashige y Skoog (MS) + Agua de coco (Acc)

**Fuente:** Propia, 2020.

Croquis experimental: El croquis experimental para los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo ejemplificado en la figura 18.

T1R1	T1R2	T1R3	T1R4
T2R1	T2R2	T2R3	T2R4
T3R1	T3R2	T3R3	T3R4
T4R1	T4R2	T4R3	T4R4
T5R1	T5R2	T5R3	T5R4
T6R1	T6R2	T6R3	T6R4

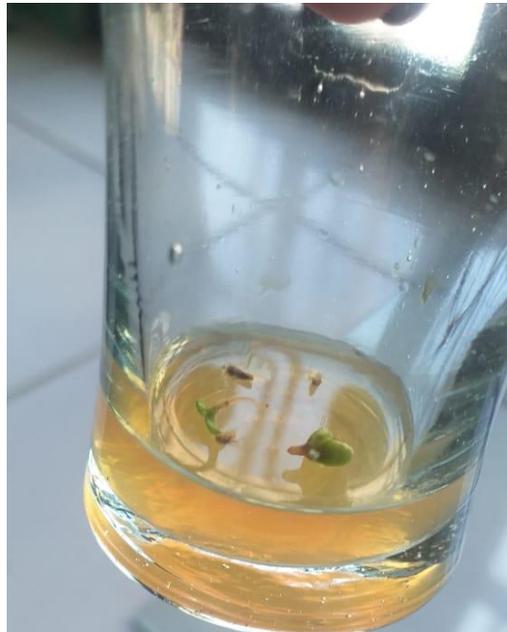
**Figura 18 Croquis reguladores de crecimiento en el medio de cultivo.**

## 5.2.8 Variables de respuesta

### 5.2.8.1 Desinfección con dos concentraciones de hipoclorito

Para efecto de establecer la desinfección con hipoclorito se tomaron lecturas a los 10 a 10 días después de siembra tomando en cuenta el 100% de los frascos en cada variable; las variables estudiadas fueron las siguientes:

Sobrevivencia de explante: De cada frasco se anotó si el explante estaba vivo o no, sin importar si el frasco con el medio estaba contaminado. Así mismo los resultados fueron expresados como variables cuantitativas discretas.



**Figura 19 Sobrevivencia de explante**

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



**Figura 20 Contaminación medio de cultivo de explantes**

#### **5.2.8.2 Evaluación de tipo de explante y tipo de reguladores en el medio de cultivo**

Para las lecturas de inicio de formación de callo y brote se estableció como tiempo 60 días al inicio del experimento, la toma de datos fue la siguiente

Formación de callo y brote: De cada frasco se determinó si los explantes formaron callo o brote en caso de rizoma 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.



**Figura 21 Formación de callo y brote**

Contaminación de medio con el tipo de regulador de crecimiento: En cada frasco con explantes se consideró que el medio estaba contaminado cuando hubo presencia de bacterias u hongos, se expresó en porcentaje.



**Figura 22 Contaminación de medio con el tipo de regulador de m crecimiento.**

Sobrevivencia: De cada frasco se anotó si el explante estaba vivo o no. Se anotó si el explante sobrevivió, tomando como el 100% 4 explantes cada uno representando el 25%.

### **5.2.9 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 para los datos que no se ajustan a la distribución normal.

Posteriormente se realizó un análisis de varianza para determinar significancia entre tratamientos y al haber, se realizó 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 los resultados obtenidos.

## **6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

De acuerdo a los objetivos planteados para la investigación, a continuación, se muestra 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 etapa del trabajo.

### **6.1 Desinfección de explantes con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (ETAPA 1)**

#### **6.1.1 Supervivencia de explantes**

La variable supervivencia de explantes fue registrada realizando un conteo de explantes 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 6.

**Tabla 6 Análisis de varianza para la variable sobrevivencia de explante**

FV	GL	SC	CM	FC	Ft
%HIPOCLORITO	1	0,34	0,34	11,96	0,0047 **
TIPO DE EXPLANTE	1	1,07	1,07	37,76	<0,0001 **
%HIPOCLORITO*TIPO DE EXPLANTE	1	3,2E-03	3,2E-03	0,11	0,7426 NS
ERROR	12	0,34	0,03		
TOTAL	15	1,75			

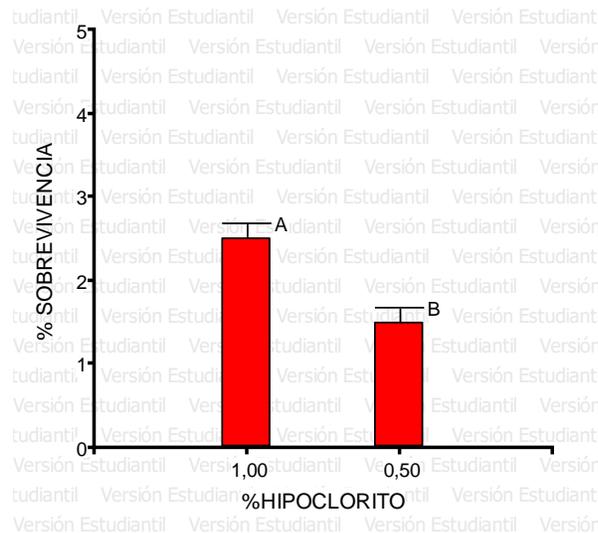
CV = 9,89

\*\*=Altamente significativo

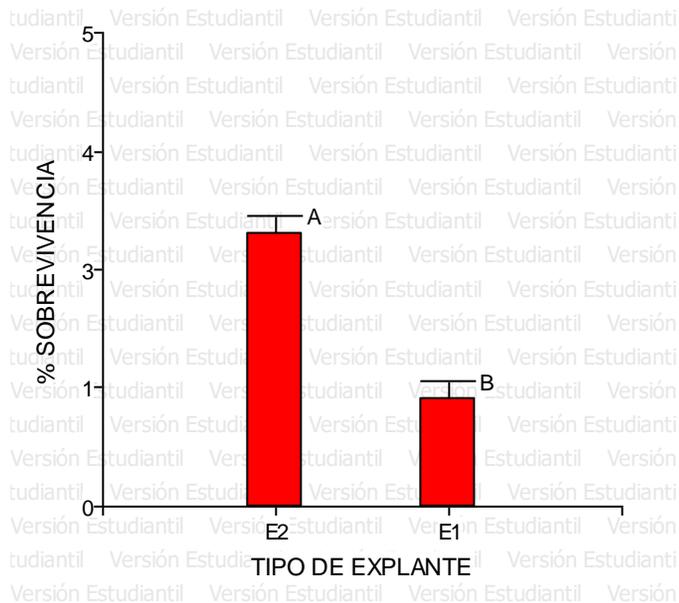
\*=Significativo

NS= No significativo

El C.V. muestra un valor del 9,89% que nos indica la confiabilidad de los datos para esta variable, así mismo el buen manejo de las unidades experimentales.



