

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a saint, likely St. Charles, seated on a throne and holding a book. Above him is a golden mitre. To the left and right are golden castles. Below the central figure are two golden columns. The entire scene is set against a blue background with a white cloud. The outer ring of the seal contains the Latin text "CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CETERAS OBIS CONSPICUA".

**Evaluación de los ácidos indolbutírico y naftalenacético para el
enraizamiento de *Tillandsia plagiotropica* Rohweder (Bromeliaceae) en
cultivo *in vitro***

Pablo Rafael Bolaños Sittler

BIOLOGO

Guatemala, agosto 2009

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a saint, likely St. Charles, holding a book and a staff. Above the figure is a golden mitre. To the left and right are golden castles. Below the figure are two golden columns. The background is a landscape with green hills and a blue sky. The Latin motto "CETERAS CIBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER" is inscribed around the perimeter of the seal.

**Evaluación de los ácidos indolbutírico y naftalenacético para el
enraizamiento de *Tillandsia plagiotropica* Rohweder (Bromeliaceae) en
cultivo *in vitro***

Informe de Tesis

Presentado por

Pablo Rafael Bolaños Sittler

Para optar al título de

Biólogo

Guatemala, agosto 2009

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Óscar Cobar Pinto, Ph.D.	Decano
Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Lic. Liliana Magali Vides de Urizar	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. María Estuardo Guerra Valle	Vocal IV
Br. Berta Alejandra Morales Mérida	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a todas las personas que colaboraron de alguna u otra manera al desarrollo del presente trabajo:

A:

MIS ASESORES

Ing. Agr. Mak Milan Cruz Sic

Por su paciencia, amistad y valiosos consejos en el desarrollo experimental de ésta investigación.

Lic. Federico Nave

Por su acertada asesoría y consejos en el área estadística.

REVISOR

Lic. Carlos Salazar

Por su apoyo y asesoría brindada

INSTITUCIÓN SEDE DEL EXPERIMENTO

LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS DE LA SUBÁREA DE MANEJO Y MEJORAMIENTO DE PLANTAS, FACULTAD DE AGRONOMÍA, USAC.

Por brindarme el equipo, reactivos y materiales necesarios para realizar la etapa experimental.

ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS

GUATEMALA

MIS PADRES, HERMANAS Y SOBRINOS

MARGARITA, MARCOS Y JUAN DIEGO

MIS SUEGROS

MIS AMIGOS

INDICE

TEMA	PÁGINA
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1 MARCO TEORICO	4
3.1.1 <i>Tillandsia</i> sp.	4
3.1.2 Descripción botánica de <i>Tillandsia</i>	5
3.1.3 Clasificación taxonómica de <i>Tillandsia</i> Rohweder	5
3.1.4 Aspectos Generales sobre Biotecnología	6
3.1.5 Micropropagación	6
3.1.6 Historia de la Micropropagación	7
3.1.7 Fases de la micropropagación	9
I Asepsia del Cultivo	9
II Multiplicación	9
III Enraizamiento de brotes y trasplante	9
3.1.8 Propagación <i>in vitro</i>	10
3.1.9 Ventajas de la Propagación <i>in vitro</i>	10
3.1.10 Enraizamiento <i>in vitro</i>	12

3.1.11 Desventajas del enraizamiento <i>in vitro</i>	13
3.1.12 Métodos de tratamiento con auxinas	13
3.1.13 Efectos de los reguladores del crecimiento	14
3.1.14 Factores que influyen en la Micropropagación	16
3.1.14.1 Medio de Cultivo	16
Agua	16
Componentes Inorgánicos	16
Componentes Orgánicos	18
Componentes naturales	19
Otros componentes	19
Agentes gelificantes	20
pH (potencial del ión hidrógeno)	20
3.1.14.2 Ambiente de Cultivo	21
3.1.14.3 Contaminación	21
3.1.14.4 Oxidación	22
3.1.14.5 Desinfección de materiales vegetales	23
3.1.14.6 Condiciones de laboratorio	24
3.1.15 Hormonas vegetales	24
3.1.16 Propagación <i>in vitro</i> de <i>Tillandsia plagiotropica</i>	26

4. JUSTIFICACIÓN	28
5. OBJETIVOS	30
6. HIPOTESIS	31
7. MATERIALES Y METODOS	32
7.1 Plantas para la siembra	32
7.1.1 <i>Tillandsia plagiotropica</i> Rohweder	32
7.2 Tratamientos	32
7.3 Equipo y Materiales	33
7.4 Recurso Humano	34
7.5 Fases de la investigación	34
7.6 Diseño experimental	36
7.7 Muestra	37
7.8 Variables de respuesta	37
7.9 Análisis estadístico	37
7.10 Boleta de toma de datos	38
7.11 Técnicas de Observación	38
8. RESULTADOS	39
9. DISCUSIÓN	46
10. CONCLUSIONES	51
	52

11. RECOMENDACIONES	54
9. REFERENCIAS	59
10. ANEXOS	60
ANEXO 1 ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS REGULADORES DEL CRECIMIENTO A EVALUAR	61
ANEXO 2 BOLETA PARA LA ELABORACIÓN DE SOLUCIONES CONCENTRADAS DE CONCENTRACIÓN CONOCIDA	63
ANEXO 3 COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO MS Y CANTIDAD AGREGADA	64
ANEXO 4 Área de Crecimiento	65
ANEXO 5 Cámara de Flujo Laminar	66
ANEXO 6 Boletas de Toma de Datos	68
ANEXO 7 PRUEBAS ESTADISTICAS	

1. RESUMEN

Varias bromelias del género *Tillandsia* spp. se encuentran en la lista CITES (Convenio Internacional sobre el Comercio de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre) como especies en peligro de extinción, por pérdida de hábitat y por su sobrecolecta con fines comerciales debido a que son plantas muy utilizadas como ornamentales. Por otro lado, su cultivo presenta la limitante de que su tasa de reproducción vegetativa *in vivo* es muy baja y la reproducción sexual requiere de al menos cinco años para que una planta produzca flores. Este trabajo consistió en evaluar una alternativa de producción *in vitro* de *Tillandsia plagiotropica* con el fin de estimular la producción de raíces, para presentar un método más efectivo para el cultivo de esta especie.

Se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog, como agentes inductores se utilizaron los reguladores de crecimiento, ácido naftalenacético (ANA) con 4 niveles 0.1, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/L y ácido indolbutírico (IBA) a 0.05, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/L. Las plantas que se utilizaron provinieron de un cultivo *in vitro* de iniciación, montado previamente en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC). Se cuantificó datos a los 150 días del trasplante a los medios con reguladores, tomando en cuenta el porcentaje de enraizamiento, el número de raíces por planta y la longitud de éstas.

Se utilizó un diseño completamente al azar, con un nivel de confianza del 95%. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) por medio del método de Kruskal Wallis, para lo cual primero se comprobó la normalidad de los datos por medio del test de

Shapiro Wilk, así mismo se realizó la prueba de Bartlett para comprobar homocedasticidad.

Se determinó que el medio MS al 25% adicionado con 0.1 mg/L de ANA, incrementa significativamente la cantidad de raíces por planta ($p < 0.05$) y la longitud de dichas raíces ($p < 0.05$), con éste tratamiento se obtuvo un porcentaje de enraizamiento del 90% de las plantas, 1.6 raíces por planta en promedio con una longitud de 7.6 mm. En las plantas de los tratamientos con IBA no hubo un incremento significativo en el desarrollo de raíces ($p > 0.05$).

2. INTRODUCCIÓN

Varias especies vegetales del Género *Tillandsia* spp. se encuentran en grave peligro de extinción, por pérdida de hábitat y por su extracción del medio natural, debido a que son plantas utilizadas como ornamentales, principalmente en Europa y Japón. Por otro lado el cultivo de esta planta, presenta la limitante que su tasa de reproducción vegetativa *in vivo* es muy baja y la reproducción sexual requiere de al menos cinco años para que produzca flores.

Este trabajo pretende evaluar una alternativa de producción *in vitro* de *Tillandsia plagiotropica* Rohweder utilizando los reguladores de crecimiento, ácido indolbutírico (IBA) y ácido naftalenacético (ANA), con el fin de estimular la producción de raíces y de tal manera presentar un método efectivo para el cultivo de estas especies. Con lo que se busca contribuir a la reducción de la pérdida de biodiversidad al presentar un método alternativo y efectivo para el cultivo de *T. plagiotropica*.

3. ANTECEDENTES

3.1 MARCO TEÓRICO

3.1.1 *Tillandsia* spp.

El Género *Tillandsia* pertenece a la Familia Bromeliaceae, con 46 géneros. Esta familia está integrada por tres Subfamilias: *Bromeloideae*, *Pitcarnioideae* y *Tillandsioideae*. De ellas, la Subfamilia *Tillandsioideae* es la más numerosa con unas 400 especies aproximadamente. Se encuentran en trópicos y subtrópicos del Nuevo Mundo, con unos cuantos taxa extendiéndose a zonas cálido-templadas. Existe un claro centro de diversidad en el centro y sur de México. La hibridación entre especies simpátricas (especies que habitan en un área común) es un fenómeno habitual, y en consecuencia la determinación definitiva de algunos ejemplares, ocasionalmente es difícil (Davidse *et al* 1994).

Las tilandsias crecen en asociación sobre árboles como encinos, pinos y otras coníferas. La época de floración es en marzo, abril y mayo. Son de hábito epífita, sus raíces solamente se adhieren a la planta huésped, sin extraer nada de ella, el alimento lo toman del aire, lluvia y materia orgánica depositada entre las raíces de esta, y la corteza del árbol (FODECYT 2005).

Las bromelias son plantas típicas de América, la mayoría crece en las selvas tropicales y subtropicales donde son necesarias altas condiciones de humedad. Las áreas con más

abundancia de epífitas son las selvas de montaña (altitudes de 1,500 msnm en promedio); aquí los árboles proveen muchos hábitat con diferentes condiciones de humedad, exposición e iluminación. En las regiones templadas, las bromelias epífitas son comunes (Universidad Autónoma de Chiapas 2007).

En Guatemala se encuentra una gran diversidad de especies (alrededor de 32). La especie *Tillandsia plagiotrópica*, proviene de México y Guatemala (FODECYT 2005).

3.1.2 Descripción botánica de *Tillandsia plagiotropica*

Epífitas, en ocasiones terrestres o rupícolas, caulescentes o acaules. Hojas fasciculadas, raramente distribuidas uniformemente a lo largo del tallo, enteras. Escapo Terminal, generalmente erecto, a veces ligera a marcadamente péndular. Inflorescencia simple o compuesta. Flores bisexuales; sépalos asimétricos o raramente simétricos, libres o el par adaxial (posterior) variadamente conados, o raramente los 3 conados en igual medida; pétalos libres, sin apéndices; estambres libres o adnatos a los pétalos basalmente, raramente conados basalmente; ovario súpero. El fruto es una cápsula septicida; semillas con apéndices plumosos (Davidse *et al* 1994).

3.1.3 Clasificación taxonómica de la especie *Tillandsia plagiotropica*

Reino: *Plantae*

Phyllum: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

Orden: *Bromeliales*

Familia: *Bromeliaceae*

Género: *Tillandsia*

Especie: *Tillandsia plagiotropica*

Nombres comunes: gallitos, claveles del aire, Tilandsias (García y Betancur 2002)

3.1.4 Aspectos Generales sobre Biotecnología:

Según Villalobos (1990), entre los avances y desarrollos más recientes de la ciencia, la Biotecnología ha logrado los de mayor importancia, principalmente en la medicina y Agronomía.

En la Agronomía, los métodos modernos de la Biotecnología han contribuido al incremento de la producción, a mejorar la calidad de los productos y se prevee en un corto plazo avances significativos en la resistencia a plagas y enfermedades y factores ambientales adversos.

La Biotecnología se define como “Cualquier técnica que utiliza organismos vivos o partes de los mismos para mejorar plantas o animales, modificar productos o desarrollar microorganismos para aplicaciones científicas” (Villalobos 1990).

3.1.5 Micropropagación

La palabra micropropagación, utilizada por primera vez en 1968 por Hartmann y Kester y parece haber ganado una amplia aceptación como término general para designar varias

de las técnicas utilizadas en la multiplicación *in vitro*. Originalmente, la micropropagación se definió como “Cualquier procedimiento aséptico que comprende la manipulación en las 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” (Krikorian, 1991).

La micropropagación clonal implica que cada una de las plántulas que se produce pueda crecer y ser fenotípicamente y genotípicamente idénticas a la planta original de la que se deriva. Hasta el momento, las puntas de los tallos y las yemas laterales han sido los explantes más comúnmente utilizados para la etapa de iniciación o establecimiento (Krikorian, 1991).

