

ESCUELA POLITECNICA DEL EJÉRCITO
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**“RESPUESTA DE EXPLANTES APICALES Y MICROESTACAS DE
CRISANTEMO (*Chrysanthemum* sp.) VAR. ANASTASIA A DIFERENTES
FRECUENCIAS EN EL SISTEMA BIORREACTOR DE INMERSIÓN TEMPORAL
EN LA FLORICOLA FLORISOL – SAN JOSÉ DE MINAS”**

GABRIELA DEL PILAR GRIJALVA VALLEJOS

**INFORME DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO
AGROPECUARIO**

SANGOLQUÍ – ECUADOR

2011

HOJA DE LEGALIZACION DE FIRMAS

ELABORADO POR
GABRIELA DEL PILAR GRIJALVA VALLEJOS

GABRIELA GRIJALVA VALLEJOS

**DIRECTORA DE LA CARRERA DE INGENIERIA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS**

Ing, Patricia Falconí

DELEGADO UNIDAD DE ADMISION Y REGISTRO

Dr. Carlos Orosco

Lugar y fecha : 13 de Octubre del 2011

CERTIFICACION

DIRECTOR
Dr. Darwin Rueda

CODIRECTOR
Ing. Elizabeth Urbano

Certifican:

Que el trabajo titulado "Respuesta de Explantes apicales y microestacas de (*Chrysantemum* sp) var. Anastasia a diferentes frecuencias en el sistema biorreactor de inmersión temporal en la florícola FLORISOL – San José de Minas"., realizado por la Srta. Gabriela del Pilar Grijalva Vallejos, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a la importancia del tema recomendamos su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a la Srta. Gabriela Del Pilar Grijalva Vallejos que lo entregue a la Ing. Patricia Falconí, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolqui, 20 de Octubre del 2011

Dr. Darwin Rueda

DIRECTOR

Ing. Elizabeth Urbano

CODIRECTOR

*La verdadera Felicidad no consiste en tener
todo cuanto se desea, sino en desear cosas que
no se tienen y en luchar por conseguirlas.*

JULIO ANTONIO MELLA

A los seres que me dieron un hogar cálido donde crecer y un ejemplo vivo a seguir

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la gracia de vivir, la fuerza y la voluntad para alcanzar mis objetivos.

A mis padres, Jacinto y Blanquita por apoyarme en la búsqueda de mis sueños, por sus preocupaciones y esfuerzos, y sobre todo, por el hecho de tenerlos a mi lado.

A mis queridas hermanas Nubia y Alexandra por ser mis compañeras, amigas y ejemplo a seguir.

A mis amigos, Jovy, Mauri, Marce, Mika y demás amistades que la universidad me dio, por los grandes momentos de lucha, desarrollo y alegría compartida.

A la ESPE, Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y su personal Docente, por los valiosos conocimientos impartidos.

Al Director, Codirector y Biometrista del Proyecto, por sus acertadas recomendaciones para el desarrollo de esta Investigación.

A la empresa Florisol en especial a la Ing. Amparo de la Vega y el Ing. Roberto Abad por su acogida y apoyo incondicional en la realización de mi tesis.

A Franklin por estar a mi lado y ser un gran apoyo para la culminación de mi tesis.

AUTORÍA

Las ideas expuestas en el presente trabajo de investigación, así como los resultados, discusión y conclusiones son de exclusiva responsabilidad del autor

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO

Pág

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	OBJETIVOS.....	3
1.1.1	OBJETIVO GENERAL.....	3
1.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1.	ORIGEN DEL CRISANTEMO.....	4
2.2.	IMPORTANCIA DEL CRISANTEMO.....	4
2.3.	BOTÁNICA DEL CRISANTEMO.....	5
2.3.1.	<u>Taxonomía</u>	5
2.3.2.	<u>Descripción de la planta</u>	5
2.4.	MICROPROPAGACIÓN.....	6
2.4.1	<u>Organogénesis</u>	7
2.4.1.1.	<u>Rizogénesis</u>	8
2.4.1.2.	<u>Callogénesis</u>	9
2.4.1.3.	<u>Caulogénesis</u>	9
2.4.2.	<u>Factores que afectan la organogénesis</u>	10
2.4.2.1.	<u>Explante</u>	10
2.4.2.2.	<u>Totipotencia</u>	11
2.4.2.3.	<u>Medio de cultivo</u>	11
2.4.3.	<u>Reguladores del crecimiento</u>	13
2.4.3.1.	<u>Auxinas</u>	4
2.4.3.2.	<u>Citocininas</u>	16
2.4.3.3.	<u>Giberelinas</u>	16
2.4.4.	<u>Factores Físicos</u>	17
2.4.4.1.	<u>Luz</u>	18
2.4.5.	<u>Cultivo de Brotes Preformados</u>	18
2.4.5.1.	<u>Cultivo de microestacas</u>	19
2.4.5.2.	<u>Cultivo de callos</u>	19
2.5.	CULTIVO INVITRO DE CRISANTEMO.....	20
2.6.	SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL.....	21
2.6.1.	<u>Funcionamiento del sistema</u>	24
2.6.1.1	<u>Sistema de Inmersión Temporal (RITA)</u>	24
2.6.1.2	<u>Sistema de Inmersión Temporal Cubano VioVeLuz</u>	26
2.7.	VENTAJAS DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL.....	27
III.	MATERIALES Y METODOS.....	29
3.1.	UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN.....	29
3.1.1.	<u>Ubicación Política</u>	29
3.1.2.	<u>Ubicación Geográfica</u>	29
3.1.3.	<u>Ubicación Ecológica</u>	30
3.2.	MATERIALES.....	30
3.2.1	<u>Fase de Laboratorio</u>	30
3.3.	MÉTODOS.....	33

3.3.1. <u>Diseño Experimental</u>	33
3.3.1.1 <u>Factores en estudio</u>	33
3.3.1.2 <u>Tratamientos</u>	34
3.3.1.3 <u>Tipo de diseño</u>	34
3.3.1.4 <u>Repeticiones o bloques</u>	34
3.3.1.5 <u>Características de las unidades experimentales</u>	35
3.3.1.6 <u>Croquis del diseño</u>	35
3.3.2 <u>Análisis Estadístico</u>	36
3.3.2.1 <u>Esquema de análisis de varianza</u>	36
3.3.2.2 <u>Coeficiente de variación</u>	37
3.3.2.3 <u>Análisis funcional</u>	37
3.3.2.4 <u>Regresiones y correlaciones</u>	37
3.3.3 <u>Análisis Económico</u>	37
3.3.4 <u>Variables a Medir</u>	38
3.3.5 <u>Métodos Específicos de Manejo del Experimento</u>	40
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	43
4.1 PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA.....	43
4.2 TIEMPO DE BROTACIÓN.....	47
4.3 PORCENTAJE DE BROTACIÓN.....	51
4.4 LONGITUD DE BROTES.....	55
4.5 PORCENTAJE DE ENRAIZAMIENTO.....	59
4.6 PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN.....	63
4.7 COSTO DE IMPLEMENTACIÓN.....	63
4.8 FRECUENCIA DE INMERSIÓN.....	63
4.9 ANÁLISIS ECONÓMICO.....	64
V. CONCLUSIONES.....	65
VI. RECOMENDACIONES.....	67
VII. RESUMEN.....	68
VIII. SUMARIO.....	69
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	70
X. ANEXOS.....	73

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N°	Pág.
Cuadro 1. Tratamientos para determinar la respuesta de explantes apicales y microestacas de crisantemo (<i>Chrysanthemum</i> sp) var. Anastasia, a diferentes frecuencias de inmersión en el sistema biorreactor VioVeLuz.....	34
Cuadro 2. Análisis de variancia para porcentaje de sobrevivencia de plántulas de crisantemo var. Anastasia bajo el efecto de dos tipos de explantes y tres tiempos de inmersión.....	43
Cuadro 3. Efectos de los explantes sobre el porcentaje de sobrevivencia de las plántulas de crisantemo en el sistema de inmersión temporal VioVeLuz.....	44
Cuadro 4. Efectos de las frecuencias de inmersión sobre el porcentaje de sobrevivencia en las plántulas de crisantemo.....	45
Cuadro 5. Efectos de los tratamientos sobre el porcentaje de sobrevivencia de plántulas de crisantemo.....	46
Cuadro 6. Análisis de variancia para tiempo de brotación de sobrevivencia de plántulas de crisantemo var. Anastasia bajo el efecto de dos tipos de explantes y tres frecuencias de inmersión, en el sistema VioVeLuz.....	47
Cuadro 7. Efecto de los explantes sobre el tiempo de brotación de las plántulas de crisantemo var. Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz.....	48
Cuadro 8. Efectos de las frecuencias de inmersión en el sistema VioVeLuz sobre el tiempo de brotación de las plántulas de crisantemo var. Anastasia.....	49
Cuadro 9. Efectos de los tratamietos sobre el tiempo de brotación de las plántulas de crisantemo var. Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz.....	50
Cuadro 10. Análisis de variancia para porcentaje de brotación de plántulas de crisantemo var. Anastasia bajo el efecto de dos tipos de explantes y tres tipos de inmersión en el sistema VioVeLuz.....	51
Cuadro 11. Efectos de los explantes sobre el porcentaje de brotación de las plántulas de crisantemo var. Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz.....	52
Cuadro 12. Efectos de las frecuencias de inmersión en el sistema VioVeLuz sobre el porcentaje de sobrevivencia de plántulas de crisantemo var. Anastasia.....	53

Cuadro 13. Efectos de los tratamientos sobre el porcentaje de brotación de plántulas de crisantemo var. Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz.....	54
Cuadro 14. Análisis de variancia para la longitud de brotes de plántulas de crisantemo var. Anastasia bajo el efecto de dos tipos de explantes y tres tipos de inmersión en el sistema VioVeLuz.....	55
Cuadro 15. Efecto de los explantes sobre la longitud de brotes en las plántulas de crisantemo var. Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz.....	56
Cuadro 16. Efectos de las frecuencias de inmersión en el sistema VioVeLuz sobre la longitud de brotes de crisantemo var. Anastasia.....	57
Cuadro 17. Efecto de los tratamientos sobre la longitud de brotes de plántulas de crisantemo var. Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz.....	58
Cuadro 18. Análisis de variancia para porcentaje de enraizamiento de plántulas de crisantemo var. Anastasia bajo el efecto de dos tipos de explantes y tres tipos de inmersión en el sistema VioVeLuz.....	59
Cuadro 19. Efectos de los explantes sobre el porcentaje de enraizamiento en las plántulas de crisantemo var. Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz.....	60
Cuadro 20. Efectos de las frecuencias de inmersión en el sistema VioVeLuz sobre el porcentaje de enraizamiento de plántulas de crisantemo Var. Anastasia.....	61
Cuadro 21. Efectos de los tratamientos sobre el porcentaje de enraizamiento de plántulas de crisantemo var. Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz.....	62
Cuadro 22. Desglose del análisis económico producido en la Florícola FLORISOL.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	Pág.
Figura 1. Sistema de Inmersión Temporal.....	23
Figura 2. Fases del Sistema de Inmersión Temporal RITA.....	25
Figura 3. Diagrama Electro- neumático del sistema de Inmersión Temporal VioVeLuz.....	26
Figura 4. Diseño del sistema de inmersión temporal VioVeLuz del proyecto realizado.....	36
Figura 5. Porcentaje de sobrevivencia de microestacas y ápices de tallo de crisantemo var. Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz cultivadas a 2,4 y 6 inmersiones/día.....	44
Figura 6. Porcentaje de sobrevivencia de ápices y microestacas de crisantemo var. Anastasia en las diferentes frecuencias de inmersión en el sistema VioVeLuz de 2,4 y 6 inmersiones/día.....	45
Figura 7. Porcentaje de sobrevivencia en los diferentes tratamientos realizados en el sistema de inmersión VioVeLuz en explantes de crisantemo var. Anastasia.....	46
Figura 8. Tiempo de brotación en microestacas y ápices de crisantemo var. Anastasia a 2,4 y 6 inmersiones/día en el sistema de inmersión VioVeLuz.....	48
Figura 9. Influencia de las frecuencias de inmersión en el tiempo de brotación de los explantes de crisantemo var. Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz.....	49
Figura 10. Tiempos de brotación en los tratamientos realizados en ápices y microestacas de crisantemo var. Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz.....	50
Figura 11. Porcentaje de brotación de microestacas y ápices de crisantemo var. Anastasia, cultivados a 2, 4 y 6 inmersiones/día en el sistema VioVeLuz.....	52
Figura 12. Influencias de las frecuencias de inmersión en el porcentaje de brotación en ápices y microestacas de crisantemo var. Anastasia en el sistema VioVeLuz.....	53
Figura 13. Porcentaje de brotación en los diferentes tratamientos realizados en el sistema de inmersión VioVeLuz en ápices y microestacas de crisantemo var. Anastasia.....	54
Figura 14. Longitud de brotes en microestacas y ápices de crisantemo var. Anastasia cultivadas a 2, 4 y 6 inmersiones/día en el sistema VioVeLuz.....	56

Figura 15. Longitud de brotes de ápices y microestacas de crisantemo var. Anastasia en las diferentes frecuencias de inmersión probados en el sistema VioVeLuz.....57

Figura 16. Longitud de brotes en los tratamientos realizados en el sistema de inmersión VioVeLuz en ápices y microestacas de crisantemo var. Anastasia.....58

Figura 17. Porcentaje de enraizamiento en ápices y microestacas de crisantemo var. Anastasia a 2,4 y 6 inmersiones/día en el sistema de inmersión VioVeLuz.....60

Figura 18. Porcentaje de enraizamiento en las diferentes frecuencias de inmersión en el sistema VioVeLuz en ápices y microestacas de crisantemo var. Anastasia.....61

Figura 19. Porcentaje de enraizamiento en los diferentes tratamientos realizados en ápices y microestacas de crisantemo var. Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz.....62

I. INTRODUCCIÓN

La exportación de crisantemo representa 1% de la producción de flores que se expende en el Ecuador a otros países, sin embargo para aquellas empresas que se dedican a la producción de esta flor representa un porcentaje considerable los costos por la demanda de producción de flores para corte de crisantemo ya que requiere de la provisión continua en tiempo y forma de material inicial de excelente calidad fisiológica y sanitaria. Por lo que es fundamental la renovación del stock de plantas madre dentro del sistema de cultivo *in vitro* debido al envejecimiento fisiológico de los clones que se manifiesta en una disminución en la producción de esquejes y en la pérdida de sensibilidad al fotoperiodo, provocando así que los clones envejecidos florezcan en condiciones no inductoras de día largo, con la consecuente pérdida de calidad de la producción de flores.

Es por esta razón que las técnicas biotecnológicas, en la actualidad han tomado mayor auge, ya que hasta el momento para muchas especies vegetales, los sistemas de propagación tradicional no satisfacen las diversas demandas de estos cultivos. Por lo tanto se han buscado variantes dentro del sistema de cultivo *in vitro* que permitan alcanzar un mayor número de plantas sanas, con capacidad de desarrollarse en condiciones de campo y con menores costos.