**Figura 23 Comparación múltiple de medias Duncan 5%, factor concentración de hipoclorito de sodio.**



**Figura 24 Comparación múltiple de medias Duncan al 5 %, para el factor Explantes**

Se logra observar en la tabla 6 el análisis de datos realizado para la variable sobrevivencia de explante, donde claramente se demuestra que hubo una alta diferencia estadística en las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio.

El factor tipo de explante presenta la significancia esto indica que hubo una diferencia estadística entre el explante de ápice de hoja y el explante de rizoma, la interacción entre ambos factores posee la no significancia, habiéndose demostrado que no existe diferencia estadística entre la concentración de hipoclorito y los tipos de explantes.

Para la determinación de la concentración de hipoclorito efectivo en la sobrevivencia de explantes se realizó una comparación múltiple de medias Duncan que se presenta en la figura 23, en el mismo se denota la concentración de 0,5 % de hipoclorito con una media promedio de sobrevivencia de 1,50 explantes que está muy por debajo de

la concentración de 1% de hipoclorito con una media de promedio de 2,50 siendo estadísticamente diferentes.

En la figura 24, se logra distinguir la diferencia estadística entre los dos tipos de explante (E1-E2) ápice de hoja y el explante de rizoma, que se agrupan por las letras A y B, esto indica que el menor promedio de sobrevivencia el E2 Rizoma que presentó el 1,13 a diferencia de E1 Apice de hoja quien obtuvo una media de 2,88 el cual nos permitirá tener mayor sobrevivencia.

Gomes (2018), realizó una investigación obteniendo el 100% de sobrevivencia del material vegetal, utilizó alcohol al 70% por 1 minuto e hipoclorito de sodio al 2% durante 6 a 8 minutos. Posada (2004) obtuvo el 68.5% de sobrevivencia utilizando únicamente hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos.

### **6.1.2 Contaminación de medios**

Se realizó un análisis de las distintas concentraciones de hipoclorito de sodio al (0.5- 1 %) a los 10 días de observación se obtuvieron los siguientes resultados en las variables. A pesar de que hubo diferencias observables entre los diferentes tratamientos. sin embargo, es importante reconocer que en la aplicación de la práctica se debe descartar los frascos contaminados como punto crítico de control de asepsia.

**Tabla 7 Análisis de varianza (A.N.V.A.) para la variable contaminación de medios %**

FV	GL	SC	CM	FC	Ft
%HIPOCLORITO	1	0,30	0,30	45,99	<0,0001 **
TIPO DE EXPLANTE	1	0,01	0,01	0,87	0,3691 NS
%HIPOCLORITO*TIPO DE EXPLATE	1	0,02	0,02	2,42	0,1458 NS
ERROR	12	0,08	0,01		
TOTAL	15	0,40			

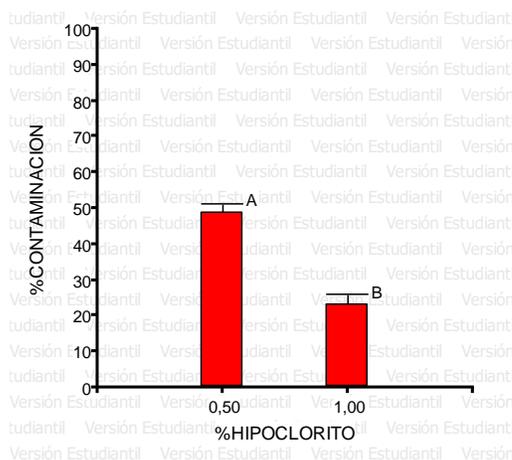
CV = 8,58

\*\*=Altamente significativo

\*=Significativo

NS= No significativo

El coeficiente de variabilidad C.V. para la variable contaminación de medios fue de 8,58 % el mismo nos hace referencia a la confiabilidad de los datos de dicha variable, así mismo al buen manejo de las unidades experimentales.



**Figura 25 Comparación múltiple de medias Duncan al 5 %, para el factor concentración de hipoclorito (%)**

En la tabla 7 se puede observar el análisis de varianza, el mismo nos muestra que el factor concentración de hipoclorito de sodio (%) fue altamente significativo, presentándose así una diferencia estadística entre las diferentes concentraciones.

El factor tipo de explante presenta no significativo esto nos indica que no hubo una diferencia estadística entre el explante de ápice de hoja y el explante de rizoma, la interacción entre ambos factores posee la no significancia, habiéndose demostrado que no existe diferencia estadística entre las concentraciones de hipoclorito de sodio (%) y los tipos de explantes.

Una vez realizada la comparación de medias que se muestra en la figura 25, logramos distinguir la diferencia estadística entre las dos concentraciones de hipoclorito de sodio (0,5-1%), que se agrupan por las letras A y B, esto nos indica que el menor promedio de contaminación presentó el 1% de hipoclorito de sodio 23,25 el cual nos permitirá tener menor contaminación a diferencia de 0,5% de hipoclorito de sodio quien obtuvo una media de 48,75.

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 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.

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 de 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, la contaminación está presente en todos los procesos involucrados en

un cultivo de tejidos, que puede abarcar desde la esterilización de los instrumentos hasta la fumigación de las plantas en el invernadero o que también al momento de la siembra de los explantes puede influir un factor microbiológico que pueda contaminar dicho explante.