3.1.6 Historia de la Micropropagación

La técnica de generar plantas nuevas en un medio de crecimiento artificial y en condiciones asépticas, se inició con investigaciones sobre fisiología vegetal. Asimismo estas investigaciones tomaron auge cuando Sacks, en 1860 y Knops en 1861 observaron que los principales nutrientes de las plantas eran compuestos orgánicos, para lo cual prepararon una solución que contenía una mezcla de ellos; esta mezcla se utilizó posteriormente por casi todos los investigadores que siguen este campo de estudio. En 1879, Vocking aportó más información de nuevas yemas y raíces, o de yemas axilares de las cuales se colocaron en una cámara de vacío (Hurtado y Merino 1988).

Heberlandt, en 1902, aisló y cultivó tejido vegetal, utilizando asepsia y vaticinó que podría ser posible cultivar células somáticas en medios de cultivo. White, en los años 1934 y 1939, cultivó raíces de tomate *in vitro*, agregándole al medio extractos de vitaminas, levadura, etc. Posteriormente, Gautheret y Nobecout, conjuntamente con otros colaboradores, indujeron el crecimiento de callo en un medio sintético (Ducreux y Rossignol 1986).

En la década de los 50-60, Skoog descubrió que el callo de tabaco proliferaba en un medio que tenía como uno de sus ingredientes ADN que provenía de semen de pescado. Este compuesto responsable del crecimiento fue identificado como cinetina reconociendo su función como regulador en la iniciación de la división celular. En 1962, Murashige y Skoog desarrollaron un medio nutritivo con el que lograron el crecimiento rápido de tejidos de tabaco que posteriormente fue útil para muchas especies de plantas. Este medio es ampliamente utilizado en cultivo *in vitro*. Después de estos descubrimientos y avances en las investigaciones de cultivo de tejidos, se han realizado innumerables trabajos aplicando técnicas de cultivo *in vitro*, en muchas especies de plantas y utilizando diversos explantes. Todos estos trabajos se han orientado más que todo a la citología, fusión de protoplastos, fitomejoramiento, propagación, mutagénesis, formación de híbridos interespecíficos, etc. (Hurtado y Merino 1988).

3.1.7 Fases de la micropropagación

Existen tres pasos importantes, que deben tomarse en cuenta en la micropropagación, según lo propuesto por Murashige en 1974.

3.1.7.1 Asepsia del Cultivo

Los medios de cultivo pueden provocar la proliferación de microorganismos en donde pueden crecer y desarrollarse, compitiendo con el cultivo, es por eso que es necesario que todos los explantes deben estar debidamente limpios y desinfectados. Las sustancias más comunes para desinfectar los explantes son: el hipoclorito de sodio o de calcio y alcohol etílico al 70 % (Mroginski 1991).

3.1.7.2 Multiplicación

En ésta etapa sucede la formación de nuevas células por división o por aumento en tamaño. Esta etapa está influenciada por las condiciones *in vitro* y la ganancia en peso seco da como resultado la diferenciación *de novo*.

3.1.7.3 Enraizamiento de brotes y trasplante

Para que se de esta etapa se debe trasladar el cultivo a otro medio con menos cantidad de sales inorgánicas y cambios en el balance hormonal, es decir, disminuir las

citocininas y aumentar las auxinas. La última etapa de la micropropagación es el período de endurecimiento o aclimatación en la cual la planta deberá colocarse en condiciones normales para su desarrollo total. Para lograr ésta fase se deberá lavar la planta y eliminar los restos del medio de cultivo que pudieran quedar en las raíces y luego sembrarlas en suelo estéril, cubriéndolas con bolsas plásticas a las cuales se le abrirán agujeros para aclimatarlas poco a poco a su nuevo hábitat (Roca 1991).

3.1.8 Propagación *in vitro*

La propagación *in vitro* consiste en cultivar asépticamente diferentes explantes constituidos por fracciones de un tejido u órgano que se extrae de la planta. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se basa en el hecho de que cuando un inóculo con potencialidad de diferenciación se incuba en condiciones favorables (balance hormonal apropiado) regenera en un nuevo individuo (Roca 1991).

Entre los usos más frecuentes de esta técnica se puede mencionar: el mejoramiento genético, la obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, conservación de germoplasma y micropropagación (Roca 1991).

3.1.9 Ventajas de la Propagación *in vitro*

Los métodos disponibles para la propagación de plantas *in vitro* son una extensión de aquellos ya desarrollados por propagación convencional. Las técnicas de cultivo *in vitro* tienen las siguientes ventajas sobre los métodos tradicionales:

- Los cultivos se comienzan con piezas muy pequeñas de plantas (explante). Sólo una pequeña cantidad de espacio es requerido para mantener las plantas o para incrementar grandemente su número.
- La propagación es idealmente aséptica. Una vez los cultivos han sido empezados debería no haber pérdidas por enfermedades y las plántulas finalmente producidas deberían estar libres de bacterias, hongos, virus y nemátodos (esto no siempre se cumple).
- Los métodos están disponibles para plantas libres de enfermedades por virus. Plantas certificadas libres de enfermedades pueden ser producidas en gran cantidad.
- Un ajuste más flexible de factores influyentes en la regeneración vegetativa es posible tales como niveles de nutrientes y reguladores del crecimiento, luz y temperatura. Por tal razón la tasa de propagación es mucho más grande que en la macropropagación y muchas más plantas pueden ser producidas en un tiempo dado. La técnica es muy conveniente cuando un alto volumen de producción es esencial.
- Puede ser posible producir clones de algunas plantas que de otra forma sería más lento y difícil (o incluso imposible) propagar vegetativamente.
- Las plantas pueden adquirir una nueva característica temporal a través de la micropropagación en la cual las hace más deseables para crecer, que el método convencionalmente utilizado.
- La producción puede continuar a lo largo de todo el año y es independiente de los cambios estacionales.

- El material producido vegetativamente puede ser almacenado por largos períodos de tiempo.
 - Se requiere menos energía y espacio para los propósitos de propagación y para el mantenimiento de inventarios de plantas.
 - El material vegetal necesita poca atención entre los subcultivos y no hay labor o requerimiento de materiales para irrigación, control de malezas, rociadores, etc.
- La micropropagación es más ventajosa ya que el costo es menor que los métodos tradicionales de multiplicación (George 1993).

Un ejemplo de la efectividad del cultivo de tejidos en bromeliáceas es el trabajo de Davidson y Donnan (1977) en el cual determinaron que en un período de 9 meses, bromelias del género *Cryptanthus* producirían 10,000 plantas a partir de una sola madre con 25 brotes.

3.1.10 Enraizamiento *in vitro*

Por lo general se encuentran cuatro fases que pueden ser distinguidas en el proceso de enraizamiento:

- Una fase de inducción: cuando la capacidad para la formación de raíz es determinada.
- Una fase de iniciación: cuando ocurren cambios citológicos visibles.
- Una fase de organización: cuando la raíz principal puede ser vista para ser producida histológicamente.

- Una fase de crecimiento (elongación de la raíz): cuando se desarrolla hacia raíces (Bolaños 2000).

3.1.11 Desventajas del enraizamiento *in vitro*

Una de las desventajas del enraizamiento *in vitro* es la dificultad de inducir un sistema de raíces el cual será efectivo completamente cuando las plantas son transferidas al terreno, las raíces producidas *in vitro* frecuentemente les faltan pelos secundarios, conexiones vasculares y posiblemente no comiencen a desarrollar un cambium secundario hasta que sea removido el tubo del cultivo.

Las raíces que han crecido *in vitro* también tienen la posibilidad de ser dañadas al remover las plantas del medio de cultivo (particularmente si éstas necesitan ser lavadas para remover el agar) y como éstas son plantadas fuera se incrementa las posibilidades de infecciones fungosas o bacterianas (George 1993).

3.1.12 Métodos de tratamiento con auxinas:

Cuando los brotes están listos para ser enraizados *in vitro* la auxina exógena puede ser aplicada en dos formas:

- Cultivado por un período prolongado en un medio conteniendo auxina.
- Tratado con una auxina por corto tiempo anterior a un cultivo en un medio libre de auxinas (George 1993).

Aplicaciones prolongadas de auxinas (crónicas)

Los brotes pueden frecuentemente ser enraizados satisfactoriamente en un medio en el cual la auxina ha sido incorporada en suficiente cantidad, para que la concentración dentro de los brotes explantados puedan volverse adecuados para la inducción de raíces. Presumiblemente, los niveles endógenos mucho tiempo después declinan suficientemente durante el período de cultivo a través del metabolismo y conjugación para permitir la iniciación de la raíz y crecimiento (George 1993).

Elección de la concentración correcta

Es necesario notar que el tratamiento con la auxina que produce el más alto número de raíces por brote, puede no necesariamente ser el más apropiado. Esto es porque el crecimiento de la planta *extra vitrum* puede ser afectada (George 1993). Debido a esta razón es necesario hacer un estudio posterior al enraizamiento, para ver que tratamiento responde mejor en el trasplante al medio fuera de las condiciones *in vitro*.

3.1.13 Efectos de los reguladores del crecimiento

Las auxinas más frecuentemente incorporadas a los medios para inducir enraizamiento son AIA (0.1 – 10 mg/L), ANA (0.05 – 3.0 mg/L). Estos componentes pueden algunas veces ser tratados como alternativos, pero frecuentemente la formación de raíz es mucho mejor con una que con otra. El ANA, por ejemplo, es superior al AIA y AIB para el enraizamiento de brotes de olivo (George 1993).

Mezclas de auxinas

La formación de raíces adventicias en algunas plantas se ha encontrado que son más efectivamente inducidas por una mezcla de auxinas que por un solo componente (George 1993).

Tratamientos de auxinas cortos (agudos)

Las raíces iniciadas por una auxina (particularmente ANA) pueden algunas veces faltar, y crecer hasta que la concentración del regulador es reducida y el crecimiento del brote puede ser similarmente suprimido. La exposición prolongada a una auxina también incrementa las posibilidades de formación de callo. Para impedir estos problemas, algunos investigadores prefieren administrar auxina sólo por un corto tiempo.

Hay dos formas de aplicar dosis penetrantes de auxina:

- Los brotes pueden ser cultivados en una solución o en un medio conteniendo auxina concentrada por un período corto.
- Los brotes pueden ser simplemente sumergidos dentro del polvo de la auxina concentrada o colocada brevemente dentro de una solución concentrada (George 1993)

Técnica de Precultivo

Se colocan los brotes sobre un medio conteniendo auxina (con frecuencia uno conteniendo una concentración anormalmente alta de auxina) por un intervalo corto, puede ser un método efectivo de inducción de raíz. Las raíces se desarrollan y crecen cuando los cortes son movidos a un medio libre de auxina. Si se supone esto, a través de esta secuencia, la concentración de auxina endógena es más efectivamente reducida para permitir el crecimiento de raíz (George 1993).

3.1.14 Factores que influyen en la Micropropagación

3.1.14.1 Medio de Cultivo

A. Agua

Los medios de cultivo de tejidos están constituidos en su mayor parte por agua; por lo tanto, es necesario utilizar agua de intercambio iónico o agua destilada, ya que el agua natural incluye algunas sustancias que pueden causar influencia negativa para el crecimiento de las plantas *in vitro*.

B. Componentes Inorgánicos

Los componentes inorgánicos son importantes para el crecimiento de las plantas. Si escasean estos, aparecen los síntomas característicos correspondientes a la deficiencia de cada elemento.

a. Nitrógeno

El nitrógeno es componente de aminoácidos (proteínas), vitaminas y ácidos nucleicos. Mientras la planta está en crecimiento activo, necesita gran cantidad de nitrógeno. Este se encuentra en forma de NH_4NO_3 y en cantidad adecuada según la especie de planta. Existen varias influencias del nitrógeno. En concentraciones altas, promueve el enraizamiento, mientras que, en concentraciones bajas, promueve el desarrollo de callo. Dos fenómenos semejantes son causados mediante el NH_4^+ .

b. Fósforo

El fósforo es uno de los elementos necesarios para el metabolismo de las plantas. Principalmente, es utilizado para sintetizar ATP como fuente de energía. Dentro de los medios de cultivo, las plantas lo absorben en forma de PO_4^{-3} .

c. Potasio

Existe relación entre el potasio iónico y la diferenciación de órganos.

d. Calcio

El calcio es componente de la pared celular.

e. Magnesio

El magnesio es un componente importante de la molécula de clorofila.

f. Hierro

Para los vegetales, el hierro es importante, particularmente, ya que es un componente de la clorofila. Normalmente se da en forma de quelato (Fe-EDTA) en los medios de cultivo, en otra forma se precipitaría.

g. Microelementos

Se adicionan manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), molibdeno (Mo) y boro (B) a los medios de cultivo como microelementos (Villalobos 1990).