En los últimos años a nivel mundial, se ha dado un salto en la automatización de la micro propagación, ya sea de forma completa o parcial, o sea en la automatización de

algunas de las fases, es así que en el año 1997, surgió el denominado Sistema de Inmersión temporal, creado en el CIRAD de Francia (1), este sistema, se logró a partir de la aplicación de un flujo de aire a uno de sus frascos, el cual hacía subir el medio de cultivo y luego de bañar los explantes, el medio descendía por gravedad. Este método ha revolucionado los métodos tradicionales de micropropagación, pues se han logrado una mayor tasa de multiplicación, enraizamiento y aclimatación, así como niveles elevados de supervivencia en condiciones de campo. Se plantea que este sistema provoca cambios en la atmósfera interna de los frascos, trayendo consigo un mayor crecimiento y desarrollo de los explantes, además de que las vitroplantas mantienen una capa superficial de medio de cultivo hasta la próxima inmersión, lo que evita la pérdida por desecación.

Por lo anteriormente planteado y por las grandes ventajas que ofrece este sistema, es que nos hemos dado a la tarea de construir un sistema similar, para su utilización en los Laboratorios de la Florícola FLORISOL, que permita a la empresa obtener su propio material libre de contaminación, apto para la multiplicación masiva y la adaptabilidad al medio que requieren, junto con pruebas de frecuencias de inmersión más adecuadas para el desarrollo de los explantes de crisantemo que son el principal rubro de esta empresa que comercializa sus flores al exterior.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la respuesta de explantes apicales y microestacas de Crisantemo (*Chrysanthemum* sp) var. Anastasia a diferentes frecuencias en el Sistema Biorreactor de Inmersión Temporal en la florícola FLORISOL- San José de Minas.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el porcentaje de sobrevivencia y el tiempo de brotación de dos explantes de crisantemo cultivados en el Sistema de Inmersión Temporal VioVeLuz.
- Establecer la longitud y el porcentaje de brotación por explante de crisantemo cultivados en el Sistema de Inmersión Temporal VioVeLuz.
- Evaluar el porcentaje de contaminación por envase de brotes de crisantemo cultivados en el Sistema de Inmersión Temporal VioVeLuz.
- Establecer costos de implementación en el Sistema de Inmersión Temporal.
- Determinar la frecuencia de inmersión más adecuada para la micropropagación de crisantemo en el sistema de inmersión temporal VioVeLuz.
- Difundir los resultados y la metodología del presente estudio a los interesados para su conocimiento y aplicación.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. ORIGEN DEL CRISANTEMO

El crisantemo tiene su origen en Asia, principalmente en China y está entre las especies florícolas más comercializadas en el mundo (Kofranek, 1992)., su cultivo se trasladó a Japón donde se convirtió en una flor santa que recibía una veneración divina. (INFOAGRO, 2009)

Fue introducido en Europa a través de Francia en el último tercio del siglo XVIII. Los primeros cultivos en España coinciden con el inicio en el siglo XIX. El crisantemo que actualmente cultivan los floricultores es un híbrido complejo y la mayoría de las especies de donde se han generado los cultivares actuales son originarias de China: *Chrysanthemum indicum*, *Chrysanthemum morifolium* y *Chrysanthemum x hortorum*. El crisantemo en maceta es denominado *Dedranthema*. (INFOAGRO, 2009)

2.2. IMPORTANCIA DEL CRISANTEMO

El crisantemo es una de las plantas ornamentales de mayor importancia económica a escala mundial, por su empleo como flor cortada, como planta en maceta y como planta de jardinería, en la actualidad representa la tercera flor más vendida. La producción es importante en varios países europeos, como los Países Bajos, Gran

Bretaña y Francia; así como en Colombia, Ecuador, Estados Unidos y Canadá donde desde hace mucho tiempo es un cultivo industrializado.

En Centroeuropa, Japón y Estados Unidos ha tenido siempre una gran demanda por lo que los trabajos de mejora genética son importantes y han dado lugar a numerosos cultivares con formas y colores, (INFOAGRO, 2009).

El Ecuador exporta 147 toneladas al exterior que representa el 1% del total de flores cultivadas. (INFOAGRO, 2009).

2.3. BOTÁNICA DEL CRISANTEMO

2.3.1. Taxonomía

El crisantemo es una planta ornamental, que pertenece al género *Chrysanthemum* de la familia Asteraceae. Existen entre 100 a 200 especies de ellas entre las más utilizadas están: *Chrysanthemum*, *Anthemis*, *Pyrethum*, etc (GRUPO OCEANO.,1999).

2.3.2. Descripción de la planta

Es una planta por lo general perenne, con hojas de bordes ondulados y casi siempre algo aromáticas. Presentan gran diversidad de colores, tamaño y formas florales, pero, independientemente de la forma, pueden cultivarse eliminando las yemas axilares,

para producir una sola flor terminal de gran tamaño (tipo uniflora) o dejar que las yemas axilares se desarrollen y eliminar la yema terminal (tipo spray). (GRUPO OCEANO., 1999).

Los Crisantemos se cultivan generalmente partiendo de esquejes que retoñan en primavera del pie de la planta madre o por la división de la mata. Es necesario dividir cada año la planta madre debido al envejecimiento anual que vuelve leñosa a la misma con la consecuente inhibición en la producción de floral.

2.4. MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación abarca una serie de técnicas de cultivo en un medio estéril de distintos segmentos (explantes) de la planta, a los que se les proporciona artificialmente las condiciones físicas y químicas con el fin de regenerar plantas enteras (Flores, 1998; Alvarenga, 2001). De esta forma se puede utilizar como explante el cotiledón, hipocótilo, tallo, hoja, raíz, meristemas, yemas axilares, embriones, inflorescencias, pétalos, óvulos y el polen (Montero, 2001).

La micropropagación se ha constituido en una técnica muy eficiente para producir plantas enteras fenotípicamente y genotípicamente idénticas a la planta madre de la que derivaron y libres de plagas y enfermedades (Flores, 1998; Palma *et al.*, 2002).

Durante el desarrollo de los tejidos, estos pueden tomar dos rutas alternas en cuanto a su diferenciación a partir de las cuales se pueden desarrollar las diferentes técnicas de propagación *in vitro* (Alatorre, 2002; Montero, 2001; Palma *et al.*, 2003).

Organizado: se inicia mediante órganos que siguen su crecimiento manteniendo sus características estructurales.

Desorganizado: se comienza con fragmentos u órganos que producen tejidos sin estructura definida (callo) a partir de los cuales se forman embriones o brotes adventicios para la regeneración de plantas.

2.4.1 Organogénesis

La organogénesis son todos los procesos morfológicos en los cuales las estructuras en su forma natural forman órganos no-autónomos en el explante (protoplastos, células, callos, fragmentos de tejido, fragmentos de planta), (Endress, 1994).

Desde el punto de vista funcional la característica más importante de la organogénesis, es el potencial organogenético de los explantes. La organogénesis se presenta bajo cuatro vías morfogénicas que conducen a la rizogénesis o formación de raíces, caulogénesis o formación de yemas, callogénesis o formación de callo y la embriogénesis somática (Navarro & Perea, 1996).

Aparentemente los factores químicos más importantes para la embriogénesis somática son las auxinas exógenas, la fuente y la concentración de nitrógeno. Desde el punto de vista de la micropropagación es el sistema más eficiente, en cuanto al número de plantas regeneradas por unidad de tiempo. Por medio de este método se pueden obtener grandes cantidades de plantas al suponerse que por cada célula suspendida en el medio de cultivo se está diferenciando una planta (Palma *et al.*, 2003).

2.4.1.1. Rizogénesis

La rizogénesis es el desarrollo de las raíces adventicias. Desde el punto de vista anatómico, consiste en la organización de iniciadores radiculares que se transforman en primordios radiculares, éstos en condiciones adecuadas crecen, atraviesan la corteza y salen al exterior mientras que en el interior se conexionan con el sistema conductor de la estaca (Baldini, 1992).

La diferenciación y emisión de primordios radiculares, suele venir acompañado del proceso de callogénesis en la base de la estaca que impide el acceso de patógenos al interior de la estaca pero no influye de ningún otro modo en el proceso de la rizogénesis.

El desarrollo de raíces es el tipo de órganos más frecuente. La rizogénesis puede ser promovida por auxinas, hidratos de carbono, luz (fotoperíodo y oscuridad). Las condiciones cambian de acuerdo con la especie de la planta y en ocasiones según

las variedades de una misma especie, por lo cual las variaciones en las concentraciones de auxinas son diferentes (Navarro & Perea, 1996).

2.4.1.2. Callogénesis

El callo puede definirse como el crecimiento desorganizado de una masa de células, que se origina mediante la proliferación de células parenquimáticas del explante inicial (Montero, 2001). Los factores que más pueden afectar la formación del callo son el tipo de explante, ya que hay una mejor proliferación de células cuando este proviene de un tejido joven al tener un mayor potencial para la división celular como para la regeneración de plantas, y el otro factor es el medio de cultivo y sus condiciones tanto físicas como químicas (Palma, 1995).

2.4.1.3. Caulogénesis

Se define caulogénesis como la formación de brotes a partir de segmentos de la planta o de un callo. En gran número de dicotiledóneas la caulogénesis ocurre mediante el equilibrio adecuado de auxinas y citocininas endógenas, para ciertos casos es necesaria la adición de concentraciones bajas de algún regulador de crecimiento (Street, 1977 citado por Navarro & Perea, 1996).

2.4.2. Factores que afectan la organogénesis

En el cultivo de tejidos vegetales para que ocurra un desarrollo organizado con éxito, debe seleccionarse el explante, el medio de cultivo y el control del medio físico (humedad, luz, temperatura y atmósfera gaseosa (Alatorre, 2002).

Cualquiera de estos factores o su combinación puede afectar profundamente la respuesta morfogénica, por lo que es necesario realizar evaluaciones sistemáticas de tales efectos con el fin de establecer un sistema característico de experimentación (Roca *et al.*, 1991).

2.4.2.1. Explante

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos y se va a determinar según el objetivo perseguido y la especie a cultivar.

En general, cualquier parte vegetal puede servir como inóculo (Endress, 1994). Estos incluyen segmentos de tallo y ápices, secciones de raíz, hojas, inflorescencias, pétalos de flores, tejido ovular y tejidos de plántulas tales como cotiledones, hipocótilos y embriones de semilla; sin embargo, los tejidos juveniles poseen un alto grado de actividad meristemática *in vitro* (Roca *et al.*, 1991).

En relación con la especie vegetal utilizada, es importante tener en cuenta la variabilidad asociada con el genotipo de las plantas. Es muy común que en condiciones idénticas de medio y ambiente, las respuestas in vitro del cultivo de un determinado explante de una especie difieran con el cultivar empleado. Además, las respuestas de los explantes pueden variar notablemente con el estado de desarrollo y edad ontogénica de los mismos; por ejemplo a partir de secciones de tallo cercanas a los ápices caulinares se puede producir mayor cantidad de meristemoides que a partir de la porción baja del tallo. Más aún, puede haber variación en los requerimientos de los reguladores de crecimiento para la organogénesis según el tipo de tejido usado como explante, aunque estos sean de la misma especie (Roca *et al.*, 1991).

2.4.2.2. Totipotencia

La totipotencia es la capacidad que tienen las células de regenerar un tejido completo. Las células diferenciadas pueden ser inducidas a un proceso de dediferenciación, para formar callo y luego mediante la acción de reguladores de crecimiento puede rediferenciarse (Montero, 2001).

2.4.2.3. Medio de cultivo

El éxito que se obtenga en un cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio nutritivo adecuado. Los usados más frecuentemente para promover la organogénesis son

los de Murashige y Skoog (1962); el White (1963); el Gamborg (1968), entre otros (Roca *et al.*, 1991).

El medio de cultivo puede ser líquido o semi-sólido, en el medio líquido se elimina la gravedad, la cual tiene gran importancia en el proceso de desdiferenciación; pues cuando las células tienen posición fija se produce un fenómeno de polarización que hace que la concentración de sustancias de crecimiento no sea uniforme, situación que no ocurre en el medio líquido; por lo tanto, hay mayor homogenización en la concentración permitiendo así el proceso de desdiferenciación. Cuando se cultivan tejidos en medio líquido hay contacto directo de estos con el medio, por lo que hay una mayor y más rápida absorción de nutrientes que en el medio sólido. Además, en el caso de que los tejidos produzcan sustancias tóxicas, éstas pueden ser eliminadas por dilución, ya que se diluyen en el total del medio, por lo tanto baja la concentración (Kuan y Ospina, 1990).

En los medios de cultivo la sacarosa es generalmente una de las fuentes carbonadas, en algunos casos la concentración puede alterar la pigmentación del callo. Este efecto también lo hace la proporción auxina . citocinina favoreciendo la formación de yemas.

La sacarosa puede asimismo estimular la formación de callo y cambiar la textura de los mismos. La concentración de carbohidratos también afecta el potencial osmótico del medio (Montero, 2001).

La caseína hidrolizada (0,02 . 0,1 %) es una fuente de nitrógeno orgánico no específica, la cual puede afectar cuantitativa y cualitativamente el desarrollo organizado. La caseína hidrolizada a sido comúnmente utilizada para estimular el crecimiento de embriones y se ha sugerido que su efecto se debe a un sinergismo entre los aminoácidos que la componen. En vainilla, este compuesto se ha usado en la germinación *in vitro* de semillas; Granados (1991) mencionado por Alatorre (2002), encontró que a medida que se incrementaba la dosis de caseína hidrolizada en un medio MS (1962), se aumentaba el porcentaje de germinación, sin embargo concluye que su efecto principal no es a nivel de germinación sino en la activación posterior del crecimiento de los protocormos.

El pH óptimo en el medio de cultivo de las especies no esta bien preciso, pero usualmente está entre 5,0 y 6,5. El pH puede influenciar la precipitación y absorción de nutrientes como también de fitohormonas (Roca *et al.*, 1991).

2.4.3. Reguladores del crecimiento

Los reguladores del crecimiento son compuestos que en pequeñas cantidades y por la naturaleza o estructura de su molécula estimulan, inhiben o modifican el desarrollo de las plantas. Algunos reguladores de crecimiento son: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido absícico, inhibidores y poliaminas (Palma *et al.*, 2002).

2.4.3.1. Auxinas

El nombre auxina significa en griego 'crecer' y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación. El ácido indolacético (IAA) es la forma predominante, sin embargo, evidencia reciente sugiere que existen otras auxinas indólicas naturales en plantas.

Aunque la auxina se encuentra en toda la planta, la más altas concentraciones se localizan en las regiones meristemáticas en crecimiento activo. Se le encuentra tanto como molécula libre o en formas conjugadas inactivas. Cuando se encuentran conjugadas, la auxina se encuentra metabólicamente unida a otros compuestos de bajo peso molecular. Este proceso parece ser reversible. La concentración de auxina libre en plantas varía de 1 a 100 mg/kg peso fresco. En contraste, la concentración de auxina conjugada ha sido demostrada en ocasiones que es sustancialmente más elevada.

Una característica sorprendente de la auxina es la fuerte polaridad exhibida en su transporte a través de la planta. La auxina es transportada por medio de un mecanismo dependiente de energía, desde el punto apical de la planta hacia su base. Este flujo de auxina reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo de esta forma la dominancia apical. El movimiento de la auxina fuera de la lámina foliar hacia la base del pecíolo parece también prevenir la abscisión.