## 6.2 Evaluación de reguladores de crecimiento (ETAPA 2)

### 6.2.1 Formación de callo y brote.

La variable se registró cuando más del 50 % de los explantes (ápice de 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 para el análisis de los mismos que se muestran en la tabla 8 a continuación:

**Tabla 8 Análisis de datos, variable días al inicio de formación de callo y brote**

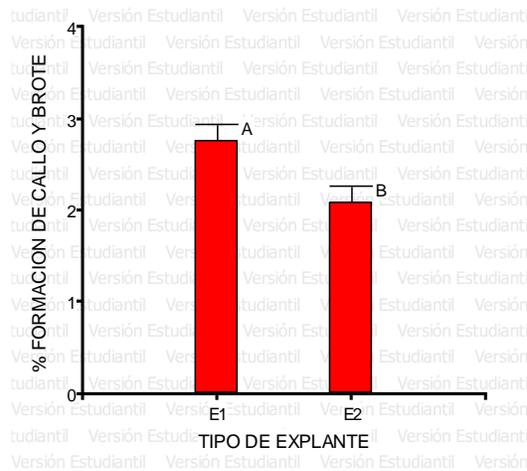
FV	GL	SC	CM	FC	Ft
TIPO DE EXPLANTE	1	0,18	0,18	5,85	0,0264 *
TIPO DE REGULADOR DE CRECIMIENTO	2	1,06	0,53	17,10	0,0001 **
TIPO DE EXP. x TIPO DE REGULADOR CREC.	2	0,03	0,02	0,50	0,6141 NS
ERROR	18	0,56	0,03		
TOTAL	23	1,84			
CV = 9,65					

\*\*=Altamente significativo

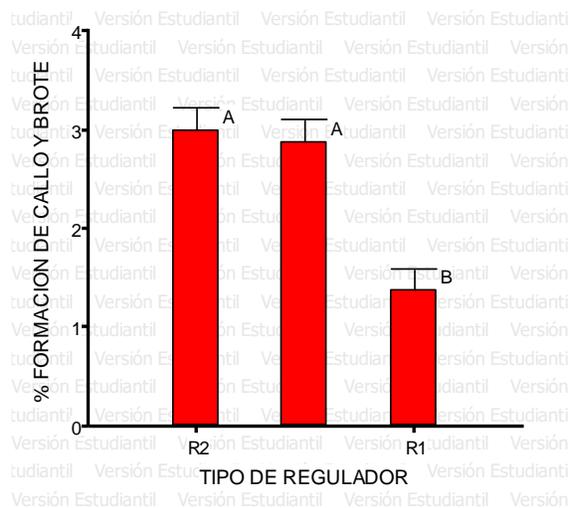
\*=Significativo

NS= No significativo

En la tabla 8 muestra un C.V. de 9,65% que demuestra la confiabilidad de los datos, así mismo el buen manejo de unidades experimentales para esta fase de la investigación.



**Figura 26 Comparación Duncan para el factor tipo de explante**



**Figura 27 Comparación múltiple de medias Duncan para el factor tipo de regulador de crecimiento.**

La tabla 8 presenta el análisis de datos para la variable formación de callo y brote, este indica la diferencia estadística que hubo en el factor tipo de explante (ápice de hoja y rizoma), entre los diferentes reguladores de crecimiento R1=Medio Murashige y Skoog

(MS) + Acido indolacético (AIA ) , R2= Medio Murashige y Skoog (MS) + Acido giberelico(G3) y R3= Medio Murashige y Skoog (MS) + Agua de coco (Acc) , se presenta significancia, la interacción entre ambos factores nos muestra que no hay significancia lo cual indica que no existe diferencia.

La Figura 26, muestra la comparación múltiple de medias Duncan para el factor tipo de explante, en el mismo se pudo observar que se presenta la mayor media de formación de callo y brote del explante de rizoma a diferencia del explante de hoja que presento una media de 2,75.

Una vez realizada la comparación de medias que se muestra en la Figura 27, logramos distinguir la diferencia estadística entre los tipos de reguladores de crecimiento, que se agrupan por las letras A y B, esto nos indica que el menor promedio de formación de callo y brote se presentó en el regulador R1 (MS+AIA) con una media de 1,38 a diferencia de los reguladores de crecimiento R2(MS+G3) Y R3(MS+Acc) quienes obtuvieron una media de 3,00 y 2.88 de formación de callo y brote.

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.

## 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 la tabla 9.

**Tabla 9 Análisis de varianza contaminación de medio**

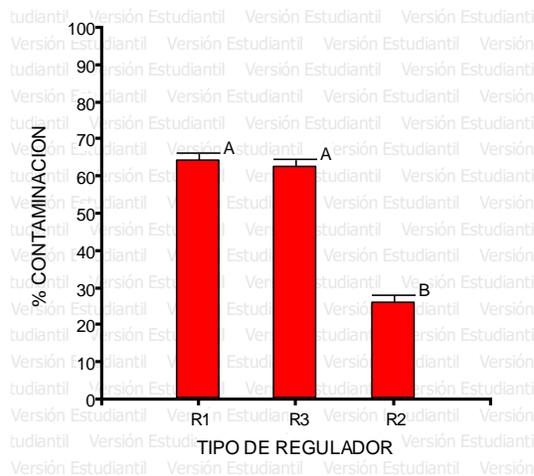
FV	GL	SC	CM	FC	Ft
TIPO DE EXPLANTE	1	0,0044	0,0044	1.17	0,2940 NS
TIPO DE REGULADOR DE CRECIMIENTO	2	0,82	0,41	99,85	<0,0001 **
TIPO DE EXP. x TIPO DE REG. CREC.	2	0,09	0,05	11.13	0,0007 **
ERROR	18	0,07	0,004		
TOTAL	23	0,99			

CV = 8,28

\*\*=Altamente significativo

\*=Significativo

NS= No significativo



**Figura 28 Comparación múltiple de medias Duncan para el factor tipo de regulador de crecimiento.**

La tabla 9, 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 los diferentes reguladores de crecimiento y la interacción entre los diferentes reguladores de crecimiento y tipos de explantes, existiendo así una diferencia estadística, sin embargo los tipos de explantes no presentaron diferencia estadística.