C. Componentes Orgánicos

a. Vitaminas

Según la especie de planta, así se adiciona tiamina (vitamina B1), piridoxina (vitamina B6) y ácido nicotínico.

b. Mio-inositol

Se sabe que el agua de coco incluye componentes que promueven la producción de células u órganos, y la diferenciación de los mismos. Mio-inositol es uno de estos componentes.

c. Aminoácidos

Acerca de la función de los aminoácidos, se sabe que estos promueven la producción y diferenciación de células y tejidos. Sin embargo, algunas veces pueden ocurrir inhibiciones en el crecimiento de las vitroplantas cuando se adiciona uno solo al medio

de cultivo. En este caso se debe incluir combinaciones de varias clases para que activen conjuntamente (Villalobos 1990).

D. Componentes naturales

Los más utilizados son la pulpa de plátano, agua de coco, emulsión de pescado, jugo de naranja, extracto de malta, hidrolizado protéico (caseína) jugo de tomate, extracto de levadura, etc.

En varios casos, éstos compuestos inducen diferenciación y la producción de células y tejidos eficazmente. Sin embargo, debido a que son componentes muy complejos, no son productos estables ni homogéneos, es mejor evitar su uso, sobre todo en trabajos de investigación (Villalobos 1990).

E. Otros componentes

a. Fuente de Carbono

Originalmente, las plantas pueden producir azúcar como fuente de energía a través de la fotosíntesis. Sin embargo, las vitroplantas casi no realizan fotosíntesis debido a la baja intensidad de luz en la que se desarrollan y aunque lo hagan producirán muy poca azúcar. A causa de esto, es necesario adicionar cierta cantidad de azúcar como fuente de energía. Por lo general esta cantidad varía entre 1 y 3% de sacarosa o glucosa que se agrega al medio de cultivo.

F. Agentes gelificantes

a. Agar

Como gelificante del medio de cultivo, el agar se utiliza más que otros agentes. Sin embargo no se puede usar uno corriente como el que se ofrece en el mercado, ya que este es impuro y puede inhibir el crecimiento de las vitroplantas. Por consiguiente, se debe utilizar uno con alto grado de pureza. Normalmente se adiciona entre 0.6 a 1% al medio de cultivo.

b. Phytigel

Es un gelificante que se aplica en porcentajes más bajos que el agar, su precio en el mercado es elevado, pero es de mayor pureza (Szabados et. al. 1991).

c. pH (potencial del ión hidrógeno)

La concentración del ión hidrógeno produce un efecto en la absorción iónica, en los medios de cultivo. La acidez y la alcalinidad extremas inhiben el crecimiento de las vitroplantas. Por lo general se estabiliza el pH apropiado entre 5.4 a 6.0 con HCl y NaOH o KOH, según la especie de planta que se va a micropropagar (Villalobos 1990).

3.1.14.2 Ambiente de Cultivo

Las condiciones del ambiente influyen sobre varios aspectos del desarrollo de las vitroplantas, sobre todo en la diferenciación de órganos y formación de embriones adventicios; por lo tanto, es importante comprender las relaciones entre los factores del ambiente y su influencia sobre las plantas de cultivo *in vitro* (Villalobos 1990).

3.1.14.3 Contaminación

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 medio de cultivo o modificarlo. Evitar contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en su posterior incubación y manipulación (Mroginski 1991).

Davidson y Donnan (1977) notaron que cultivos de bromelias del género *Cryptanthus* contaminados con una bacteria, se tornaban con un color más opaco que las no contaminadas y en ocasiones llegaban a morir. Sus resultados indicaron que las plantas no contaminadas producían casi el triple de plántulas adyacentes que los medios del cultivo contaminados.

3.1.14.4 Oxidación

La oxidación es una reacción originada por un grupo de sustancias aromáticas, llamadas fenoles que son derivados del benceno, las cuales son muy frecuentes en el reino vegetal en forma de éteres y glucósidos, en el proceso de oxidación forman compuestos con propiedades antisépticas que pueden impedir en el cultivo *in vitro* el desarrollo del propio explante. La oxidación de los cultivos *in vitro* es causada por la liberación de fenoles al medio de cultivo, que reaccionan con el oxígeno del frasco y producen coloraciones rojas, amarillas y en casos avanzados café oscuro. Éstos compuestos fenólicos son exudados por la herida del tejido dentro del medio, a la vez son atrapados por el agar y acumulados formando un área negra alrededor del explante, resultando en una inhibición del crecimiento (Córdova 1976).

El fenómeno de la oxidación se observa normalmente en explantes viejos después de cultivarlos durante un tiempo largo, formándose materia orgánica alrededor del explante. Algunas especies tienen una tendencia de oxidación desde el inicio del cultivo, ocurriendo necrosis o inhibición del crecimiento. La toxicidad por oxidación se cree que ocurre a través de algún complejo químico de fenol orgánico metabólico (George 1993).

Antioxidantes

Muller L. y A. Krikorian (1985), citados por Cruz (2004), indican que los antioxidantes son sustancias que se usan durante la preparación de los explantes o que se adicionan al

medio para evitar o reducir la oxidación de ciertos compuestos, especialmente derivados de fenoles o polifenoles, que pueden afectar el desarrollo de los explantes.

Lee (1999), citado por Cruz indica que algunos de los procedimientos utilizados para evitar dicha oxidación son:

- Agregar Polivinilpirrolidona (PVP).
- Modificando el potencial redox, a través de agentes reductores o con menor disponibilidad de oxígeno.
- Inactivando las enzimas fenolasas.
- El control más efectivo, son los subcultivos frecuentes y la eliminación de tejidos que se encuentran casi muertos y por lo general se localizan en la base de los brotes.

3.1.14.5 Desinfección de materiales vegetales

Previo a la siembra de nuevo material, o por motivos de tratamiento de vitroplantas contaminadas, se debe de realizar una desinfección que, según sea el caso, se puede utilizar varios compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes, pero en la actualidad es casi generalizado el empleo de etanol (70% v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1% al 3% contenido en productos de uso doméstico (cloro comercial). Con menor frecuencia se usan el hipoclorito de calcio (Ca(OCl)_2 6% a 12%) y el cloruro de mercurio (HgCl_2 , 0.1% a 1.5%), aunque hay que recalcar que este compuesto es altamente tóxico y que no es fácilmente removible del explante (Mroginski 1991).

3.1.14.6 Condiciones de laboratorio

Para el buen desarrollo de estas plantas, es necesario tener bajo un buen control la luz y humedad. La mayor parte de producciones comerciales se efectúa bajo invernaderos que usan en la parte superior sarán que permite un paso de luz del 60 por ciento. La temperatura adecuada es de 15° C a 25° C. Las condiciones óptimas para la multiplicación de estas plantas oscilan entre los 750 y 1,200 metros sobre el nivel del mar, donde es factible obtener plantas vigorosas, sanas y uniformes (García 2002, Betancourt 1998).

3.1.15 Hormonas vegetales

Una hormona vegetal es un compuesto orgánico sintetizado en una parte de la planta y translocado a otra parte donde, en concentraciones muy bajas, produce una respuesta fisiológica (Salisbury 2000).

Actualmente se conocen cinco grupos de hormonas: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico y etileno (Salisbury 2000). Entre éstas las auxinas desempeñan una función importante en la expansión de las células de tallos. Estimulan también la división celular, fomentan el desarrollo de callos, de los que se desprenden crecimientos similares a raíces; de este modo son muy eficaces para iniciar la formación de raíces de varias especies vegetales, esta respuesta fue la base de la primera aplicación práctica en la agricultura de sustancias en crecimiento. Las auxinas pueden iniciar la floración e inducir el amarre de frutos y su desarrollo en algunas especies (Mansilla 2007).

El ácido-3-indolacético (IAA) fue la primera auxina descubierta (Anexo 1, figura 1). Luego se evidenció que las plantas contienen otros compuestos que son estructuralmente similares al IAA y provocan muchas respuestas idénticas; por lo que se consideran hormonas auxínicas, estas son, el ácido 4-cloroindolacético (4-cloroIAA), el ácido fenilacético (PAA) y el ácido indolbutírico (IBA) (Anexo 1, figura 2). El IBA, se pensó en un principio que era sólo una auxina sintética activa, pero se da en hojas de maíz y en varias dicotiledóneas, por lo que seguramente está presente en muchas otras plantas (Salisbury 2000).

Ciertos compuestos sintetizados únicamente en laboratorio también pueden causar muchas respuestas fisiológicas y también se les considera auxinas. Entre ellos, el ácido α -naftalenacético (ANA), es uno de los que mejor se conocen (Anexo 1, figura 3); como no son sintetizados por plantas, no son hormonas, solamente se les considera reguladores del crecimiento vegetal (Salisbury 2000).

Desde el punto de vista químico, una definición de auxina, es que todos los compuestos conocidos similares a la auxina se parecen al IAA en que tienen un grupo carboxilo unido a otro grupo carbonatado (normalmente $-\text{CH}_2-$) que, a su vez, está unido a un anillo aromático (Salisbury 2000).

En el presente experimento se utilizará IBA y ANA, que son reguladores del crecimiento de fácil obtención y de uso frecuente en la agricultura (H. Poliszulk *et al* 1999).

3.1.16 Propagación *in vitro* de *Tillandsia plagiotropica*

Ya se ha tenido éxito en procedimientos para la germinación de tilandsias *in vitro*, así como también se ha realizado con éxito algunos estudios para la producción de brotes en plantas cultivadas *in vitro* con motivos de multiplicación vegetativa (Cueva et. al. 2006).

Davidson y Donnan (1977) lograron propagar e inducir el enraizamiento *in vitro* con éxito de bromeliáceas del género *Cryptanthus*. Para ello utilizaron medio MS conteniendo 1 mg/L de ANA. En este experimento se evaluó ácido indolacético (IAA), ácido indolbutírico (IBA) y ácido naftalenacético (ANA); los datos finales indicaron que el ANA fue la auxina que produjo mayor iniciación de raíz con un promedio de 6.7 raíces por planta. Los resultados indicaron que la formación de raíces estuvo directamente relacionada con la concentración de auxina presente en el medio (Davidson y Donnan (1977)).

Se realizó una investigación sobre el cultivo *in vitro* de *Vriesea gigantea* y *V. philippocoburgii*, en la cual Droste et. al. (2005) demostraron que estas bromelias desarrollaron raíces en medio MS al 50% de su concentración conteniendo 0.2 mg/L de ANA.

Se han realizado pocos trabajos sobre el cultivo *in vitro* de *Tillandsia* spp. Se puede mencionar un trabajo de micropropagación que fue realizado, con fines de conservación de especies de origen nativo del género *Tillandsia* spp. Utilizando embriones

inmaduros y posteriormente propagados *in vitro*. Con el empleo de esta técnica, una gran cantidad de cultivares de *Tillandsia* spp. fueron exitosamente cultivados. Esta técnica también produjo una buena tasa de multiplicación de las plantas regeneradas (Huertas *et al* 1995).

Otro trabajo que se realizó sobre el cultivo *in vitro* de *Tillandsia* spp. fue un proyecto de propagación *in vivo* e *in vitro* de cinco especies en vías de extinción, en el cual se evaluó varias concentraciones de bencilaminopurina (BAP), para la multiplicación vegetativa de las especies estudiadas. En este estudio se logró el desarrollo de varios brotes por planta y se determinó la concentración óptima de BAP, entre las que se evaluaron (FODECYT 2005).

4. JUSTIFICACIÓN

A lo largo de los siglos muchas especies han sido “domesticadas” e integradas en los sistemas de producción agropecuarios, sin embargo otros bienes denominados productos forestales no maderables (PFNM) siguen siendo recolectados en forma silvestre (Zamora 2001), tal es el caso de las tilandsias.

Guatemala comercializa anualmente a otros países, millones de especímenes de flora silvestre con fines ornamentales (Banco de Guatemala 2005), y las tilandsias se encuentran entre las más vendidas, actualmente se comercializa más de 35 diferentes especies. Las exportaciones reportadas por CONAP de tilandsias, asciende a más de 25,000 plantas anuales por especie (Huertas *et al* 1995). El atractivo ornamental de estas plantas, se debe a que tienen formas muy peculiares, son fáciles de cuidar y transportar (Huertas *et al* 1995).

La mayoría de empresas exportadoras de tilandsias, para cumplir con la demanda extranjera, además de su producción, continúa con la sobrecolecta, extrayéndola del medio natural (FODECYT, 2005). Anualmente, se estima que en Guatemala por lo menos el 75 % de estas plantas son colectadas en estado salvaje (Universidad Autónoma de Chiapas 2007).

Otro factor que también amenaza y reduce las poblaciones naturales vulnerables en el país es la destrucción de los bosques por el avance de la frontera agrícola (FODECYT

2005). Tal es el caso de especies como *Tillandsia plagiotropica* Rohweder, la cual se encuentra incluida en los listados de especies amenazadas de la CITES y también figura en la lista roja de flora silvestre del Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP 2008).