La auxina ha sido implicada en la regulación de un número de procesos fisiológicos:

- Promueve el crecimiento y diferenciación celular, y por lo tanto en el crecimiento en longitud de la planta,
- Estimulan el crecimiento y maduración de frutas,
- floración,
- senectud,
- geotropismo,
- La auxina se dirige a la zona oscura de la planta, produciendo que las células de esa zona crezcan más que las correspondientes células que se encuentran en la zona clara de la planta. Esto produce una curvatura de la punta de la planta hacia la luz, movimiento que se conoce como fototropismo.
- Retardan la caída de hojas, flores y frutos jóvenes
- Dominancia apical

El efecto inicial preciso de la hormona que subsecuentemente regula este arreglo diverso de eventos fisiológicos no es aún conocido. Durante la elongación celular inducida por la auxina se piensa que actúa por medio de un efecto rápido sobre el mecanismo de la bomba de protones ATPasa en la membrana plasmática, y un efecto secundario mediado por la síntesis de enzimas.

2.4.3.2. Citocininas

Estimulan la división celular y se encuentran en casi todos los tejidos, son particularmente abundantes en los granos, frutas y raíces; son necesarias al igual que las auxinas para la proliferación de callo, favorece la formación directa o indirecta de tallos, estimulan brotes preformados o adventicios a partir de ápices, en altas concentraciones inhiben la formación, desarrollo y crecimiento de raíces, así como pueden suprimir el efecto estimulativo de las auxinas (Palma *et al.*, 2002).

Entre las citocininas más utilizadas en cultivo de tejidos vegetales, se encuentra la benciladenina (BA), utilizada para estimular la proliferación de las yemas laterales. La BA se ha utilizado frecuentemente en el cultivo *in vitro* de la vainilla, haciéndose necesaria para la obtención de brotes vigorosos. Las dosis utilizadas varían pero una concentración arriba de los 5 mg L⁻¹ resulta inhibitoria (Alatorre, 2002).

La diferenciación de yemas se logra subcultivando los callos en un medio que tenga alta relación citocinina . auxina; en cambio, para la diferenciación de raíces se requieren medios con una relación citocinina . auxina baja. En medios con citocinina, algunas veces ocurre la organogénesis directamente del explante (Montero, 2001).

2.4.3.3. Giberelinas

Las giberelinas son fitohormonas. Se producen en la zona apical, frutos y semillas.

Sus funciones son:

- Interrumpir el periodo de latencia de las semillas, haciéndolas germinar.
- Inducir la brotación de yemas.
- Promover el desarrollo de los frutos (floración).
- Crecimiento longitudinal del tallo

Es opuesta a otra hormona vegetal denominada ácido abscísico

Son obtenidas a partir del hongo *Giberrella fujikuroi* (*Fusarium heterosporium*) provocando el gigantismo en el arroz. Estimulan el alargamiento celular de los entrenudos del tallo y los pedúnculos florales. Rompen la dormancia de gran número de semillas y brotes. Son generalmente empleadas en forma de ácido giberèlico (AG₃) (Navarro & Perea, 1996).

2.4.4. Factores Físicos

Los factores físicos que deben tenerse en cuenta son la temperatura y la luz; el grado higrométrico del aire no tiene mucha importancia puesto que las plantas cultivadas *in vitro* se encuentran en una atmósfera naturalmente saturada (Navarro & Perea, 1996).

2.4.4.1. Luz

Es el principal factor físico y se ha demostrado que tiene un efecto sobre el desarrollo organizado *in vitro*. Generalmente en los cuartos de crecimiento el fotoperiodo utilizado fue de 12 a 16 horas luz con una intensidad lumínica entre los 1000 y 10000 lux (Navarro & Perea, 1996). Un cambio de intensidad lumínica puede causar organogénesis y cambios morfogénéticos específicos debido a la longitud de onda de la iluminación (Alatorre, 2002).

Temperatura: generalmente los tejidos vegetales cultivados *in vitro* se mantienen en un rango que va de los 20° C a los 25°C; sin embargo, las temperaturas que estén dentro de los 18 . 28°C son también efectivas. Las fluctuaciones que puedan ocurrir entre la temperatura del día y de la noche pueden estimular la organogénesis (Montero, 2001).

2.4.5. Cultivo de Brotes Preformados

Mediante el uso de reguladores del crecimiento se estimulan las yemas axilares permitiendo la formación de una planta por cada yema, siendo esto último lo que restringe su eficiencia. Una de las ventajas que presenta este método es que las plantas obtenidas muestran una alta estabilidad genética (Pierik, 1990).

2.4.5.1. Cultivo de microestacas

La micropropagación de microestacas consiste en estimular con la ayuda de reguladores de crecimiento, el desarrollo de yemas axilares, que normalmente están dormantes por la dominancia apical. La dominancia apical se mantiene porque la corriente alimenticia que asciende por el tallo se dirige a la yema apical y no a las ramas laterales, debido al gradiente auxínico que resulta de la producción de auxina en el ápice (Orellano, 1997).

La aplicación de citocininas causa el inicio de divisiones celulares y la producción de auxina, a la que seguirá automáticamente la liberación de la dominancia apical (Bidwell, 1993). El subcultivo de estos explantes permite la producción de brotes en forma exponencial. Además, el enraizamiento *in vitro* es más fácil de obtener que en brotes producidos por otras biotécnicas (Orellano, 1997).

2.4.5.2. Cultivo de callos

El callo es un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales se llevan a una desdiferenciación celular, formando una masa amorfa de tejido, como resultado de la proliferación continua y acelerada de las células. La coloración de este tejido también varía, pueden existir callos que carecen de pigmentos, mientras que otros pueden ser de distintos tonos de verdes, amarillo, café o rojo (Hurtado y Merino, 1987).

El mismo autor cita que, la inducción del callo ocurre colocando el explante en contacto con un medio de cultivo que promueva y mantenga un crecimiento y una división celular continuas. La proliferación del callo se puede iniciar casi a partir de cualquier órgano vegetal: hoja, raíz, polen, embriones, semillas, entre otros.

El cultivo del callo se puede dividir en las siguientes etapas:

- Inducción: las células inician el crecimiento, tanto en número como en tamaño.
- Proliferación celular: el callo aumenta su masa celular al máximo.
- Inducción de la diferenciación: en esta etapa se obtienen meristemos (apicales y radiculares), embrioides, tejido vascular, entre otros.
- Envejecimiento y pérdida de la capacidad del crecimiento acelerado.

2.5. CULTIVO IN VITRO DE CRISANTEMO

Como consecuencia de múltiples infecciones por virus y viroides se ha hecho necesario recurrir a la técnica de reproducción in vitro del crisantemo, siendo esta una alternativa de solución para dicho problema disponiéndose de cantidades suficientes y necesarias de plantas en el tiempo requerido así como también lograr rescatar y regenerar variedades del mismo.

Cáceres (2005) comparó la utilización de fertilizantes comerciales para la preparación de los medios de cultivo en crisantemo, con el medio basal de MS. Consiguiendo resultados satisfactorios con la primera opción.

Linares *et al* (2003) quien cultivó crisantemos libres de agentes patógenos, a partir de las plantas sometidas a termoterapia durante tres semanas. Seleccionó el medio MS suplementado con 1 mg L^{-1} de Acido Giberélico (AG_3), obteniéndose un 67,74% de formación de plántulas, 74,67% de sobrevivencia de plantas a la termoterapia y un 97% sobrevivencia al proceso de aclimatación.

2.6. SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL

En el cultivo *in vitro*, el uso de medios líquidos ha presentado grandes ventajas en varias especies, sin embargo en algunas se produce vitrificación de los explantes, es por esta razón que se consideró la opción del diseño de sistemas de inmersión temporal, que evitan la exposición constante del explante al medio de cultivo, mediante un sistema que pone en contacto el explante con el medio en forma intermitente cada cierto período de tiempo (Teisson *et al.*, 1994 citado por Flores *et al.*, 2002).

Los problemas que presentan los medios líquidos pueden ser superados por métodos alternativos, como los biorreactores (Damiano *et al.*, 2003), cuyo principio básico es la inmersión periódica de los explantes en el medio de cultivo, lo que permite el intercambio gaseoso dentro del recipiente.

Una unidad de inmersión temporal utilizada normalmente consiste en dos recipientes interconectados por tubos de silicona (figura 1) (Jiménez *et al.*,1999). Uno se usa para la mantención del medio y el otro para el cultivo de los explantes. Para la ventilación se ajusta un filtro esterilizable en cada recipiente. El número de veces (frecuencia) y el tiempo que las plantas son inmersas en el medio se regulan mediante un programador conectado a válvulas selenoides.

Al abrir una de las válvulas el medio es inyectado desde el recipiente de mantención al del cultivo; al abrirla otra vez, el medio vuelve al recipiente de mantención. Con este sistema los explantes son inmersos en el medio de cultivo sólo por un tiempo definido, permitiendo la absorción de nutrientes por toda su superficie (Alvard *et al.*, 1993). El intercambio gaseoso se restaura cuando el medio de cultivo es trasladado a recipiente de mantención.

Las ventajas de mantener un cultivo en un SIT incluyen tres aspectos: un mayor contacto entre la biomasa vegetal y el medio, la inexistencia de restricciones en el intercambio gaseoso y la posibilidad de controlar la composición del medio, así como la de la atmósfera dentro del biorreactor (Ziv, 1995). Estas características se reflejan en mayores tasas de multiplicación y en un mejor desarrollo de los explantes; por ejemplo, en estudios realizados con frutilla Don y manzana Gala se observó un aumento de 85 y 131% en la tasa de multiplicación, respectivamente (Damiano *et al.*, 2003).

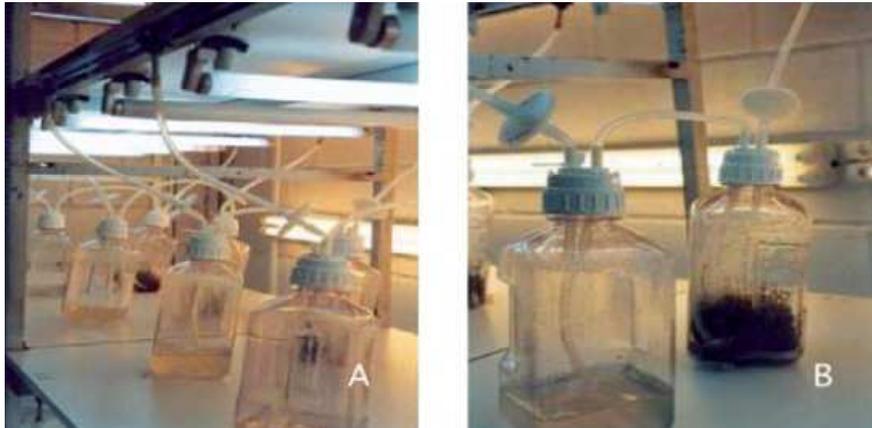


Figura 1. Sistema de inmersión temporal.

A) Vista general; B) Unidad de inmersión temporal.

Otros estudios realizados en caña de azúcar (*Sacharum* spp.) mostraron una tasa de multiplicación de $8,13 \pm 0,6$ explantes cuando se cultivó en SIT, comparada con $4,0 \pm 0,8$ *versus* el cultivo en medio semisólido (Lorenzo *et al.*, 1998). Otro ejemplo es el de papa Desirée (Jiménez *et al.*, 1999):

- $22,5 \pm 0,4$ cm de altura, con más entrenudos, en un sistema de inmersión temporal
- $6,5 \pm 0,1$ cm de altura, en medio semisólido

Los sistemas de inmersión temporal también han sido utilizados exitosamente en producción, para la obtención de un mayor número de bulbos y tubérculos. Por ejemplo, en papas de las variedades Desirée y Atlantic se alcanzó un promedio de 2,8 y 3,1 tubérculos por explante, respectivamente, comparado con 1 a 1,5 tubérculos obtenidos normalmente en medio semisólido (Jiménez *et al.*, 1999). El peso fresco de los microtubérculos también fue mayor en el primer sistema. No existe información respecto de la tuberización de plantas de cala en SIT.

Para el funcionamiento efectivo de un SIT deben existir condiciones óptimas de cultivo (Ackermann *et al.*, 2003); además de factores ambientales como intensidad lumínica y temperatura, se debe considerar: frecuencia y tiempo de inmersión, densidad del cultivo, volumen del medio y composición y duración del cultivo. Estos factores se deben determinar para cada especie y etapa de desarrollo.

El sistema de inmersión temporal se inicio con el empleo de unidades de filtración comercial que se modificaron con un tubo de silicón, inyectando presión de aire al compartimiento inferior se logra que el medio de cultivo ascienda y moje periódicamente los explantes. El laboratorio Biotrop del CIRAD en Montpellier desarrollo y patentó otros diseños, cuyo nombre comercial es RITA (Recipiente para Inmersión Temporal Automático) (Flores *et al.*, 2002).

2.6.1. FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA

2.6.1.1. Sistema de inmersión temporal (rita)

El sistema de inmersión temporal funciona mediante 4 fases que se explican a continuación:

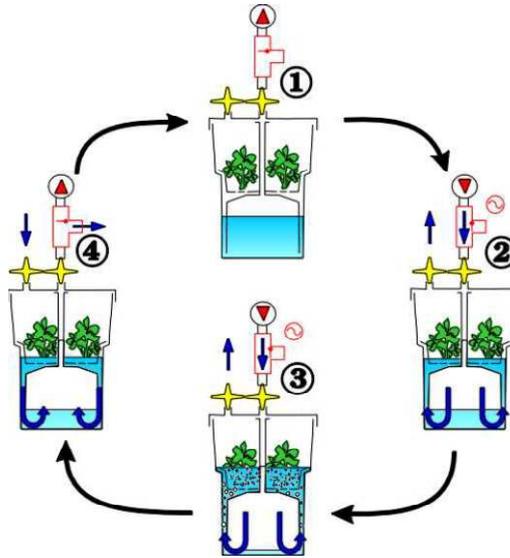


FIGURA 2. Fases del Sistema de Inmersión Temporal Automático RITA

Fase emergida. Esta fase es la de mayor duración.

1. Los explantes están colocados sobre un disco de esponja de poliuretano.

Fase sumergida. La duración de esta fase se define por experimentación pero siempre es muy corta: Puede variar de 1 minuto por día hasta 4 veces 15 minutos por día.

2. Una sobrepresión de aire estéril, aplicada en la parte baja, permite al medio de cultivo subir a la parte alta donde se encuentran los explantes.

3. El aire inyectado permite la oxigenación del medio. El aire de la parte alta se renueva totalmente.

4. Pasado el tiempo de inmersión, la bomba de aire se apaga. Las presiones se equilibran, y el medio vuelve a bajar por gravedad a la parte inferior. Por capilaridad, una fina película de medio se mantiene en contacto sobre los explantes (CIRAD, 2001).