Se puede apreciar en la figura 28 la comparación de medias entre los tipos de reguladores de crecimiento, donde se presenta la mayor media de contaminación regulador R1 (MS+AIA) con 64,38% y R3 (MS+Acc) con 62,50% a diferencia de R2(MS+G3) con 26,25%.

### 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 10.

**Tabla 10 Análisis de varianza sobrevivencia de explantes**

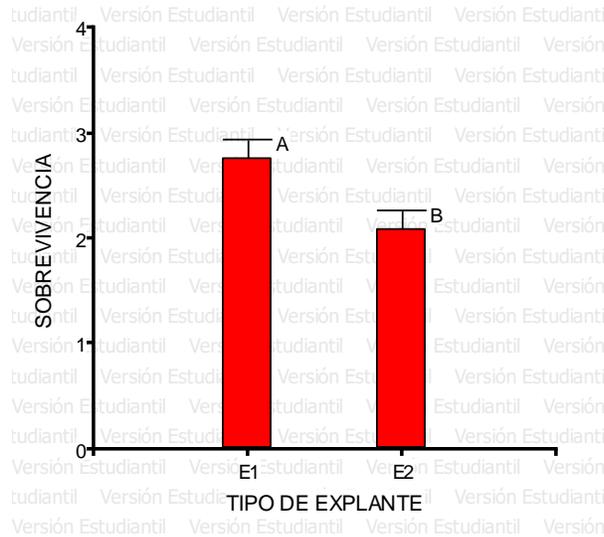
FV	GL	SC	CM	FC	Ft
TIPO DE EXPLANTE	1	0,18	0,18	5,85	0,264 *
TIPO DE REGULADOR DE CRECIMIENTO	2	1,06	0,53	17,10	0,0001 **
TIPO DE EXP. x TIPO DE REG. CREC.	2	0,03	0,02	0,50	0,6141 NS
ERROR	18	0,56	0,03		
TOTAL	23	1,84			
CV = 9,65					

\*\*=Altamente significativo

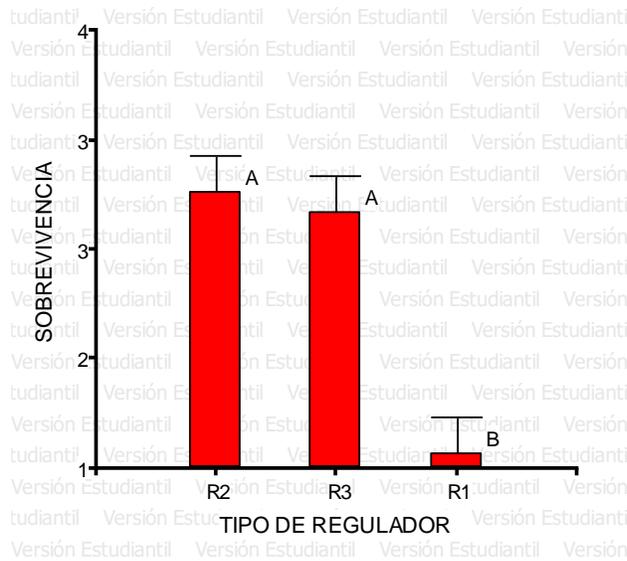
\*=Significativo

NS= No significativo

Observamos un coeficiente de variabilidad de 9,65% siendo la representación de la confiabilidad del manejo de los datos y así de las unidades experimentales.



**Figura 29 Comparación Duncan para el factor tipo de explante**



**Figura 30 Comparación múltiple de medias Duncan para el factor tipo de regulador de crecimiento.**

Realizado el análisis de los datos en la tabla 10 el nivel de significancia para los factores en estudio, así mismo la significancia en tipo de explantes siendo estadísticamente diferentes ambos factores, de igual forma para el factor tipo de regulador de crecimiento se presenta la alta significancia indicándonos la existencia de una diferencia estadística entre el regulador R1(MS+AIA), R2(MS+G3) Y R3(MS+Acc) con respecto a la sobrevivencia.

Las figuras 29 y 30 presentan la comparación múltiple de medias para ambos factores, determinándose así: el mejor promedio de sobrevivencia con respecto al tipo regulador de crecimiento se presenta en los tipos de reguladores R2 y R3 con 3 explantes vivos a diferencia del regulador R1 quien presenta 1 explante. Respectivamente el tipo de explante con mayor promedio de sobrevivencia fue el E1 quien presenta una media de 3 explantes, a diferencia del explante de apice de hoja con 1 explantes en promedio.

Esto demuestra que las células vegetales que se desarrollan en condiciones asépticas sobre medios de cultivo adicionados con reguladores vegetales, pueden dividirse dando como respuesta una desdiferenciación celular acompañada por un crecimiento tumoral que da lugar a células indiferenciadas denominadas callo (Rosell, 1990).

De esta manera se confirma evaluaciones realizadas por Geier (1990), donde explica que, en ausencia de reguladores de crecimiento, muy pocos explantes foliares forman callo. Las auxinas generalmente inducen la división celular formación de callo, expansión de tejidos y formación de raíces adventicias. Además, según

Murashigue y Skoog (1962), las citocininas son unas sustancias muy activas al igual que la auxina, las cuales presentan muchas formas de actuar como a la elongación de las células para las auxinas y la división celular y la producción de callos como lo promueven las citocininas, sobre los segmentos foliares de hoja. Las dos se complementan, obteniéndose que la auxina favorece a la duplicación del ADN y la citocinina hace posible la separación de los cromosomas, un papel muy claro en la organogénesis indirecta, en la que brinda estimulación considerable sobre los explantes de hoja para la formación de callo.

## **7 CONCLUSIONES**

En relación con los objetivos planteados en este trabajo de investigación se llegó a las siguientes conclusiones.

La utilización de hipoclorito de sodio en las concentraciones de 0,5 y 1 % para la desinfección de explantes de Gerbera (*Gerbera jamesonii*) evitaron la contaminación de los medios de cultivo de 15 minutos fragmentados en 5 minutos con un espacio de enjuague en agua destilada 2 veces, cada uno por 3 minutos.