Con el fin continuar con la comercialización de *T. plagiotropica* Rohweder y a la vez contribuir a evitar su extinción, es necesario manejarlas de forma sustentable, a través del mejoramiento de los métodos de propagación. Los reguladores de crecimiento podrían ser utilizados en el cultivo de tejidos *in vitro* (Mansilla 2007), pudiendo aprovechar su acción como modificadores de las actividades metabólicas de las plantas directamente en la capacidad de enraizamiento y así lograr acelerar el cultivo de tillandsias; lo cual podría servir para la reintroducción al medio natural, conservación de germoplasma *ex situ*, o bien, su comercialización.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Estandarizar una metodología de propagación *in vitro*, de *T. plagiotropica* Rohweder utilizando el ácido indolbutírico y ácido naftalenacético como reguladores del crecimiento para estimular la inducción de raíces.

5.2 Específicos

5.2.1 Determinar si el ácido naftalenacético y el ácido indolbutírico inducen significativamente la cantidad y longitud de raíces en *Tillandsia plagiotropica* Rohweder.

5.2.2 Encontrar la concentración de ácido naftalenacético y ácido indolbutírico que incremente significativamente el número y longitud de raíces en *T. plagiotropica* Rohweder.

6. HIPOTESIS

6.1 El ácido indolbutírico y ácido naftalenacético aumentan el enraizamiento de *T. plagiotropica* Rohweder.

6.2 Al menos una de las dosis de ácido indolbutírico (0.05, 0.10, 0.50 y 1.00 mg/L) o ácido naftalenacético (0.10, 0.50, 1.00 y 2.00 mg/L), induce significativamente la cantidad de raíces en *T. plagiotropica* Rohweder.

6.3 Al menos una de las dosis de ácido indolbutírico (0.05, 0.10, 0.50 y 1.00 mg/L) o ácido naftalenacético (0.10, 0.50, 1.00 y 2.00 mg/L), induce significativamente la longitud de las raíces en *T. plagiotropica* Rohweder.

7. MATERIALES Y METODOS

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Agronomía de la USAC, localizado en el edificio T-8 de la Ciudad Universitaria.

7.1 Plantas para la siembra

7.1.1 *Tillandsia plagiotropica* Rohweder

- Se utilizó especímenes de *T. plagiotrópica* Rohweder en condiciones *in vitro*, cultivados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Agronomía de la USAC. Los cultivos fueron obtenidos a partir de semilla, sembrados en el laboratorio el 3 de marzo de 2007. Tienen 0.5 cm de altura en promedio y de 7 a 8 hojas. Se desarrollaron en un cuarto de crecimiento con luz controlada (3000 lux), 16 horas de fotoperiodo y una temperatura ambiental promedio de 24° C.

7.2 Tratamientos

A los tubos de ensayo para el cultivo se les agregó 7 ml de medio MS al 25%, se les adicionó ácido naftalenacético en las siguientes concentraciones 0.10, 0.50, 1.00 y 2.00 mg/L (tratamientos 1,2,3 y 4 respectivamente) y a otros se les agregó ácido indolbutírico en las cantidades de 0.05, 0.10, 0.50 y 1.00 mg/L (tratamientos 5,6,7 y 8 respectivamente) (**Tabla 1**).

	ANA				IBA			
No Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8
(mg/L)	0.10	0.50	1.00	2.00	0.05	0.10	0.50	1.00

Tabla 1. Tratamientos: Aquí se puede observar los diferentes tratamientos que se evaluó. Las concentraciones se muestran en cantidad de miligramos de regulador por litro de medio de cultivo.

- Se evaluó las ocho concentraciones de reguladores.
- Se realizó 10 repeticiones para cada tratamiento. En total 80 muestras.

7.3 Equipo y Materiales

Reactivos

Bencilaminopurina

Acido naftalenacético

Nitrato de amonio

Nitrato de potasio

Fosfato diácido de potasio

Cloruro de calcio

Sulfato de magnesio

Sacarosa

Alcohol al 95%

Agar

Materiales

Marcador indeleble

Plantas de la especie *Tillandsia plagiotropica* Rohweder

Equipo

Horno de microondas

Potenciómetro

Balanza analítica

Refrigeradora a 4° C

Autoclave

Estufa con agitación magnética

Computadora

Cámara de flujo laminar

Equipos de aire acondicionado

7.4 Recurso Humano

- Ing. Mak Milan Cruz (asesor)
- Lic. Carlos Salazar (revisor)
- Lic. Federico Nave (asesor de estadística)
- Pablo Bolaños (investigador)

7.5 Fases de la investigación

Fase I Preparación de medios de cultivo

- Para la preparación de los medios de cultivo se utilizó soluciones patrón, las cuales se prepararon previamente en base a la tabla que se presenta en el **Anexo**

2. Para garantizar la ausencia de contaminantes, se utilizó cristalería esterilizada así como agua desmineralizada y autoclaveada como solvente.
- Se evaluó medio de cultivo de Murashigue y Skoog (MS) al 25% de su concentración. Con la ayuda de micropipetas se midió el volumen de los nutrientes y vitaminas a agregar, debido a que la mayoría de las cantidades que se necesita son muy pequeñas. Luego se agregó agar como gelificante.
 - Para la medición del pH en los medios de cultivo, se utilizó un potenciómetro; y el medio se calibró en 5.7 (Cruz, *Com pers.*).
 - Al medio de cultivo se le agregó dos hormonas estimuladoras de enraizamiento, ácido indolbutírico (IBA) y ácido naftalenacético (ANA), en diferentes proporciones según se indica en la **Tabla 1**.
 - Se utilizó tubos de ensayo de 50 ml de capacidad, 2.5 cm de diámetro y 25 cm de longitud, con 10 ml de medio MS cada uno.

Fase II Siembra

- La siembra se llevó a cabo en cámara de flujo laminar, siguiendo una serie de procedimientos para garantizar la ausencia de contaminantes, como el uso de guantes, mascarilla, cristalería y herramientas esterilizadas, etc. (**Anexo 5**). Se sembró 5 tubos extras de cada tratamiento, por si se hubiera dado el caso de que

se necesitara reemplazar algún medio contaminado durante el proceso de crecimiento.

Fase III Crecimiento

- El cultivo se instaló en un cuarto de crecimiento con luz controlada (3000 lux), 16 horas de fotoperiodo y una temperatura ambiental promedio de 24° C +/- 2° C. (**Anexo 4**). Debido a que los cultivos *in vitro* son vulnerables de contaminarse, fue necesario realizar una evaluación semanal del proceso de crecimiento, al detectarse contaminación en algún medio se procedió a reemplazarlo por otro tubo preparado para este fin.

Fase IV Análisis de datos

7.6 Diseño experimental

- Se realizó un diseño completamente al azar, cuyas variables de estudio fueron el crecimiento y número de raíces de las especies a estudiar, durante un período de 150 días.

$$Y_{ij} = \mu + B_i + \epsilon_j$$

Donde:

Y_{ij} = variable de respuesta de la ij-ésima unidad experimental

μ = efecto de la media general de la población

B_i = efecto de la i-ésima dosis de BAP

ϵ_j = error asociado a la ij-ésima unidad experimental

7.7 Muestra:

La muestra o unidad experimental es un tubo de ensayo con 7 ml de medio de cultivo (según el tratamiento respectivo) y una plántula de *Tillandsia plagiotropica* Rohweder.

7.8 Variables de respuesta

- Las variables de respuesta se evaluaron a los 150 días de la siembra, las cuales fueron:
 - A. Longitud de las raíces: medida en milímetros desde la base hasta el ápice de la raíz.
 - B. Número de raíces: se midió el número de raíces por planta en unidades.

7.9 Análisis estadístico

- Para el análisis se realizó un ANDEVA con un nivel de confianza del 95 %.

El análisis estadístico se realizó con ayuda del programa Bioestat 5.0. Para los datos que se obtuvo de cada una de las variables de respuesta se hizo una prueba de normalidad por medio de la prueba de Shapiro-Wilk. Luego se probó homocedasticidad con el test de Bartlett. Debido a que solamente un tratamiento para cada variable de respuesta presentó distribución normal, se realizó la prueba de Kruskal Wallis para evaluar diferencias significativas.

7.10 Boleta de toma de datos

El modelo de la boleta de toma de datos empleada para cada tratamiento y fecha de muestreo se presenta en el **Anexo 6**.

7.11 Técnicas de Observación

- Se midió las raíces con una regla milimetrada y se contó el número de éstas a los 150 días de la siembra, en base a las variables de estudio “largo de raíces” y “número de raíces”.

8. RESULTADOS

Para todas las variables de respuesta evaluadas, se comprobó la normalidad de los datos por medio del test de Shapiro Wilk ($p > 0.05$); en todos los casos solamente el tratamiento número 1 (0.1 mg/L ANA) presentó datos distribuidos de forma normal. Además se comprobó homocedasticidad, en cuyo caso en la evaluación de las variables “cantidad de raíces por planta” y “crecimiento longitudinal de las raíces” las medias diferían estadísticamente ($p < 0.05$). Posteriormente se realizó un análisis por medio del test de Kruskal Wallis con un nivel de decisión de $\alpha = 0.05$.

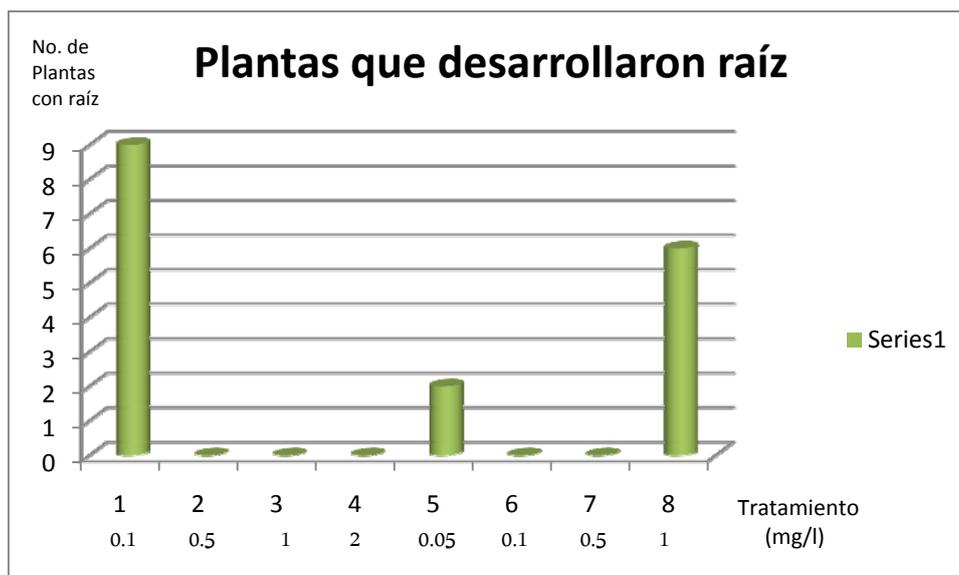
Porcentaje de Enraizamiento

El tratamiento que produjo el mayor número de plantas con enraizamiento fue el número 1 (0.10 mg/L ANA) con 9 ($n = 10$) plantas con crecimiento radical, seguido por el tratamiento 8 (1.0 mg/L IBA) con 6 plantas con enraizamiento y por último el 5 (0.05 mg/L IBA) con solamente 2 plantas enraizadas, el resto de tratamientos no indujo la producción de raíces en ninguna planta (**Tabla 2, Gráfica 1**).

Cantidad de Plantas que Desarrollaron Raíz por Tratamiento

Tratamiento mg/L	1 ANA 0.1	2 ANA 0.5	3 ANA 1	4 ANA 2	5 IBA 0.05	6 IBA 0.1	7 IBA 0.5	8 IBA 1
Total	9	0	0	0	2	0	0	6

Tabla 2. El tratamiento que produjo la mayor cantidad de plantas con raíz fue el 1 (0.1 mg/L ANA), seguido por el tratamiento 8 (1 mg/L IBA).