2.6.1.2. Sistema de Inmersión Temporal Cubano VioVeLuz

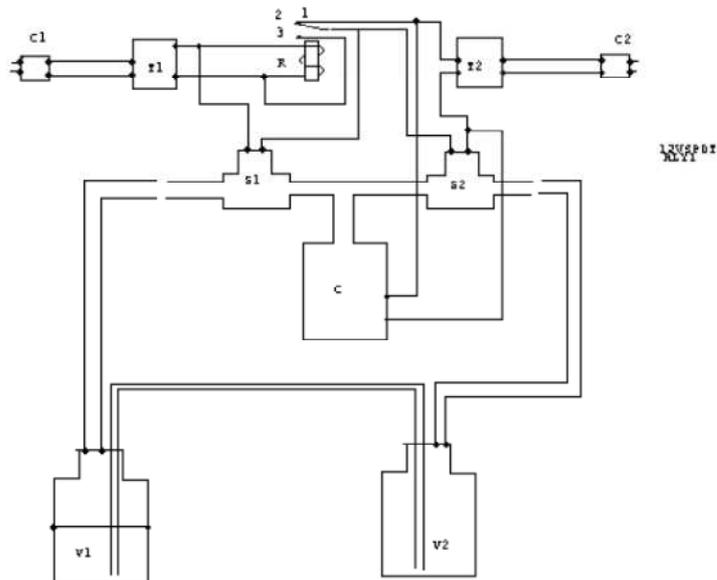
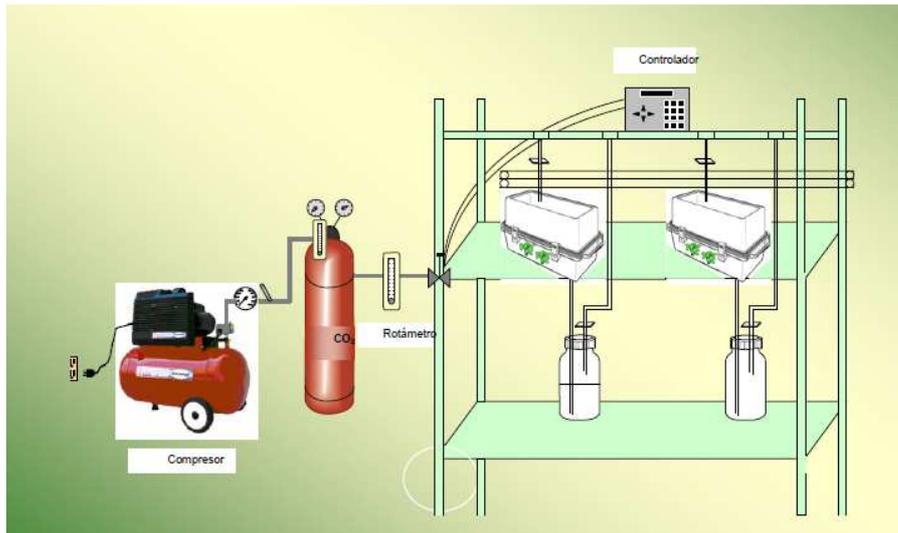


FIGURA 3. Diagrama Electro-neumático del Sistema de Inmersión Temporal VioVeLuz

C1 y C2 son enchufes que se conectan a 110 volts.

T1 y T2 son controles de tiempo “Timers” que funcionan con voltaje alterno de 110 volts.

R es un interruptor electromagnético “relay” con tres contactos 1, 2 y 3

S1 y S2 son válvulas electromagnéticas que funcionan con voltaje alterno de 110 v

C es un compresor que funciona con voltaje alterno de 110 volts.

V1 y V2 son vasos de vidrio de 250 ml.

Según Jiménez y Colmenares (2004) el sistema implementado por los Franceses RITA es mucho mas costoso que el sistema VioVeLuz (cubana) Este sistema es muy sencillo para su fabricación y fue construido en su totalidad con componentes que se pueden comprar en el comercio local, con excepción de los filtros, que son de importación.

2.7 VENTAJAS DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL

- a. Disminución del costo de la mano de obra, debido a la facilidad de manipulación de los explantes y del cambio de medio.
- b. Permite una mejor nutrición mineral. Un contacto estrecho entre la superficie de los explantes y el medio durante la fase de inmersión. Por capilaridad, una fina película de medio se mantiene sobre los explantes.
- c. Fuerte disminución de los problemas de asfixia o vitrificación de los tejidos en comparación con una inmersión permanente.
- d. Renovación completa del aire dentro del recipiente durante cada inmersión.

- e. Mejor separación de los tejidos o células bajo el efecto de las burbujas.
- f. Control de los procesos morfológicos debido a la frecuencia.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN

3.1.1. Ubicación Política

La investigación se realizó en el laboratorio de cultivo *in vitro* de la florícola FLORISOL, ubicada en la provincia de Pichincha, cantón Quito, parroquia San José de Minas, sector Alobuela.

3.1.2. Ubicación Geográfica



3.1.3. Ubicación Ecológica

Altitud	1925msnm
Temperatura (media)	23,08°C
Precipitación (anual)	500 – 600 mm
Suelo	Franco Arenoso
pH	6,5 – 7,5
Vegetación	Eucaliptos Aguacates Toctes Pasto Elefante Kikuyo Cultivos de alfalfa Cítricos (mandarina principalmente) Flores de verano (crisantemo, hypericum, lilis, gysophila, solidago)

3.2. MATERIALES

3.2.1 Fase de Laboratorio

a) Material vegetativo

- Explantes: Microestacas de Crisantemo
- Explantes: Apíces de Tallos de crisantemo

b) Material para creación e implementación del sistema de inmersión temporal

- 1 filtro regulador ½’’ 50micras manual – semiautomático 0-12 bar
- Filtro ½’’ 50 micras manual- semiautomático
- Filtro coalescente ½’’ manual semiautomático 0,01um
- Electroválvula 5/3 1/8’’ Reacción resorte, selenoide asistida central
- 2 Bobinas tipo 22 D=8 BA
- 2 Fichas de conexión tipo 22 LED 220v
- 2 Silenciadores tecnopolímero ajustable con llave ¼

- 4 Conectores Codo giratorio macho T/P 8 ¼ FOX
- Conector Recto 6mm 4M5
- 6m de manguera de poliuretano 6mm azul
- 2 Reguladores de caudal 8x8
- 16 Conectores unión T 8 FOX
- 20m de manguera de poliuretano 8mm azul
- 1 Gabinete metálico de 20x20x15
- 3 selectores de 3 posiciones
- 20mt de cable flexible #18
- 2 Bushin de ½ a ¼
- 1 Manómetro de 0 a 60 psi glicerina
- 1 Llave de paso ½ vuelta
- 2 Neplos de 172 X 4"
- 2 Fusibles de vidrio de 1 amp
- 2 Porta fusibles para riel din
- 24 frascos de vidrio con tapa rosca de plástico
- 8 m de manguera siliconada de 1/8 – ¼
- 36 fitins plásticos
- 1 Logo
- Focos
- Compresor de aire seco

c) Materiales para la producción del medio de cultivo

- 6 Probetas

- Vasos de precipitación
- Papel aluminio
- Empafilm
- Focos
- Agua destilada

d) Medio de cultivo (estándar para crisantemo)

- Nitrato de Amonio (NH_4NH_3)
- Nitrato de Potasio (KNO_3)
- Cloruro de Calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Fosfato de Potasio (KH_2PO_4)
- Acido Bórico (H_3BO_3)
- Sulfato de Magnesio
- Sulfato de Zinc
- Yoduro de Potasio
- Molibdato de Sodio
- Sulfato de Cobre
- Cloruro de Cobalto
- Sulfato de Magnesio
- EDTA (Na_2EDTA)
- Sulfato de Hierro ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Tiamina
- Piridoxina
- Ác Nicotínico

- Glicina
- Agar
- Carbón Activado

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Diseño Experimental

3.3.1.1. Factores en estudio

- Explantes:

- o E1 (Microestacas)
- o E2 (Ápices de Tallos)

- Frecuencias de inmersión Sistema VioVeLuz

MICROESTACAS

ÁPICES DE TALLO

-I1: 2 inmersiones/día (i1)

I1: 2 inmersiones/día (i4)

- I2: 4 inmersiones/día (i2)

I2: 4 inmersiones/día (i5)

- I3: 6 inmersiones/día (i3)

I3: 6 inmersiones/día (i6)

3.3.1.2. Tratamientos

De la combinación de los dos factores en estudio se obtuvieron siguientes tratamientos en estudio.

Cuadro 1. Tratamientos para determinar la respuesta de explantes apicales y microestacas de crisantemo (*Chrysanthemum* sp.) var. Anastacia, a diferentes frecuencias de inmersión en el sistema VioVeLuz en la Florícola FLORISOL – San José de Minas, 2011.

TRATAMIENTO	EXPLANTE	NÚMERO DE INMERSIONES /DÍA
1 E1I1	Micro estaca	2(i1)
2 E1I2	Micro estaca	4(i2)
3 E1I3	Micro estaca	6(i3)
4 E2I1	Ápice de tallo	2(i4)
5 E2I2	Ápice de tallo	4(i5)
6 E3I3	Ápice de tallo	6(i6)

3.3.1.3. Tipo de diseño

Diseño completamente al azar en arreglo factorial dos por tres.

3.3.1.4. Repeticiones

4 repeticiones

3.3.1.5. Características de las UE

Estuvieron constituidas por 30 esquejes de Crisantemo de la variedad Anastasia blanco, de 20 días de cultivo entre las que estuvieron microestacas (E1) y ápices de tallos (E2), las mismas que estuvieron en frascos de vidrio de 500ml, aparte estuvieron frascos de vidrio de 250ml con la solución para realizar el proceso del sistema de inmersión temporal VioVeLuz.

Para el presente estudio se ocuparon 28 frascos en los que se encontraron 30 esquejes en cada frasco y 28 frascos que contenían el medio con las sales necesarias para el crecimiento de los esquejes, como se muestra en la figura 3.

3.3.1.6. Croquis del diseño

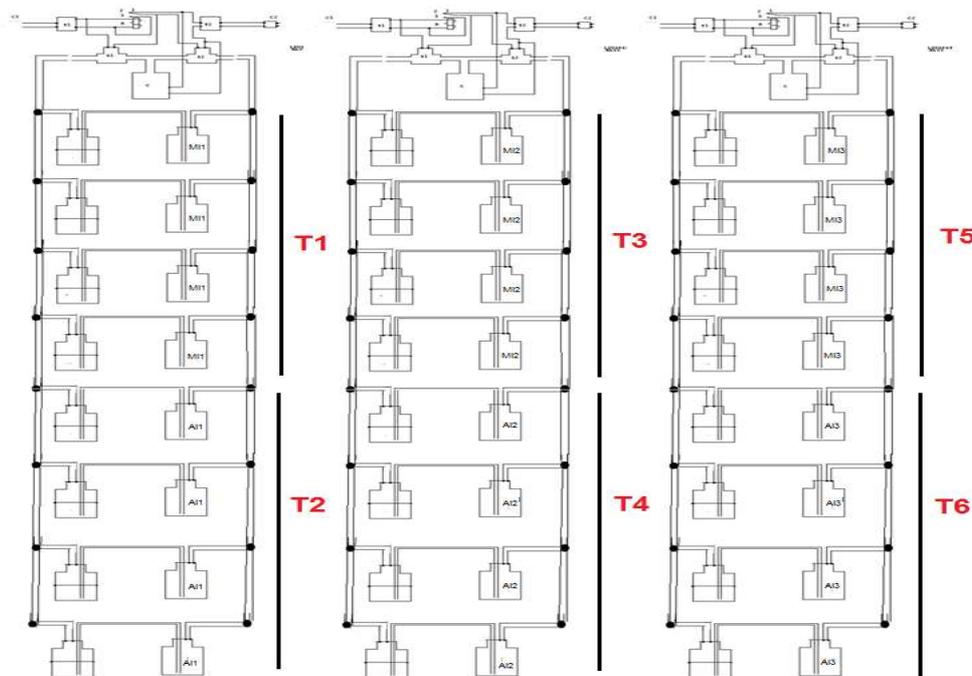


FIGURA 4. Diseño del sistema de inmersión temporal VioVeLuz del proyecto realizado.

T1	E1I1	Microestaca a frecuencia de inmersión 1
T2	E1I2	Microestaca a frecuencia de inmersión 2
T3	E1I3	Microestaca a frecuencia de inmersión 3
T4	E2I1	Ápice de tallo a frecuencia de inmersión 1
T5	E2I2	Ápice de tallo a frecuencia de inmersión 2
T6	E2I3	Ápice de tallo a frecuencia de inmersión 3
T7	T	Testigo

3.3.2. Análisis Estadístico

3.3.2.1. Esquema de análisis de varianza

F de V	GL
Total	27
Tratamientos	(6)
Explantes (e)	1
F inmersión (i)	2
F inmersión lineal	1
F inmersión cuadrática	1
Explante x F inmersión	2
Testigo vs Resto	1
Error	21

3.3.2.2. Coeficiente de variación

$$CV\% = \frac{\sqrt{CME}}{X} * 100$$

3.3.2.3. Análisis funcional

Prueba de DMS al 5% para explantes, prueba de Duncan al 5% para frecuencias de inmersión y tratamientos. Polinomios y comparaciones ortogonales.

3.3.2.4. Regresiones y correlaciones

Regresión y Correlación entre las frecuencias de inmersión con cada una de las variables dentro de cada explante.

3.3.3. Análisis Económico

El análisis económico se estableció, bajo el esquema de beneficio - costo. Para lo cual se tomó el número de plantas totales obtenidas por cada uno de los tratamientos y se multiplicó por el valor en el mercado, obteniendo el beneficio bruto. Por otro lado se obtuvo los costos variables de cada uno de los tratamientos que correspondieron a los explantes y a los tiempos de inmersión, así como a su mano de obra. De la diferencia de los beneficios brutos con los costos variables se obtuvo el beneficio neto.

Colocando los beneficios netos, en orden decreciente acompañado de sus costos variables se efectuó el análisis de dominancia, donde tratamiento dominado es aquel que con igual o menor beneficio neto presentó un mayor costo variable. Definiendo de esta manera cuales son los tratamientos no dominados.

Con los tratamientos no dominados se procedió a establecer el análisis marginal determinando para cada uno de estos tratamientos la tasa interna de retorno marginal que permitió seleccionar los tratamientos más económicos.

3.3.4. Variables Medidas

a) Porcentaje de sobrevivencia

Se determinó mediante la relación entre los explantes muertos tanto apicales como microestacas y el número total de explantes apicales y microestacas sembradas en cada tratamiento a los 6 días de realizada la siembra, multiplicado por 100.

b) Tiempo de brotación

El tiempo de brotación se determinó como el número de días a partir de la siembra en que el 50% de los explantes apicales y microestacas alcanzaron al menos 0,5 cm de altura.

c) Porcentaje de brotación

Se determinó según el número de explantes de la unidad experimental que produjeron al menos un brote una semana después de la siembra. Con relación al total de explantes tanto microestacas como ápices de tallo multiplicado por 100.

d) Longitud de brotes

Se midió la longitud de brotes de los explantes apicales y de microestacas a partir de su inserción en el explante hasta su extremo apical, a partir de los 7 días de realizada la siembra.

e) Porcentaje de enraizamiento

Se determinó mediante la relación de explantes apicales y microestacas con al menos una raíz de 3 mm de longitud con el número total de explantes del tratamiento, a los 6 días después de realizada la siembra.

f) Porcentaje de contaminación

Se determinó mediante el número de frascos de la unidad experimental que contenían alguna presencia de hongos o bacterias. Con relación al total de frascos multiplicado por 100.

g) Costos de implementación

Se realizó comparaciones de los costos de producción tanto del sistema de micropropagación tradicional con el sistema de inmersión temporal establecido para crisantemo.

h) Frecuencias de inmersión

El tiempo de inmersión se determinó al final del ensayo, con la comparación de los mejores resultados en las variables, porcentaje de sobrevivencia, tiempo de brotación, porcentaje de brotación, longitud de brotes y el porcentaje de enraizamiento.

3.3.5. Métodos Específicos de Manejo del Experimento

Con el propósito de determinar el tipo de explante más adecuado para propagar Crisantemo, variedad Anastasia se evaluaron dos tipos de explantes, los cuales se tomaron de plantas micropropagadas en el laboratorio. Dichos explantes fueron: *microestacas*: sección del tallo con un nudo en el que está una yema axilar y *ápices de tallos*: sección terminal del tallo que contiene el meristemo apical más una porción del tallo con uno o dos nudos.

Se utilizó el sistema de inmersión temporal VioVeluz desarrollado por Cuba, que consta de dos frascos de vidrio cada uno con sus respectivas tapas las cuales contienen dos fitins por tapa, manquera siliconada (3 trozos de 6cm dependiendo de tamaño del frasco y dos de 4cm) .

Como recipientes se utilizaron frascos de 500ml de capacidad. Cada frasco se conectó a un sistema de aire proveniente de un compresor, el cual fue accionado por un programador automático para el control de la frecuencia y duración de las inmersiones;

la frecuencia dependió del tratamiento (dos, cuatro, seis inmersiones/día) y la duración fue de 6 minutos cada una.

El sistema permaneció conectado al compresor a un litro de aire por minuto y con una presión de 0,8 bar. El aire entrante o saliente de cada recipiente se esterilizó mediante filtros milipore (tamaño del poro 1µm) de manera que cada uno se manipuló de forma independiente sin riesgos de contaminación.

Para cultivar los explantes (ápices de tallo y microestacas) de Crisantemo, variedad Anastasia, se utilizó el medio de cultivo que contiene sales de Murashige y Skoog (M&S, 1962) a una concentración del 100%; además, dicho medio se suplementó con 100mg L⁻¹ de sacarosa y 1ml L⁻¹ de una solución de vitaminas preparada (Ácido Nicotínico, Glicerina, Tiamina) a un pH de 5,7. El medio de cultivo se esterilizó por autoclave (20 min/litro de medio, a 121°C). Cada recipiente que contenía el medio se le agregó 35ml de medio de cultivo y se cultivó en los otros frascos 30 explantes por cada uno de ellos.

Para el cultivo en el sistema de inmersión temporal VioVeluz de Crisantemo, variedad Anastasia se utilizó dos diferentes explantes (ápices de tallos y microestacas), los cuales se cultivaron por separado para determinar en cada uno el efecto de 2, 4 y 6 inmersiones/día en el medio de cultivo.

El sistema se mantuvo en el cuarto bajo un fotoperiodo de 16 horas luz: 8 horas oscuridad; como fuentes de luz se empleó lámparas de luz fluorescentes con intensidades lumínicas de 2000 lux. Los cultivos se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y a una humedad relativa de 70%.

NOTA: Los protocolos utilizados tanto de asepsia, siembra y funcionamiento del sistema de inmersión temporal VioVeLuz, se encuentran dentro de los Anexo 1, 2 , 3 y 4 respectivamente.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA

Al establecer el análisis de variancia para el porcentaje de sobrevivencia, no se encontró diferencias estadísticas para tratamientos, sin embargo se encontró diferencias estadísticas a nivel del 5% entre los explantes, el resto de fuentes de variación no manifestaron diferencias estadísticas (Cuadro 2).

El promedio general del porcentaje de sobrevivencia fue de 94,76%, con un coeficiente de variación de 12,09% independiente del tipo de explante.

CUADRO 2. Análisis de variancia para porcentaje de sobrevivencia de plántulas de crisantemo var. Anastasia bajo el efecto de dos tipos de explantes y tres tiempos de inmersión en el sistema VioVeLuz en la Florícola FLORISOL – San José de Minas, 2011.

Fuentes de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F
Total	27	4165,18		
Tratamientos	(6)	1409,53	234,92	1,79 ns
Explantes (E)	1	896,34	896,34	6.83 *
Inmersión (I)	2	192,57	96,29	0.73 ns
Inmersión lineal	1	177,76	177,76	1,35 ns
Inmersión cuadrática	1	14,82	14,82	0,11 ns
E x I	2	192,57	96,29	0,73 ns
Testigo vs Resto	1	128,05	128,05	0.98 ns
Error	21	2755,64	131,22	
X(%)			94,76	
CV (%)			12,09	

El mayor porcentaje de sobrevivencia se presento bajo el ápice del tallo, con el 100% de sobrevivencia mientras que con microestacas alcanzó el 87.78%, debido a que el tipo de material de origen presentaba contaminación, no visible en el momento de la multiplicación *in vitro* dentro de la cámara de flujo laminar. (Cuadro 3) y (Figura 4).

CUADRO 3. Efectos de los explantes sobre el porcentaje de sobrevivencia de las plántulas de crisantemo en el sistema de inmersión temporal VioVeLuz.

Explantes	X Porcentaje de sobrevivencia (%)	
E1 Microestaca	87,78	
E2 Ápice de tallo	100,00	

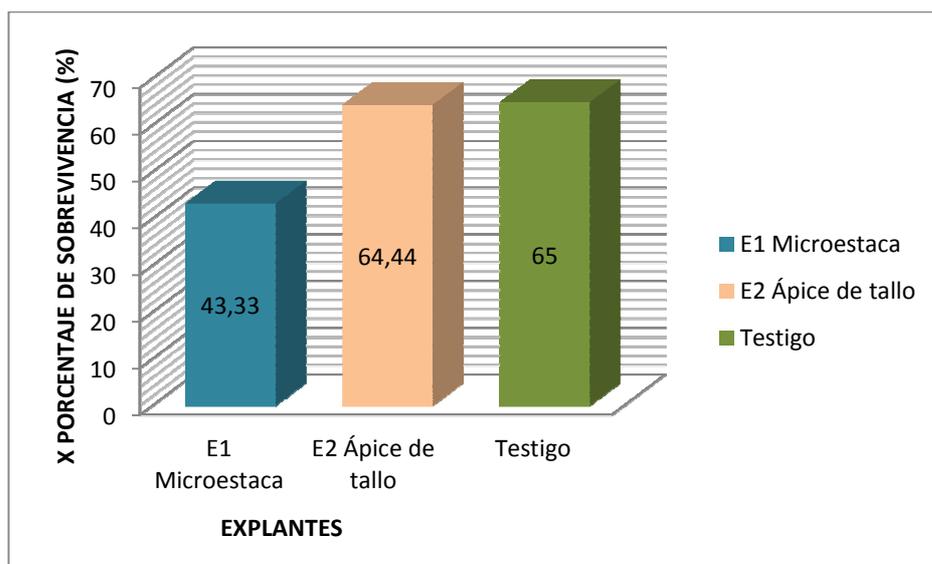


FIGURA 5. Porcentaje de sobrevivencia de microestacas y ápices de tallo de crisantemo variedad Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz cultivadas a 2, 4 y 6 inmersiones/día

A pesar de no encontrar diferencias estadísticas en las frecuencias de inmersión, a medida que se incrementan las inmersiones aumenta el porcentaje de sobrevivencia, debido, a la presencia limitada de nutrientes que existe en este sistema, permitiendo así

que los explantes reaccionen de manera positiva aumentando su sobrevivencia. (Cuadro 4), nótese que existe levemente una inflexión (Figura 5)

CUADRO 4. Efectos de las frecuencias de inmersión sobre el porcentaje de sobrevivencia de plántulas de crisantemo.

Frecuencias de inmersión	X Porcentaje de sobrevivencia (%)	
I1 (2 inmersiones/día)	90,00	
I2 (4 inmersiones /día)	95,00	
I3 (6 inmersiones /día)	96,67	

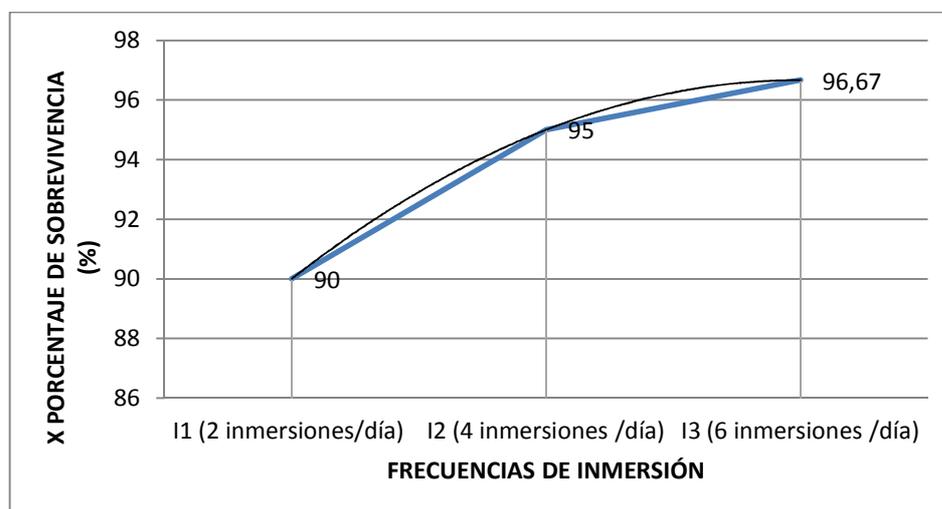


FIGURA 6. Porcentaje de sobrevivencia de ápices y microestacas de crisantemo variedad Anastasia en las diferentes frecuencias de inmersión en el sistema VioVeLuz de 2, 4 y 6 inmersiones/día

Al analizar todos los tratamientos se puede apreciar que únicamente los tratamientos provenientes de las microestacas no alcanzaron el 100% de sobrevivencia, mientras que el testigo con todos los tratamientos de ápice de tallo lograron el 100% de sobrevivencia. La sobrevivencia fue alta, lo cual demuestra que mediante ésta técnica se puede cultivar

con un bajo índice de mortalidad siempre y cuando se cumplan las debidas normas de asepsia y de selección del material que se va a cultivar. (Cuadro 5) y (Figura 6).

CUADRO 5. Efectos de los tratamientos sobre el porcentaje de sobrevivencia de plántulas de crisantemo.

Tratamientos	X Porcentaje de sobrevivencia (%)	
T1 E1 I1	80,00	b
T2 E1 I2	90,00	ab
T3 E1 I3	93,33	ab
T4 E2 I1	100,00	a
T5 E2 I2	100,00	a
T6 E2 I3	100,00	a
T7 Testigo	100,00	a

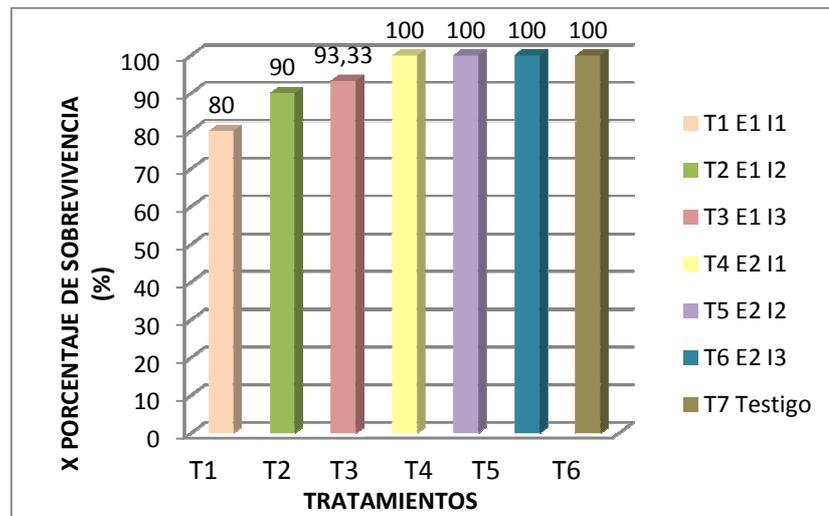


FIGURA 7. Porcentaje de sobrevivencia en los diferentes tratamientos realizados en el sistema de inmersión VioVeLuz en explantes de crisantemo variedad Anastasia.

4.2 TIEMPO DE BROTACIÓN

Al establecer el análisis de variancia para los tiempos de brotación, no se pudo estimar las Fuentes de variación (F) debido a que la variación entre las diferentes repeticiones es cero razón por la cual hay una ausencia total de la variancia del error (Cuadro 6).

El promedio general del tiempo de brotación fue de 11 días, con un coeficiente de variación de 0% adecuado para esta investigación.

CUADRO 6. Análisis de variancia para Tiempo de Brotación de sobrevivencia de plántulas de crisantemo variedad Anastasia bajo el efecto de dos tipos de explantes y tres frecuencias de inmersión, en el sistema VioVeLuz, en la florícola FLORISOL- San José de Minas, 2011.

Fuentes de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F
Total	27	528,00		
Tratamientos	(6)	528,00	88,00	----
Explantes (E)	1	42,67	42,67	----
Inmersión (I)	2	17,33	8,67	----
Inmersión lineal	1	8,99	8,99	----
Inmersión cuadrática	1	8,34	8,34	----
E x I	2	1,33	0,67	----
Testigo vs Resto	1	466,67	466,67	----
Error	21	0,00	0,00	
X días			11	
Cv (%)			0,00	

El menor tiempo de brotación se presentó bajo el ápice del tallo, con una media de 8 días para su brotación, mientras que con microestacas se obtuvo en 10,67 días, ya que el ápice de tallo al contener hojas produce fotosíntesis por el intercambio gaseoso dentro

de los frascos que acelera el crecimiento de los ápices cosa que no ocurre con las microestacas que están completamente desnudas y realizan mayor esfuerzo en la provocación de su brote (Cuadro 7) y (Figura 7).

CUADRO 7. Efecto de los explantes sobre el tiempo de brotación de las plántulas de crisantemo variedad Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz

Explantes	X Tiempo de Brotación (días)	
E1 Microestaca	10,67	
E2 Ápice de tallo	8,00	

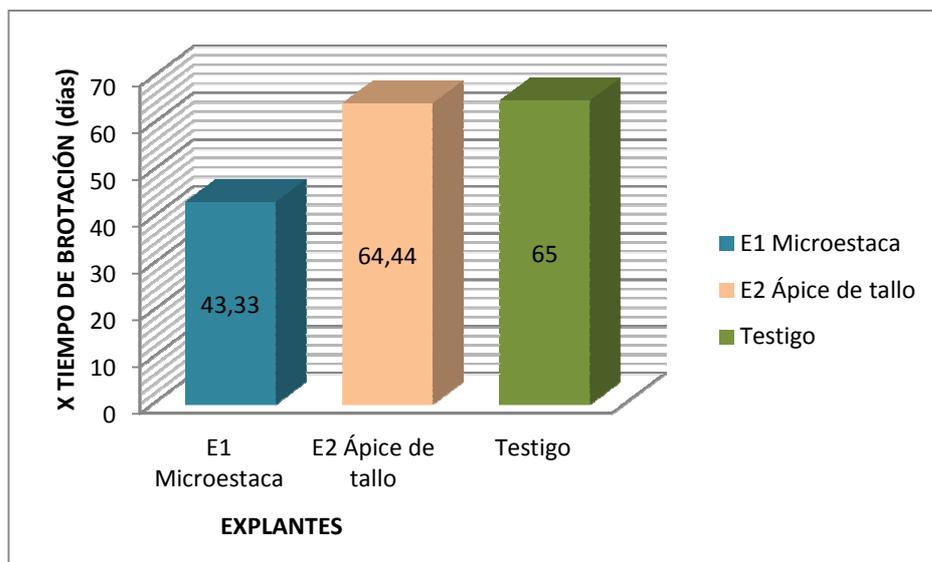


FIGURA 8. Tiempo de brotación en microestacas y ápices de Crisantemo variedad Anastasia a 2, 4 y 6 inmersiones/día en el sistema de inmersión VioVeLuz.