Se desarrolló un protocolo de desinfección para explantes de gerbera jamesonii. L basado en diferentes concentración de hipoclorito de sodio (0,5 -1%) y tipos de explante de gerbera (explante de ápice 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 siendo el 1% de concentración de hipoclorito de sodio el que menor contaminación tuvo alcanzando un 23,25 % y un promedio de sobrevivencia de explantes por unidad experimental de 2,50.

En la evaluación de diferentes reguladores de crecimiento R1(MS+AIA) , R2 (MS+G3) Y R3 (MS+Acc) se llegó a determinar a través de sus variables de respuesta formación de callo y brote, contaminación de medio y sobrevivencia de explante lo siguiente: el regulador de crecimiento R1(MS+AIA) nos permite obtener un menor promedio de la formación de callo y brote con 1,38 , en cambio los reguladores de crecimiento R2 (MS+G3) y R3 (MS+Acc) tuvo su efecto en los explantes quienes presentaron un promedio de 2.75 de formación de callo y brote.

El regulador de crecimiento, R2 (MS+G3) permitió obtener el menor porcentaje de contaminación con una media de 26,25% y un promedio de sobrevivencia de 3 explantes por unidad experimental.

## **8 RECOMENDACIONES**

Al término del trabajo de investigación se recomienda lo siguiente:

Utilizar el hipoclorito de sodio al 1% los explantes de Gerbera (*Gerbera jamesonii.L* ) durante 15 minutos espaciados en 5,5 y 5 minutos, después de cada tiempo lavar tres veces con agua destilada estéril durante 3 minutos como parte del proceso de desinfección previo a la siembra de explantes.

Evaluar factores asociados a la sobrevivencia de explantes de *G. jamesonii* en cultivo *in vitro* como tamaño del explante, oxidación del medio, entre otros. Esto con el fin de evitar la pérdida de explantes que pueden ser potenciales en producción de plantas.

Continuar estudios con los reguladores de crecimiento al medio MS, evaluando diferentes concentraciones y diferentes tipos de reguladores (auxinas o citoquininas) para mejorar el porcentaje de formación de callo en explantes de hoja de *G. jamesonii*, tomando en cuenta las características morfológicas de los callos (tamaño, tipo de callo, color, etc.).

Continuar estudios con reguladores de crecimientos obtenidas naturalmente como el agua de coco ya que contiene los nutrientes requeridos para la generacion de una nueva planta o bioplasmas.

Al momento de realizar evaluaciones con propagación de *G. jamesonii in vitro* se sugiere que se realice con la mayor cantidad de réplicas posibles además de contemplar subréplicas para disminuir la variabilidad de los datos.

## 9 BIBLIOGRAFIA

**AbcAgro, 2002.** El cultivo de la gerbera, CL. morfología y taxonomía.  
<http://www.abcagro.com/flores/flores/docs/gerbera4.asp>

**Abdelnour y Vincent 1994.** Conceptos Básicos de Cultivo de Tejidos vegetales.  
CATIE. Guatemala. p. 2-20.

**Acosta, C.C. 2012.** El micro propagación en especies forestales. Ciencia actual Vol  
Numero 2 Julio/diciembre 2011.

**AGEXPRONT. 2000.** Manual del cultivo de Gerbera, Asociación Gremial de  
Exportadores de Productos No Tradicionales, 36 p.

**Aguilar, M; Melgarejo, L.M.;Romero, M. 2012.** FITOHORMONAS. Laboratorio de  
fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de biología. Universidad Nacional de  
Colombia

**Aguirre, G. y Villarroel, C. 1998.** Cultivo de tejidos aplicados en papa y en otros  
tubérculos andinos: Avances de la Investigación Agrícola en Bolivia. La Paz, Bolivia.  
s.p.(200p).

**Aguirre, L. 2003.** Propagación in vitro de tres procedencias de mora (*Robus sp.*) en  
Tesis Ing. Agr. Guatemala URL. 74p.

**Anónimo 2010,** ED. Universidad Autónoma del Litoral. Efecto de un bioestimulante, a  
base de humus, en el crecimiento y desarrollo de plantas hortícolas y florícolas.  
Facultad de Ciencias Agrarias. Cultivos intensivos. 38 p.

**Arévalo, A. 1995.** Técnicas empleadas en el laboratorio de cultivo *in vitro* (ICIV).

**Arteaga, J., 2016.** Métodos estadísticos para la investigación. La Paz- Bolivia 78pp.

**Atlas, M. y Bartha,R. 2002.** Ecología microbiana y microbiología ambiental. Cuarta edición. Addison Wesley. Nueva York, USA. Pp. 217-262.

**Barba, A. Luna, B.; Romero, J. 2001.** Micropropagacion de plantas. Editorial Trillas. Mexico. D.F. p. 7-53.

**Billard, C. 1995.** Inducción de callos utilizando la técnica de cultivo "in vitro". 3 p. En: Guía de Trabajos Prácticos de Fisiología Vegetal. Fac. Cs. Agropecuarias. UNER

**Cabrera I. R. 2002.** Manejo de sustratos para la producción de plantas ornamentales en maceta. Department of Horticultural Sciences Texas A&M University. 9 p.

**Caplin, SM. y Steward, FC. 1948.** Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. Science 108: 655-657. en: Roca, WM. y Mroginski, LA. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia. CIAT. 970p.

**Carrillo, E. 2004** Biotecnología Vegetal. Consultado el 20 de diciembre del 2006. Disponible en: <http://www.ELUCAS42@HOTMAIL.COM>.

**CIAT – JICA, 1994** CIAT (Centro de Investigación Agrícola Tropical, Bol). y JICA (Agencia de Cooperación Internacional Japón, Bol). 1994. Frutos cultivados en Bolivia. Santa Cruz, Bolivia. 24p.

**Cultivo de Gerbera. 2004.** Florist de Kwakel B.V. Disponible en: Cultivos Tropicales. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) La Habana,Cuba, núm. Sin mes, Pp. 65-75. Cultivos Tropicales. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) La Habana, Cuba, núm. Sin mes, Pp. 65-75.

**Espinoza, RG. 2013.** Biotecnología Agrícola: Introducción a la Biotecnología Vegetal. Esp. 1° ed. BO. Facultad de Agronomía. Universidad San Carlos de Guatemala P.21

**García, M. 2000.** Propagación clonal in vitro del Eucalipto: medio de cultivo líquido. Tesis Doc. Pinar del Río, Cuba. Ministerio de Educación Superior. 100p.

**Garibaldi & Jona, 1989; Mur et al., 2003; Hatamzadeh & Shafyii Masouleh, 2013.**

Garibaldi Accati, E. & Jona, R. (1989). Parameters influencing gerbera cut flower longevity. Acta Hortic. 261, 63-68.

**George y Sherrington 1984.** Plant propagation by tissue culture part 2 in practice, (2da Ed.), Exegetics Limited. Inglaterra, pp 917-923, 929-950.

**George y Sherrington. George, E.F. 1996** Plant propagation by tissue culture part 2 in practice, (2da Ed.), Exegetics Limited. Inglaterra, pp 917-923, 929-950.

**Gonzalez, C.A. 2005.** Sustratos y soluciones nutritivas orgánicas en la Producción de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) bajo invernadero. Tesis Maestria en Ciencias de Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. Pp. 166.

**Gomes, R. 2018.** Estandarización de un protocolo de micropropagación de papaya (*Carica papaya* L.) en un sistema de inmercion temporal de vasos gemelos (BIT). Tesis. Medellín, Colombia. Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias. 90 p.

**Posada, L. 2004.** Establecimiento in vitro de ápices de plantas de campo del híbridocubano de Papaya. Cuba. pp. 42-99.

**Hartmann y Hudson 1997**, [http://www.floristdekwakel.nl/nl/asp\\_files/nieuws.asp](http://www.floristdekwakel.nl/nl/asp_files/nieuws.asp)

**Hurtado y Merino 1994**. Cultivo De Tejidos Vegetales. 2da Reimpresión. Editorial Trillas. México, D.F. Pp. 48 – 63.

**IBTEN 2002**, (Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear, BO). 2002. Curso de Biotecnología Vegetal Agrícola. s.e. La Paz, Bolivia. s.p.(55p).

**Infoagro, 2003**. INFOAGRO (Sistema de Información y comunicación del sector Agropecuario,CR). 2004. Frutas tropicales (en línea). San José, CR. Consultado 20 feb. 2010.Disponible en [http://www.infoagro.com/frutas tropicales/plátano.htm](http://www.infoagro.com/frutas_tropicales/plátano.htm)

**INTA, 2010**. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria definición de micropropagación.

ISSN 2248-468x

**John, C. K.; Nadgauda, R. S. y Mascararehas, L. Tissue 1998** John, C. K.; Nadgauda, R. S. y Mascararehas, L. Tissue culture of economic plants. Ed. Centre for Science and Technology of the Non-Aligned and other Developing Countries. London: Commonwealth Science Council, 1998. 269 p.

**Letham, DS. 1974**. Regulators of cell division in plant tissues; 20: The cytokinins of coconut milk *Physiol. Plant.* 2:66-70. en: Roca, WM. y Mroginski, LA. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia. CIAT. 970p.

**López, P. 1990**. Establecimiento de laboratorio de Cultivo de Tejidos: Fundamento teórico – práctico del cultivo de tejidos vegetales. Roma, Italia. 15p.

**LOPEZ, R. y Casp, A., 2004**. Cloro y productos clorados. En R. Lopez, Tecnología de Mataderos (págs. 395-396). Madrid, España: Aedos, S.A

**Mangara, J. 1988.** Multiplicación vegetativa y cultivo invitro, los meristemas y la organogénesis. Madrid, España. Mundi prensa.232p.

**Margar, J. 1988.** Multiplicación Vegetativa y Cultivo in vitro; Los Meristemas y la Organogénesis. Mateo, JM. y Urbano, PT. (Trad). Madrid, España. Mundi – Prensa. 232p.

**Medina, M. 2005.** Organismos vegetales. Fundamentos de la organografía vegetal. (Online) (05 abril 2007).

**Mejía, R. 1988.** Técnicas de Laboratorio: Cultivo in vitro de plantas de papa. Lima, Perú. Prensa. 95p

**Morgan., 2009.** Cultivo de tejido vegetal. International Plant Laboratories. Estados Unidos UK.

**Moya, T. Mederos, B. 2001.** Cultivo de meristemas para la eliminación del virus S de la papa en plantas cultivadas in vitro. Tesis.Cuba, CU. Instituto de Biotecnología de la Plantas. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. 119 p

**Muñoz de Malajovich, M. A. 2006** Biotecnología. Editorial Universidad Nacional de Quilmes

**Mur et al., 2003; Mascarini, 2005** Evaluación de la calidad postcosecha de tres cultivares de gerbera jamesonii L. y del efecto de la utilización de cloruro de calcio sobre el curvado del pedúnculo floral,

**Murashigue, T. y Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant. (USA)* 15:473-497.

**Murillo, RA. 2014**Introducción a la Biotecnología Agrícola: Historia del cultivo de tejidos vegetales. Esp. 1° ED. Bo. MMAYA. 101p.

**OCHOA, R., 2009.** Diseños Experimentales, Primera Edición, La Paz – Bolivia, P. 388.

**Oszkinis, K. y Lisiecka, A. 1990.** Gerbera. Edamex. Universidad Ppopular Autonoma del Estado de Puebla. 248 pp.

**Pallares, Anónimo, 2010.** ED. Universidad Autónoma del Litoral. . Efecto de un bioestimulante, a base de humus, en el crecimiento y desarrollo de plantas hortícolas y florícolas. Facultad de Ciencias Agrarias. Cultivos intensivos. 38

**Pérez ,1998; citado por Murillo, 2014** Pérez, JN; Jiménez, GA; Agramonte, PD. 1998. Aumento de la Eficiencia de la Micropropagación, en: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. v1, p. 179-191.

**Perla, 2007.** Evaluación de métodos de desinfección y tipos de explante de la especie vegetal *Piper oradendron* Trel. & Standl., para el establecimiento de su cultivo in Vitro.

**Portillo, G. 1999.** Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. Los meristemas y la or Preil, W. 1991. Application of biorectors in plants propagation. En: Micropropagation. Debergh. Academy Publisherts, p. 425-445.ganogénesis. Madrid, España. Mundi Prensa. 232p.

**Ramirez E. 2001.** Renovación y Conservación *in vitro* de Germoplasma de papa M. Sc. Tesis. Guatemala. GT. Técnico de Innovación Tecnológica en Biotecnología, Laboratorio de Biotecnología, CIAL-ICTA. 50 p.

**Ramírez, R. S.P. 2000.** Gerbera jamesonii H. Bolus cultivada bajo cubierta en Tabasco. Tesis Licenciatura Ingeniero Agrónomo especialista en Zonas Tropicales.

**Roca. W.M. y Mroginski. L.A. 1991.** Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Colombia. Centro de Información y Documentación. p. 14 – 27.

**Rosell, Ch. y Villalobos, V. 1990.** Fundamento teórico – práctico del cultivo de vegetales. Roma, FAO. 113 P

**Salomón, V. y Davids, P. 1978.** BIOLOGIA; México: Editorial INTERAMERICANA, S.A. Primera Edición.

**Sandoval 2001,** Sandoval, FJ; Brenes, GG; Pérez, SL. 1991. Micropropagación de plátano y banano (Musa AAB, AAA) en el CATIE. Turrialba, Costa Rica. 23 p. (Serie Informe técnico/CATIE; no 186)

**Santiago 2011.** Disponible <http://www.abcagro.com/flores/flores/docs/gerbera4.asp>

**Soberon Quiroga.** sampietro A. VATTUONE M. facultad de bioquímica y farmavia Seemann, J.K. 1993. Callus induction and culture of rosa. Sci. Hortic 17:361- 370. universidad nacional de tucuman San miguel de tucuman Argentina.

**Soliz M. 2004** Utilización de tres diferentes almidones, como agente de soporte, en medios de propagación In vitro de papas nativas Solanum Tuberosum Sub sp

andigena, var. Huaycha paceña y Solanum x Juzepzuki var. Bola luki. Tesis de Lic. En Ing. Agro. UMSA FAC de Agronomía. La Paz, Bolivia pp. 2-35.

**Soroa, Bell M. R. 2000.** Producción alternativa de *Gerbera jamesonii* para una floricultura urbana. Universidad Agraria de La Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez". Centro de Estudios en Agricultura Sostenible. La Habana. 74 pp.

**Soroa, M. R. 2005.** "Revisión bibliográfica *Gerbera jamesonii* L. Bolus". Soroa, M. R. (2005). "Revisión bibliográfica *Gerbera jamesonii* L. Bolus". Cultivos Tropicales. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) La Habana, Cuba, núm. Sin mes, Pp. 65- Usui, K. y Okabe, K. (1996). Principios básicos del cultivo de tejidos. Instituto de ciencia y Tecnología Agrícolas: Guatemala

**Suarez et al, 2006; Acosta, 2012.** Suárez, F. 1993. Agricultura, Biotecnología y Propiedad Intelectual. IICA. San José, Costa Rica. 65p.

**Van Overbeek, Conklin y Blackeslee citados por Ball, 1946.** Van Overbeek, J. 1942. Hormonal control of embryo and seedling growth. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 10:126-134. ; Conklin, ME. y Blakeslee, AF. 1942. Cultivation in vitro of small *Datura* embryos. Amer. J. Bot. 29:472-477.

**Van Staden, J. y Drewes, SE. 1974.** Identification of cell division inducing compounds from coconut milk. Physiol. Plant. 32:347-352. en: Roca, WM. y Mroginski, LA. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia. CIAT. 970p.

**Vergara, I. 1993.** Sintomatología e identificación de enfermedades bacterianas y fungosas en gerbera (*Gerbera jamesoni* H. Bolus) en Chapingo, Tesis profesional. Universidad Autónoma Chapingo, México. 125 p.

**Villalobos A., VM. 1980.** Plantas libres de virus. Ciencia y Desarrollo, CONACYT. México. 33: 35-49. en: Roca, WM. y Mroginski, LA. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia. CIAT. 970p.

**Volker y Lehmann, 2000.** Volker and Lehmann. 2000. Cuban Agrobiotechnology.

# ANEXOS



**Anexo 1 Plantas madre de Gerbera jamesonii**



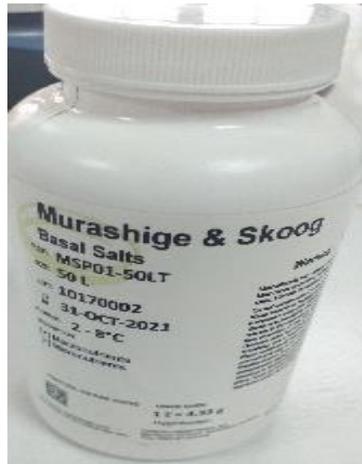
**Anexo 2 Autoclavado de materiales**



**Anexo 3 Cámara de flujo (Irradiación con Rayos U.V.)**



**Anexo 4 Materiales para el proceso de desinfección**



**Anexo 5 Medio de cultivo Murashige Skoog**



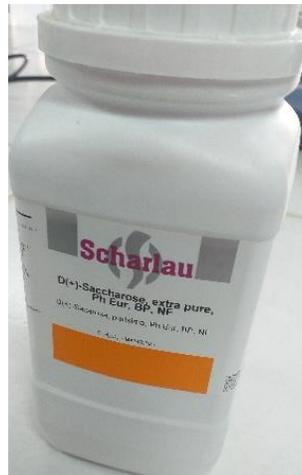
**Anexo 6 Regulador de crecimiento AIA**



**Anexo 7 Regulador de crecimiento G3**



**Anexo 8 Agua de coco (Cocos nucifera)**



**Anexo 9 Sacarosa**



**Anexo 10 Agente gelificante Agar agar**



**Anexo 11 Siembra de explantes**



## Anexo 12 Medios de cultivo con diferentes tipos de explante y reguladores

### Anexo 13 Análisis de varianza y pruebas de medias por variable de respuesta

Variable de respuesta. (etapa 1)

#### Sobrevivencia de explantes.

##### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% sobrevivencia	16	0,81	0,76	9,89

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,41	3	0,47	16,61	0,0001
%HIPOCLORITO	0,34	1	0,34	11,96	0,0047
TIPO DE EXPLANTE	1,07	1	1,07	37,76	<0,0001
%HIPOCLORITO*TIPO DE EXPLA..	3,2E-03	1	3,2E-03	0,11	0,7426
Error	0,34	12	0,03		
Total	1,75	15			

##### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,2917 gl: 12

%HIPOCLORITO	Medias	n	E.E.	
1,00	2,50	8	0,19	A
0,50	1,50	8	0,19	B

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

##### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,2917 gl: 12

TIPO DE EXPLANTE	Medias	n	E.E.	
E2	2,88	8	0,19	A
E1	1,13	8	0,19	B

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

##### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,2917 gl: 12

%HIPOCLORITO	TIPO DE EXPLANTE	Medias	n	E.E.	
1,00	E2	3,50	4	0,27	A
0,50	E2	2,25	4	0,27	B
1,00	E1	1,50	4	0,27	B C
0,50	E1	0,75	4	0,27	C

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

## Contaminación de medios

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
%contaminacion	16	0,80	0,76	8,58

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,32	3	0,11	16,43	0,0002
%HIPOCLORITO	0,30	1	0,30	45,99	<0,0001
TIPO DE EXPLANTE	0,01	1	0,01	0,87	0,3691
%HIPOCLORITO*TIPO DE EXPLA..	0,02	1	0,02	2,42	0,1458
Error	0,08	12	0,01		
Total	0,40	15			

### Teat: Duncan Alfa=0,05

Error: 55,1667 gl: 12

%HIPOCLORITO	Medias	n	E.E.
0,50	48,75	8	2,63
1,00	23,25	8	2,63

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

### Teat: Duncan Alfa=0,05

Error: 55,1667 gl: 12

TIPO DE EXPLANTE	Medias	n	E.E.
E1	37,50	8	2,63
E2	34,50	8	2,63

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

### Teat: Duncan Alfa=0,05

Error: 55,1667 gl: 12

%HIPOCLORITO	TIPO DE EXPLANTE	Medias	n	E.E.
0,50	E2	50,00	4	3,71
0,50	E1	47,50	4	3,71
1,00	E1	27,50	4	3,71
1,00	E2	19,00	4	3,71

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

## Evaluación de reguladores de crecimiento (etapa 2)

Variable de respuesta.

### Formación de callo y brote.

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% SOBREVIVENCIA	24	0,70	0,61	9,65

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,28	5	0,26	8,21	0,0003
TIPO DE EXPLANTE	0,18	1	0,18	5,85	0,0264
TIPO DE REGULADOR	1,06	2	0,53	17,10	0,0001
TIPO DE EXPLANTE*TIPO DE R..	0,03	2	0,02	0,50	0,6141
Error	0,56	18	0,03		
Total	1,84	23			

#### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,4167 gl: 18

TIPO DE EXPLANTE	Medias	n	E.E.	
E1	2,75	12	0,19	A
E2	2,08	12	0,19	B

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

#### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,4167 gl: 18

TIPO DE REGULADOR	Medias	n	E.E.	
R2	3,00	8	0,23	A
R3	2,88	8	0,23	A
R1	1,38	8	0,23	B

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

#### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,4167 gl: 18

TIPO DE EXPLANTE	TIPO DE REGULADOR	Medias	n	E.E.	
E1	R2	3,50	4	0,32	A
E1	R3	3,25	4	0,32	A
E2	R2	2,50	4	0,32	A
E2	R3	2,50	4	0,32	A B
E1	R1	1,50	4	0,32	B C
E2	R1	1,25	4	0,32	C

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

## Contaminacion de medio

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
%CONTAMINACION	24	0,93	0,90	8,28

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,92	5	0,18	44,63	<0,0001
TIPO DE EXPLANTE	4,8E-03	1	4,8E-03	1,17	0,2940
TIPO DE REGULADOR	0,82	2	0,41	99,85	<0,0001
TIPO DE EXPLANTE*TIPO DE R..	0,09	2	0,05	11,13	0,0007
Error	0,07	18	4,1E-03		
Total	0,99	23			

### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 35,0694 gl: 18

TIPO DE EXPLANTE	Medias	n	E.E.
E1	52,50	12	1,71 A
E2	49,58	12	1,71 A

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

### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 35,0694 gl: 18

TIPO DE REGULADOR	Medias	n	E.E.
R1	64,38	8	2,09 A
R3	62,50	8	2,09 A
R2	26,25	8	2,09 B

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

### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 35,0694 gl: 18

TIPO DE EXPLANTE	TIPO DE REGULADOR	Medias	n	E.E.
E1	R3	68,75	4	2,96 A
E1	R1	68,75	4	2,96 A
E2	R1	60,00	4	2,96 A B
E2	R3	56,25	4	2,96 B
E2	R2	32,50	4	2,96 C
E1	R2	20,00	4	2,96 D

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

## Sobrevivencia de explantes

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% SOBREVIVENCIA	24	0,70	0,61	9,65

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,28	5	0,26	8,21	0,0003
TIPO DE EXPLANTE	0,18	1	0,18	5,85	0,0264
TIPO DE REGULADOR	1,06	2	0,53	17,10	0,0001
TIPO DE EXPLANTE*TIPO DE R..	0,03	2	0,02	0,50	0,6141
Error	0,56	18	0,03		
Total	1,84	23			

### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,4167 gl: 18

TIPO DE EXPLANTE	Medias	n	E.E.
E1	2,75	12	0,19 A
E2	2,08	12	0,19 B

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

### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,4167 gl: 18

TIPO DE REGULADOR	Medias	n	E.E.
R2	3,00	8	0,23 A
R3	2,88	8	0,23 A
R1	1,38	8	0,23 B

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

### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,4167 gl: 18

TIPO DE EXPLANTE	TIPO DE REGULADOR	Medias	n	E.E.
E1	R2	3,50	4	0,32 A
E1	R3	3,25	4	0,32 A
E2	R2	2,50	4	0,32 A
E2	R3	2,50	4	0,32 A B
E1	R1	1,50	4	0,32 B C
E2	R1	1,25	4	0,32 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes