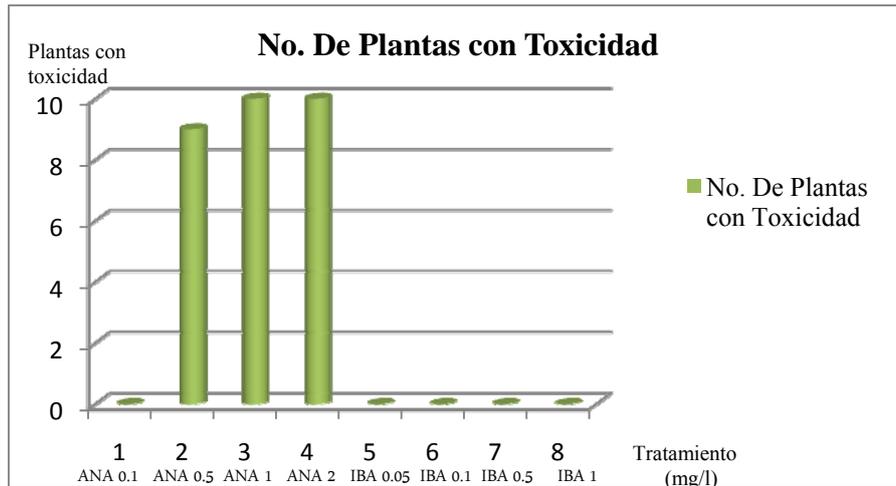
Gráfica 1. El tratamiento que produjo el mayor número de plantas con generación de raíz fue el número 1 (0.10 mg/L ANA) con 9 plantas ((n = 10) con crecimiento radical, seguido por el tratamiento 8 (1 mg/L IBA) con 6 plantas con enraizamiento y por último el 5 (0.05 mg/L IBA) con solamente 2 plantas enraizadas, el resto de tratamientos no produjo ninguna planta con raíz.

En las muestras adicionadas con ANA se presentó toxicidad en los tratamientos de 0.5 mg/L (tratamiento 1), 1 mg/L (tratamiento 2) y 2 mg/L (tratamiento 3) (**Tabla 3**). Las muestras tratadas con IBA no presentaron toxicidad a ninguna de las concentraciones evaluadas. El tratamiento número 1, el más diluido con ANA (0.10 mg/L) no presentó toxicidad y fue el que estimuló el enraizamiento en mayor medida de todos los tratamientos evaluados con los dos reguladores (**Gráfica 2**).

Número de Plantas por Tratamiento que Presentaron Toxicidad

Tratamiento mg/L	1 ANA 0.1	2 ANA 0.5	3 ANA 1	4 ANA 2	5 IBA 0.05	6 IBA 0.1	7 IBA 0.5	8 IBA 1
Total	0	9	10	10	0	0	0	0

Tabla 3. En las muestras adicionadas con ANA, se presentó toxicidad en los tratamientos de 0.5 mg/L (tratamiento 1), 1.0 mg/L (tratamiento 2) y 2.0 mg/L (tratamiento 3). Las muestras tratadas con IBA no presentaron toxicidad a ninguna de las concentraciones evaluadas.



Grafica 2. En las muestras adicionadas con ANA se presentó toxicidad en los tratamientos de 0.5 mg/L (tratamiento 1), 1 mg/L (tratamiento 2) y 2 mg/L (tratamiento 3). Las muestras tratadas con IBA no presentaron toxicidad a ninguna de las concentraciones evaluadas. Así mismo el tratamiento 1, el más diluido con ANA (0.10 mg/L) no presentó toxicidad.

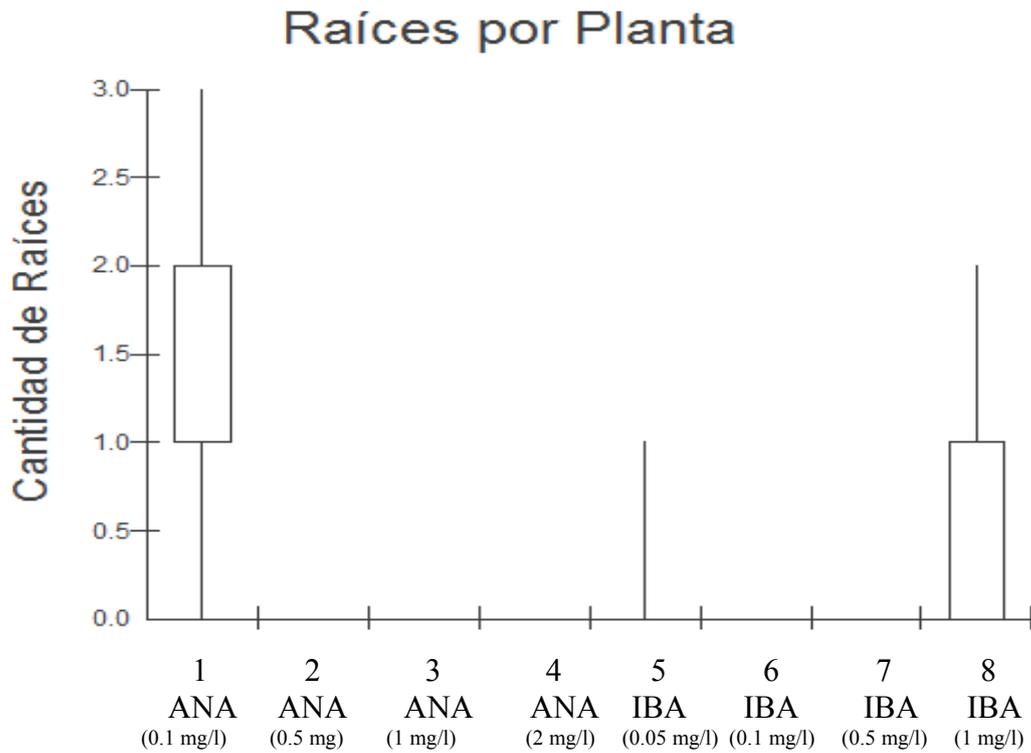
Cantidad de Raíces por Planta

Se llevó a cabo 10 repeticiones de cada tratamiento, de los cuales, el que estimuló el crecimiento del mayor número de raíces por planta fue el número 1 (0.10 mg/L ANA), con una planta con tres raíces, cinco plantas con desarrollo de dos raíces, tres plantas con una raíz y solamente una planta sin crecimiento radical, pero sin presentar toxicidad (**Tabla 3**). Así mismo, en la **Grafica 3** se observa que con éste tratamiento se obtuvo un promedio de 1.6 raíces por planta, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos 1 y 5 ($p < 0.01$) (**Anexo 7**).

Promedio de Cantidad de Raíces por Planta

Tratamiento mg/L	1 ANA 0.1	2 ANA 0.5	3 ANA 1	4 ANA 2	5 IBA 0.05	6 IBA 0.1	7 IBA 0.5	8 IBA 1
Total	1.6	0	0	0	0.2	0	0	0.7

Tabla 3. El tratamiento 1 (0.1 mg/L IBA) generó un promedio de 1.6 raíces por planta, luego el tratamiento número 8 (1.0 mg/L IBA), estimuló la producción de 0.7 raíces por planta en promedio.

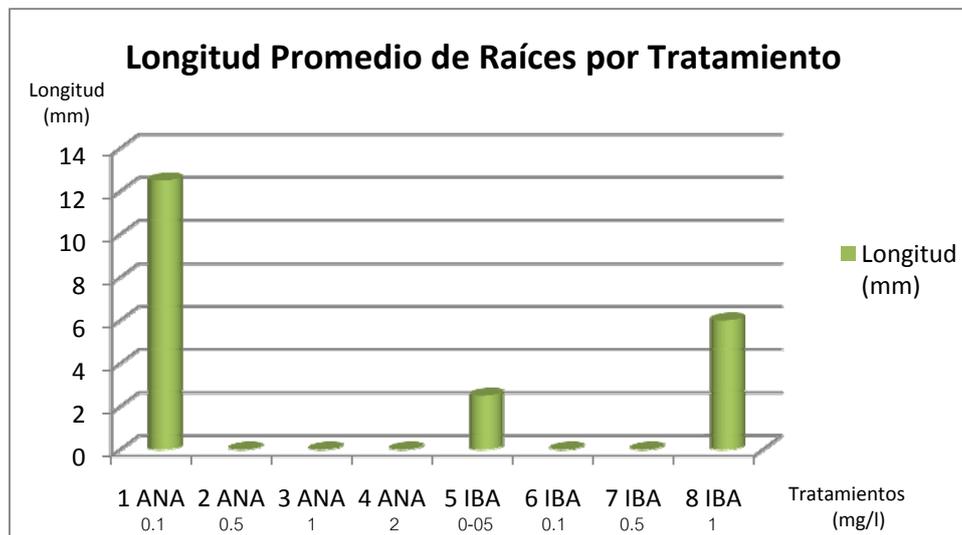


Gráfica 3. El tratamiento número 1 (0.1 mg/L ANA) fue el que estimuló la mayor producción en número de raíces por planta.

El tratamiento número 8, produjo desarrollo de cinco plantas con una raíz, una planta con dos raíces y ninguna planta con desarrollo de tres raíces. Las restantes cuatro plantas no presentaron crecimiento radical. En promedio, con éste tratamiento se obtuvo 0.6 raíces por planta (**Tabla 3**), pero no se obtuvo un incremento significativo ($p < 0.05$) en el desarrollo de raíces en comparación con los otros tratamientos. (**Anexo 7**).

Longitud de Raíces

El Tratamiento que produjo raíces más largas fue el número 1 (0.1 mg/L ANA), el cual produjo raíces de hasta 13 mm, con un promedio de 7.6 mm por cada raíz (**Tabla 4**, **Gráfica 4**), existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$) (**Anexo 7**).



Gráfica 4. Se observa la longitud promedio del tratamiento número 1 de 12 mm, mucho más grande que en los demás tratamientos.

Longitud de Raíces por Tratamiento (mm)

Tratamiento	1 ANA 0.1	2 ANA 0.5	3 ANA 1	4 ANA 2	5 IBA 0.05	6 IBA 0.1	7 IBA 0.5	8 IBA 1
Muestra	Raíz	Raíz	Raíz	Raíz	Raíz	Raíz	Raíz	Raíz
1	6	0	0	0	0	0	0	2
2	22	0	0	0	0	0	0	0
3	17	0	0	0	0	0	0	0
4	10	0	0	0	0	0	0	11
5	18	0	0	0	0	0	0	10
6	0	0	0	0	0	0	0	15
7	9	0	0	0	0	0	0	10
8	13	0	0	0	11	0	0	0
9	16	0	0	0	14	0	0	0
10	11	0	0	0	0	0	0	12
Total (mm)	122	0	0	0	25	0	0	60

Tabla 4. La tabla muestra en detalle el crecimiento de las raíces de cada planta de cada una de las muestras de todos los tratamientos. El tratamiento número 1 (0.1 mg/L ANA) tuvo más del doble de producción radical en longitud que el 8 (1 mg/L IBA).

Detalle de la Producción de Raíces en el Tratamiento 1 (0.1 mg/L ANA)

Muestra	Longitud (mm)		
	Raíz 1	Raíz 2	Raíz 3
1	6		
2	10	6	6
3	13	4	
4	10		
5	10	8	
6	0		
7	5	4	
8	13		
9	8	8	
10	5	6	

Tabla 5. Se muestra la longitud de cada raíz obtenida por muestra. En el tratamiento 1 (0.1 mg/L ANA) se obtuvo un máximo de tres raíces por muestra y un mínimo de cero, sin presentarse toxicidad en ninguna planta.

Detalle del Crecimiento de Raíces en el Tratamiento 5 (0.05 mg/L IBA)

Muestra	Longitud (mm)	
	Raíz	
1	0	
2	0	
3	0	
4	0	
5	0	
6	0	
7	0	
8	11	
9	14	
10	0	

Tabla 6. El crecimiento radical en este tratamiento (0.05 mg/L IBA) fue muy pobre, solamente se obtuvo una raíz en dos plantas.

Detalle del Crecimiento de Raíces en el Tratamiento 8 (1 mg/L IBA)

Muestra	Longitud (mm)	
	Raíz 1	Raíz 2
1	1	1
2	0	
3	0	
4	11	
5	10	
6	15	
7	10	
8	0	
9	0	
10	12	

Tabla 7. En el tratamiento número 8 (1.0 mg/L IBA) se obtuvo un máximo de dos raíces por planta.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En general, la auxina que estimuló el mayor porcentaje de enraizamiento, fue el ANA (0.1 mg/L), en la concentración más baja entre las evaluadas con 9 plantas con crecimiento radical (n = 10) (**Foto 1**), luego el tratamiento número 8 de IBA (1.0 mg/L) produjo solamente 6 plantas (n = 10) con enraizamiento, lo cual coincide con el trabajo de Davidson y Donnan (1977), en el cual el mayor éxito de enraizamiento de la bromelia *Cryptanthus* spp. se obtuvo con ANA. Por otro lado Mercier y Kerbauy (1992, 1993) citados por Lopes et. al. (2005) señalan que el porcentaje de enraizamiento *in vitro* de *Dyckia macedoi* y *Dyckia distachya*, dos bromelias en peligro de extinción, aumenta con la adición de ANA a concentraciones de 0.1 mg/L. En otras especies de plantas como en *Clitoria ternatea*, el porcentaje de enraizamiento es mayor a concentraciones de 2.5 mg/L de ANA.



Foto 1. Tratamiento 1 (0.1 mg/L ANA), se observa el crecimiento de tejido radical en las plántulas.

Se indica que el tratamiento con ANA de 0.1 mg/L, produjo mayor éxito de enraizamiento, pero también el ANA produjo más toxicidad en las dosis elevadas (**Foto 2 y 3**). Se presentó toxicidad en 9 repeticiones (n = 10) de 0.5 mg/L y en todas las repeticiones (n = 10) de 1.0 y 2.0 mg/L de ANA, lo cual concuerda con trabajos como el de Quintero (2000) en el cual se determinó que el ANA es tóxico a ciertos niveles de concentración en el enraizamiento *in vitro* de *Dioscorea* sp. Así mismo es ampliamente conocido que algunos reguladores del crecimiento, como los que se estudiaron en este trabajo, son utilizados como herbicidas a altas concentraciones (Salisbury 2000). Es evidente la importancia que tiene el evaluar varias dosis de reguladores, desde muy diluidas hasta concentradas en experimentos como el presente, ya que los resultados pueden ser muy distintos dependiendo de la proporción del regulador.



Foto 2. En esta fotografía se puede apreciar el cultivo *in vitro* de los distintos tratamientos, se observa la alta toxicidad en los tratamientos 2, 3 y 4.



Foto 3 Se observa el efecto de la toxicidad, similar en los tratamientos 2 (0.5 mg/L ANA), 3 (1 mg/L ANA) y 4 (2 mg/L ANA), la cual produjo una senescencia prematura en las plántulas.

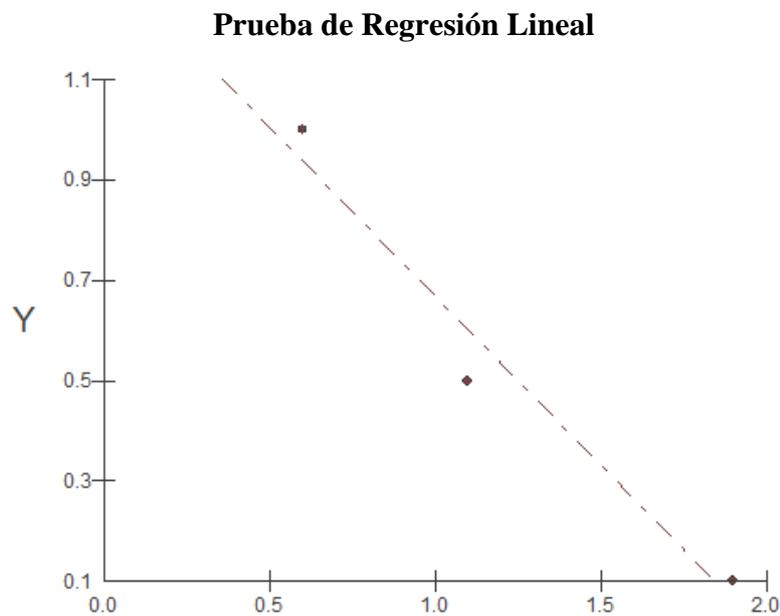
El tratamiento que estimuló el crecimiento de mayor número de raíces por planta fue el número 1 (0.1 mg/L ANA) (**Tabla 3, Gráfica 4**) con un promedio de 1.6 raíces por planta (**Gráfica 3**). Estos datos coinciden con el trabajo de Davidson y Donnan (1977), en donde también la mayor cantidad de raíces por planta se obtiene con ANA, pero en éste experimento se encontró que la mejor concentración para enraizamiento de *Cryptanthus* spp., una bromelia, era de 1.0 mg/L, a diferencia de lo encontrado en este trabajo para *T. plagiotropica* (0.1 mg/L ANA). Así mismo, los resultados del presente trabajo, también refuerzan lo obtenido por Droste et. al. (2005) quienes demostraron experimentalmente, al evaluar varias concentraciones y reguladores de crecimiento distintos, que las bromelias *Vriesea gigantea* y *Vriesea philippocoburgii* desarrollan raíces más numerosas a concentraciones de ANA de 0.2 mg/L, lo cual se acerca bastante a los resultados obtenidos en la investigación que aquí se presenta. Es por esto

que se hace necesario realizar evaluaciones con reguladores del crecimiento para cada especie en particular, ya que está comprobado que los requerimientos fisiológicos varían dependiendo de la especie de planta a estudiar.

En cuanto a la longitud de las raíces, también el tratamiento número 1 (0.1 mg/L ANA) produjo plántulas con raíces más largas, de hasta 13 mm, lo cual se acerca a lo encontrado por Droste et. al. (2005), quienes determinaron que *V. gigantea* y *V. philippocoburgii* desarrollan raíces más largas a concentraciones de ANA de 0.2 mg/L. Además Mercier y Kerbauy (1992) citados por Droste et. al. afirman que el crecimiento longitudinal de raíces en *V. fosteriana* se estimula con la adición de ANA en la concentración mencionada.

En los tratamientos con IBA, no hubo una respuesta de enraizamiento tan grande como con ANA ($p > 0.05$). Por otro lado, se pudo comprobar la influencia de éste regulador en la producción de brotes laterales, con posibilidades de ser separados con propósitos de propagación clonal (**Foto 4**). En los tratamientos números 6 (0.1 mg/L), 7 (0.5 mg/L), y 8 (1 mg/L) se presentó un decremento en el número de brotes al incrementar la concentración de IBA de 0.1 a 1.0 mg/L. Se realizó una prueba de regresión lineal (**Gráfica 5**) determinándose un índice de correlación de 0.9808, lo cual indica una relación inversamente proporcional entre la concentración de IBA y el incremento de brotes laterales. Estos resultados son similares a los presentados por Koh y Davies (2002) citados por Lopes (2005), quienes encontraron que con varias concentraciones de IBA, plántulas de *Tillandsia fasciculata* produjeron múltiples brotes laterales. Así

mismo Cueva y Espinosa (2008) encontraron que plantas *in vitro* de *Aechmea* Little Harv. y *Tillandsia cyanea*, dos bromelias importantes y amenazadas de Ecuador, desarrollaron brotes utilizando una combinación de 1.0 mg/L ANA + 0.1 mg/L BAP + 40 mg/L de adenina, denotando las amplias posibilidades que tiene la evaluación de distintas concentraciones y reguladores combinados, según sean los propósitos que se desea en el cultivo *in vitro*.



Grafica 5 Se determinó un coeficiente de correlación de 0.9808 entre la concentración de IBA y la producción de brotes laterales.



Foto 4 Crecimiento de brotes laterales observado en los tratamientos 6 (0.1 mg/L IBA), 7 (0.5 mg/L IBA) y 8 (1 mg/L IBA).

10. CONCLUSIONES

- El ácido naftalenacético (ANA) en la concentración de 0.1 mg/L incrementó significativamente ($p < 0.05$) el número y longitud de raíces en *T. plagiotropica* Rohweder en cultivo *in vitro*.
- El ácido indolbutírico (IBA) no tuvo un efecto significativo en el aumento del número y longitud de raíces de *T. plagiotropica* Rohweder en cultivo *in vitro*.

11. RECOMENDACIONES

- Para el enraizamiento *in vitro* de *Tillandsia plagiotropica* Rohweder, se recomienda utilizar medio MS al 25% de su concentración adicionado con 0.1 mg/L de ácido naftalenacético (ANA), como preparación previa para la posterior aclimatación de las plantas a condiciones de invernadero.
- Se recomienda llevar a cabo investigaciones como la presente, principalmente con especies en peligro de extinción, con el fin de crear protocolos de cultivo *in vitro* que permitan reproducir éstas plantas ya sea con fines de reintroducción al medio natural, conservación *ex situ*, o simplemente poder contar con un método de obtención alternativo que sustituya a la simple recolección de estas especies.
- Para obtener un detalle más fino de la concentración necesaria para lograr el enraizamiento de *T. plagiotropica*, se podría realizar un experimento evaluando ANA en concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mg/L en medio de cultivo MS al 25%, ya que podría encontrarse una concentración óptima cercana a la concentración que se encontró como más favorable en éste experimento.
- Se debe realizar un estudio sobre la aclimatación de las plántulas enraizadas con el método aquí presentado, evaluando distintos tipos de sustrato a nivel de

invernadero. Al realizar este trabajo se completaría con el protocolo para el cultivo *in vitro* de *T. plagiotropica* desde semilla.

12. REFERENCIAS

- CONAP. 2008. Listado de especies en peligro de extinción. Guatemala. Consultado el 30 de mayo de 2008. Disponible en:
<http://conap.gob.gt:7777/Conap/portal/certificados-cites-y-no-cites>
- Cueva, A., C. Espinosa. 2008. Multiplicación *in vitro* de *Tillandsia cyanea* Linden ex K. Koch y *Aechmea* Little Harv., dos bromelias amenazadas del Ecuador. Unidad de Fisiología Vegetal, Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador. 1 p.
- Mansilla, J. 2007. Propagación *in vitro* de la especie epífita *Tillandsia caput-Medusae* (*Bromeliaceae*) con fines de uso sostenible. Tesis, Agronomía, USAC. Guatemala. 90 p.
- Universidad Autónoma de Chiapas. 2007. Plan para la cosecha sustentable de bromelias en la comunidad “Ejido Guatimoc”, Municipio de Cacahoatán, Chiapas. Tuxtla Gutiérrez. Mexico. 20 p.
- Cueva, A. et. al. 2006. Efficient *in vitro* multiplication of *Aechmea* “littler harv” and *Tillandsia cyanea* Linden ex K. Koch. Propagation of Ornamental Plants. Ecuador. (6):165-169
- BANGUAT (Banco de Guatemala, GT). 2005. Estadísticas de exportación por rubro: 1994-2002. Consultado el 6 de abril de 2008. Disponible en:
<http://www.banguat.gob.gt/estaeco/>

Droste, A. Machado, A. 2005. In Vitro Culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: Two Vulnerable Bromeliads Native to Southern Brazil. Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais; UNISINOS; C. P. Brasil. Brazilian Archives of Biology and Technology. 5 pp.

FODECYT. 2005. Propagación *in vivo* e *in vitro* de cinco especies del género *Tillandsia* en vías de extinción y de potencial uso sustentable. Guatemala. 43 p.

Cruz, M. 2004. Efecto de la 6-bencilaminopurina en la proliferación de Brotes *in vitro* de tres variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Tesis, Agronomía, USAC. Guatemala. 88 p.

Lopes, A. et. al. Micropropagation of *Dyckia agudensis* Irgang & Sobral an extinction threatened bromeliad. Universidade Federal de Santa Maria, laboratorio de Cultura de Tecidos Vegetais, Departamento de Fitotecnia. Brasil. 5 pp.

Quintero I., Polo J. et al. 2003. Enraízamiento *in vitro* de *Dioscoreas* sp. Universidad de Córdoba. Revista colombiana de biotecnología. Volumen V No 2. p 51-56.

Labus-Schneider, FO; Abel, WO. 2002. Regeneration of *Tillandsia* through immature embryo culture. In International symposium on plant biotechnology and its contribution to plant development, multiplication and improvement. Acta Horticulturae 289.

Consultado el 7 de abril de 2008. Disponible en:

http://www.actahort.org/books/289/289_24.htm

García, N.; Betarcur, J. 2002. Dos especies nuevas de *Tillandsia* (Bromeliaceae) de la cordillera oriental de Colombia. Caldasia. Colombia. 7 p.

Radmann, E. Fachinello J. et al 2002. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira. Revista Brasileira de Fruticultura. Brasil. 6 p.

AGEXPRONT (Asociación Gremial de Exportadores de Productos no Tradicionales, GT). 2001. Nacional directory of exporters of ornamental plants, foliage and flowers, Guatemala. Guatemala. 77 p.

Zamora, M. 2001 Información sobre productos forestales no madereros y árboles fuera del bosque en América latina. Consultado el 8 de abril de 2008. disponible en: <http://www.rlc.fao.org/proyecto/rla133ec/Tallerpdf/Taller%20Venezuela.PDF>

Bolaños, E. 2000 Efecto de 3 auxinas sobre el enraizamiento *in vitro* de 10 clones de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis, Agronomía, USAC. Guatemala. 117 p.

Salisbury, F., Ross, C. 2000. Fisiología de las Plantas 3, desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. Paraninfo, Thomson Learning. España. 988 p.

H. Poliszulk, W. Silva, *et al.* 1999. Efectos de distintos tratamientos hormonales en la inducción de raíces adventicias en estacas apicales de "Búcaro" *Bucida buceras*. Facultad de Agronomía. Universidad de Zulia. Venezuela. 3 p.

ICTA. 1996. Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales. JOCV (Japanese Organization Corp of VolunTERS, JP). Guatemala. 165 p.