La frecuencia (I2) de 4 inmersión/día produjo un tiempo de brotación más corto y uniforme tanto en las microestacas como en los ápices de tallos que fue de 8 días, seguido de la frecuencia (I3) de 6 inmersión/día , con 9 días y por último la frecuencia (I1) de 2 inmersiones/día con 10,5 días, debido a los requerimientos y necesidades de los explantes de Crisantemo var. Anastasia junto con la adaptabilidad al intercambio

gaseoso dentro de los frascos y a la cantidad de nutrientes requeridas por las mismas.

(Cuadro 8) y (Figura 8) Nótese que el comportamiento no es lineal sino cuadrático.

CUADRO 8. Efectos de las frecuencias de inmersión en el sistema VioVeLuz sobre el tiempo de brotación de las plántulas de crisantemo variedad Anastasia.

Frecuencia de inmersión	X Tiempo de Brotación (días)	
I1 (2 inmersiones/día)	10,50	c
I2 (4 inmersiones /día)	8,50	a
I3 (6 inmersiones /día)	9,00	b

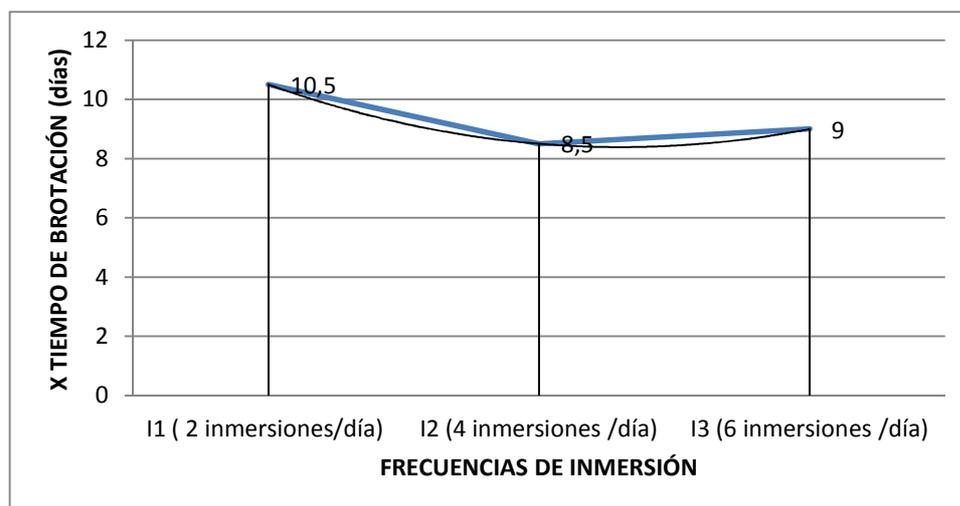


FIGURA 9. Influencia de las frecuencias de inmersión en el tiempo de brotación de los explantes de crisantemo variedad Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz.

Al analizar todos los tratamientos se puede apreciar que únicamente el testigo tuvo un tiempo de brotación mayor de 21 días seguido por los tratamientos de microestaca con un rango de 12 a 10 días y los tratamientos del ápice de tallo que van de 7 a 9 días siendo estos los más precoces, debido al intercambio gaseoso que existe dentro del

sistema y a la presencia de hojas de los ápices de tallo que permite realizar fotosíntesis, al mismo tiempo que al despojar de alimento a los explantes estos asimilan más eficientemente los nutrientes absorbidos, permitiendo así la aceleración de la brotación (Cuadro 9) y (Figura 9).

CUADRO 9. Efectos de los tratamientos sobre el tiempo de brotación de las plántulas de crisantemo variedad Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz.

Tratamientos	X Tiempo de Brotación (días)	
T1 E1 I1	12,00	e
T2 E1 I2	10,00	d
T3 E1 I3	10,00	d
T4 E2 I1	9,00	c
T5 E2 I2	7,00	a
T6 E2 I3	8,00	b
T7 Testigo	21,00	f

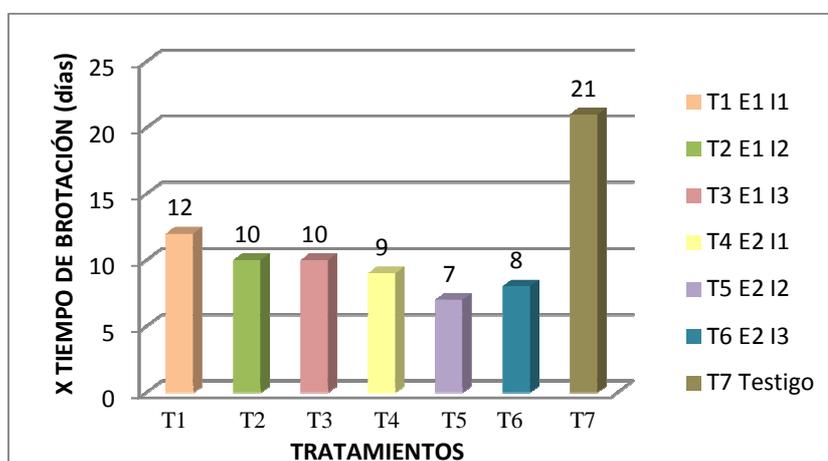


FIGURA 10. Tiempos de brotación en los tratamientos realizados en ápices y microestacas de crisantemo variedad Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz.

4.3 PORCENTAJE DE BROTACIÓN

Al establecer el análisis de variancia para el porcentaje de brotación, se encontró que existen diferencias estadísticas del 1% en todas las fuentes de variación a excepción de la interacción Explante por Inmersión (ExI), esta no significación nos indica que los dos factores actuaron independientemente (Cuadro 10).

El promedio general del porcentaje de brotación fue de 55,44%, con un coeficiente de variación de 17,67%

CUADRO 10. Analisis de variancia para porcentaje de brotación de plántulas de crisantemo variedad Anastasia bajo el efecto de dos tipos de explantes y tres tiempos de inmersión en el sistema VioVeLuz en la Florícola FLORISOL – San José de Minas, 2011.

Fuentes de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F
Total	27	17606,73		
Tratamientos	(6)	15590,99	2598,50	27,07 **
Explantes (E)	1	2792,67	2792,67	29,09 **
Inmersión (I)	2	7366,30	3683,15	38,37 **
Inmersión lineal	1	1038,29	1038,29	10,82 **
Inmersión cuadrática	1	6328,01	6328,01	65,92 **
E x I	2	380,67	190,33	1,98 ns
Testigo vs Resto	1	5051,36	5051,36	52,62 **
Error	21	2015,75	95,99	
X (%)			55,44	
Cv (%)			17,67	

El mayor porcentaje de brotación se presentó bajo el ápice del tallo, con el 60,74% , mientras que con microestacas apenas alcanzó el 39,17% debido a que el intercambio gaseoso y al proceso fotosintético es menor, en ausencia de partes vegetativas (Cuadro 11) y (Figura 10).

CUADRO 11. Efecto de los explantes sobre el porcentaje de brotación de las plántulas de crisantemo variedad Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz.

Explantes	X Porcentaje de brotación (%)	
E1 Microestaca	39,17	b
E2 Ápice de tallo	60,74	a

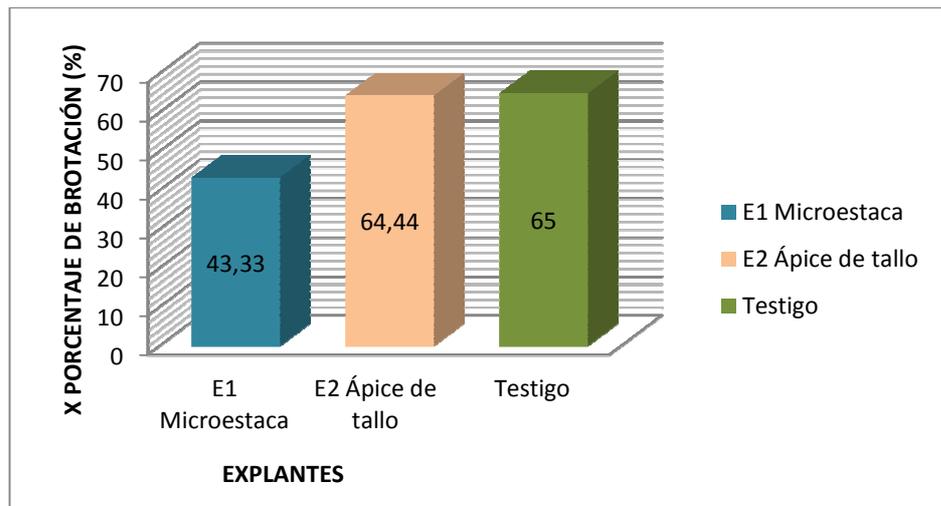


FIGURA 11. Porcentaje de brotación de microestacas y ápices de crisantemo variedad Anastasia, cultivados a 2, 4 y 6 inmersiones/día en el sistema VioVeLuz.

El porcentaje de brotación mayor fue de 72,92% con 4 inmersiones/día (I2), seguido del de 6 inmersiones/día (I3) de 46,53% finalizando con el de 2 inmersiones/día (I1) de 30,42%, debido a los requerimientos y adaptabilidad de los explantes a los tiempos de inmersión necesarios que precisaron tanto los ápices de tallo como las microestacas para

su alimentación. (Cuadro12) Nótese que el comportamiento no es lineal sino cuadrático.

(Figura 11)

CUADRO 12. Efectos de las frecuencias de inmersión en el sistema VioVeLuz sobre el porcentaje de sobrevivencia de plántulas de crisantemo variedad Anastasia.

Frecuencias de inmersión	X Porcentaje de brotación (%)	
I1 (2 inmersiones/día)	30,42	c
I2 (4 inmersiones /día)	72,92	a
I3 (6 inmersiones /día)	46,53	b

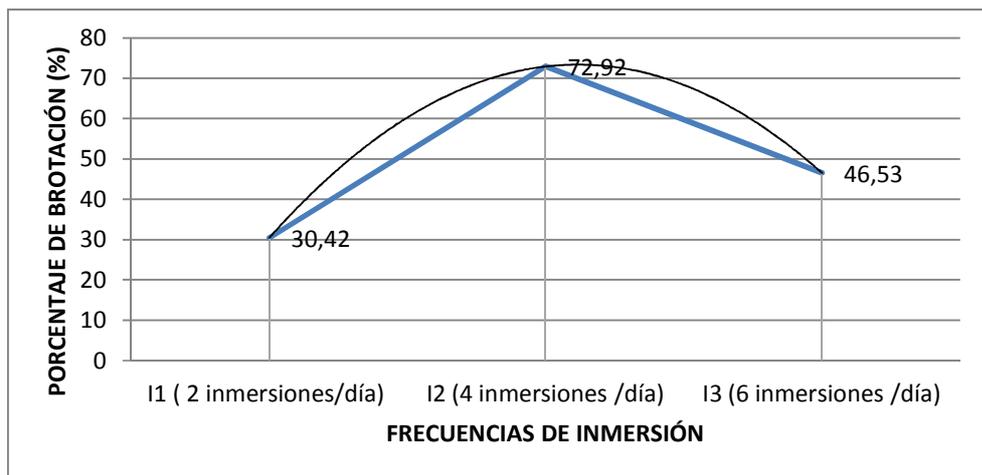


FIGURA 12. Influencia de las frecuencias de inmersión en el porcentaje de brotación en ápices y microestacas de crisantemo variedad Anastasia en el sistema VioVeLuz.

Al analizar todos los tratamientos se puede apreciar que el tratamiento 1 tuvo el menor porcentaje de brotación que fue de 19,17%, seguido de los tratamientos 3, 4, 6 y 2 con un porcentaje de brotación de 40,83%, 41,67%, 52,22% y 57,50% respectivamente y los tratamientos que tuvieron mayor porcentaje de brotación fueron los tratamientos 5 y 7 con 88,34% para los dos casos, debido a la respuesta inmediata de los explantes a los

requerimientos necesarios tanto de nutrientes como de racionamiento necesario de alimento para su brotación (Cuadro 13) y (Figura 12)

CUADRO 13. Efectos de los tratamientos sobre el porcentaje de brotación de plántulas de crisantemo variedad Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz.

Tratamientos	X Porcentaje de brotación (%)	
T1 E1 I1	19,17	d
T2 E1 I2	57,50	b
T3 E1 I3	40,83	c
T4 E2 I1	41,67	c
T5 E2 I2	88,34	a
T6 E2 I3	52,22	bc
T7 Testigo	88,34	a

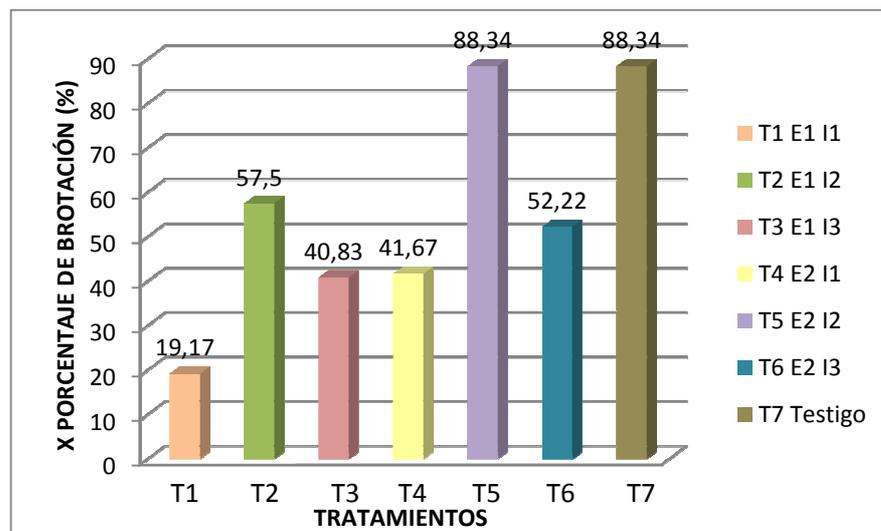


FIGURA 13. Porcentaje de brotación en los diferentes tratamientos realizados en el sistema de inmersión VioVeLuz en ápices y microestacas de crisantemo var. Anastasia.

4.4 LONGITUD DE BROTES

Al establecer el análisis de variancia para la longitud de brotes, se encontró que existen diferencias estadísticas del 1% en todas las fuentes de variación a excepción de las interacciones Explante por Inmersión (ExI) y Testigo vs el Resto, estas no significaciones nos indican que los factores actuaron independientemente (Cuadro 14).

El promedio general de la longitud de brotes fue de 1,39cm, con un coeficiente de variación de 12,02%

CUADRO 14. Análisis de variancia para la longitud de brotes de plántulas de crisantemo variedad Anastasia bajo el efecto de dos tipos de explantes y tres tiempos de inmersión en el sistema VioVeLuz en la Florícola FLORISOL – San José de Minas, 2011.

Fuentes de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F
Total	27	4,74		
Tratamientos	(6)	4,15	0,69	24,79 **
Explantes (E)	1	1,47	1,47	52,45 **
Inmersión (I)	2	2,47	1,24	44,29 **
Inmersión lineal	1	1,02	1,02	36,33 **
Inmersión cuadrática	1	1,46	1,46	52,24 **
E x I	2	0,12	0,06	2,00 ns
Testigo vs Resto	1	0,09	0,09	3,29 ns
Error	21	0,59	0,03	
X (cm)			1,39	
Cv (%)			12,02	

Los ápices de tallo en cuanto a la longitud de brotes presentaron la mayor respuesta y fue de 1,66 cm, seguida de las microestacas con 1,17cm debido a la competencia por

nutrientes que influye de manera positiva en la respuesta inmediata al desarrollo del brote (Cuadro 15) y (Figura 13).

CUADRO 15. Efecto de los explantes sobre la longitud de brotes de las plántulas de crisantemo variedad Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz..

Explantes	X Longitud de brotes (cm)	
E1 Microestaca	1,17	b
E2 Ápice de tallo	1,66	a

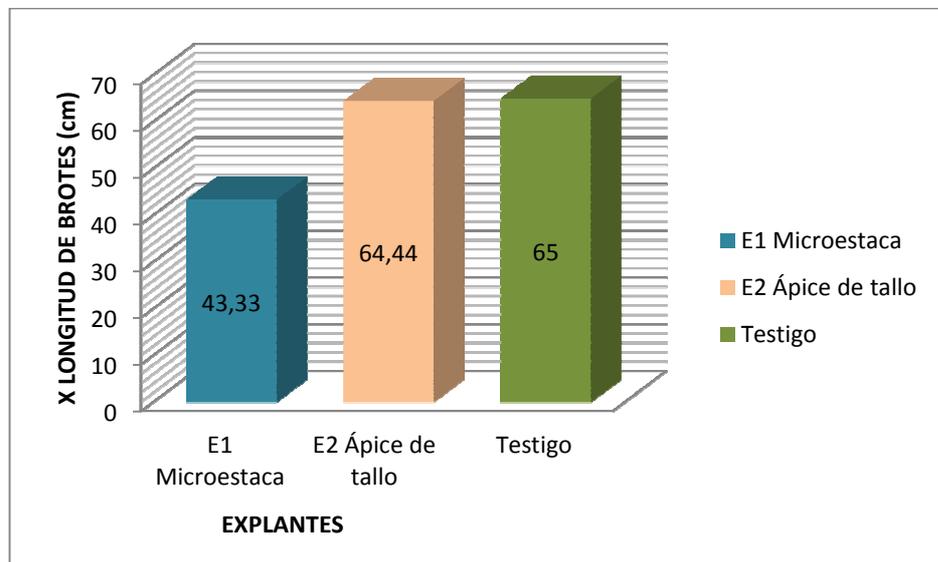


FIGURA 14. Longitud de brotes en microestacas y ápices de crisantemo variedad Anastasia, cultivadas a 2, 4 y 6 inmersiones/día en el sistema VioVeLuz.

Los explantes tanto microestacas como ápices de tallos cultivados a 4 inmersiones/día presentaron la mejor respuesta en cuanto a la longitud de brotes y uniformidad de los explantes que fue de 1,76 cm , seguida de 6 inmersiones/día con 1,49 cm finalmente con 2 inmersiones/días se obtuvo una longitud de brotes de 0,99 cm debido a la necesidad y frecuencia del alimento requerida en esta especie y variedad de planta. (Cuadro 16) y (Figura 14).

CUADRO 16. Efectos de las frecuencias de inmersión en el sistema VioVeLuz sobre la longitud de brotes de plántulas de crisantemo variedad.

Frecuencias de inmersión	X Longitud de brotes (cm)	
I1 (2 inmersiones/día)	0,99	c
I2 (4 inmersiones /día)	1,76	a
I3 (6 inmersiones /día)	1,49	b

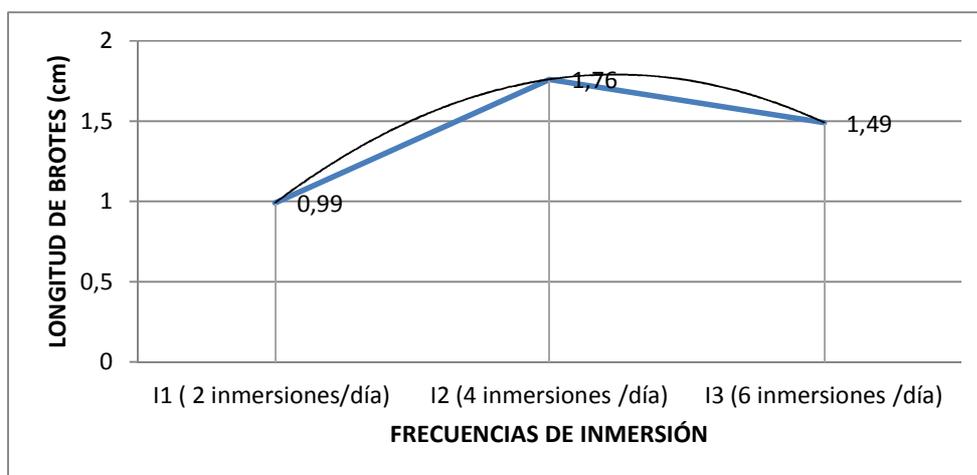


FIGURA 15. Longitud de brotes de ápices y microestacas de crisantemo variedad Anastasia en las diferentes frecuencias de inmersión probados en el sistema VioVeLuz.

Al analizar todos los tratamientos se puede apreciar que el tratamiento (1) microestaca a 2 inmersiones/día tuvo la menor longitud en cuanto a los brotes ya que fue de 0,65 cm, seguido de los tratamientos (3) microestaca a 6 inmersiones/día,(7) el Testigo, (4) ápice de tallo a 2 inmersiones/día y (2) microestaca a 4 inmersiones/día con una longitud de brotación de 1,25 cm para los dos primeros casos seguido de 1,33cm y 1,60cm para los siguientes respectivamente finalmente, los tratamientos que tuvieron mayor longitud de brotes fueron el tratamiento (5) ápice de tallo a 4 inmersiones/día y el tratamiento (6) ápice de tallo a 6 inmersiones/día con 1,93 cm y 1,73cm respectivamente (Cuadro 17) y

(Figura 15). Este fenómeno ocurre por el intercambio gaseoso que aporta el sistema mejorando y acelerando así el desarrollo del brote

CUADRO 17. Efectos de los tratamientos sobre la longitud de brotes de plántulas de crisantemo variedad Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz..

Tratamientos	X Longitud de brotes (cm)	
T1 E1 I1	0,65	d
T2 E1 I2	1,60	b
T3 E1 I3	1,25	c
T4 E2 I1	1,33	c
T5 E2 I2	1,93	a
T6 E2 I3	1,73	ab
T7 Testigo	1,25	c

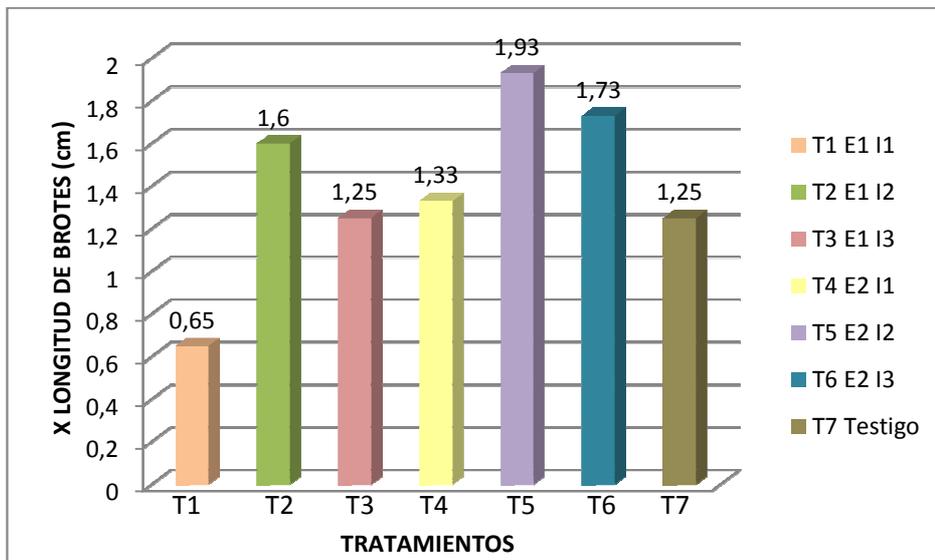


FIGURA 16. Longitud de brotes en los tratamientos realizados en el sistema de inmersión VioVeLuz en ápices y microestacas de crisantemo variedad Anastasia.

4.5 PORCENTAJE DE ENRAIZAMIENTO

Al establecer el análisis de variancia para el porcentaje de enraizamiento, se encontró que existen diferencias estadísticas del 1% en todas las fuentes de variación a excepción de la interacción Testigo vs el Resto que tiene diferencia estadística del 5% y de la interacción Explante por Inmersión (ExI) que no presenta diferencias significativas, esta no significación indica que los dos factores actuaron independientemente (Cuadro 18).

El promedio general del porcentaje de enraizamiento fue de 55,48%, con un coeficiente de variación de 15,29%

CUADRO 18. Analisis de variancia para porcentaje de enraizamiento de plántulas de crisantemo variedad Anastasia bajo el efecto de dos tipos de explantes y tres tiempos de inmersión en el sistema VioVeLuz en la Florícola FLORISOL – San José de Minas, 2011.

Fuentes de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F
Total	27	12488,15		
Tratamientos	(6)	10976,98	1829,50	25,42 **
Explantes (E)	1	2673,79	2673,79	37,16 **
Inmersión (I)	2	7806,78	3903,39	54,24 **
Inmersión lineal	1	1806,24	1806,24	25,10 **
Inmersión cuadrática	1	6000,53	6000,53	83,39 **
E x I	2	73,09	36,54	0,05 ns
Testigo vs Resto	1	423,32	423,32	5,88 *
Error	21	1511,17	71,96	
X (%)			55,48	
Cv (%)			15,29	

Los ápices de tallo presentaron un mayor porcentaje de enraizamiento que fue de 64,44% lo que no se dio en las microestacas que obtuvieron un 43,33% de enraizamiento debido a la influencia de la concentración de medio y al intercambio gaseoso que permite con mayor facilidad a los ápices de tallo por la presencia de hojas que estos poseen, desarrollar mayor cantidad de raíces (Cuadro 19) y (Figura 16).

CUADRO 19. Efecto de los explantes sobre el porcentaje de enraizamiento de las plántulas de crisantemo variedad Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz.

Explantes	X Porcentaje de enraizamiento(%)	
E1 Microestaca	43,33	b
E2 Ápice de tallo	64,44	a

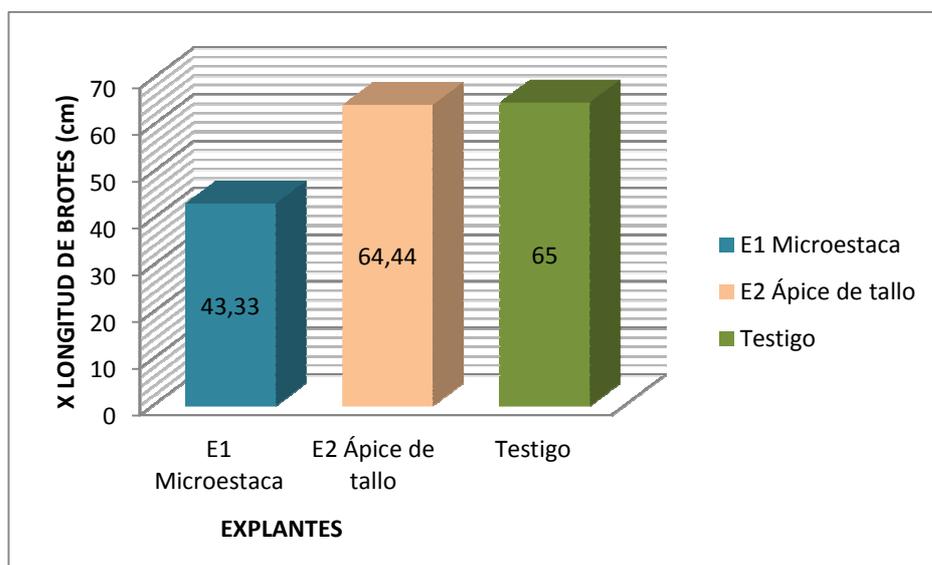


FIGURA 17. Porcentaje de enraizamiento en ápices y microestacas de crisantemo variedad Anastasia a 2, 4 y 6 inmersiones/día en el sistema de inmersión VioVeLuz.

Con la frecuencia de inmersión I2 (4 inmersiones/día) se obtuvo el mejor porcentaje de enraizamiento que fue de 76,25% seguido de la frecuencia de inmersión I3 (6

inmersiones/día) con 53,33% finalizando con la frecuencia de inmersión I1 (2 inmersiones/día) con 32,08% debido probablemente a la concentración del medio, disponibilidad de las necesidades de los explantes y el intercambio gaseoso que permite realizar la fotosíntesis la misma que ayuda a la producción de raíces. (Cuadro 20) y (Figura 17).

CUADRO 20. Efectos de las frecuencias de inmersión en el sistema VioVeLuz sobre el porcentaje de enraizamiento de plántulas de crisantemo variedad Anastasia.

Frecuencias de inmersión	X Porcentaje de enraizamiento (%)	
I1 (2 inmersiones/día)	32,08	c
I2 (4 inmersiones /día)	76,25	a
I3 (6 inmersiones /día)	53,33	b

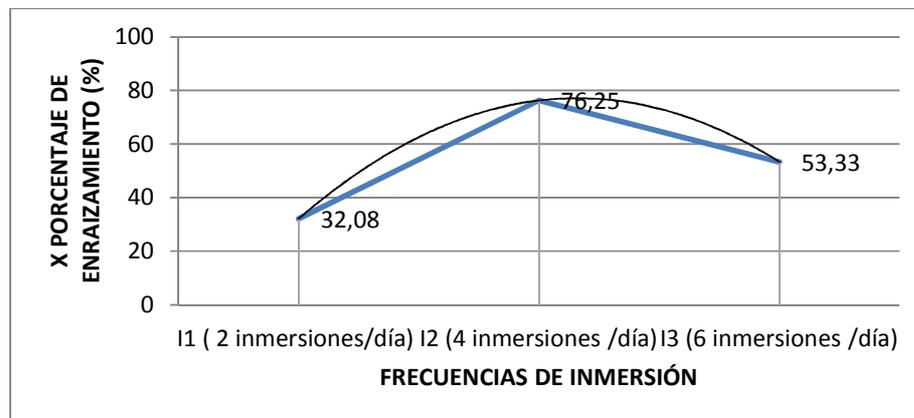


FIGURA 18. Porcentaje de enraizamiento en las diferentes frecuencias de inmersiones en el sistema VioVeLuz en ápices y microestacas de crisantemo variedad Anastasia

Al analizar todos los tratamientos se puede apreciar que el tratamiento 1 microestaca a 2 inmersiones/día tuvo el menor porcentaje de enraizamiento ya que fue de 19,17%, seguido de los tratamientos 3 microestaca a 6 inmersiones/día y 4 ápice de tallo a 2

inmersiones/día, con un porcentaje de 43,33% y 45,00% respectivamente continuando con los tratamientos 6 ápice de tallo a 6 inmersiones día , 7 el Testigo y 2 microestaca a 4 inmersiones/día con un porcentaje de enraizamiento de 63,33%, 65,00% y 67,50% respectivamente y finalmente obteniendo como el mejor resultado el tratamiento 5 ápice de tallo a 4 inmersiones/día con un porcentaje de enraizamiento de 85,00% esto puede deberse a la reacción de los explantes a los tiempos necesarios para su alimentación, junto con los requerimientos nutricionales de los explantes en estudio y al intercambio gaseoso que se da en los frascos (Cuadro 21) y (Figura 18).

CUADRO 21. Efectos de los tratamientos sobre el porcentaje de enraizamiento de plántulas de crisantemo variedad Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz.

Tratamientos	X Porcentaje de enraizamiento (%)	
T1 E1 I1	19,17	d
T2 E1 I2	67,50	b
T3 E1 I3	43,33	c
T4 E2 I1	45,00	c
T5 E2 I2	85,00	a
T6 E2 I3	63,33	b
T7 Testigo	65,00	b

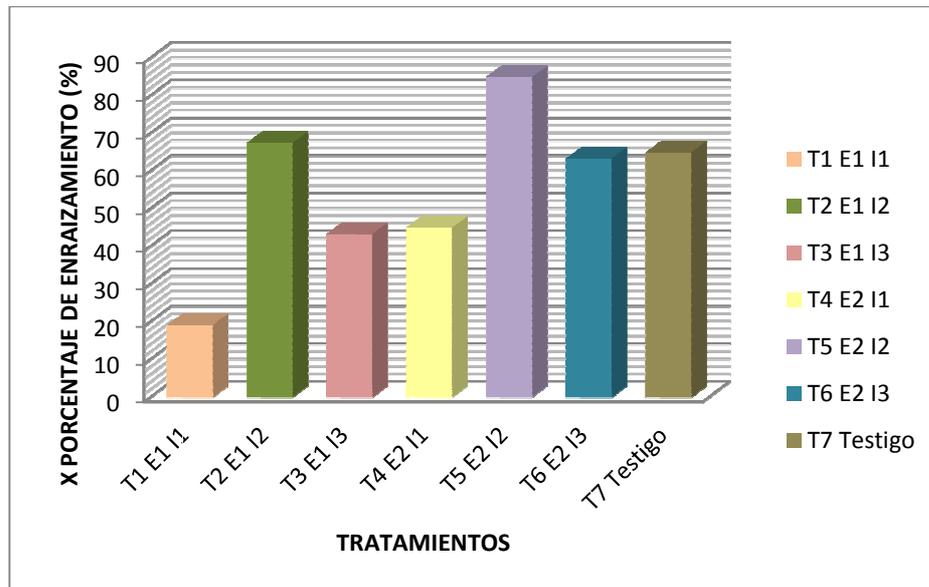


FIGURA 19. Porcentaje de enraizamiento en los diferentes tratamientos realizados en ápices y microestacas de crisantemo variedad Anastasia en el sistema de inmersión VioVeLuz.

4.6 PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN

Se determinó mediante el número de frascos de la unidad experimental que contenían alguna presencia de hongos o bacterias. Con relación al total de frascos multiplicado por 100, de lo que se obtuvo un porcentaje de contaminación de 10,71% que pudo deberse al mal manejo del material en el momento de la siembra o por la adquisición de material contaminado.

4.7 COSTOS DE IMPLEMENTACIÓN

La implementación del sistema de inmersión temporal en la Florícola FLORISOL alcanzó el valor de \$2502,66 dólares como se puede apreciar en el Anexo 4. Con una

capacidad de 20 SIT los mismos que permiten obtener una cantidad de 50 plantas, por SIT, tomando en cuenta que este sistema permitió acortar tiempo de 3 semanas y dinero en la micropropagación de 0,02ctv por planta.

4.8 FRECUENCIAS DE INMERSIÓN

Al comparar los mejores resultados en las variables, porcentaje de sobrevivencia, tiempo de brotación, porcentaje de brotación, longitud de brotes y porcentaje de enraizamiento se obtuvo que el mejor tiempo de inmersión al que se adaptaron los explantes de crisantemo tanto microestacas como ápices de tallo fue el de 4 inmersiones/día ya que las variables se cumplieron en menor tiempo y con resultados notables a diferencia de los tratamientos con 2 y 6 inmersiones/día.

4.9 ANÁLISIS ECONÓMICO

Según la metodología de beneficio costo para el análisis económico se determino que el tratamiento con inmersión temporal tiene una mayor relación beneficio/costo que el sistema de micropropagación tradicional debido al menor costo que se obtuvo en la producción *invitro* dentro del laboratorio como se puede observar en el Cuadro 22.

CUADRO 22. Desglose del Análisis Económico producido en la Florícola FLORISOL

Análisis Económico							
	# plantas prod	precio venta	costos /planta/lab	costo/plantas /prod	Costo/plantas/año	Beneficio	Ganancia
Micro Trad	72000	0,50	0,08	0,35	25200	36000	10800
SIT	72000	0,50	0,06	0,33	23760	36000	12240

V. CONCLUSIONES

1. La mejor respuesta obtenida en el sistema de inmersión temporal VioVeLuz en la florícola FLORISOL – San José de Minas fue de 4 inmersiones/día en explantes apicales.
2. Con el Sistema de Inmersión Temporal, el porcentaje óptimo de sobrevivencia y el tiempo de brotación de los explantes fue de 94,76% y 11 días respectivamente, vs los 21 días del testigo.
3. Para logra obtener una longitud de 1,39 cm dentro del sistema de inmersión temporal fue necesario de 11 días, tiempo mínimo y suficiente comparado con el testigo que requirió de 21 días.
4. El porcentaje de contaminación en el Sistema de Inmersión Temporal fue de 10,71%, valor bajo, en comparación con el del testigo que fue del 50%.
5. En cuanto al análisis económico beneficio/costo se determinó que con el Sistema de Inmersión Temporal VioVeLuz se logró bajar costos de producción de 0,08 ctv por planta a 0,06ctv.
6. El porcentaje de enraizamiento en el Sistema de Inmersión Temporal fue de 55,48% a diferencia del testigo que fue de 10%.

7. El Sistema de Inmersión Temporal VioVeLuz permitió una producción masiva a corto tiempo, con índices de contaminación bajos, plantas fuertes y adaptables al medio externo.

VI. RECOMENTACIONES

- Implementar el Sistema de Inmersión Temporal en el área de laboratorio de la florícola FLORISOL - San José de Minas.
- Usar máximo 4 inmersiones/día para evitar desperdicio de recursos.
- Almacenar material vegetativo para banco de regeneración en medios gelificados o semisólidos.
- Dejar partes vegetativas como hojas o segmentos de hojas, ya que favorece el proceso de intercambio gaseoso y fotosíntesis.
- Realizar investigaciones complementarias para determinar dosis adecuadas de hormonas reguladoras de crecimiento.

VII. RESUMEN

El desarrollo de los sistemas de inmersión temporal han permitido el empleo de medio líquido sin efectos colaterales como la vitrificación, con costos menores y plantas estériles. Por lo que en esta investigación se construyó un prototipo para inmersión temporal con insumos nacionales e importados, con el objetivo de evaluar la respuesta de explantes tanto microestacas como ápices de tallo en Crisantemo (*Chrysanthemum* sp.) var Anastasia a diferentes frecuencias de inmersión, los mismos que fueron cultivados en un medio líquido compuesto por sales de M&S a una concentración del 100%; dicho medio se suplementó con 100mg L⁻¹ de sacarosa y 1ml L⁻¹ de una solución de vitaminas preparadas (Ácido Nicotínico, Glicerina, Tiamina) a un pH de 5,7 con frecuencias de inmersión de 4 minutos cada 12 horas (2 inmersiones/día), 4 minutos cada 6 horas (4 inmersiones/día) y por último de 4 minutos cada 4 horas (6 inmersiones/día), siendo la mejor la de 4 inmersiones/día en explantes apicales, debido a que estos tenían partes vegetativas como hojas o segmentos de hojas que favorecieron el intercambio gaseoso y fotosíntesis, logrando así cumplir con las variables establecidas en la investigación.

VIII. SUMARIO

The development of temporary immersion systems has allowed the use of liquid medium without side effects such as vitrification, with lower costs and sterile plants. So in this research we built a prototype for temporary immersion domestic and imported inputs, in order to assess the response of both micro-cuttings as explants stem apices of *Chrysanthemum* (*Chysantemum* sp.) Var Anastasia immersion at different frequencies, the they were grown in a liquid medium composed of salts of M & S at a concentration of 100%, this medium was supplemented with 100 mg L⁻¹ sucrose and 1 ml L⁻¹ of a vitamin solution prepared (nicotinic Acid, Glycerin, Thiamin) to pH 5.7 with immersion frequency of 4 minutes every 12 hours (2 dives / day), 4 minutes every 6 hours (4 dives / day) and finally to 4 minutes every 4 hours (6 dives / day) , being the best of 4 dives / day in apical explants, because these were vegetative parts as leaves or leaf segments that favored gas exchange and photosynthesis, thus complying with the variables set in the investigation.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann, D.; Bruschi, A.; Sonntag, K. & Sellner, M. 2003. Using the temporary immersion technique for *in vitro* culturing of renewable resources plants. Pp. 46-49 In: Agricultural techniques and technologies on the light agenda.
- Alatorre C. F. 2002. Estudio morfogénico e histológico del híbrido *Vanilla planifolia* x *Vanilla pompona* Schiede obtenido *in vitro*. Tesis. Bach. Agr. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México. 86 p.
- Alvard, D.F. y C. Teisson. 1993. Comparison of methods of liquid medium for banana micropropagation. *Plant Cell, Tiss and Org Cult.* 32: 55-56.
- Alvarenga, S. 2001. Manual: Laboratorio cultivo de tejidos I. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 62 p.
- Baldini, E. 1992. Arboricultura General. Mundi-Prensa . Madrid – España.375p
- Berthouly, M.; Dufour, M.; Alvard, D.; Carasco, C.; Alemanno, L.; Teisson, C. (1995). Coffe micropropagation in liquid medium using temporary immersion technique, ASIC, Kyoto, vol.2: 514 – 519C.
- Bidwell, R. 1993. Fisiología vegetal. 2 ed. México. AGT Editor S.A. 780 p.
- Cáceres. 2005. Cultivo de Tejidos, consultado el 05-09-2010 en: http://biblioteca.unet.edu.ve/db/alexandr/db/bcunet/edocs/TEUNET/2006/Pregrado/Agronomia/OrozcoS_YenyferS/CapituloII.pdf
- CIRAD (Centro Internacional de Investigación Agronómico para el desarrollo). 2001. Sistemas de Inmersión Temporal. Ventajas. Montpellier. Francia. Consultado el 21/06/2010 en: www.cirad.fr/produits/rita/es/internet.htm
- CORPEI, 2008, Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones, consultado el 01/06/10 en: www.corpei.org
- Damiano, C.; Gentile, A.; La Starza, S.R.; Frattarelli, A. & Monticelli, S. 2003. Automation in micropropagation through temporary immersion techniques. *Acta Horticulturae*, 616:359-364.
- Dole, J.M. and H.F. Wilkins. 1999. Floriculture. Principles and species. Ed. Prentice Hall. New Jersey. Pags. 613.

- Endress, R. 1994. Plant cell biotechnology. Springer-Verlag. Berlín, Alemania. 353p.
- Etienne, H. *et al.* 1997. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 33: 81-87
- Fides. 1990. Fides Mum manual for all year round chysanthemums. Ed. Fides Holland BV, De Lier.
- Flores, M; Abdelnour, A; Alvarenga, S. 2002. Cultivo de tejidos II: Manual de laboratorio. Escuela de biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 52 p.
- Flores, V. E. M. 1998. La planta: Estructura y función. 2ª ed. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 504 p.
- Gamborg, O.L. (1968) Plants Tissue culture Biotechnology. In his Milestones "in vitro" cellular and Developmental Biology – Plants Cambriolge. Pág.84-92.
- GRUPO OCEANO., 1999. Cultivo de Crisantemo
- Hurtado, D. V. y Merino, M.E.1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed. Trillas. México.232pág
- INFOAGRO. 2009. Cultivo de Crisantemo. Consultado el 2 de Julio del 2010 en: <http://www.infoagro.com>.
- Jiménez, E.; Pérez, J.; de Feria, R.; Barbón, R.; Capote, A.; Chávez, M.; Quiala, E. & Pérez, J., 1999. Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. Plant cell, Tissue and Organ Culture, 59:19-23.
- Kofranek, A. M.1992. Cut Crisanthemus. In: Larson, R. A (Ed) Introduction to Floriculture. 2. ed. San Diego: Academic Press, p. 3-42.
- Kuan, C; Ospina, I. 1990. Introducción a la técnica de cultivo de tejidos. Departamento Técnico Agropecuario. Instituto Nacional de Aprendizaje. San José, Costa Rica. 86 p.
- Linares *et al.* .2003. Cultivo de Tejidos en Crisantemo. España. 15p
- Lorenzo, J.C.; González, B.; Escalona, M.; Teisson, C.; Espinosa, P. & Borroto, C., 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. Plant cell, Tissue and Organ culture 54:197-200.

- Montero, W. 2001. Estudio morfogénico e histológico de *Echinacea purpurea in vitro*. Tesis para optar Bach. Agr. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 60 p.
- Murashige T.; Y Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473 – 497.
- Navarro, W; Perea, M. 1996. Técnicas in vitro para la producción y mejoramiento de plantas. 2 ed. Editorial de la Universidad Nacional (EUNA). Heredia, Costa Rica. 105 p.
- Orellano, A. 1997. Desarrollo de un sistema de cultivo in vitro para los explantes nodales de caoba (*Swietenia macrophylla. King*). Tesis. M.Sc. Programa de enseñanza para el desarrollo y la conservación. Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica.
- Palma, T. 1995. Manual de práctica de biotecnología de plantas. Departamento de Agronomía. Instituto Tecnológico de Costa Rica. San Carlos, Costa Rica.
- Palma, T; Montero, W. 2002. Curso de biotecnología orientada a la micropropagación de especies tropicales: curso impartido para profesores del Colegio Técnico Agrícola de Pital, San Carlos. San Carlos, Costa Rica. Editorial Tecnológica. 50 p.
- Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mateo-Sagasta, L. 3 ed. Artes Gráficas Palermo, SL. España. 326p.
- Roca, W; Mroginski, L. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 143-160 p.
- Teisson, C., D. Alvard, B. Berthouly, T. Cote, J. Escalant, H. Etienne y M. Lartaud. 1996. Simple apparatus to perform plant tissue culture by immersion. *Acta Hort.* 440:521-526.
- Ziv, M. 1995. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. *Acta Horticulturae*, 393:25-38.