Huertas, GM; Dix, M; Toledo, E; Bauer, L. 1995. Manual de Identificación de 22 especies guatemaltecas del género *Tillandsia* de potencial uso sustentable. Guatemala, fideicomiso para la conservación en Guatemala. Guatemala, Universidad del Valle de Guatemala, Centro de Estudios Ambientales. 70 p.

Davidse, G., Sousa, M., *et al.* 1994. Flora Mesoamericana. Volumen 6. Universidad Nacional Autónoma de México, Missouri Botanical Garden, The Natural History Museum. Inglaterra. 543 p.

George, E. 1993. Plant propagation by tissue culture. 2 ed. Editorial Exegetics. 1,574 p.

Krikorian, A. 1991. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Ed. William Roca y Luis A. Mroginski. CIAT. Colombia. P 41-69.

Mroginski, L., Roca, W. 1991 Establecimiento de tejidos vegetales in vitro. In Roca, W. 1991 Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones.

Capítulo 2 CIAT Centro internacional de agricultura tropical. Colombia. 40 p.

Roca, W. 1991 Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. CIAT Centro internacional de agricultura tropical. Colombia. 951 p.

Szabados, L. et. al. 1991. Agentes gelatinizadores en el cultivo de tejidos. In Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Ed. Wiliam roca y Luis A. Mroginski. CIAT. Colombia. 79-93.

Villalobos, R. 1990 Fundamentos técnico-prácticos del cultivo de tejidos Vegetales. Chapingo, Centro de Genética, Laboratorio de Biotecnología. México. 160 p.

Hurtado, M., Merino, M. 1988. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas. México. 232 p.

Weaver, R. 1985. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. Trad. Agustín Contín. Trillas. México. 622 p.

Devlin, R. 1980. Fisiología vegetal. Trad. Xavier Llimona Pages. 3 ed. Omega. España. 517 p.

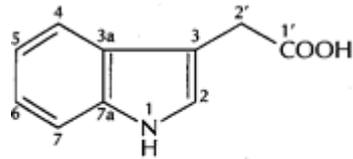
Davidson, S. Y Donnan, A. 1977. In vitro propagation of *Cryptanthus* spp. Proc. Fla. State Hort. Soc. EEUU. (90):303-304.

Córdova 1976. Fisiología vegetal. Rosario. España. 439 p.

10. ANEXOS

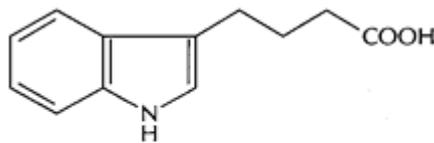
ANEXO 1

ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS REGULADORES DEL CRECIMIENTO A EVALUAR



Ácido-3-indolacético

Figura 1 IAA



Ácido-3-indolbutírico

Figura 2 IBA

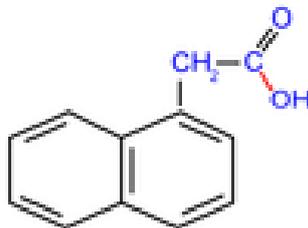


Figura 3 ANA

ANEXO 2

BOLETA PARA LA ELABORACIÓN DE SOLUCIONES CONCENTRADAS DE CONCENTRACIÓN CONOCIDA

No	Nombre del Compuesto	Fórmula	mg/L. MS	Cantidad Vol. Deseado (gr)		
I	Macronutrientes 10 X			500	250	100
1	Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	1900	8.25	4.125	---
2	Nitrato de potasio	KNO ₃	1600	9.50	4.750	---
3	Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ x 7H ₂ O	370	1.85	0.925	---
4	Dihidrogeno fosfato de potasio	KH ₂ PO ₄	170	0.85	0.425	---
II	Micronutrientes "A" 1000 X					
1	Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6.2	---	---	0.62
2	Sulfato de manganeso monohidratado	MnSO ₄ x H ₂ O	22.3	---	---	2.23
3	Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8.6	---	---	0.86
4	Molibdato de sodio dihidratado	Na ₂ Mo ₄ x 2 H ₂ O	0.25	---	---	0.025
III	Micronutrientes "B" 5000 X					
1	Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025	---	---	0.125
2	Cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025	---	---	0.125
IV	Ioduro de Potasio 1000 X					
1	Ioduro de potasio	KI	0.83	---	---	0.083
V	Cloruro de Calcio 10 X					
1	Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ x 2H ₂ O	440	2.20	1.10	---
VI	Myo-Inositol 100 X					
1	Myo-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100	---	---	1.00
VII	Solución de Hierro 100 X					
1	Cristales de sal disodio dihidratada	Na ₂ EDTA	37.3	---	---	0.373
2	Sulfato de hierro heptahidratado	FeSO ₄ x 7H ₂ O	27.8	---	---	0.278
VIII	Tiamina					
1	Tiamina monoclorhídrica	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS*H ₂ O	0.1	---	---	0.01

IX	Vitaminas 1000 X		mg/L. MS	Cantidad Vol. Deseado (gr)		
1	Acido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0.5	---	---	0.05
2	Pyridoxol hydrochloride	C ₈ H ₁₂ ClNO ₃	0.5	---	---	0.05
3	Tiamina monoclorhidrica HCl	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS H ₂ O	0.1	---	---	0.01
4	Glicina	H ₂ NCH ₂ COOH	2.0	---	---	0.20
X	Reguladores del Crecimiento					
A	Auxinas					
1	Ácido-3-indolacético – IAA- *	C ₁₀ H ₉ NO ₂	250	---	---	0.0252
2	Acido 3-indolbutirico – IBA- *	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂	250	---	---	0.0252
3	Acido 1-naftalenacético –ANA- *	C ₁₂ H ₁₀ NO ₂	250	---	---	0.0252
4	Acido giberélico 90 %	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	250	---	---	0.0252
5	2,4- Diclorofenoxiacetico (2,4-D) **		1000	---	---	0.1031
B	Citocininas		ppm	500 ml	250 ml	100 ml
1	Cinetina 6- Furfurilaminopurina *	C ₁₀ H ₉ N ₅ O	250	---	---	0.0252
2	N ⁶ -Benziladenina	C ₁₂ H ₁₁ N ₅	250	---	---	0.0252
3	6-Benzilaminopurina *	C ₁₂ H ₁₁ N ₅	250	---	---	0.0252
4	Adenina 6-Aminopurina	C ₅ H ₅ N ₅	250	---	---	
	Solvente: *: NaOH 1N **: Et-OH 95%					

	SOLUCION DESINFECTANTE		Conc.	1000 ml	500 ml	350 ml
1	Benomyl		0.1%	1.0 gr	0.5 gr	0.35 gr
2	Agrimicyn		0.15%	1.5 gr	0.75 gr	0.525 gr
3	Cloranfenicol		500 ppm	8,200 ul	4,100 ul	2,870 ul
4	Acido ascórbico		0.2%	2.0 gr	1.0 gr	1.4 gr
5	Acido cítrico		0.4%	4.0 gr	2.0 gr	0.7 gr
	OTROS					
	Hidróxido de sodio, lentejas	Na OH	1.0 N	---	---	4 gr
	Hidróxido de sodio, lentejas	Na OH	0.1 N	---	---	0.4 gr
	Hidróxido de sodio, lentejas	Na OH	0.01 N	---	---	0.04 gr
	Acido clorhídrico 37%		1.0 N			
	Solución buffer		pH 7	Ampolla de 400 ml.		
	Solución buffer		pH 5	Ampolla de 400 ml.		

ANEXO 3

COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO MS Y CANTIDAD AGREGADA

Componentes	Conc.	1000 ml	500 ml	250 ml	Observaciones
Macronutrientes	10X	100	50	25	
Micronutriente A	1000X	1	0.5	0.25	
Micronutriente B	5000X	0.2=200ul	0.1=100ul	0.02=50ul	
KI	1000X	1	0.5	0.25	
Ca Cl ₂ 2H ₂ O	10X	100	50	25	
Hierro	100X	10	5	2.5	
Myo-inositol	100X	10	5	2.5	
Vitaminas	1000X	1	0.5	0.25	
Sucrosa	3%	30	15	7.5	Gramos
Agar	0.7%	7	3.5	1.75	Gramos (/volumen)
pH					5.7-5.8

ANEXO 4



Aquí se observa el área de crecimiento con varias especies cultivadas en diferentes tipos de medios. La temperatura se mantiene a 24° C en promedio. 3000 lux de iluminación y 16 horas de fotoperíodo.

ANEXO 5



En esta fotografía se observa la cámara de flujo laminar con los medios esterilizados al fondo, luego está el tubo de ensayo con alcohol al 95% para esterilizar las herramientas de trasplante y siembra como pinzas y bisturí, también cajas de petri. El mechero también se llena con alcohol al 95 %. Previo a la utilización de la cámara, se debe encender el ventilador 30 minutos y rociar alcohol al 70% por todas las superficies. Con esto se asegura de mantener un ambiente libre de contaminantes como bacterias y hongos.

ANEXO 7

PRUEBAS ESTADÍSTICAS

Raíces por Planta

	1 ANA 0.1 #	2 ANA 0.5 #	3 ANA 1 #	4 ANA 2 #	5 IBA 0.05 #	6 IBA 0.1 #	7 IBA 0.5 #	8 IBA 1 #
Muestra	raíces/ planta	raíces/p lanta	raíces/p lanta	raíces/p lanta	raíces/p lanta	raíces/p lanta	raíces/p lanta	raíces/pl anta
1	1	0	0	0	0	0	0	2
2	3	0	0	0	0	0	0	0
3	2	0	0	0	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0	0	0	1
5	2	0	0	0	0	0	0	1
6	0	0	0	0	0	0	0	1
7	2	0	0	0	0	0	0	1
8	1	0	0	0	1	0	0	0
9	2	0	0	0	1	0	0	0
10	2	0	0	0	0	0	0	1
Total	16	0	0	0	2	0	0	7

Prueba de Normalidad, Test de Shapiro Wilk

Resultados	- 1 -	- 5 -	- 8 -
Tamanho da amostra =	10	10	10
Média =	1.6000	0.2000	0.7000
Desvio padrão =	0.8433	0.4216	0.6749
W =	0.8905	0.5096	0.8021
p =	0.2246	0.0065	0.0184

Test de Bartlett para Comprobar Homocedasticidad

Var 1

Matriz T

22.1667

Matriz W

12.1000

Phi = 18.1615

Graus de liberdade = 2

Número de amostras = 3

Número de variáveis = 1

(p) = 0.0001

Debido a que sólo el tratamiento 1, de entre los que se obtuvo datos, posee distribución normal, se realizó el test de Kruskal Wallis.

Prueba de Kruskal Wallis

Ho = La cantidad de raíces por planta es independiente del tipo de tratamiento con reguladores

Hi = La cantidad de raíces por planta depende del tipo de tratamiento con reguladores

Nivel de decisión: $\alpha = 0.05$

Test de Kruskal Wallis

Variable Raíces por Planta

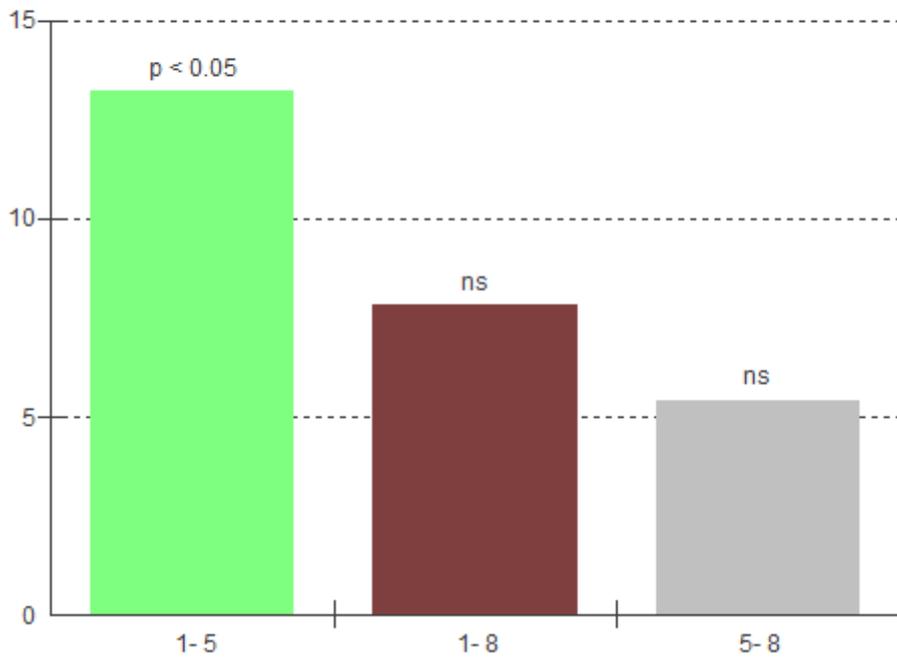
Resultados

	(muy
H =	11.8944 significativo)
Graus de liberdade =	2
(p) Kruskal-Wallis =	0.0026
R 1 =	225
R 5 =	93
R 8 =	147
R 1 (posto médio) =	22.5
R 5 (posto médio) =	9.3
R 8 (posto médio) =	14.7

Comparações (método de

Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
				<
Postos médios 1 e 5	13.2	3.3528	2.394	0.05
Postos médios 1 e 8	7.8	1.9812	2.394	ns
Postos médios 5 e 8	5.4	1.3716	2.394	ns

Kruskal-Wallis - Diferença entre as Médias dos Postos



Entre el tratamiento 1 y el 5, hay diferencias significativas $\alpha < 0.05$.

Crecimiento Radical Total (mm)

	1 ANA	2 ANA	3 ANA	4 ANA	5 IBA	6 IBA	7 IBA	8 IBA	
	0.1	0.5	1	2	0.05	0.1	0.5	1	
Muestra	Raíz 1								
1	6	0	0	0	0	0	0	0	2
2	22	0	0	0	0	0	0	0	0
3	17	0	0	0	0	0	0	0	0
4	10	0	0	0	0	0	0	0	11
5	18	0	0	0	0	0	0	0	10
6	0	0	0	0	0	0	0	0	15
7	9	0	0	0	0	0	0	0	10
8	13	0	0	0	11	0	0	0	0
9	16	0	0	0	14	0	0	0	0
10	11	0	0	0	0	0	0	0	12
	122	0	0	0	25	0	0	0	60

Prueba de Normalidad, Test de Shapiro Wilk

Tratamientos =	- 1 -	- 5 -	- 8 -
Tamanho da amostra =	10	10	10
Média =	12.2000	2.5000	6.0000
Desvio padrão =	6.4256	5.3177	6.0919
W =	0.9819	0.5337	0.8108
p =	0.9736	0.0068	0.0240

Test de Bartlett para Comprobar Homocedasticidad

Var 1
Matriz T
1442.7000

Matriz W
960.1000

Phi = 12.2170
Graus de liberdade = 2
Número de amostras = 3
Número de variáveis= 1
(p) = 0.0022

Debido a que sólo el tratamiento 1, de entre los que se obtuvo datos, posee distribución normal, se realizó un análisis de varianza utilizando el test de Kruskal Wallis.

Prueba de Kruskal Wallis

Ho = El crecimiento en longitud de las raíces por planta es independiente del tipo de tratamiento con reguladores

Hi = El crecimiento en longitud de las raíces por planta depende del tipo de tratamiento con reguladores

Nivel de decisión: $\alpha = 0.05$

Test de Kruskal Wallis

Variable Crecimiento Radical Total

Resultados

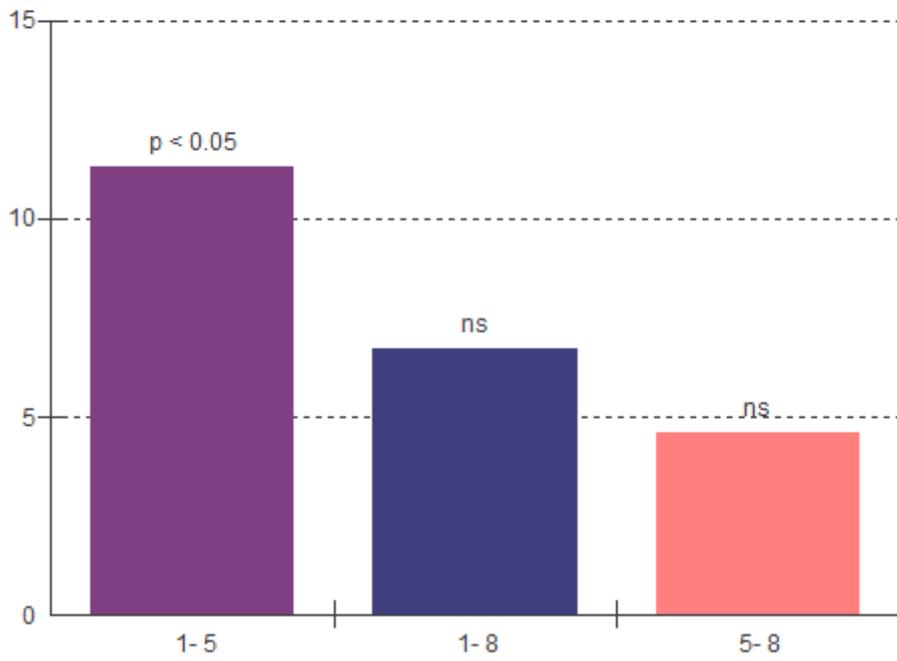
H =	8.3478 (significativo)
Graus de liberdade =	2
(p) Kruskal-Wallis =	0.0154
R 1 =	215
R 5 =	102
R 8 =	148
R 1 (posto médio) =	21.5
R 5 (posto médio) =	10.2
R 8 (posto médio) =	14.8

Comparações (método de

Dunn)

	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
Postos médios 1 e 5	11.3	2.8702	2.394	0.05
Postos médios 1 e 8	6.7	1.7018	2.394	ns
Postos médios 5 e 8	4.6	1.1684	2.394	ns

Kruskal-Wallis - Diferença entre as Médias dos Postos



De nuevo, en el crecimiento en la longitud de las raíces hay diferencia estadística significativa.

Número de Brotes por Planta

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8
	ANA 0.1	ANA 0.5	ANA 1	ANA 2	IBA 0.05	IBA 0.1	IBA 0.5	IBA 1
a	Brotos	Brotos	Brotos	Brotos	s	s	s	s
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	2	3
3	0	0	0	0	0	2	2	3
4	0	0	0	0	0	3	1	0
5	0	0	0	0	0	3	3	0
6	0	0	0	0	0	1	3	0
7	0	0	0	0	0	1	0	0
8	0	0	0	0	0	1	0	0
9	0	0	0	0	0	4	0	0
10	0	0	0	0	0	4	0	0
	0	0	0	0	0	19	11	8

Prueba de Normalidad, Test de Shapiro Wilk

Resultados	- 6 -	- 7 -	- 8 -
Tamaño da amostra =	10	10	10
Média =	1.9000	1.1000	0.6000
Desvio padrão =	1.5239	1.2867	1.2649
W =	0.8950	0.7859	0.5096
p =	0.2505	0.0119	0.0065

Test de Bartlett para Comprobar Homocedasticidad

Var 1
Matriz T
58.8000

Matriz W
50.2000

Phi = 4.7438
Graus de liberdade = 2
Número de amostras = 3
Número de variáveis = 1
(p) = 0.0933

Debido a que sólo el tratamiento 6, de entre los que se obtuvo datos, posee distribución normal, se realizó un análisis de Kruskal Wallis.

Prueba de Kruskal Wallis

Ho = La cantidad de brotes por planta es independiente del tipo de tratamiento con reguladores

Hi = La cantidad de brotes por planta depende del tipo de tratamiento con reguladores

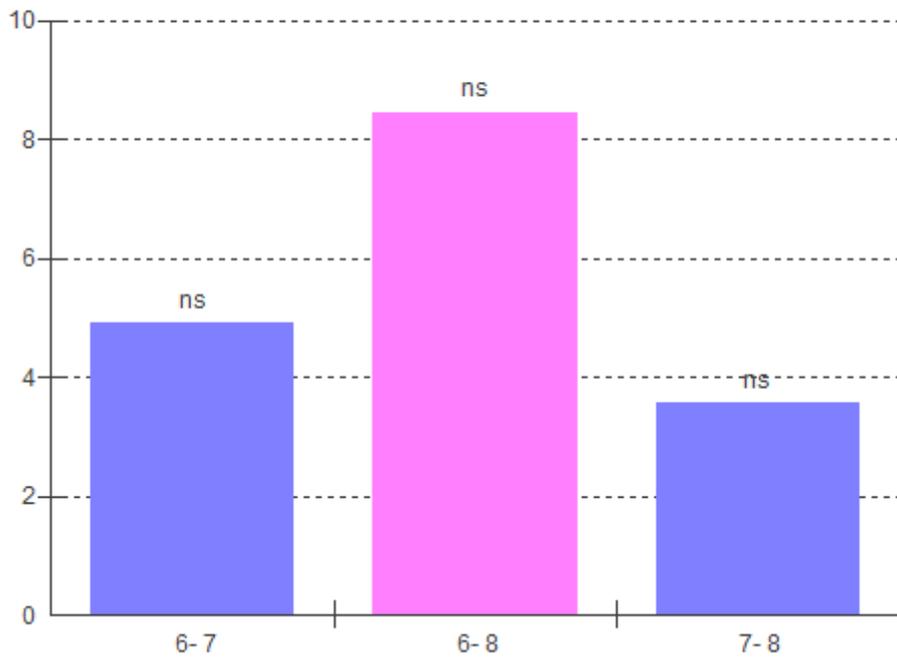
Nivel de decisión: $\alpha = 0.05$

Test de Kruskal Wallis

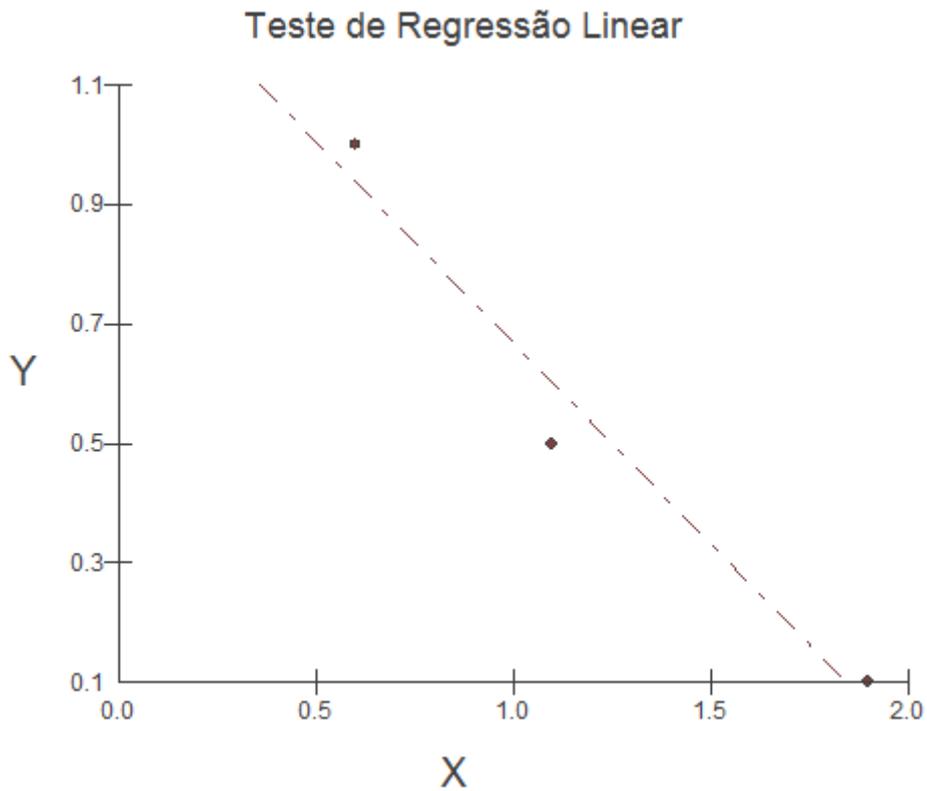
Variable Brotes por Planta

	Resultados
H =	4.6981
Graus de liberdade =	2
(p) Kruskal-Wallis =	0.0955

Kruskal-Wallis - Diferença entre as Médias dos Postos



Regresi3n Linear Brotes



Fontes de varia3o	GL	SQ	QM
Regress3o	1	0.3912	0.3912
Erro	1	0.0155	0.0155
Total	2	0.4067	---

F (regress3o) = 25.2300 p = 0.1312

Vari3vel dependente = Coluna 1

Vari3vel independente = Coluna 2

M3dia (X) = 1.2000

M3dia (Y) = 0.5333

Coef. de Determina3o (R²) = 0.9619

R² (ajustado) = 0.9238

Coefficiente de Correla3o = 0.9808

Intercepto (a) = 1.3426 t = 7.6100 p = 0.0832

Coef. de Regressão (b) =	-0.6744	t = -5.0229	p = 0.1251
IC 95% (a)	-0.899 a 3.584		
IC 95% (b)	-2.380 a 1.032		
Equação	$Y' = a + bX$		



Br. Pablo Rafael Bolaños Sittler

Autor

Ing. Mak Milan Cruz Sic

Asesor

Lic. Carlos Salazar

Revisor

Licda. Rosalito Barrios de Rodas

Directora Escuela de Biología

Dr. Óscar Manuel Cobar Pinto

Decano Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia