

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA
Facultad de Ciencias Agrícolas

Escuela Académico Profesional de Agronomía

**Introducción al sistema de cultivo in vitro y micro propagación
de cinco ecotipos de orégano (*Origanum vulgare* L.) en
condiciones de laboratorio**

TESIS

Presentada por:

Bach. Elizabeth Chambe Chambilla

Para optar el Título Profesional de:

INGENIERO AGRÓNOMO

TACNA—PERÚ
2008

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA

FACULTAD DE CIENCIA AGRÍCOLAS

Escuela Académico Profesional de Agronomía

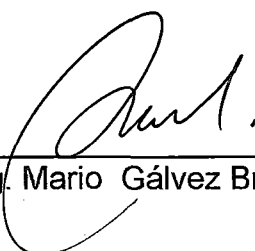
**Introducción al sistema de cultivo *in vitro* y micro propagación de
cinco ecotipos de orégano (*Origanum vulgare*, L.)**

en condiciones de laboratorio

TESIS SUSTENTADA Y APROBADA EL 31 DE OCTUBRE DEL 2008;

ESTANDO EL JURADO CALIFICADOR INTEGRADO POR:

PRESIDENTE:



Ing. Mario Gálvez Briceño

SECRETARIO:



Msc. Magno Robles Tello

VOCAL:



Ing. Rodi Alferez García

ASESOR:



Dr. René Chávez Alfaro

UNIVERSIDAD NACIONAL "JORGE BASADRE GROHMANN" DE TACNA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRICOLAS

TITULO PROFESIONAL

Temas: 02

Folio N° 436

El Decano de la Facultad, GERTIFICA:

Que el Bachiller: CHAMBE CHAMBILLA
ELIZABETH

ha sustentado el presente Trabajo de Tesis y ha sido APROBADO
por MAYORIA con el calificativo de REGULAR

Tacna, 2009 NOVIEMBRE


DECANO FCAG

DEDICATORIA

Dedicado a mis queridos padres por su constante apoyo, su gran amor y por la confianza que siempre me han tenido.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi profundo agradecimiento al Dr. Rene Chávez por su asesoramiento en mi tesis; así mismo deseo agradecer al Dr. Oscar Fernández por su apoyo y sus sabios consejos.

Expreso mi profundo agradecimiento a todos a mis profesores, quienes durante mis cinco años de estudio, compartieron sus grandes conocimientos y me brindaron gran apoyo.

Va mi inmenso agradecimiento y gratitud al Dr. Jorge Hoyos por su constante apoyo, estímulo y grandes consejos durante mis cinco años de estudio; por las facilidades que me brindó en el trabajo, para poder estudiar y asimismo ejecutar mi tesis.

Agradezco particularmente al Ing. Fernando Miñano, Ing. Bety Huarcaya; quienes con su experiencia me prestaron bastante colaboración y ayuda logística para la conducción de mi trabajos experimentales.

Mi reconocimiento y agradecimiento a los bachilleres Joel Flores y Fernando Rodríguez: por su gran ayuda y colaboración durante la ejecución y evaluación de mi respectivo trabajo de tesis.

Al ingeniero Avelino García Lévano por su apoyo constante y aliento para la culminación y presentación de mi presente trabajo de tesis.

Deseo expresar mi agradecimiento al Sr. Alfredo Agapito y demás agricultores, quienes generosamente y desinteresadamente me brindaron su apoyo al donar plantas de orégano de sus campos de cultivo.

Estas líneas finales las he reservado para agradecer a mi querida familia que son fuente constante de superación, inspiración y admiración; el eterno amor y agradecimiento a mi querido padre y a mi querida madre.

Asimismo quiero agradecer a mi esposo y a mi querido hijo por su presencia en mi vida.

A todas estas personas mencionadas extendiendo mi gran aprecio agradecimiento por su valiosa colaboración e invaluable ayuda.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación que lleva por título **“Introducción al sistema de cultivo *in vitro* y micro propagación de cinco ecotipos de orégano en condiciones de laboratorio”**, se llevó a cabo en los ambientes de laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias agrícolas de la universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna, ubicada en el Centro Experimental Agrícola III “los Pichones”

El objetivo del presente trabajo de investigación fue introducción al sistema *in vitro* y micro propagación de cinco ecotipos orégano bajo condiciones de invernadero.

El modelo utilizado fue diseño completamente al azar con arreglo factorial de 5 (Ecotipos) x 2 (Medios de cultivo: completo e incompleto) con 10 repeticiones, efectuándose para ello el análisis de varianza, se empleo la prueba de F de 0,05 y 0,01 de probabilidad. Para realizar las pruebas de comparaciones múltiples de medias entre los tratamientos en estudio se utilizó la prueba de significación de Duncan.

Los resultados señalan que para altura de planta a los 52 días el ecotipo 1 (Susapaya) presenta la mayor altura en ambos medios de cultivo con 4,15 cm (Medio completo) y 3,46 cm (Medio incompleto); en el segundo puesto el ecotipo 2 (Ilabaya) con 3,41 (Medio completo) y 3,09 cm (medio incompleto) respectivamente

En cuanto al número de brotes a los 52 días el ecotipo 2 (Ilabaya) tuvo el mayor promedio en ambos medios de cultivo con 6,89 y 5,28, asimismo para la variable número de hojas el ecotipo 2 (Ilabaya) y ecotipo 1 (Susapaya) alcanzaron el mayor promedio con 54,67 (Medio completo) y 40,00 (Medio incompleto) respectivamente.

En el vigor de la planta el ecotipo 3 (Ticaco) alcanzó el mayor con 7,00 (Medio completo) y el ecotipo 2 (Ilabaya) con 6,80 (Medio incompleto), asimismo en el grado de desarrollo el ecotipo 2 (Ilabaya) alcanzó el mayor promedio en ambos medios de cultivo con 5,80 (Medio completo) y 7,00 (Medio incompleto) respectivamente.

CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	01
II. REVISIÓN BIBLIOGRAFÍA	03
III. MATERIALES Y MÉTODOS	35
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
V. CONCLUSIONES	105
VI. RECOMENDACIONES	108
VII. BIBLIOGRAFÍA	109
VIII. ANEXOS	114

I.-INTRODUCCIÓN

En la actualidad nuestra agricultura requiere de técnicas nuevas para alcanzar un mayor desarrollo, pues el aumento de la población en forma desmesurada así lo requiere, por lo tanto, el hombre debe de empezar a tomar en cuenta todos los métodos que sean necesarios para optimizar sus cosechas: unos de los caminos es la utilización de material vegetativo sano; el cultivo del orégano es atacado por diferentes plagas (pulgones, cicadelidos o cigarritas y gusanos de tierra) y enfermedades (*Fusarium*, *Puccinia* sp), aunque no todas causen pérdidas significativas en rendimientos, las enfermedades constituyen factores limitantes en la producción, estas pueden ser causadas por hongos, bacterias virus e incluso por factores abióticos.

Existe la necesidad de buscar e incorporar nuevas características de resistencia y mayor adaptabilidad para aumentar el potencial biotecnológico y agrícola para la producción masal y comercial de orégano. Con las técnicas de la genética y la biotecnología, es posible producir, más rápidamente que antes, nuevas variedades superiores de plantas con características mejoradas y modernas como por ejemplo

mayor producción, tolerancia a condiciones adversas, resistencia a plagas y enfermedades.

El principal mercado de destino es Argentina, país al que se dirige el 42% de nuestras exportaciones, le sigue en importancia, Chile con el 31,3%, España 10,1% y Brasil 8,8 %.

El departamento de Tacna produce aproximadamente el 90% de la producción nacional de orégano, destacando el distrito de Camilaca, y luego los distritos de Ilabaya, Susapaya, Sitajara.

Por lo expuesto anteriormente se presentan como alternativas la aplicación de técnicas de cultivo in vitro de meristemas y micropropagación clonal. El cultivo de tejidos meristemáticos permite la obtención de plantas libres de patógenos. Esta técnica se ha aplicado a numerosas especies agronómicas de interés comercial, permitiendo introducir rápidamente al cultivo, selecciones y clones mejorados.

El objetivo del presente trabajo fue introducción al sistema in vitro y micro propagación de cinco ecotipos orégano bajo condiciones de invernadero.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen

Tiene su origen en la región mediterránea de Europa. Los principales países productores en América Latina son: México, Brasil, Chile y Costa Rica **(14)**

2.2. Clasificación botánica del orégano

Reino : Vegetal

División : Fanerógamas

Subdivisión : Angiospermas

Clase : Cotiledones

Subclase : Metaclamideas ó Simpétalas

Orden : Tubifloras

Suborden : Verveneas

Familia : Labiadas

Tribu : Estaquioideas

Género : *Origanum*

Especie : *Vulgare*

Nombre científico: *Origanum vulgare*, L.

Nombre común: Orégano

2.3. Características agronómicas

El orégano es una planta herbácea, rústica, perenne (La primera siembra dura aproximadamente 4 años), crece como una mata y su altura varían entre 35 y 45 cm.

Las hojas brotan de dos en dos en cada nudo, enfrentadas, son enteras, ovaladas, acabadas en punta, también se recubren de pelusilla por ambas caras y su longitud es de hasta 4 centímetros. Poseen pecíolo y aparecen cubiertas también de glándulas. **(21)**

Las flores se disponen formando espiguillas de hasta 3 centímetros; las flores son muy pequeñas (los pétalos no sobrepasan los 2 ó 3 milímetros de longitud), de color violeta rosado, rezuman unas gotitas de un líquido amarillento aromático. **(24)**

Florece en verano, de julio a octubre, y su fruto es un tetraquenio con cada parte ovoidea y lisa, es seco y globoso. **(22)**

2.4. Características edafoclimáticas

2.4.1 Altitud

El cultivo del orégano puede desarrollarse desde 50 a 3400 m.s.n.m. es decir casi desde el nivel del mar hasta la zona de las altas montañas. **(3)**

El mayor porcentaje de aceites esenciales se logra en zonas de temperatura frías.

El orégano es una especie con amplia tolerancia en altitudes y temperaturas. Sin embargo el mayor porcentaje de aceites esenciales se logran en zonas con temperaturas frías. **(22)**

2.4.2 Temperatura

El orégano es resistente al frío; sin embargo, las temperaturas menores a 5 grados centígrados afectan al cultivo de orégano retrasando el crecimiento y quemando los bordes de las hojas. **(21)**

2.4.3. Recursos hídricos

Los riegos en el cultivo de orégano inicialmente deben ser continuos, posteriormente dos veces por semana, después del primer mes se regará semanalmente. **(22)**

No exige mucho agua, quizás su principal problema sea el riego excesivo, ya que carece prácticamente de plagas, lo cual provoca hongos de pudrición en el cuello de la planta (a ras de suelo) y en raíces. **(23)**

2.4.4. Suelos

La planta del orégano crece y se desarrollo en diversidad de suelos, de secos a bastante húmedos. Se desarrolla muy bien en suelos: sueltos, arcillosos, francos, permeables y ricos en materia orgánica. **(20)**

La planta de orégano prefiere suelos franco-arenosos, que puede vivir y producir buen orégano hasta los 14 años. En cambio en suelos arcillosos se reduce su vida a 5 años. **(26)**

Tolera valores de pH alcalinos, no exagerados. Soporta las heladas y los veranos cálidos; la exposición del cultivo debe ser a pleno sol, ya que

no se da cosechas de buena calidad, ya sea para deshidratados o aceites esenciales bajo sombra. **(18)**

2.4.5. Inducción al macollamiento

Normalmente, a los 3 ó 4 meses de realizada la instalación de un campo de orégano, se procede al corte, siega de la producción. Este corte tiene como única finalidad, inducir a formar nuevas ramas primarias y secundarias. Generalmente, este producto, no es aprovechado comercialmente por su baja calidad y mínimo rendimiento. **(18)**

2.4.6. Multiplicación del orégano

El orégano se puede multiplicar por tres métodos: semilla, división de mata o esquejes. Los tres son muy fáciles de hacer.

1. División de mata

Es el método más práctico y sencillo para conseguir nuevos ejemplares simplemente consiste en separar la planta madre en trozos, llevando cada uno una porción de raíces con la tierra. **(23)**

2. Semillas

La siembra puede hacerse durante el otoño o la primavera, en bandejas o macetas (semilleros) o sembrar directamente en el terreno del huerto o jardín. Necesita buena luz y temperatura en torno a 20° C para germinar a los 10 días. En 2 ó 3 meses ya tienen las plantitas tamaño suficiente para ser trasplantadas al jardín o a macetas individuales (repicado). **(23)**

3. Esquejes

En primavera, se pueden cortar trozos de ramitas de unos 15 cm. de longitud para hacerlos enraizar en macetas o bandejas. Una vez agarrada, se trasplanta a macetas individuales. **(23)**

2.4.7. Recolección y conservación del orégano

Para secar o congelar, recoge las hojas preferiblemente en verano, cuando se cultiva comercialmente se hacen entre 1 y 3 cortes anuales entre final de primavera y principios de otoño.

La cosecha puede ser manual o mecánica, evitando realizarla a pleno sol o con rocío. Al cosechar se deja orear el material verde durante 12 o 48 horas en el campo, dependiendo de las condiciones antes de realizar el deshidratado. Otras operaciones son la limpieza, el despalillado y el zarandeado, todas ellas con la idea de liberar el producto de toda impureza que pudiera haber. **(24)**

2.4.8. Época de plantación

La más oportuna es entre diciembre y marzo (Época de lluvias), otra menos usada es de mayo a junio, pero hay un menor prendimiento por falta de agua. **(27)**

2.4.9 LABORES ESPECIALES

- **Corte apical**, al mes o mes y medio de instalar el cultivo, se corta la parte apical, sobre todo la inflorescencia para propiciar el macollamiento o ramificación basal. **(22)**

- **Aporques**, el primero se realiza a dos meses de la instalación, los demás en las cosechas con la fertilización. **(22)**

2.5 Plagas y enfermedades del cultivo de orégano

Existen diversas especies de insectos que causan daños en el orégano incidiendo en el área foliar (Pulgones, araña roja, polilla, gusanos cortadores).

- **Plagas**

2.5.1 Pulgones

Son las especies que absorben los jugos vitales (Savia) de la planta, y al mismo tiempo son transmisores de enfermedades. Proliferan rápidamente. Su ataque es generalmente en los meses de invierno (Mayo-julio). El control se realiza utilizando insecticidas a base de tabaco, ceniza y otros productos caseros, es muy exitoso. **(18)**

Una de las plagas más importantes del cultivo de orégano es el pulgón verde (*Macrosiphum salanifoli*). Normalmente se encuentra localizado en el envés e las hojas de orégano, de donde succiona la savia a través de sus estilotes ó lancetas.

2.5.2 Arañita roja (*Tetranychus urticae*)

Puede atacar a los órganos verdes de la planta. La succión de los contenidos celulares por parte del ácaro provoca la desecación de las mismas induciendo un aspecto como manchado a la cara superior de las hojas. La araña amarilla teje sobre los vegetales una fina tela la cual da origen a su nombre, el *Tetranychus tejedor*.(18)

- **Enfermedades**

Los patógenos que causan enfermedades al follaje son los que más preocupan al cultivo del orégano ya que de ahí se saca la cosecha. Condiciones de alta humedad ambiental favorecen el desarrollo de hongos y otros patógenos.(25)

Las enfermedades más comunes e importantes del orégano son: la roya y el oidio.

La roya produce pequeñas pústulas en las hojas y al intensificarse puede provocar defoliación de las plantas. El oidio produce una tela de polvillo blanco.(18)

2.5.3 Marchitez o Wilt

Los síntomas en las plantas adultas se producen un amarillamiento de las hojas primarias y secundarias, las que eventualmente se secan y se caen. Pudrición d raíces, marchitamiento y muerte de las plantas.

Agente causal: Hongo *Fusarium* sp.(25)

2.5.4 Podredumbre del tallo

Síntomas: se han encontrado que el tallo de las plantas de orégano es atacado por el hongo: *Phoma* sp., Es el que causa podredumbre y ocasiona lesiones de color bruno oscuras o negras.(23)

2.5.5 *Colletotrichum* spp.

Una de las más importantes enfermedades del orégano es debida a *Colletotrichum* spp causante de necrosis foliares que deprecian la calidad de la producción en verde. Los síntomas que se observan primero son unas pequeñas manchas pardas sobre las hojas y los tallos. Al extenderse progresivamente por la lámina foliar, las áreas necróticas coalescentes producen el total marchitamiento de las hojas, que caen finalmente.(22)

2.5.6 Manchas caulinares

Las manchas caulinares también aumentan su superficie cubriendo los nudos y entrenudos de los tallos afectados que terminan secándose. En ninguno de los órganos enfermos se observan fructificaciones del hongo. Dos han sido las especies de *Colletotrichum* aisladas del orégano: *Colletotrichum dematium* y *Colletotrichum gloeosporioides*, ambos fueron aislados y cultivados en PDA (Patata-Dextrosa-Agar) dando dos tipos diferentes de colonias.(23)

2.5.7 *Erysiphe galeopsidis*.

Se ha podido observar sobre cultivos de orégano un oidio causa lesiones fungosas por *Erysiphe galeopsidis* el cual provoca unas manchas blancas sobre los tallos y las hojas de las plantas enfermas.

Otros agentes causantes de enfermedades de origen fúngico en el orégano son *Botrytis cinerea* y una roya, *Puccinia rubsaameni*. Ambos parasitan al orégano y le causan podredumbres.(24)

2.5.8 Virus

Sobre cultivos de orégano ha sido detectado y aislado los virus causantes del mosaico de la alfalfa (AMV) y el del pepino (CMV). Estos virus son transmitidos por vectores como son los pulgones. Los síntomas observados sobre el orégano han sido manchas amarillas y blanquecinas sobre las hojas, una deformación y un marchitamiento de aquellas, retardando y después parando el crecimiento de la planta. **(24)**

2.6.COSECHA

La ciega o corte se hace cuando la planta está entre el 15 y 20% de floración; el primer corte para resiembra se hace a los 7 meses y el segundo para comercialización se hace a los 11 a 12 meses. **(18)**

2.7. RENDIMIENTO

Los rendimientos son variables, según la época y la precipitación pluvial de los meses de enero, febrero y marzo. La determinación de los rendimientos por unidad de superficie, se hace en dos estados del producto:

- En verde
- En seco

En verde, los estimados de producción son útiles para fines estadísticos y varían de 5,5 a 8,0 t/ha /corte.

En seco, el estimado del volumen de producción por hectárea, se realiza sobre el producto comercial, sobre hojas secas. Los rendimientos promedios por hectárea-corte, varía de 700 a 1000 kilogramos de hojas, de acuerdo a la época de cosecha y calidad del producto. **(18)**

Se puede estimar en 3 t/ha de planta fresca para el primer año y en 15 t/ha y más a partir del segundo año de instalado el cultivo. **(22)**

2.8. PRINCIPIOS GENERALES DEL CULTIVO IN VITRO:

El cultivo de tejidos vegetales consiste esencialmente en aislar un explante (Una porción de la planta) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido **(18)**.

El cultivo in vitro de tejidos se basa en un principio sobre teoría celular planteado por Shann y Schleiden (1838- 39), el cual la célula se describe como unidad biológica más pequeña a la que se puede considerar totípote; esto es, que una célula aislada es capaz de transformarse en una planta completa .

2.8.1 Totipotencia:

Potencialidad de las células o tejidos para formar todo tipo de células y/o regenerar una planta. **(14)**.

La totipotencialidad de la célula mantiene la posibilidad de expresar todo el potencial genético de la planta madre **(15)**

Se define cultivo in vitro como el cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles, de plantas y semillas, embriones, órganos, explantos, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores **(14)**.

El cultivo de tejidos in vitro comprende, en su acepción amplia, un heterogéneo grupo de técnicas, mediante las cuales un explante, se utiliza asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones controladas **(17)**.

2.8.2 Aplicaciones del cultivo in vitro de plantas

Hay muchos tipos diferentes de cultivo in vitro, de la misma forma que se encuentran materiales diferentes en la constitución de las plantas estos tipos de cultivo son:

- Cultivo de plantas intactas, se siembra la semilla in vitro.
- Cultivo de embriones; se cultiva el embrión aislado.
- Cultivo de órgano aislados; meristemos, ápices, raíces, anteras (explanto).
- Cultivo de callo; porción de tejido que se diferencia in vitro originando un callo.

- Cultivo de células aisladas; es el crecimiento de células individuales de un tejido o callo o cultivo en suspensión.
- Cultivo de protoplastos; se obtiene a partir de células **(14)**.

2.8.3. La micropropagación

La micropropagación clonal implica que cada una de las plántulas que se producen, pueda crecer y ser fenotípica y genotípicamente idéntica a la planta original de la que se deriva. **(17)**

Existen una serie de tejidos que pueden explantarse de diferentes especies como material de partida para la micropropagación.

La mayor parte de la micropropagación se lleva a cabo manteniendo tejidos organizados por multiplicación de meristemas y de yemas axilares.

Las etapas implicadas en la micropropagación de un genotipo vegetal dado son las siguientes:

- Selección y preparación de plantas parentales
- Elección de plantas típicas, vigorosas y sanas.
- Puede ser necesaria la detección/ eliminación de virus.
- Establecimiento de cultivos asépticos.
- Esterilización en superficie y transferencia de los explantes al cultivo.

2.8.4 Multiplicación

- Multiplicación de estructuras capaces de dar lugar a plantas.
- Los cultivos podrán reciclarse varias veces para obtener las tasas de crecimiento.
- Preparación para la transferencia.
- Formación de raíces.

2.8.5. Transferencia al medio natural.

- Lavado del agar de las raíces
- Mantenimiento inicial de humedad elevada.
- Consolidación gradual. **(9)**

2.8.6 Pasos para la micropropagación:

Murashige (1974) ha propuesto tres pasos fundamentales para micro propagar eficientemente.

a. Establecimiento del cultivo:

Una vez seleccionado el mejor explante, se requiere desinfectarlo superficialmente con soluciones como hipoclorito de sodio y de calcio, el peróxido de hidrógeno el cloro comercial y el alcohol a diferentes porcentajes.

b. Crecimiento del inóculo:

En estado de crecimiento, el explante se multiplica con la formación de callos o sin ella según las condiciones del cultivo.

c. Enraizamiento de los brotes y preparación para su trasplante.

El proceso de enraizamiento en los brotes propagados in vitro requiere generalmente del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. El medio de Murashige (1962) por ejemplo diluido

El estado fisiológico de la planta que da el explante influye en su capacidad morfogénica. Se sabe que mientras más joven y menos diferenciado este el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta in vitro (17)

2.8.7. Composición del medio de cultivo

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta: sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir in vitro o in vivo. También se deben añadir azúcares al medio. (14)

Los medios de cultivo empleados tienen diversas composiciones y se emplean como líquidos o geles. Los constituyentes básicos incluyen todos los elementos minerales esenciales para el desarrollo de la planta: Un azúcar, usualmente sacarosa o sucrosa, algunas veces una o más vitaminas como: Tiamina, ácido nicotínico y piridoxina, glicina y pantotenato de calcio. Y como agente gelificante se usa en algunos casos agar o unas mezclas de agar-gelrite.

Los medios mas usados para promover la órgano génesis son los de Murashige (1962). Con los macro y micronutrientes completos: en algunas ocasiones diluidos a la mitad, los requerimientos nutritivos para un crecimiento in vitro óptimo varían con la especie. **(15)**

a. Agua:

Se debe prestar gran atención a la calidad de agua, ya que representa el 95% del medio de cultivo, se debe utilizar agua destilada de buena calidad y estéril.

Si se utiliza vidrio para almacenar el agua debe ser de tipo pirex, o recipientes de polietileno, ya que el vidrio contienen trazas de plomo, sodio y arsénico.**(14)**

Azúcar:

El azúcar es esencial para el crecimiento y desarrollo in vitro, es un componente muy importante en un medio nutritivo, ya que el crecimiento tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis o incluso

en la oscuridad. Generalmente se usa una concentración de 1- 5 % de sacarosa, también se pueden utilizar glucosa y fructosa. **(9)**.

El azúcar blanca refinada, de uso doméstico presenta sucrosa con 100% de pureza y puede ser utilizado en la mayoría de cultivos como fuente principal de carbono.**(11)**

2.9 NUTRICIÓN MINERAL (SALES):

Después de los azúcares, los minerales constituyen el grupo mas importante de sustancias nutritivas en el cultivo in vitro, comprendiendo los macro y micronutrientes. **(14)**

2.9.1. Vitaminas.

El complejo vitamínico B, contienen compuestos esenciales para el metabolismo, y el crecimiento de las plantas: Una o varias de las siguientes vitaminas se utilizan algunas veces en el cultivo in vitro: Tiamina, inositol, ácido nicotínico, piridoxina, ácido pantoténico, ácido fólico, colina , riboflavina. **(17)**

A veces se utilizan altas concentraciones de ácido ascórbico, la vitamina C se utiliza en altas concentraciones elevadas como antioxidante. (17)

2.9.2 Agar:

Es una mezcla de polizácaridos, derivado de extractos de varias especies de algas rojas (Un polizácarido es uncarbohidrato que contiene un gran número de azúcares simples, tal como la glucosa, como agente gelificante el agar en el medio de cultivo es lo suficientemente fuerte para sostener el cultivo.

Cuando se utiliza el medio de cultivo líquido, el explante puede sumergirse y llegar a morir debido a la escasez de oxígeno, para evitar esto el medio de cultivo es gelificado con agar. (11)

2.10. REGULADORES DE CRECIMIENTO

Los reguladores de crecimiento vegetal han hecho posible el cultivo de tejidos a partir de células, protoplastos, callos, meristemos, embriones, raíces, segmentos de tallos, hojas, granos de polen, anteras y óvulos para la regeneración de plántulas, mejoramiento y eliminación de patógenos.

Por lo tanto los reguladores de crecimiento se han utilizado desde hace muchos años en el cultivo de tejidos vegetales con el fin de estimular o inhibir el crecimiento. **(15)**

Los reguladores de crecimiento son utilizados según la necesidad y el objetivo que se persigue dentro de la técnica de cultivo de tejido.

2.10.1 Auxinas

Ácido Indolacético (AIA) que es la principal auxina natural, al igual que el ácido indolbutírico (AIB); generalmente las auxinas son incorporadas a los medios de cultivo con la finalidad de estimular la iniciación de raíces y el crecimiento de callos. El principal efecto auxínico es la estimulación de alargamiento celular o su depresión según la concentración del producto. **(8)**

En la naturaleza las hormonas de este grupo están identificadas por ocasionar elongación de tallo e internudos, tropismo y dominancia apical, abscisión y enraizamiento **(15)**

Las auxinas se sintetizan principalmente en el ápice del tallo y ramas jóvenes, en las yemas y hojas jóvenes y, en general en los meristemo. **(6)**

El IBA y el ANA son ampliamente usados para el enraizamiento y, en interacción con las citoquininas, para la proliferación de brotes.

Pueden disolverse en etanol o en NAOH. **(11)**

2.10.2 Citoquininas:

Las citoquininas se sintetizan principalmente en la raíz y su presencia en las yemas del tallo. La adición de citoquininas es usualmente requerida para obtener crecimiento de callos, mientras que en la micropropagación, las citoquininas son usadas para promover las ramificaciones axilares. Promueven la división celular, y en concentraciones bajas pueden dar origen al crecimiento de raíces laterales. **(15)**

Las citoquininas mas comúnmente usadas son benzilaminopurina (BAP), isopentl adenina(2-ip) y furfurylamino purina (Kinetina). **(15)**

2.10.3 Giberelinas

Se sintetizan principalmente en hojas jóvenes y en las semillas. generalmente el ácido giberélico es empleado en la propagación in vitro con la finalidad de elongar los entrenudos, y el crecimiento de los meristemas o yemas in vitro **(15)**

El AG₃ es usado con frecuencia como un regulador de suplemento de las auxinas y citoquininas en medios de cultivo. El AG₃ es fácilmente soluble en agua fría. Se usa hasta 1000 mg/L. **(11)**.

2.11 MEDIOS DE CULTIVO PARA CULTIVO IN VITRO:

El crecimiento de las plántulas in vitro depende principalmente de los medios utilizados y por lo tanto de las soluciones preparadas. El medio base Murashige Skoog (1962) es ampliamente utilizado; las concentraciones de sales y vitaminas que contienen son las más adecuadas para un normal crecimiento de las plántulas en condiciones in vitro. En la actualidad los medios base se obtienen fácilmente en su forma comercial. **(19)**

2.11.1 El medio masal

Generalmente el medio de cultivo debe ser rico en elementos minerales; en particular, el potasio debe estar en un nivel alto para una mejor multiplicación vegetativa desde este punto de vista el medio Murashige 1962 es el mas convenientemente **(15)**

2.12 DESINFECCIÓN Y ASEPSIA:

2.12.1 Condiciones de asepsia en el laboratorio

En el laboratorio la asepsia es uno de los requerimientos más importante

El laboratorio de cultivos debe contar con 4 ambientes básicos: oficina, cuarto de preparación de medios y lavado, cuarto de transferencia y cuarto de cultivo. Los cuales requieren de mayor a menor grado de limpieza. **(19)**

2.12.2 Desinfección del material vegetal

Existen cuatro fuentes de infección: planta (su exterior o su interior), el medio nutritivo (insuficientemente esterilizado), el aire y el operador (trabajo poco preciso). La más importante se estas condiciones es la planta misma, el material vegetal debería ser bien esterilizado antes de su aislamiento. **(14)**

Los beneficios prácticos de esta tecnología son sustanciales si se considera el efecto de los virus sobre el rendimiento y la calidad de las cosechas El cultivo de meristemas es un método efectivo para la eliminación de infecciones virales y es el material preferido para la conservación de germoplasma. **(10)**

2.12.3 Esterilización química:

La esterilización química (erradicación de los micro-organismos por medio de sustancias químicas) se puede realizar con:

- **Alcohol:**

Se utiliza del 70% para material vegetal; y para instrumental y mesas se debe utilizar el de 96%. Cuando se esterilizan las plantas sumergirlas durante unos cuantos segundos.

- **Lejía:**

Generalmente se usa al 1%, añadiendo una parte de lejía y 9 partes de agua destilada.

La esterilización química puede hacerse más eficaz:

- Lavando el material vegetal en agua, cambiando el agua.
- Colocar el material vegetal con el alcohol al 70% por unos segundos, con lo que se elimina las burbujas de aire, permitiendo al líquido esterilizante un mejor contacto con el material vegetal.
- La adición de Tween (Agente mojante), disminuyen la tensión superficial permitiendo un mejor contacto.
- Realizar la esterilización con lejía, agitar durante la utilización de lejía.

- La elección del tiempo de esterilización y la concentración de la lejía se pueden hacer en función a las circunstancias particulares de cada caso **(14)**

2.13. Eliminación de virus y de patógenos:

En condiciones de crecimiento normales las plantas pueden ser susceptibles a una serie de agentes patógenos entre los que se incluyen: Bacterias, virus, viroides, hongos, nemátodos e insectos: los contaminantes superficiales pueden eliminarse fácilmente por esterilización superficial pero es importante que estos agentes estén ausentes de las plantas almacenadas antes de que estas pasen a cultivo. **(8)**

Las enfermedades víricas pueden encontrarse en casi todas las plantas cultivadas, dependiendo de la gravedad de la infección, provocar pérdidas graves, los virus de plantas propagadas vegetativamente, representan el mayor problema, puesto que las plantas derivadas de ellas mismas también estarán infectadas; en algunos casos, los virus también

pueden ser transmitidos a través de semillas. La técnica de cultivo de meristemas es un método importante y efectivo para la eliminación de virus. Los meristemas apicales son grupos de células localizadas al extremo del ápice de crecimiento, que normalmente se dividen activamente y de modo organizado. El meristemo apical de los brotes esterilizados superficialmente pueden escindir, estos ápices pueden cultivarse en un medio adecuado y en condiciones apropiadas para regenerar plantas completas. Cuando se lleva a cabo este procedimiento, se observa que los virus antes presentes en la planta madre pueden estar ausentes en la planta regenerada. (9)

2.14 Importancia del cultivo de tejidos y la micropropagación

El cultivo de tejidos vegetales y la micropropagación se han convertido en una herramienta de gran ayuda para la obtención de individuos libre de enfermedades y la multiplicación de plantas de interés económico para el hombre. Las principales ventajas de estas técnicas se pueden resumir en:

- Obtención de materiales libre de enfermedades y plagas.
- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo
- Esto permite introducir rápidamente al cultivo, selecciones y clones mejorados.
- Uniformidad de las plantas producidas (clones).
- Propagación de materiales en cualquier momento del año independientemente de las condiciones climáticas.
- Conservación del germoplasma. **(6)**

2.15 DEFINICIONES

2.15.1. Ecotipo

Población de organismos que presentan una adaptación, determinada genéticamente a un hábitat.

2.15.2 Especies

Grupo de organismos que se pueden reproducir entre ellos real o potencialmente y que conservan sus semejanzas dentro de sus propios límites naturales.

2.15.3. Variedad

Grupo de plantas similares dentro una especie, que difiere del resto por caracteres secundarios pero permanentes

2.15.4. Cultivar

Conjunto de plantas cultivadas que se distingue claramente de otras de su especie por cualquier carácter (morfológico, fisiológico, citológico y químico) y que reproducido sexual o asexualmente conserva sus caracteres distintivos, la designación completa de un cultivar, conforme a los criterios del código de nomenclatura de plantas cultivadas, incluye la especie y el nombre propio, precedido de la abreviación Cv. **(5)**

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología de la facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna, situado en el Centro Experimental Agrícola (CEA III) " Los Pichones " siendo sus coordenadas geográficas:

Latitud sur	: 17° 59' 38''
Latitud oeste	: 70° 14' 22''
Altitud	: 550 m.s.n.m.

3.2 MATERIAL EXPERIMENTAL

3.2.1. Material biológico:

El material experimental utilizado en la investigación, consistió en ecotipos seleccionados de las diferentes zonas alto andinas de Tacna, de los distritos de Susapaya, Ilabaya, Tarata, Ticaco y Borogueña

a. Ecotipo 1: Material proveniente de Susapaya.**Características:**

- Hojas: Verdes oscuras de regular tamaño
- Inflorescencia: Es de mayor longitud: flor blanca con pigmentación púrpura, los verticilios generalmente está conformada por más brácteas.
- Entrenudos: Largos 4 a 6, poco ramificado, tallo verde con líneas rojas cuando son adultos; alcanza una altura de 30 a 40 cm de promedio
- Macollaje: Es de forma rala está referido generalmente a la menor cantidad de ramas secundarias y tallos, que presenta esta forma de orégano.

b. Ecotipo 2: Material proveniente de Ilabaya.**Características:**

- Hojas: Grandes de color verde intenso pubescentes, el haz presenta una coloración verde más intensa que el envés, y es más pubescente
- Inflorescencia: Corta, de color blanco con pigmentación púrpura: los verticilios están conformados por menos 30 brácteas
- Entrenudos: cortos de 3 a 5 cm son bien ramificados, con bastante formación de tallos secundarios; tallo de color verde, altura de entre 25 a 30 cm.
- Macollaje: Es más denso, forma coposa

c. Ecotipo 3: Material proveniente de Ticaco

Características:

- Hojas: Grandes, de color verde oscuro, pubescente.
- Inflorescencia: Larga, de color blanco
- Entrenudos: Largo de 4 a 6 cm con regular formación de ramas secundarias; tallo color rojo intenso, alcanzando un promedio de 20 a 25 cm de altura en la zona.
- Macollaje: Matojoso o coposo cuyo desarrollo se caracteriza por la formación de muchas ramas y tallos.

d. Ecotipo: Material proveniente de Borogueña

Características:

- Hojas: Pequeñas de color verde claro de forma redondeadas
- Inflorescencia: Corta de color blanca con pigmentaciones púrpura
- Entrenudos: Largos de 4 a 8 cm, pocas ramas secundarias, la altura de planta en la zona es de 30 a 35 cm
- Macollaje: De forma ralo, muy pocas ramas secundarias
-

e. Ecotipo 5: Material proveniente de Tarata**Características:**

- Hojas: Pequeñas pubescentes, entrenudos cortos de 4 a 5 cm
- Inflorescencia: Bien corta
- Entrenudos: Tallo verde con pigmentación rojiza presenta una mayor cantidad de ramas secundarias; la altura de planta llega en la zona de 30 a 45 cm.
- Macollaje: Es mas denso en la forma coposa.

3.2.2. Material instrumental:

- **Equipos:**

- Cámara de flujo laminar.
- Autoclave.
- Destilador.
- Microondas
- Balanza analítica.
- Medidor de pH.
- Conductímetro.

- **Material de vidrio:**

- Tubos de ensayo de 18 mm, de diámetro.
- Breakers de: 1000 ml, 500 ml, 250 ml y 50 ml.
- Probetas de: 1000 ml, 500 ml, y 250 ml.
- Pipetas graduadas de: 10 ml, 5 ml, 1 ml y 0.1 ml
- Placas petri.
- Matraces 1000 ml.
- Frascos de vidrio

- **Instrumental:**

- Bisturís Nº 20, Nº 11 y Nº 10.
- Portabisturis de mango largo.
- Pinzas.
- Frascos de plástico.
- Papel aluminio.
- Algodón.
- Parafilm.
- Pipetas
- Guantes.
- Mascarillas.
- Gorros.
- Papel kraf
- Piola.
- Marcadores.
- Libreta de apuntes.

- **Desinfectantes y fungicidas.**

- Alcohol de 96° y de 70°.
- Hipoclorito de sodio.
- Benlate.
- Yodo.

- **Componentes del medio basal:**

Sales de Murashige y Skoog (MS); que viene preparado y listo para ser usado.

- Ácido giberélico.
- Ácido indolbutírico
- Sucrosa.
- Mioinositol.
- Agar.
- Tiamina.
- Glicina.
- Ácido nicotínico.
- Piridoxina
- Agua destilada.

Otros:

- Ácido ascórbico
- Ácido clorhídrico.
- Hidróxido de potasio.
- Agua destilada
- Papel filtro.

3.3. METODOLOGÍA**3.3.1 Factores en estudio:****Factor A:** Ecotipos de orégano

- a₁ : Ecotipo 1 proveniente de Susapaya
- a₂ : Ecotipo 2 proveniente de Ilabaya
- a₃ : Ecotipo 3 proveniente de Ticaco
- a₄ : Ecotipo 4 proveniente de Borogueña
- a₅ : Ecotipo 5 proveniente de Tarata

Factor B: Medios de cultivo

- b₁ : Medio completo
- b₂ : Medio incompleto

Cuadro 1: Combinación de los factores en estudio

Ecotipos	Medios de cultivo	Tratamientos
a ₁ : Ecotipo 1	b ₁ : Medio completo	T ₁
a ₂ : Ecotipo 2		T ₂
a ₃ : Ecotipo 3		T ₃
a ₄ : Ecotipo 4		T ₄
a ₅ : Ecotipo 5		T ₅
a ₁ : Ecotipo 1	b ₂ : Medio incompleto	T ₆
a ₂ : Ecotipo 2		T ₇
a ₃ : Ecotipo 3		T ₈
a ₄ : Ecotipo 4		T ₉
a ₅ : Ecotipo 5		T ₁₀

Fuente: Elaboración propia

3.3.2. Diseño experimental

El diseño utilizado fue el diseño completamente aleatorio (D.C.A:) con arreglo factorial 5 x 2 (Cinco ecotipos x dos medios de cultivo) con 10 repeticiones, teniendo un total de 100 unidades experimentales.

3.3.3. Análisis estadístico:

Se realizó utilizando la técnica del análisis de varianza, bajo el modelo completamente al azar, siendo el modelo aditivo lineal siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$$i = 1, \dots, a \quad j = 1, \dots, b \quad k = 1, \dots, n$$

donde:

Y_{ijk} = Es el valor de la variable respuesta observada con el i -ésimo nivel del factor A, j -ésimo del factor B, K -ésima repetición.

μ = Es el efecto de la media general

α_i = Es el efecto del i -ésimo nivel del factor A

β_j = Es el efecto del j -ésimo nivel del factor B

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Es el efecto de la interacción en el i -ésimo nivel del factor A, j -ésimo nivel del factor B

ε_{ijk} = Es el efecto del error experimental en el i -ésimo nivel del factor A, J -ésimo nivel del factor B, k -ésima repetición.

a = Es el número de los niveles del factor A

b = Es el número de los niveles del factor B

k = Es el número de repeticiones en el i -ésimo nivel del factor A, j -ésimo nivel del factor B

La prueba estadística correspondió a la prueba de F a un nivel de significación α 0,05 y 0,01, para realizar la comparación de medias en los diferentes tratamientos se realizó la prueba de significación de Duncan α 0,05 de probabilidad.

Cuadro 2: Modelo del ANVA

Fuentes de variación	Grados de libertad
Tratamientos	9
Ecotipos	4
Medios	1
Interacción	4
Error exp.	90
Total	99

Fuente: Elaboración propia

Para la tabulación de datos se transformó los datos antes de realizar el análisis de varianza, utilizando la siguiente fórmula (Steel y Torrie).

$$\sqrt{x+1}; \sqrt{x}$$

Donde x es el dato a transformar, esta transformación se debió a que algunas de las variables evaluadas tienen valores discontinuos o no paramétricos.

Se utilizó valores cualitativos expresados en escalas recomendados por el Centro Internacional de la Papa

3.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

3.5.1 Preparación de hormonas y soluciones:

a. Solución Concentrada de ácido giberélico AG₃ : 1000 ppm.

- Se peso 0,2 g de ácido giberélico y disolvió bien con algunas gotas de alcohol.
- Se añadió 200 ml de agua destilada, se guardo en un frasco debidamente rotulado, y se conservo a 0° C; (Un ml de la solución concentrada a 1000 ppm) con 1 mg de ácido giberélico.

b. Solución concentrada de ácido indolbutírico (AIB):

- Se aplicó el mismo procedimiento que el anterior.

c. Soluciones para ajustar el pH:

Solución para bajar el pH (Ácido clorhídrico 1N HCL)

- Se colocó en un vaso agua destilada 91,4 ml (Usando guantes y mascarillas para protegerse de los vapores ácidos).

- Se extrajo en una pipeta 8,6 ml de ácido clorhídrico concentrado de 36,5 a 38%.

d. Solución para elevar el pH hidróxido de potasio 1N (KOH):

- Se colocó en un vaso 50 ml de agua destilada
- Se añadió 5,6 g KOH, y se disolvió bien, completando a 10 ml con agua destilada.
- Luego se conservó en un frasco a temperatura ambiente. **(19)**
-

3.5.2 Preparación de los medios de cultivo

Se realizarón los siguientes medios:

- a. Medio completo**
- b. Medio incompleto**

La preparación de los medios se realizó siempre teniendo en cuenta las siguientes normas básicas, siendo estas las siguientes:

Para preparar las soluciones se disuelve uno a uno, todos los ingredientes, en los volúmenes de agua que se indicaran, siempre se

debe usar agua destilada estéril (autoclavada); los reactivos que pueden precipitarse no se mezclan, y si los ingredientes no se disuelven bien deben calentarse ligeramente, sin que la solución llegue a hervir ya que esto puede anular o precipitar ciertas vitaminas **(4)**

Primeramente se tienen listos los ingredientes y se empieza por medir 1000 ml de agua destilada en una probeta, luego agregamos a un beaker tan solo 500 ml, y agregamos un sobre de sales de murashige skoog (MS), ya que viene listo para un litro, se debe agitar constantemente con una bageta mientras se incorpora las sales, es necesario agitar bien para que las sales se disuelvan bien, seguidamente se agrega azúcar después se ajusta el pH que debe de ser de 5,5 a 5,6; para ajustar el pH se puede usar unas gotas de KOH y el HCL respectivamente según corresponda el caso. Finalmente se agrega la sustancia que dará consistencia al medio de cultivo (agar), sin detener la agitación hasta que la solución este totalmente uniforme.

Para que la solución este totalmente disuelta se lleva a autoclave o a cocina por unos minutos pero sin que el medio llegue a hervir, una vez que el medio esta totalmente disuelto, se dispensa en los tubos de ensayo, en una cantidad aproximada de 5ml por tubo y se colocan las

tapas de papel aluminio, procediendo luego a su esterilización en una autoclave a 121° C durante 15 minutos y a una presión de 151 b/p². Una vez que termine el autoclavado, se espera a que enfrié un poco, se sacan los tubos y se colocan en las gradillas, para esperar que el medio solidifique, en el momento que enfrían, se procede al marcado respectivo según el medio, tratamiento, número de tubo.

Estando listos para la labor de micropropagación o para ser almacenados en refrigeración a 5° C. ver anexos.

3.6 Variables de evaluación

Las siguientes son las evaluaciones que se realizarán durante el transcurso de este trabajo experimental.

1. Supervivencia:

Se contó el número de yemas o nudos meristemáticos que prendieron sin sufrir muerte. Se expresa en número de yemas sobrevivientes por tratamiento. Esta evaluación se realizó al inicio del experimento.

2. Contaminación bacteriano y fungosos:

Aquí se evaluó la presencia de hongos y bacterias, la contaminación puede darse por patógenos que están en el exterior de él tejido o en el interior de la planta (contaminación sistémica): esta evaluación se realizó al inicio del experimento, en la fase de introducción

3. Fenolización:

Se refiere a la oxidación del tejido, que puede necrosar el brote o la yema, esto puede acelerarse por el proceso de desinfección a que es sometido el tejido durante la fase de introducción; la evaluación fue al inicio del experimento.

4. Desarrollo radicular

- Número de raíces

Se procedió a contar el número de raíces que se formaron en cada plántula, seleccionándose 10 muestras por tratamiento.

- Vigor de las raíces

Se evaluó seleccionándose 10 muestras en forma aleatoria para cada uno de los tratamientos. Se utilizó la siguiente escala de evaluación recomendada por el Centro Internacional de la Papa:

1. Sin vigor.
3. Regularmente vigoroso.
5. Medianamente vigoroso.
7. Vigoroso.
9. Altamente vigoroso

7. Desarrollo del follaje:

- **Número de brotes:**

Se contó el número de tallo que se formaron por cada nudo sembrado, se tomaron 30 muestras en forma aleatoria por tratamientos.

9. Grado de desarrollo

Se evaluó seleccionándose 10 muestras en forma aleatoria para cada uno de los tratamientos en estudio. Utilizándose la siguiente escala de evaluación.

- 1 : Plántula normal: hojas tallo y raíz.
- 3 : Desarrollo normal del tallo sin raíz.
- 5 : Desarrollo normal del tallo, con callos sin raíz.
- 7 : Desarrollo normal del tallo con callo y con raíz.
- 9 : Yema sin desarrollo (estático)

3.4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.4.1 Introducción al sistema in vitro

3.4.1.1. Desinfección

El paso previo y obligado para obtener el material vegetal libre de microorganismos es la desinfección superficial del explante, para poder liberar de cualquier contaminante (Hongos, bacterias esporádicamente de

levaduras y actinomiceto). En general el proceso de desinfección puede resumirse en las siguientes etapas:

A.- Etapas:

I Etapa:

El material vegetal que fue propagado en speedlings, fue cortado y se espero que broten nuevamente una vez que alcanzaron entre 15 y 20 cm de altura; se procedió llevar a laboratorio, previo lavado con agua a chorro, para eliminar polvo y partículas extrañas.

II Etapa:

- En laboratorio se procedió a eliminar las hojas y se corto en segmentos de 4- 6 cm utilizando solo brotes apicales, con 2 a 3 yemas como máximo.
- Se disolvió Benlate a 1000 ppm (0,1 g en 100 ml de agua)
- Las yemas cortadas se sumergieron en la solución de Benlate por 30 minutos después se realizaron 4 lavados como mínimo con agua destilada, para eliminar todo el Benlate de los tejidos.

- Posteriormente las yemas se sumergieron en alcohol de 70° por 2 minutos, se enjuagó con agua destilada 4 veces.
- Las yemas fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio (lejía) al 20% (20 ml de lejía en 80 ml de agua destilada mas 2 gotas de tween, por un espacio de 8 minutos, se enjuagó 4 veces con agua destilada.

III Etapa:

En la cámara de flujo laminar se procedió a realizar lo siguiente:

- Se sumergieron las yemas en alcohol al 70% durante 2 minutos, se enjuagó con agua destilada.
- Se sumergió en lejía al 20% durante 2 minutos y se enjuagó con agua destilada estéril 4 veces como mínimo.
- Finalmente, las yemas se las dejo en inmersión en una solución de ácido ascórbico de 100 mg/l, para evitar la fenolización u oxidación de las yemas.
- Las yemas se quedaron es esta solución hasta la finalización del trabajo de introducción.

- Para realizar los enjuagues se utilizó agua destilada estéril; para los diferentes lavados y enjuagues se recomienda agitar las soluciones mientras dura el proceso de desinfección.

Se recomienda preparar las soluciones y el agua destilada en distintos frascos previo rotulado, para evitar confusiones y o contaminaciones, ya que el material fue recolectado en diferentes zonas de Tacna; Además son distintos ecotipos.

B. INTRODUCCIÓN

La labor de introducción se realizó en las mejores condiciones asépticas posibles, para evitar cualquier contaminación que deteriore todo el cultivo, es esencial desinfectar el piso con lejía; lavarse las manos y los brazos con abundante jabón y agua; para finalmente lavarse con alcohol yodado, antes de iniciar una sesión de trabajo, usar mandil limpio, mascarillas guantes, gorro; todo el instrumental a emplearse fue estéril (auto clavado).

Los pasos o procedimientos para la introducción son los siguientes:

- Se desinfectó con alcohol de 96% el área de trabajo y la cámara de flujo laminar.
- Este procedimiento se realizó ordenadamente por cada ecotipo con que se estaba trabajando.
- Se transfirió los segmentos o cortes de las yemas a una placa petrii estéril haciendo uso de pinzas y bisturí
- Se eliminó todos los tejidos muertos o dañados por la desinfección, solamente se dejó una yema (Meristemo) y una pequeña porción de tejido del nudo de 0,3 a 0,5 cm de longitud.
- Se inóculo cada yema meristemática en un tubo de ensayo con medio de introducción. Fue necesario asegurarse que cada nudo repose sobre la superficie del agar, con la yema hacia arriba.
- Se flameo la boca de los tubos y se los tapó con papel aluminio; sellándolas con papel parafilm, se las marco con la identificación del ecotipo, medio y fecha de introducción.
- Todos estos pasos se trabajaron siempre dentro de la cámara de flujo laminar al igual que cerca el mechero, flameando el instrumental después de cada corte o actividad realizada, del mismo modo se cambio constantemente de placas petri y bisturís

de acuerdo a los distintos ecotipos con los que se trabajo. Para finalmente colocar los tubos en el área de crecimiento o cultivo, que debió estar limpia y estéril.

La temperatura para el orégano fue de 18 y 20 ° C con una iluminación de 3 000 lux y con un fotoperíodo de 16 horas luz, originado cada nudo una nueva plántula in vitro.

C. SELECCIÓN:

Luego de aproximadamente los 52 a 60 días, cuando las yemas crecieron y al existir una plántula desarrollada, se procedió a la selección de los ecotipos que respondieron positivamente al medio de introducción y que lograron una plántula desarrollada, que pudieran tener un buen número de yemas para micropropagar, además se descartaron los clones contaminados, oxidados y o fenolizados.

D. Preparación del medio de cultivo para micropropagación:

El procedimiento para la preparación del medio de cultivo para la multiplicación es en forma semejante al medio de introducción, con la

única diferencia de que la concentración de AIB varia y que se agrega otras sustancias que el medio de introducción no tiene.

D. Multiplicación masal

Este paso fue para propagar masalmente los ecotipos seleccionados, los que debieron de tener la cantidad de yemas necesarias para la parte experimental.

Se transfirieron las plántulas de los tubos de ensayo del medio de introducción a una placa petri estéril y se cortaron esquejes con un solo nudo; cada esqueje se seleccionó en segmentos de tallos de 0,2 a 0,5 cm con una yema axilar.

Se colocó cada nudo en un tubo de ensayo y se siguió con el mismo procedimiento de introducción.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 3: Análisis de varianza de altura de planta 22 días de cinco ecotipos de orégano en dos medios de cultivo completo e incompleto in vitro.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular	
					0,05	0,01
Tratamientos	9	7,453	0,828	6,731	1,98	2,64**
Ecotipos	4	2,624	2,624	21,248	2,47	3,53**
Medios	1	2,682	0,670	5,429	3,90	6,88*
Interacción ExM	4	2,146	0,536	4,344	2,47	3,53**
Error	90	11,115	0,123			
Total	99	18,568				

CV: 18,976 %

Fuente: Elaboración propia

El cuadro 3, del análisis de varianza señala que se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos indicando que existen diferencias reales en sus promedios. Para el factor principal A ecotipos se halló alta significación estadística, los que nos indican que unos de los ecotipos utilizados alcanzó mayor promedio de altura.

Para el factor principal B medios de cultivo se encontró significación estadística significativa, por lo que se deduce que uno de los medios de cultivo causó mayor efecto en la altura de planta.

En cuanto al factor interacción ecotipos por medios de cultivo se encontró significación estadística alta, por lo tanto ambos factores actuaron dependientemente, es decir, que las diferencias entre los efectos simples del factor ecotipo para los dos niveles del factor medio de cultivo es altamente significativa y viceversa.

El coeficiente de variación de 18,976 % señala que es aceptable para las condiciones del experimento.

Cuadro 4: Análisis varianza de efectos simples para la interacción ecotipos por medio de cultivo (ExM) para la altura de planta a los 22 días.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	FC	F _{tabular}	
					0,05	0,01
Entre A en b ₁	1	4,234	4,234	34,423	3,94	6,90 **
Entre A en b ₂	1	2,792	2,792	22,629	3,94	6,90 **
Entre B en a ₁	4	0,220	0,055	0,447	2,46	3,51 ns
Entre B en a ₂	4	0,012	0,003	0,024	2,46	3,51 ns
Entre B en a ₃	4	0,648	0,162	1,317	2,46	3,51 ns
Entre B en a ₄	4	0,018	0,005	0,040	2,46	3,51 ns
Entre B en a ₅	4	0,002	0,0005	0,004	2,46	3,51 ns
Error	90	11,115	0,123			

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 4, de análisis de efectos simples de los factores principales indica que el factor principal A ecotipos mostró diferencias altamente significativas en los dos medios de cultivo completo e incompleto con respecto a la altura de planta a los 22 días, no encontrándose diferencias estadísticas entre factor principal B (Medios de cultivo) con los niveles del factor principal A (Ecotipos) por lo tanto los ecotipos obtuvieron promedios similares en altura de planta a los 22 días.

Los resultados del análisis de efectos simples señalan que los medios de cultivos son los que causan diferente efecto sobre la altura de planta.

Cuadro 5: Prueba de rango múltiple de Duncan en efecto simple de ecotipos de orégano en los medios completo e incompleto in vitro.. Evaluación de altura de planta a los 22 días.

Orden	Factor B Medio completo			Factor B Medio incompleto		
	Factor A ecotipos	Prom.	α 0,05	Factor A ecotipos	Prom.	α 0,05
1	Ilabaya	2,29	a	Ilabaya	2,24	a
2	Susapaya	2,00	a	Susapaya	2,10	a
3	Borogueña	1,66	b	Borogueña	1,80	b
4	Tarata	1,65	b	Ticaco	1,72	b
5	Ticaco	1,44	c	Tarata	1,63	b

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 5, de la prueba de significación de Duncan del efecto simple de los factores principales ecotipos en los medios de cultivo completo e incompleto, los resultados señalan que el ecotipo 2 (Ilabaya) presenta la mayor altura en ambos medios de cultivo con 2,29 y 2,24 mm respectivamente, y en segundo lugar el ecotipo 1 (Susapaya) con 2,00 y 2,0 mm respectivamente. En último lugar se encuentra el ecotipo 3 (Ticaco) con 1,44 y el ecotipo 5 (Tarata) 1,63 mm.

Cuadro 6: Análisis de varianza de altura de planta 32 días de cinco ecotipos de orégano en dos medios de cultivo completo e incompleto in vitro.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular	
					0,05	0,01
Tratamientos	9	11,953	1,328	6,176	1,98	2,64 **
Ecotipos	4	5,522	5,522	25,671	2,47	3,53**
Medios	1	2,695	0,674	3,132	3,90	6,88 ns
Interacción ExM	4	3,374	0,934	4,340	2,47	3,53 **
Error	90	19,361	0,215			
Total	99	31,314				

CV: 19,578 %

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 6, del análisis de varianza de altura de planta a los 32 días, señala que se encontraron diferencias estadísticas altas entre los tratamientos, es decir que al menos uno de los tratamientos alcanzó mayor altura. Para el factor principal A ecotipos se halló alta significación estadística, por lo tanto uno de los ecotipos empleados ocasionan diferente respuestas con los medios de cultivo empleados. Para el factor principal B medios de cultivo no se encontró significación estadística, por lo tanto tuvieron el mismo efecto sobre la altura de planta, por lo que indicamos que los ecotipos tuvieron diferente comportamiento.

En cuanto al factor interacción ecotipos por medio de cultivo se encontró significación estadística alta, por lo tanto ambos factores actuaron dependientemente es decir, que las diferencias entre los efectos simples del factor A ecotipo para los dos niveles del factor B medio de cultivo son altamente significativas y viceversa.

El coeficiente de variación de 19,578 % señala que es aceptable para el experimento.

Cuadro 7: Análisis varianza de efectos simples para la interacción ecotipos por medio de cultivo (ExM) para la altura de planta a los 32 días.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	FC	F _{tabular}	
					0,05	0,01
Entre A en b ₁	1	9,711	2,428	11,293	3,94	6,90 **
Entre A en b ₂	1	1,946	0,486	2,260	3,94	6,90 ns
Entre B en a ₁	4	2,178	2,178	10,130	2,46	3,51 **
Entre B en a ₂	4	0,013	0,013	0,060	2,46	3,51 ns
Entre B en a ₃	4	0,0005	0,0005	0,002	2,46	3,51 ns
Entre B en a ₄	4	0,002	0,002	0,009	2,46	3,51 ns
Entre B en a ₅	4	0,313	0,313	1,456	2,46	3,51 ns
Error	90	19,361	0,215			

Fuente: Elaboración propia

El cuadro 7, de análisis de varianza de efectos simples de los factores principales se observa que se encontraron diferencias altamente significativas entre el factor principal A ecotipos con el factor principal B el medio de cultivo completo por lo que deducimos que utilizando este medio completo los ecotipos alcanzan diferente respuesta en cuanto a la altura, asimismo entre el factor B medios de cultivo con el ecotipo proveniente de Susapaya se encontró diferencias altamente significativa sobre la altura de la planta a los 32 días, sobresaliendo con relación a los demás ecotipos en estudio.

Cuadro 8: Prueba de rango múltiple de Duncan en efecto simple de ecotipos de orégano en los medios completo e incompleto in vitro. Evaluación de altura de planta a los 32 días.

Orden	Factor B medio completo			Factor B medio incompleto		
	Factor A ecotipos	Prom.	α 0,05	Factor A ecotipos	Prom.	α 0,05
1	Susapaya	3,21	a	Susapaya	2,55	a
2	Ilabaya	2,59	b	Ilabaya	2,54	a
3	Ticaco	2,15	b	Tarata	2,28	a
4	Borogueña	2,06	c	Ticaco	2,16	a
5	Tarata	2,05	c	Borogueña	2,04	b

Fuente: Elaboración propia

Según el cuadro 8, de la prueba de Duncan del efecto simple de los factores principales ecotipos en los medios de cultivo completo e incompleto, los resultados señalan que el ecotipo 1 (Susapaya) presenta la mayor altura en ambos medios con 3,21 y 2,55 cm respectivamente y en segundo lugar el ecotipo 2 (Ilabaya) en ambos medios con 2,59 y 2,54. Los ecotipos 5 (Tarata) y 4 (Borogueña) alcanzaron la menor altura con 2,05 y 2,04 cm de altura respectivamente.

Cuadro 9: Análisis de varianza de altura de planta 52 días de cinco ecotipos de orégano en dos medios de cultivo completo e incompleto in vitro.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular	
					0,05	0,01
Tratamientos	9	22,863	2,540	12,57	1,98	2,64 **
Ecotipos	4	14,745	14,745	72,74	2,47	3,53**
Medios	1	2,846	0,711	3,51	3,90	6,88 ns
Interacción ExM	4	5,271	1,317	6,50	2,47	3,53 **
Error	90	18,243	0,203			
Total	99	41,106				

CV: 14,440%

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 9, del análisis de varianza señala que se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos es decir que existen diferencias reales en sus promedios. Para el factor principal A ecotipos se halló diferencias estadísticas significativas altas, los que nos indican que los ecotipos ocasionan diferentes respuestas a los medios de cultivo en cuanto a la altura.

Para el factor principal B medios de cultivo no se encontró significación estadística por lo tanto tuvieron los mismo efectos sobre la variable de estudio

En lo relacionado al factor interacción ecotipos por medio de cultivo se encontró significación estadística altamente significativa, por lo tanto ambos factores actuaron dependientemente es decir, que las diferencias entre los efectos simples del factor A ecotipo para los dos niveles del factor B medio de cultivo es altamente significativa y viceversa.

El coeficiente de variación de 14,440 % señala que es aceptable para las condiciones del ensayo.

Cuadro 10: Análisis varianza de efectos simples para la interacción ecotipos por medio de cultivo (ExM) para la altura de planta a los 52 días.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	FC	F _{tabular}	
					0,05	0,01
Entre A en b ₁	1	9,401	9,401	46,310	3,94	6,90 **
Entre A en b ₂	1	6290	6,290	30,985	3,94	6,90 **
Entre B en a ₁	4	1,741	0,435	2,143	2,46	3,51 ns
Entre B en a ₂	4	0,512	0,128	0,630	2,46	3,51 ns
Entre B en a ₃	4	3,613	0,903	4,448	2,46	3,51 **
Entre B en a ₄	4	1,568	0,392	1,931	2,46	3,51 ns
Entre B en a ₅	4	0,008	0,002	0,009	2,46	3,51 ns
Error	90	18,243	0,203			

Fuente: Elaboración propia

El análisis de efectos simples de los factores principales se observa que se encontraron diferencias altamente significativas entre el factor A ecotipos en los dos medios de cultivo por lo que deducimos que los medios de cultivo ocasionan efectos diferentes sobre los ecotipos y diferencias altamente significativas entre factor B medios de cultivo cuando se combina con el ecotipo proveniente de Ticaco con respecto a la altura de planta a los 52 días.

Cuadro 11: Prueba de rango múltiple de Duncan en efecto simple de ecotipos de orégano en los medios completo e incompleto in vitro. Evaluación de altura de planta (cm) a los 52 días.

Orden	Factor B Medio completo			Factor B Medio incompleto		
	Factor A ecotipos	Prom.	α 0,05	Factor A ecotipos	Prom.	α 0,05
1	Susapaya	4,15	a	Susapaya	3,46	a
2	Ilabaya	3,41	b	Ilabaya	3,09	a
3	Tarata	3,30	b	Borogueña	2,74	b
4	Ticaco	3,08	b	Ticaco	2,55	c
5	Borogueña	2,73	c	Tarata	2,52	c

Fuente: Elaboración propia

Según el cuadro 11, de la prueba de Duncan del efecto simple de los factores principales ecotipos en los medios de cultivo completo e incompleto. El ecotipo 1 (Susapaya) presenta la mayor altura en ambos medios de cultivo con 4,15 cm y 3,46 cm respectivamente; en el segundo puesto con 3,41 y 3,09 cm de altura el ecotipo 2 (Ilabaya), los ecotipos 4 (Borogueña) y 5 (Tarata) alcanzaron la menor altura con 2,73 y 2,52 cm respectivamente.

Cuadro 12: Análisis de varianza de número de brotes a los 22 días de cinco ecotipos de orégano en dos medios de cultivo completo e incompleto in vitro.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular	
					0,05	0,01
Tratamientos	9	1,62	0,18	2,95	1,98	2,64 **
Ecotipos	4	0,61	0,15	2,48	2,47	3,53*
Medios	1	0,54	0,54	8,87	3,90	6,88 **
Interacción ExM	4	0,47	0,12	1,94	2,47	3,53 ns
Error	90	5,50	0,06			
Total	99	7,12				

CV: 11,99%

transformación $\sqrt{x+1}$

Fuente: Elaboración propia

El cuadro 12, del análisis de varianza señala que se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos, es decir que existen diferencias reales en sus promedios. Para el factor principal A e ecotipos se encontró significación estadística, el cual explica que hay diferencias en el número de brotes, de la misma manera se encontró alta significación estadística en cuanto al factor principal B medios de cultivo por lo tanto causaron diferentes efectos sobre la variable de estudio.

En cuanto al factor interacción ecotipos por medio de cultivo no se encontró significación estadística, por lo tanto ambos factores actuaron independientemente, podemos inferir que la variabilidad debida a la interacción no es significativa, es decir, que la variación en los medios de cultivo no interfiere en el número de brotes de los ecotipos ni estas influyen en el efecto de un distinto medio de cultivo

El coeficiente de variación de 11,99 % señala que es aceptable para las condiciones del experimento.

Cuadro 13: Prueba de rango múltiple de Duncan en efecto simple de ecotipos de orégano en los medios completo e incompleto in vitro. Evaluación de número de brotes a los 22 días.

Orden	Factor B Medio completo			Factor B Medio incompleto		
	Factor A Ecotipo	Prom.	α 0,05	Factor A Ecotipos	Prom.	α 0,05
1	Borogueña	4,30	a	Borogueña	3,30	a
2	Ilabaya	4,11	a	Ilabaya	3,30	a
3	Ticaco	3,27	a b	Tarata	3,10	a
4	Susapaya	3,20	a b	Susapaya	3,00	a
5	Tarata	3,00	b	Ticaco	2,67	a

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 13, de la prueba de Duncan del efecto simple de los factores principales ecotipos en los medios de cultivo completo e incompleto señala que el ecotipo 4(Borogueña) presenta el mayor número de brotes a los 22 días en ambos medios con 4,30 y 3,30 respectivamente, y en segundo lugar el ecotipo 2 (Ilabaya) con 4,11 y, 3,30. los ecotipos que alcanzaron el menor número fueron ecotipo 5 (Tarata) y el ecotipo 3 (Ticaco) con 3,00 y 2,67 respectivamente.

Cuadro 14: Análisis de varianza de número de brotes a los 32 días de cinco ecotipos de orégano en dos medios de cultivo completo e incompleto in vitro.

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular	
					0,05	0,01
Tratamientos	9	2,50	0,28	3,29	1,98	2,64 **
Ecotipos	4	1,57	0,39	4,65	2,47	3,53**
Medios	1	0,18	0,18	2,19	3,90	6,88 ns
Interacción ExM	4	0,74	0,19	2,20	2,47	3,53 ns
Error	90	7,59	0,08			
Total	99	10,09				

CV: 13,59%

transformación $\sqrt{x+1}$

Fuente: Elaboración propia

El cuadro 14, del análisis de varianza señala que se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos es decir que existen diferencias reales en sus promedios. Para el factor principal A ecotipos se halló alta significación estadística, el cual explica que hay diferencias entre sus promedios. Para el factor B medios de cultivo no se encontró significación estadística por lo tanto tuvieron los mismos efectos sobre la variable de estudio.

En el mismo cuadro nos muestras que el factor interacción ecotipos por medios de cultivo no se encontró significación estadística, por lo tanto ambos factores tienen efectos independientes uno del otro sobre el número de brotes, podemos inferir que la variabilidad debida a la interacción no es significativa, es decir, que la variación en los medios de cultivo no interfiere en el número de brotes de los ecotipos ni estas influyen en el efecto de un distinto medio de cultivo.

El coeficiente de variación de 13,59 % señala que aceptable para las condiciones del ensayo.

Cuadro 15: Prueba de rango múltiple de Duncan en efecto simple de ecotipos de orégano en dos medios de cultivo in vitro completo e incompleto. Evaluación de número de brotes a los 32 días.

Orden	Factor B Medio completo			Factor B Medio incompleto		
	Factor Ecotipos	Prom.	α 0,05	Factor Ecotipos	Prom.	α 0,05
1	Borogueña	4,60	a	Susapaya	4,20	a
2	Ilabaya	4,44	a	Ilabaya	3,80	a
3	Susapaya	3,60	a	Borogueña	3,50	a
4	Tarata	3,20	b	Tarata	3,50	a
5	Ticaco	3,18	b	Ticaco	2,33	b

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 15, de la prueba de Duncan del efecto simple de los factores principales ecotipos en los medios de cultivo completo e incompleto señala que el ecotipo 4(Borogueña) obtuvo el mayor número de brotes a los 22 días con 4,60 y el ecotipo 1 (Susapaya) con 4,20 respectivamente, y en segundo lugar el ecotipo 2 (Ilabaya) con 4,44 y, 3,80 en ambos medios de cultivo. El ecotipos que alcanzo el menor número de brotes fue el ecotipo 3 (Ticaco) con 3,18 y 2,33 respectivamente.

Cuadro 16: Análisis de varianza de número de brotes a los 52 días de cinco ecotipos de orégano en dos medios de cultivo completo e incompleto in vitro

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular 0,05 0,01
Tratamientos	9	5,80	0,64	4,66	1,98 2,64 **
Ecotipos	4	4,20	1,05	7,59	2,47 3,53**
Medios	1	0,32	0,32	2,33	3,90 6,88 ns
Interacción ExM	4	1,28	0,32	2,31	2,47 3,53 ns
Error	90	12,46	0,14		
Total	99	18,26			

CV: 15,68%

Fuente: Elaboración propia

transformación: $\sqrt{x+1}$

El cuadro 16, del análisis de varianza para número de brotes a los 52 días señala que se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos por lo tanto existen diferencias reales en sus promedios. Para el factor principal A ecotipos se halló alta significación estadística el cual explica que hay diferencias en las respuestas de los ecotipos en el número de brotes. Para el factor principal B medios de cultivo no se encontró significación estadística por lo tanto tuvieron el mismo efecto sobre la variable de estudio.

En el mismo cuadro nos muestras que el factor interacción ecotipos por medio de cultivo no se encontró significación estadística, por lo tanto ambos factores tienen efectos independientes uno del otro sobre el número de brote, podemos inferir que la variabilidad debida a la interacción no es significativa, es decir, que la variación en los medios de cultivo no interfiere en el número de brotes de los ecotipos ni estas influyen en el efecto de un distinto medio de cultivo.

El coeficiente de variación de 15,68 % aceptable para las condiciones del ensayo.

Cuadro 17: Prueba de rango múltiple de Duncan en efecto simple de ecotipos de orégano en los medios de cultivo completo e incompleto in vitro. Evaluación de número de brotes a los 52 días.

Orden	Factor B Medio completo			Factor B Medio incompleto		
	Factor A Ecotipos	Prom.	α 0,05	Factor A Ecotipos	Prom.	α 0,05
1	Ilabaya	6,89	a	Ilabaya	5,28	a
2	Borogueña	6,60	a	Susapaya	5,00	a
3	Susapaya	4,80	b	Borogueña	4,60	b
4	Ticaco	4,45	b	Tarata	3,70	b
5	Tarata	3,30	b	Ticaco	3,67	b

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 17, de la prueba de Duncan del efecto simple de los factores principales ecotipos en los medios de cultivo completo e incompleto. El ecotipo 2 (Ilabaya) tuvo el mayor número de brotes a los 52 días en ambos medios con 6,89 y 5,28, y en segundo lugar el ecotipo 4 (Borogueña) con 6,60 y, ecotipo 1 (Susapaya) con 5,00. Los ecotipos que alcanzaron el menor número fueron ecotipo 5 (Tarata) con 3,30 y ecotipo 3 (Ticaco) con 3,67 respectivamente.

Cuadro 18: Análisis de varianza de número de hojas a los 22 días de cinco ecotipos de orégano en dos medios de cultivo completo e incompleto in vitro.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular 0,05 0,01
Tratamientos	9	44,14	4,90	7,39	1,98 2,64 **
Ecotipos	4	35,91	8,98	13,52	2,47 3,53**
Medios	1	3,96	3,96	5,97	3,90 6,88 *
Interacción ExM	4	4,27	1,07	1,61	2,47 3,53 ns
Error	90	59,76	0,66		
Total	99	103,90			

CV:20,01%

Fuente: Elaboración propia

transformación \sqrt{x}

El cuadro 18, del análisis de varianza señala que se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos por lo que existen diferencias reales en sus promedios. Para el factor principal A ecotipos se halló alta significación estadística por lo tanto existen diferencias entre los ecotipos en el número de brotes. Para el factor principal B medios de cultivo se encontró diferencias significativas por lo tanto causaron diferentes efectos sobre la variable de estudio.

En cuanto al factor interacción ecotipos por medio de cultivo no se encontró significación estadística, lo cual nos sugiere que ambos factores actúan independientemente. podemos inferir que la variabilidad debida a la interacción no es significativa, es decir, que la variación en los medios de cultivo no interfiere en el número de hojas de los ecotipos ni estas influyen en el efecto de un distinto medio de cultivo

El coeficiente de variación de 20,01 % señala que es aceptable para las condiciones del ensayo.

Cuadro 19: Prueba de rango múltiple de Duncan en efecto simple de ecotipos de orégano en dos medios de cultivo completo e incompleto in vitro. Evaluación de número de hojas a los 22 días.

Orden	Factor B Medio completo			Factor B Medio incompleto		
	Factor A Ecotipos	Prom.	α 0,05	Factor B Ecotipos	Prom.	α 0,05
1	Borogueña	27,40	a	Susapaya	21,20	a
2	Susapaya	23,30	a	Borogueña	17,60	b
3	Ilabaya	20,33	b	Ticaco	16,20	b
4	Ticaco	13,27	c	Ilabaya	14,00	b
5	Tarata	11,50	c	Tarata	10,70	c

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 19, de la prueba de Duncan del efecto simple de los de los factores principales ecotipos en los medios de cultivo completo e incompleto para el número de hojas el ecotipo 4 (Borogueña) presenta el mayor número de hojas a los 22 días con 27,40 y el ecotipo 1 (Susapaya) con 21,20 y en segundo lugar el ecotipo 1 (Susapaya) en el medio completo con 23,30, ecotipo 4 (Borogueña) con 17,60 en el medio incompleto. El ecotipo que alcanzó el menor número de hojas fue el ecotipo 5 (Tarata) en ambos medios con 11,50 y 10,70 respectivamente.

Cuadro 20: Análisis de varianza de número de hojas a los 32 días de cinco ecotipos de orégano en dos medios de cultivo completo e incompleto in vitro.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular	
					0.05	0.01
Tratamientos	9	53,24	5,92	6,42	1,98	2,64 **
Ecotipos	4	48,34	12,09	13,11	2,47	3,53**
Medios	1	0,23	0,23	0,25	3,90	6,88 ns
Interacción ExM	4	4,66	0,17	1,26	2,47	3,53 ns
Error	90	82,96	0,92			
Total	99	136,19				

CV: 15,68 %

transformación \sqrt{x}

Fuente: Elaboración propia

El cuadro 20, del análisis de varianza para el número de hojas a los 32 días señala que se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos por lo tanto existen diferencias reales en sus promedios. Para el factor principal A ecotipos se halló alta significación estadística el cual explica que hay diferencias en sus promedios de número de hojas. Para el factor principal B medios de cultivo no se encontró significación estadística por lo tanto causaron el mismo efecto sobre la variable de estudio.

En el mismo cuadro nos muestra que el factor interacción ecotipos por medio de cultivo no se encontró significación estadística, por lo tanto ambos factores tienen efectos independientes uno del otro sobre el número de hojas podemos inferir que la variabilidad debida a la interacción no es significativa, es decir, que la variación en los medios de cultivo no interfiere en el número de hojas de los ecotipos ni estas influyen en el efecto de un distinto medio de cultivo

El coeficiente de variación de 15,68 % señala que es aceptable para las condiciones del ensayo.

Cuadro 21: Prueba de rango múltiple de Duncan en efecto simple de ecotipos de orégano en dos medios de cultivo completo e incompleto in vitro. Evaluación de número de hojas a los 32 días.

Orden	Factor B Medio completo			Factor B Medio incompleto		
	Factor A Ecotipos	Prom.	α 0,05	Factor A Ecotipos	Prom.	α 0,05
1	Ilabaya	33,78	a	Susapaya	33,20	a
2	Borogueña	31,60	a	Ilabaya	27,80	a
3	Susapaya	28,20	a	Borogueña	27,40	a
4	Ticaco	17,36	b	Ticaco	19,78	b
5	Tarata	16,60	b	Tarata	14,90	b

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 21, de la prueba de Duncan del efecto simple de los factores principales ecotipos en los medios de cultivo completo e incompleto. El ecotipo 2 (Ilabaya) presenta el mayor número de brotes con 33,78 en el medio completo y el ecotipo 1 (Susapaya) con 33,20 en el medio incompleto, y en segundo lugar el ecotipo 4 (Borogueña) con 31,60 y, el ecotipo 2 (Ilabaya) con 27,80. El ecotipo que alcanzó el menor número de hojas fue ecotipo 5 (Tarata) en ambos medios con 16,60 y 14,90 respectivamente.

Cuadro 22: Análisis de varianza de número de hojas a los 52 días de cinco ecotipos de orégano en dos medios de cultivo completo e incompleto in vitro.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular 0,05 · 0,01
Tratamientos	9	71,35	7,93	5,82	1,98 2,64 **
Ecotipos	4	61,10	15,28	11,22	2,47 3,53**
Medios	1	1,37	1,37	1,01	3,90 6,88 ns
Interacción ExM	4	8,88	2,22	1,63	2,47 3,53 ns
Error	90	122,53	1,36		
Total	99	19			

CV: 20,51%

transformación \sqrt{x}

Fuente: Elaboración propia

El cuadro 22, del análisis de varianza para número de hojas a los 52 días señala que se encontraron diferencias significativas altas entre los tratamientos por lo tanto existen diferencias reales en sus promedios. Para el factor principal A ecotipos se halló alta significación estadística, el cual explica que hay diferencias entre los ecotipos. Para el factor B medios de cultivo no se encontró significación estadística por lo tanto tienen el mismo efecto sobre la variable de estudio.

En lo que respecta al factor interacción ecotipos por medio de cultivo no se encontró significación estadística, por lo tanto ambos factores actuaron independientemente.

El coeficiente de variación de 20,51 % señala que es aceptable para las condiciones del ensayo.

Cuadro 23: Prueba de rango múltiple de Duncan en efecto simple de ecotipos de orégano en dos medios completo e incompleto in vitro. Evaluación de número de hojas a los 52 días.

Orden	Factor B Medio completo			Factor B Medio incompleto		
	Factor A Ecotipos	Prom.	α 0,05	Factor A Ecotipos	Prom.	α 0,05
1	Ilabaya	54,67	a	Susapaya	40,00	a
2	Borogueña	36,00	b	Ilabaya	39,50	a
3	Ticaco	35,80	b	Borogueña	35,00	a
4	Susapaya	33,80	b	Ticaco	28,20	b
5	Tarata	21,80	c	Tarata	17,60	b

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 23, de la prueba de Duncan del efecto simple de los factores principales ecotipos en los medios de cultivo completo e

incompleto. El ecotipo 2 (Ilabaya) en el medio completo y ecotipo 1 (Susapaya) en el medio incompleto alcanzaron el mayor número de brotes con 54,67 y 40,00 respectivamente, y en segundo lugar el ecotipo 4 (Borogueña) en el medio completo con 36,00 y, el ecotipo 2 (Ilabaya) en el medio incompleto con 39,50. El ecotipo que alcanzó el menor número de hojas fue el ecotipo 5 (Tarata) con 21,80 y 17,60 en ambos medios de cultivo.

Cuadro 24: Análisis de varianza de vigor de follaje a los 22 días de cinco ecotipos de orégano en dos medios de cultivo completo e incompleto in vitro.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular 0,05 0,01
Tratamientos	9	3,88	0,43	4,15	1,98 2,64 **
Ecotipos	4	2,81	0,70	6,76	2,47 3,53**
Medios	1	0,12	0,12	1,20	3,90 6,88 ns
Interacción ExM	4	0,94	0,24	2,27	2,47 3,53 ns
Error	90	9,36	0,10		
Total	99	13,24			

CV: 13,93%

Fuente: Elaboración propia

transformación $\sqrt{x+1}$

El cuadro 24, del análisis de varianza para vigor el follaje a los 22 días señala que se encontraron diferencias altamente significativas entre

los tratamientos por lo tanto existen diferencias reales en sus promedios. Para el factor principal A ecotipos se halló alta significación estadística, el cual explica que hay diferencias entre los ecotipos, los que causan diferencias en sus promedios en el vigor del follaje. Para el factor principal B medios de cultivo no se encontró significación estadística existiendo diferencias reales en sus promedios.

En lo cuanto al factor interacción ecotipos por medio de cultivo no se encontró significación estadística, por lo tanto ambos factores actuaron independientemente.

El coeficiente de variación de 13,93 % señala que es aceptable para las condiciones del ensayo.

Cuadro 25: Prueba de rango múltiple de Duncan en efecto simple de ecotipos de orégano en los medios completo e incompleto in vitro. Evaluación de vigor de follaje a los 22 días

Orden	Factor B Medio completo			Factor B Medio incompleto		
	Factor A Ecotipos	Prom.	α 0,05	Factor A Ecotipos	Prom.	α 0,05
1	Susapaya	5,80	a	Ilabaya	5,40	a
2	Ilabaya	4,80	a	Tarata	4,80	a b
3	Tarata	3,60	b	Ticaco	4,40	a b
4	Ticaco	3,20	b	Susapaya	4,20	a b
5	Borogueña	2,80	b	Borogueña	3,80	b

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 25, de la prueba de Duncan del efecto simple de los ecotipos en los medios de cultivo completo e incompleto. El ecotipo 2 (Ilabaya) alcanzó el mayor vigor a los 22 días en ambos medios con 5,80 y 5,40 respectivamente, y en segundo lugar el ecotipo 1 (Susapaya) con 4,80 en el medio completo y, ecotipo 5 (Tarata) con 4,80 en el medio incompleto. El ecotipo que alcanzó el menor vigor fue el ecotipo 4 (Borogueña) con 2,80 y 3,80 en ambos medios de cultivo.

Minaño, F (2001) en su estudio realizado en cultivo in vitro de papa realizado en el laboratorio de biotecnología vegetal de la UNJBG obtuvo diferencias estadística en sus tratamientos que variaron en el vigor de la planta a los 21 días de 2,91 a 3,16 respectivamente inferiores con respecto a los ecotipos de orégano en el medio incompleto.

Cuadro 26: Análisis de varianza de vigor de follaje a los 32 días de cinco ecotipos de orégano en dos medios de cultivo completo e incompleto in vitro.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular 0,05 0,01
Tratamientos	9	3,16	0,35	2,40	1,98 2,64 *
Ecotipos	4	1,81	0,45	3,10	2,47 3,53 *
Medios	1	0,82	0,82	5,63	3,90 6,88 *
Interacción ExM	4	0,53	0,13	0,90	2,47 3,53 ns
Error	90	13,16	0,15		
Total	99	16,33			

CV: 14,97 %

transformación $\sqrt{x+1}$

Fuente: Elaboración propia

El cuadro 26, del análisis de varianza señala que se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos por lo tanto existen diferencias reales en sus promedios. Para el factor principal A

ecotipos se halló significación estadística. Para el factor principal B medios de cultivo se encontró alta significación estadística es decir tuvieron diferente efecto sobre la variable de estudio.

En lo que respecta al factor interacción ecotipos por medio de cultivo no se encontró significación estadística, por lo tanto ambos factores actuaron independientemente.

El coeficiente de variación de 14,97 % señala que fue aceptable para las condiciones del ensayo.

Cuadro 27: Prueba de rango múltiple de Duncan en efecto simple de ecotipos de orégano en los medios completo e incompleto in vitro. Evaluación de vigor de follaje a los 32 días.

Orden	Factor B Medio completo			Factor B Medio incompleto		
	Factor A Ecotipos	Prom.	α 0,05	Factor A Ecotipos	Prom.	α 0,05
1	Ilabaya	6,40	a	Ticaco	6,60	a
2	Susapaya	5,60	a	Ilabaya	6,20	a
3	Ticaco	4,00	b	Susapaya	6,00	a
4	Tarata	4,00	b	Tarata	5,40	a b
5	Borogueña	3,80	b	Borogueña	5,20	a b

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 27, de la prueba de Duncan del efecto simple de los factores principales ecotipos en los medios de cultivo completo e incompleto. El ecotipo 2 (Ilabaya) en el medio completo y el ecotipo 3 (Ticaco) en el medio completo alcanzaron el mayor vigor a los 32 días con 6,40 y 6,60 , y en segundo lugar el ecotipo 1 (Susapaya) en el medio completo con 5,60 y, ecotipo 2 (Ilabaya) en el medio incompleto con 6,20, el ecotipo que alcanzó el menor vigor fue el ecotipo 4 (Borogueña) en ambos medios con 3,80 y 5,20 respectivamente.

Cuadro 28: Análisis de varianza de vigor de follaje a los 52 días de cinco ecotipos de orégano en dos medios de cultivo completo e incompleto in vitro.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular	
					0,05	0,01
Tratamientos	9	3,13	0,25	3,00	1,98	2,64 **
Ecotipos	4	1,90	0,48	4,10	2,47	3,53**
Medios	1	0,89	0,89	7,70	3,90	6,88 **
Interacción ExM	4	0,34	0,08	0,73	2,47	3,53 ns
Error	90	10,44	0,12			
Total	99	13,58				

CV: 12,95%

transformación $\sqrt{x+1}$

Fuente: Elaboración propia

El cuadro 28, del análisis de varianza señala que se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos es decir que existen diferencias reales en sus promedios. Para el factor principal A ecotipos se halló alta significación estadísticas en sus promedios de número de hojas. Para el factor principal B medios de cultivo se encontró significación estadística alta por lo tanto causaron diferente efecto sobre la variable en estudio.

En el mismo cuadro nos muestra que el factor interacción ecotipos por medios de cultivo no se encontró significación estadística, por lo tanto

ambos factores tienen efectos independientes uno del otro sobre el vigor de la planta.

El coeficiente de variación de 12,95 % señala que es aceptable para las condiciones del ensayo.

Cuadro 29: Prueba de rango múltiple de Duncan en efecto simple de ecotipos de orégano en los medios completo e incompleto in vitro. Evaluación de vigor de follaje a los 52 días.

Orden	Factor B Medio completo			Factor B Medio incompleto		
	Factor A Ecotipos	Prom.	α 0,05	Factor A Ecotipos	Prom.	α 0,05
1	Ticaco	7,00	a	llabaya	6,80	a
2	llabaya	6,60	a	Susapaya	6,60	a
3	Borogueña	6,60	a	Tarata	5,60	a
4	Susapaya	6,00	a	Ticaco	5,40	a
5	Tarata	4,20	b	Borogueña	5,20	a b

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 29, de la prueba de Duncan del efecto simple de los factores principales ecotipos en los medios de cultivo completo e incompleto. Los ecotipo 3 (Ticaco) en el medio completo y ecotipo 2

(Ilabaya) en el medio incompleto con 7,00 y 6,80 de vigor respectivamente , y en segundo lugar el ecotipo 2 (Ilabaya) en el medio completo y, ecotipo 1 (Susapaya) en el medio incompleto 6,60. los ecotipos que alcanzaron el menor número vigor fueron el ecotipo 5 (Tarata) en el medio completo y el ecotipo 4 (Borogueña) 4,20 y 5,20 de promedio de vigor.

Vargas, G (1999) En su evaluación de vigor de la planta en un cultivo in vitro de duraznero obtuvo promedio de vigor de 5 inferiores a los obtenidos en la presente investigación.

Huacollo, M (1993) Sometió a estudio clones de camote bajo tratamientos de salinidad en cultivo in vitro evaluando el desarrollo general de las plántulas (parte área y radicular) obtuvo promedios de vigores que van de 0,80 a 3,20 respectivamente menores a los del presente estudio.

Al igual que en las evaluaciones de anteriores de vigor, hay un gran contraste en las respuestas de los ecotipos, así que se incrementaron los promedios que presentan plántulas vigorosas.

Cuadro 30: Análisis de varianza de grado de desarrollo a los 22 días de cinco ecotipos de orégano en dos medios de cultivo completo e incompleto in vitro.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular	
					0,05	0,01
Tratamientos	9	1,20	0,13	6,33	1,98	2,64 **
Ecotipos	4	0,45	0,11	5,28	2,47	3,53 **
Medios	1	0,50	0,50	23,51	3,90	6,88 **
Interacción ExM	4	1,26	0,06	2,08	2,47	3,53 ns
Error	90	1,90	0,02			
Total	99	3,10				

CV: 5,72 %

transformación $\sqrt{x+1}$

Fuente: Elaboración propia

El cuadro 30, del análisis de varianza para el grado de desarrollo a los 22 días señala que se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos por lo tanto existen diferencias reales en sus promedios. Para el factor principal A ecotipos se halló alta significación estadística es decir hay diferencias entre los ecotipos en el grado de desarrollo. Para el factor B medios de cultivo se encontró significación estadística altas por lo tanto causaron diferente efecto sobre la variable en estudio.

En el mismo cuadro nos muestra que el factor interacción ecotipos por medio de cultivo no se encontró significación estadística, por lo tanto ambos factores tienen efectos independientes uno del otro sobre el grado de desarrollo.

El coeficiente de variación de 5,72 % señala aceptable para las condiciones del ensayo.

Cuadro 31: Prueba de rango múltiple de Duncan en efecto simple de ecotipos de orégano en los medios de cultivo completo e incompleto in vitro. Evaluación de grado desarrollo a los 22 días.

Orden	Factor B Medio completo			Factor B Medio incompleto		
	Factor A Ecotipos	Prom.	α 0,05	Factor A Ecotipos	Prom.	α 0,05
1	Susapaya	5,20	a	Susapaya	6,40	a
2	Ilabaya	5,00	a	Ilabaya	6,00	a
3	Tarata	5,00	a	Borogueña	6,00	a
4	Borogueña	5,00	a	Tarata	5,20	b
5	Ticaco	5,00	a	Ticaco	5,20	b

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 31, de la prueba de Duncan del efecto simple de los de los factores principales ecotipos en los medios de cultivo completo e incompleto. El ecotipo 1 (Susapaya) alcanzó el mayor grado de desarrollo a los 22 días en ambos medios con 5,20 y 6,40 respectivamente, y en segundo lugar el ecotipo 2 (Ilabaya) en ambos medios con 5,00 y 6,00, el ecotipo que alcanzó el menor grado de desarrollo fue el ecotipo 3 (Ticaco) en ambos medios con 5,00 y 5,20 respectivamente.

Cuadro 32: Análisis de varianza de grado de desarrollo a los 32 días de cinco ecotipos de orégano en dos medios de cultivo completo e incompleto in vitro.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular	
					0,05	0,01
Tratamientos	9	1,99	0,22	5,87	1,98	2,64 **
Ecotipos	4	0,27	0,07	1,79	2,47	3,53 ns
Medios	1	1,45	1,45	38,64	3,90	6,88 **
Interacción ExM	4	0,26	0,07	1,76	2,47	3,53 ns
Error	90	3,39	0,04			
Total	99	5,38				

CV: 7,33%

transformación $\sqrt{x+1}$

Fuente: Elaboración propia

El cuadro 32, del análisis de varianza para el grado de desarrollo a los 32 días señala que se encontraron diferencias altamente significativas

entre los tratamientos por lo tanto existen diferencias reales en sus promedios. Para el factor principal A ecotipos no se halló significación estadística. Para el factor principal B medios de cultivo se encontró alta significación estadística por lo tanto tienen diferente efecto en el grado de el grado de desarrollo.

En el mismo cuadro nos muestra que el factor interacción ecotipos por medio de cultivo no se encontró significación estadística, por lo tanto ambos factores tienen efectos independientes uno del otro sobre grado de desarrollo.

El coeficiente de variación de 7,33 % señala que es aceptable para las condiciones del ensayo

Cuadro 33: Prueba de rango múltiple de Duncan en efecto simple de ecotipos de orégano en los medios de cultivo completo e incompleto in vitro. Evaluación de grado desarrollo a los 32 días.

Orden	Factor B Medio completo			Factor B Medio incompleto		
	Factor A Ecotipos	Prom.	α 0,05	Factor A Ecotipos	Prom.	α 0,05
1	Susapaya	5,60	a	Susapaya	7,00	a
2	llabaya	5,60	a	Borogueña	6,80	a
3	Tarata	5,40	ab	llabaya	6,80	a
4	Borogueña	5,40	ab	Ticaco	6,40	a b
5	Ticaco	5,20	ab	Tarata	6,00	b

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 33, de la prueba de Duncan del efecto simple de los de los factores principales ecotipos en los medios de cultivo completo e incompleto. El ecotipo 1 (Susapaya) alcanzó el mayor grado desarrollo a los 32 días en ambos medios con 5,60 y 7,00 respectivamente, y en segundo lugar el ecotipo 2 (llabaya) en el medio completo con 5,60 y, ecotipo 4 (Borogueña) en el medio incompleto con 6,80. Los ecotipos que alcanzaron el menor número fueron ecotipo 3 (Ticaco) en el medio completo y, el ecotipo 5 (Tarata) en el medio incompleto con 5,20 y 6,00 respectivamente.

Cuadro 34: Análisis de varianza de grado de desarrollo a los 52 días de cinco ecotipos de orégano en dos medios de cultivo completo e incompleto in vitro.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular	
					0,05	0,01
Tratamientos	9	2,21	0,25	8,67	1,98	2,64 **
Ecotipos	4	0,20	0,05	1,77	2,47	3,53 ns
Medios	1	1,98	1,98	69,82	3,90	6,88 **
Interacción ExM	4	0,03	0,01	0,27	2,47	3,53 ns
Error	90	2,56	0,03			
Total	99	4,90				

CV: 6,25%

transformación $\sqrt{x+1}$

Fuente: Elaboración propia

El cuadro 34, del análisis de varianza para el grado de desarrollo a los 52 días señala que se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos por lo tanto existen diferencias reales en sus promedios. Para el factor principal A ecotipos no se encontró diferencias estadísticas por lo que indicamos que tienen promedios similares. Para el factor principal A medios de cultivo se encontró significación estadística alta, el cual explica que hay diferencias entre los medios en el grado de desarrollo.

En cuanto al factor interacción ecotipos por medio de cultivo no se encontró significación estadística, por lo tanto ambos factores actuaron independientemente.

El coeficiente de variación de 6,25 % señala que es aceptable para las condiciones del ensayo.

Cuadro 35: Prueba de rango múltiple en efecto simple de ecotipos de orégano en los medios de cultivo completo e incompleto in vitro. Evaluación de grado desarrollo a los 52 días.

Orden	Factor B Medio completo			Factor B Medio incompleto		
	Factor A Ecotipos	Prom.	α 0,05	Factor A Ecotipos	Prom.	α 0,05
1	Ilabaya	5,80	a b	Ilabaya	7,00	a
2	Tarata	5,60	b	Susapaya	7,00	a
3	Ticaco	5,60	b	Borogueña	6,80	a
4	Borogueña	5,60	b	Ticaco	6,60	a b
5	Susapaya	5,60	b	Tarata	6,40	a b

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 35, de la prueba de Duncan del efecto simple de los factores principales ecotipos en los medios de cultivo completo e

incompleto. El ecotipo 2 (Ilabaya) alcanzó el mayor grado desarrollo a los 52 días en ambos medios de cultivo con 5,80 y 7,00 respectivamente, y en segundo lugar el ecotipo 5 (Tarata) con 5,60 en el medio completo y, ecotipo 1 (Susapaya) en el medio incompleto con 7,00. el ecotipo que alcanzó el menor grado de desarrollo fue ecotipo 1 (Susapaya) con 5,60 en el medio completo y el ecotipo 5 (Tarata) con 6,40 respectivamente.

V. CONCLUSIONES

1. Para la altura de planta en los medios de cultivo completo e incompleto el ecotipo 1 (Susapaya) presenta la mayor altura en ambos medios de cultivo 3,21 y 2,55 cm a los 32 días de evaluación, asimismo a los 52 días de evaluación el ecotipo 1 (Susapaya) presenta la mayor altura en ambos medios de cultivo con 4,15 cm y 3,46 cm; en el segundo puesto con 3,41 y 3,09 cm de altura el ecotipo 2 (Ilabaya) en ambos medios de cultivo.
2. En cuanto a la variable número de brotes en los medios de cultivo completo e incompleto el ecotipo 4(Borogueña) alcanzó mayor promedio de número de brotes a los 32 días con 4,60 (Medio completo) y el ecotipo 1 (Susapaya) con 4,20 (Medio incompleto) respectivamente, y en segundo lugar el ecotipo 2 (Ilabaya) con 4,44 y, 3,80 en ambos medios de cultivo, a los 52 días de evaluación el ecotipo 2 (Ilabaya) tuvo el mayor número de brotes a los 52 días en ambos medios con 6,89 y 5,28.
3. En lo que respecta al número de hojas el ecotipo 2 (Ilabaya) presenta el mayor número de brotes con 33,78 (Medio completo) y

el ecotipo 1 (Susapaya) con 33,20 (Medio incompleto) , y en segundo lugar el ecotipo 4 (Ticaco b) con 31,60 (Medio completo) y, el ecotipo 2 (Ilabaya) con 27,80 (Medio incompleto) a los 22 días de evaluación. En la última evaluación a los 52 días el ecotipo 2 (Ilabaya) y ecotipo 1 (Susapaya) alcanzaron el mayor número de brotes con 54,67 (Medio completo) y 40,00 (Medio incompleto) respectivamente, y en segundo lugar el ecotipo 4 (Borogueña) con 36,00 (Medio completo) y, el ecotipo 2 (Ilabaya) con 39,50 (Medio incompleto).

4. En el vigor de la planta el ecotipo 2 (Ilabaya) y el ecotipo 3 (Ticaco) alcanzaron el mayor vigor a los 32 días con 6,40 (Medio completo) y 6,60 (Medio incompleto) respectivamente, y en segundo lugar el ecotipo 1 (Susapaya) con 5,60 (Medio completo) y, ecotipo 2 (Ilabaya) con 6,20 (Medio incompleto). Los ecotipos que alcanzaron el mayor vigor a los 52 días fueron los ecotipos 3 (Ticaco) con 7,00 (Medio completo) y el ecotipo 2 (Ilabaya) en el medio incompleto con 6,80 y en segundo lugar el ecotipo 2 (Ilabaya) con 6,60 (Medio completo) y el ecotipo 1 (Susapaya) con un promedio de 6,60 (Medio incompleto)

5. En cuanto al grado desarrollo el ecotipo que alcanzó el mayor promedio fue el ecotipo (Susapaya) a los 32 días de evaluación en ambos medios de cultivo con 5,60 y 7,00 respectivamente, y en segundo lugar el ecotipo 2 (Ilabaya) con 5,60 (Medio completo) y, ecotipo 4 (Borogueña) con 6,80 (Medio incompleto), a los 52 días de evaluación el ecotipo 2 (Ilabaya) alcanzó el mayor grado desarrollo a los 52 días en ambos medios de cultivo con 5,80 (Medio completo) y 7,00 (Medio incompleto) respectivamente, y en segundo lugar el ecotipo 5 (Tarata) con 5,60 (Medio completo) y, ecotipo 1 (Susapaya) 7,00 (Medio incompleto).

VI. RECOMENDACIONES

1. Utilizar el ecotipo Ilabaya en ambos medios de cultivo, ya que con este ecotipo se lograron el mayor grado de desarrollo, así mismo con el ecotipo Susapaya que también logró un grado de desarrollo superior a los demás
2. También sería de mucha utilidad realizar diferentes trabajos de investigación utilizando ambos medios de cultivo con ecotipos de otras zonas alto andinas.
3. Tanto para el agricultor como para futuros trabajos de investigación, en campos experimentales seleccionar ecotipos de mayor desarrollo para su introducción al sistema in vitro.
4. Conservar el material experimental seleccionado en la presente investigación en el banco de germoplasma del laboratorio de tejidos de la UNJBG, por ser el orégano un cultivo de mucha importancia en la región Tacna.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. **ALLARD R.W. 1980** Principios de la mejora genética de plantas IV Edición. Ediciones Omega S.A. 325 pp.
2. **BARREYRO R., RINGUELET. J. 2003** Fertilización nitrogenada y rendimiento en Orégano(*Origanum x applii*). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales Universidad Nacional de La Plata, U.N.L.P. La Plata, Argentina 15 pp.
3. **CALZADA. J. 1970** Métodos estadísticos para la Investigación. Edit. Jurídica S.A. 3ª edición Lima Perú 457 pp.
4. **CIAT. 1980** Centro Internacional de Agricultura Tropical. El Cultivo de Meristemas de yuca. Cali Colombia 40 pp.
5. **DICCIONARIO DE CIENCIAS HORTÍCOLAS. 1999** Sociedad española de ciencias hortícolas. Ediciones mundi prensa 605 pp.

- 6. GARIBARAY M. 1993** Biotecnología alimentaria. Editorial Limusa
México 350 pp.
- 7. HUACOLLO, M. 1994** Respuesta in Vitro de Clones Elite de papa
(*Solanum tuberosum* L) y Camote (*Ipomoea batatas*
L.) Tolerancia a Salinidad. Trabajo de Tesis para
Ingeniero. Universidad Nacional Jorge Basadre
Grohmann de Tacna, Facultad de Ciencias Agrícolas
120 pp.
- 8. HURTADO M. 1988** Cultivos de tejidos vegetales. Edición trillas
México 256 pp.
- 9. LINDSEY, K Y JONES M. 1992.** Biotecnología Vegetal agrícola.
España. 273 pp.
- 10. KRIKORIAN, A. 1991** Propagación clonal in vitro en: Cultivo de
tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones
Roca, W. Y. Mringinski, L. ed. CIAT Cali Colombia
970 pp.

11. **MEJIA. R 1994.** Propagación comercial 312 Especies de Plantas por Cultivo In Vitro. La Molina Lima Perú 1994. 364 pp.

12. **MONASTERIOS G. 1999** Evaluación del Potencial de Micropropagación masal de variedades Mejoradas de Papa (*Solanum tuberosum* L.) libre de patógenos. trabajo de Tesis para Ingeniero. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna, Facultad de Ciencias Agrícolas. 122 pp.

13. **MURASHIGE, T. IR SKOOG, F. 1962** A revised médium for rapid greowth and bioassays with tobacco tissue culttures. *Physiol. Plant* 497 pp.

14. **PIERIK, M. 1990.** In Vitro Culture of Higher plant. España. 326 pp.

15. **PEÑA R. 2002** Biotecnología, Clonación e Ingeniería Genética. Principios y Aplicaciones al alcance de todos. Perú 2002. 300 pp.

16. **ROJAS. G 1993** Fisiología Vegetal Aplicada. México. 273 pp.

- 17. ROCA. M. Y MROGINSKI, A. 1991** Cultivo de tejidos en la agricultura Fundamentos y aplicaciones. Colombia. 968 pp.
- 18. SIURA, S. UGÁS R. Y H CARAZAS 2006.** Cultivo de orégano. Programa de Horticultura Universidad Nacional Agraria La Molina 5 pp
- 19. TOLEDO. J, ESPINOZA, N Y GOLMIRZAIE, A. 1998** Cultivo de Tejidos Manejo de Plántulas In Vitro en la Producción de Semilla de Papa. Manual de Capacitación. CIP Lima Perú. 16 pp.
- 20. TORROBA M. DEL C.; BRAVO S. L.; AGUILERA L. G. Y PACCAPELO H. 2005.** Establecimiento y regeneración in vitro de plantas de *Origanum x majoricum* Cambess (orégano). VI Simposio de Biotecnología REDBIO Argentina 2005, I Congreso Internacional de Biotecnología - Grupo Bio, I Encuentro Trinacional REDBIO Chile/Argentina/Uruguay. p 159 -160

21. VALERIANI V. R (2006) Orégano: hierba aromática de promisorio futuro en la agroexportación peruana. Oficina de General de Planificación Agraria. Ministerio de agricultura. 10 pp.

22. VARGAS, M (1999) Micropropagación in Vitro de Duraznero (*Prunus persica*) CV. OKINAWA 86 pp.

ANEXOS

Anexo 1:

Composición química del agar:

constituyentes	Bacto agar	Agar noble	Agar purificado
Ceniza	4,5%	2,6%	1,75%
Calcio	0,13%	0,25%	0,27%
Bario	0,01%	0,01%	0,01%
Silica	0,19%	0,26%	0,09%
Cloro	0,43%	0,18%	0,13%
Sulfato	2,54%	1,90%	1,32%
Nitrógeno	0,17%	0,10%	0,14%
Hierro	11,00 mg/L	11,00 mg/L	11,00 mg/L
Magnesio	285,00 mg/L	260,00 mg/L	695,00 mg/L
Cobre	5,00 mg/L	7,50 mg/L	20,00 mg/L

Fuente: Elaboración propia

Anexo 2:

Composición del MS

Constituyentes	Concentraciones (mg/l)	
	Completo	Incompleto
Sales mayores		
NH ₄ NO ₃	1650	825
KNO ₃	1900	950
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	220
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185
KH ₂ PO ₄	170	85
Sub total	4530	2265
Sales menores		
H ₃ BO ₃	6,2	3,10
MnSO ₄ .H ₂ O	16,8	8,40
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	4,30
KI	0,83	0,42
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,12
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,002
Hierro	32,73	16,36
Na ₂ EDTA	37,30	18,65
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80	13,90
Mg/l	4627,83	2313,91

Fuente. (R. Mejía 1994)

Anexo 3:

Componentes orgánicos

Componentes orgánicos	mg/l
Tiamina	0,1
Mioinositol	100,0
Glicina	2,0
AIA	1,0
Kinetina	0,004
Ac. nicotínico	0,5
Piridoxina	0,5
Agar	3,0 g/l
Azúcar	15,0 g/l

Fuente: Elaboración propia

Anexo 4:

Medio para orégano (g/l)

Ingredientes	ETAPAS					
	II		I		II	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI
Sales MS						
MS	4,6	2,3	4,6	2,3	4,6	2,3
Azúcar	12,5	12,5	15	15	15	15
Mioinositol	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Glicina	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
Ac.	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006
Nicotínico	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
Glicina	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006
Piridoxina	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
Tiamina	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7
Agar	5,5	5,5	5,5		5,5	5,5
Hormonas						
AIB	0,25	0,25	1,0	1,0	1,5	1,5
AG ₃	0,5	0,5	0,5	0,5	1,5	1,5

Fuente : Murashige Skog 1962 MC : Medio completo MI: Medio incompleto

Anexo 5:
Evaluación medio completo

Ecotipos	Días de evaluación	Contaminación	Oxidación	Fenolización	Plantas sanas vivas
Ecotipo Susapaya	8	2	1	0	7
	16	1	0	0	6
	24	0	0	0	6
	32	0	0	0	6
	40	0	0	0	6
Total		3	1	0	6
Ecotipo llabaya	8	2	2	0	6
	16	1	1	0	4
	24	0	0	0	4
	32	0	0	0	4
	40	0	0	0	4
Total		3	3	0	4
Ecotipo Ticaco	8	2	3	0	5
	16	1	2	0	2
	24	0	0	0	2
	32	0	0	0	2
	40	0	0	0	2
Total		3	5	0	2
Ecotipo Borogueña	8	1	2	0	7
	16	1	1	0	5
	24	0	0	0	5
	32	0	0	0	5
	40	0	0	0	5
Total		2	3	0	5
Ecotipo Tarata	8	1	2	0	7
	16	1	1	0	5
	24	0	0	0	5
	32	0	0	0	5
	40	0	0	0	5
Total		2	3	0	5

Fuente: Elaboración propia

Anexo 6:
Evaluación medio incompleto

Ecotipos	Días de evaluación	Contaminación	Oxidación	Fenolización	Plantas sanas vivas
Ecotipo Susapaya	8	1	1	0	9
	16	0	0	0	8
	24	0	0	0	0
	32	0	0	0	0
	40	0	0	0	0
Total		1	1	0	8
Ecotipo llabaya	8	1	1	0	8
	16	0	1	0	7
	24	0	0	0	7
	32	0	0	0	7
	40	0	0	0	7
Total		1	2	0	7
Ecotipo Ticaco	8	1	2	0	7
	16	0	1	0	6
	24	0	1	0	5
	32	0	0	0	5
	40	0	0	0	5
Total		1	4	0	5
Ecotipo Borogueña	8	0	2	0	8
	16	0	1	0	7
	24	0	0	0	7
	32	0	0	0	7
	40	0	0	0	7
Total		0	3	0	7
Ecotipo Tarata	8	1	2	0	8
	16	0	1	0	8
	24	0	0	0	8
	32	0	0	0	8
	40	0	0	0	8
Total		1	1	0	8

Fuente: Elaboración propia

**Anexo 7:
Altura a los 22 días(mm)**

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	2,0	2,0	3,0	2,3	1,5	2,0	1,5	2,0	1,6	1,5
R ₂	1,5	2,3	2,5	2,5	1,2	1,7	1,7	1,7	1,5	1,1
R ₃	1,7	2,0	2,6	2,5	1,3	1,5	2,0	1,5	1,4	1,8
R ₄	1,9	2,0	2,3	1,8	1,3	1,5	1,3	1,5	1,2	1,5
R ₅	2,4	2,3	1,6	2,0	1,8	2,2	2,8	2,2	2,0	1,9
R ₆	2,4	2,5	2,2	2,3	1,3	2,5	1,3	2,1	1,5	1,8
R ₇	1,5	2,0	2,2	2,5	2,0	2,0	2,0	1,0	1,4	1,7
R ₈	2,5	2,1	2,0	2,0	1,5	1,9	1,5	2,0	2,1	2,0
R ₉	2,5	2,3	2,5	2,5	1,0	1,6	1,0	1,6	2,0	1,5
R ₁₀	1,6	1,7	2,0	2,0	1,5	1,1	1,5	1,6	1,8	1,5

Fuente: Elaboración propia

**Anexo 8:
Altura a los 32 días (cm)**

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	4,5	2,5	3,4	2,5	2,0	2,2	2,0	2,0	2,0	2,5
R ₂	4,7	2,3	2,8	2,8	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,7
R ₃	3,7	2,0	2,8	2,7	2,0	2,0	2,5	2,0	2,0	2,0
R ₄	2,8	2,4	2,5	2,3	1,3	2,2	2,3	2,2	1,5	1,8
R ₅	4,3	2,4	2,3	2,4	2,2	2,5	2,2	2,5	2,5	2,8
R ₆	2,7	3,6	2,3	2,8	2,4	2,9	1,4	2,3	2,2	2,6
R ₇	2,1	2,3	2,2	2,8	2,3	1,9	2,3	1,8	2,4	2,3
R ₈	2,5	2,4	2,2	2,6	2,2	2,0	1,8	2,0	2,5	2,4
R ₉	2,8	3,3	2,8	2,5	2,6	2,0	2,6	2,0	1,5	2,7
R ₁₀	2,0	2,3	2,6	2,0	2,5	1,9	1,7	1,8	2,0	2,3

Fuente: Elaboración propia

**Anexo 9:
Altura a 52 días (cm)**

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	4,9	3,5	3,5	4,0	3,5	2,5	3,5	2,5	2,5	2,7
R ₂	5,0	3,0	3,5	3,5	2,9	2,7	2,5	2,7	2,4	2,5
R ₃	3,8	3,5	4,0	3,0	3,0	2,2	3,0	2,4	2,8	2,9
R ₄	4,0	2,8	3,5	3,5	3,4	2,5	2,6	2,5	2,9	2,7
R ₅	4,5	4,0	2,5	2,5	3,8	3,0	4,8	3,0	3,0	3,3
R ₆	4,0	4,0	3,0	3,0	2,5	3,3	2,5	3,3	2,7	3,2
R ₇	4,0	3,8	4,0	3,0	4,0	2,0	3,0	2,0	3,1	2,5
R ₈	3,7	3,0	3,3	3,0	3,5	2,3	2,5	2,3	2,9	2,5
R ₉	4,0	3,5	3,3	2,7	3,7	2,5	3,7	2,0	2,5	3,0
R ₁₀	3,6	3,5	3,5	2,7	3,7	2,5	2,7	2,5	2,6	2,5

Fuente: Elaboración propia

**Anexo 10:
Número de brotes a los 22 días**

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	2	3	5	1	6	2	5	2	3	3
R ₂	3	3	5	3	2	2	5	6	3	3
R ₃	3	3	4	6	6	4	4	2	3	3
R ₄	3	3	4	4	2	4	4	4	3	3
R ₅	3	3	6	3	2	2	6	3	3	3
R ₆	5	3	4	4	2	2	4	2	3	3
R ₇	5	3	4	4	6	2	4	3	3	3
R ₈	3	3	4	3	2	3	4	6	3	3
R ₉	4	3	4	3	3	3	4	3	3	4
R ₁₀	1	3	3	2	2	3	3	2	3	3

Fuente: Elaboración propia

Anexo 11:
Datos transformados número de brotes a los 22 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	1,73	2,00	2,45	1,41	2,65	1,73	2,45	1,73	2,00	2,00
R ₂	2,00	2,00	2,45	2,00	1,73	1,73	2,45	2,65	2,00	2,00
R ₃	2,00	2,00	2,24	2,65	2,65	2,24	2,24	1,73	2,00	2,00
R ₄	2,00	2,00	2,24	2,45	1,73	2,24	2,24	2,24	2,00	2,00
R ₅	2,00	2,00	2,65	2,00	1,73	1,73	2,65	2,00	2,00	2,00
R ₆	2,45	2,00	2,24	2,24	1,73	1,73	2,24	2,24	2,00	2,00
R ₇	2,45	2,00	2,24	2,24	2,65	1,73	2,24	1,73	2,00	2,00
R ₈	2,00	2,00	2,24	2,00	1,73	2,00	2,24	2,65	2,00	2,00
R ₉	2,24	2,00	2,24	2,00	2,00	2,00	2,24	2,00	2,00	2,24
R ₁₀	1,41	2,00	2,00	1,73	1,73	2,00	2,00	1,73	2,00	2,00

Fuente: Elaboración propia

Anexo 12:
Número de brotes a los 32 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	2	4	5	1	8	2	5	2	3	4
R ₂	3	3	6	4	3	2	6	6	3	3
R ₃	3	4	6	4	4	3	6	2	3	4
R ₄	3	4	4	6	2	4	4	4	3	4
R ₅	3	6	8	4	2	2	8	3	3	3
R ₆	6	4	4	2	2	2	4	2	3	3
R ₇	6	4	4	5	6	2	4	3	5	3
R ₈	3	3	4	4	2	2	4	6	3	4
R ₉	6	6	4	4	2	2	4	3	3	4
R ₁₀	1	4	3	4	2	2	3	4	3	3

Fuente: Elaboración propia

Anexo 13:

Datos transformados número de brotes a los 32 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	1,73	2,24	2,45	1,41	3,00	1,73	2,45	1,73	2,00	2,24
R ₂	2,00	2,00	2,65	2,24	2,00	1,73	2,65	2,65	2,00	2,00
R ₃	2,00	2,24	2,65	2,24	2,24	2,00	2,65	1,73	2,00	2,24
R ₄	2,00	2,24	2,24	2,65	1,73	2,24	2,24	2,24	2,00	2,24
R ₅	2,00	2,65	3,00	2,24	1,73	1,73	4,00	2,00	2,00	2,00
R ₆	2,65	2,24	2,24	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	2,00	2,00
R ₇	2,65	2,24	2,24	2,45	2,65	1,73	2,00	2,00	2,45	2,00
R ₈	2,00	2,00	2,24	2,24	1,73	1,73	2,65	2,65	2,00	2,24
R ₉	2,65	2,65	2,24	2,24	1,73	1,73	2,00	1,73	2,00	2,24
R ₁₀	1,41	2,24	2,00	2,24	1,73	1,73	2,24	2,00	2,00	2,00

Fuente: Elaboración propia

Anexo 14:

Número de brotes a los 52 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	3	4	8	2	8	2	8	4	3	4
R ₂	3	3	8	8	3	3	8	8	3	3
R ₃	8	4	8	8	8	3	8	2	4	4
R ₄	6	4	8	5	2	6	8	6	3	4
R ₅	3	8	6	6	2	2	6	3	3	4
R ₆	6	4	8	3	2	2	8	2	3	4
R ₇	8	4	4	5	8	2	4	3	5	4
R ₈	3	5	6	5	2	7	6	8	3	3
R ₉	6	8	6	4	4	4	6	4	3	4
R ₁₀	2	6	6	6	2	4	6	6	3	3

Fuente: Elaboración propia

Anexo 15:

Datos transformados de número de brotes a los 52 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	2,00	2,24	3,00	1,73	3,00	1,73	3,00	2,24	2,00	2,24
R ₂	2,00	2,00	3,00	3,00	4,00	2,00	3,00	3,00	2,00	2,00
R ₃	3,00	2,24	3,00	3,00	3,00	2,00	3,00	1,73	2,24	2,24
R ₄	2,65	2,24	3,00	2,45	1,73	2,65	3,00	2,65	2,00	2,24
R ₅	2,00	3,00	2,65	2,65	1,73	1,73	2,65	2,00	2,00	2,24
R ₆	2,65	2,24	3,00	2,00	1,73	1,73	3,00	1,73	2,00	2,24
R ₇	3,00	2,24	2,24	2,65	3,00	1,73	2,24	2,00	2,45	2,24
R ₈	2,00	2,45	2,65	2,65	1,73	2,82	2,65	3,00	2,00	2,00
R ₉	2,65	3,00	2,65	2,24	2,45	2,24	2,65	2,24	2,00	2,24
R ₁₀	1,73	2,65	2,65	2,65	1,73	2,24	2,65	2,65	2,00	2,00

Fuente: Elaboración propia

Anexo 16:

Número de hojas 22 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	22	24	26	6	24	10	36	14	12	10
R ₂	18	18	23	26	6	8	22	36	9	18
R ₃	12	20	28	22	20	14	26	14	12	6
R ₄	22	22	18	14	4	24	14	24	15	6
R ₅	27	24	21	10	12	8	30	14	12	18
R ₆	28	22	22	10	12	18	32	12	10	12
R ₇	26	20	28	16	28	6	40	12	2	8
R ₈	22	10	26	14	8	16	8	24	16	12
R ₉	38	26	18	24	14	22	26	16	8	12
R ₁₀	18	26	14	20	8	10	40	10	12	5

Fuente: Elaboración propia

Anexo 17:

Datos transformados de número de hojas a los 22 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	4,69	4,90	5,09	2,82	4,90	3,16	3,74	3,74	3,45	3,16
R ₂	4,24	4,24	4,80	5,09	2,82	2,82	6,00	6,0	3,00	4,24
R ₃	3,45	4,47	5,29	4,69	4,47	3,74	3,74	3,74	3,45	2,45
R ₄	4,69	4,69	4,24	3,74	2,00	4,90	4,90	4,90	3,87	2,45
R ₅	5,20	4,90	4,58	3,16	3,45	2,82	3,74	3,74	3,45	4,24
R ₆	5,29	4,69	4,69	3,16	3,45	4,24	3,45	3,45	3,16	3,45
R ₇	5,09	4,47	5,29	4,00	5,29	5,29	3,45	3,45	1,41	2,82
R ₈	4,69	3,16	5,09	3,74	2,82	2,45	4,90	4,90	4,00	3,45
R ₉	6,16	5,09	4,24	4,90	3,74	4,69	4,00	4,00	2,82	3,45
R ₁₀	4,24	5,09	3,74	4,47	2,82	3,16	3,16	3,16	3,45	2,24

Fuente: Elaboración propia

Anexo 18:

Número de hojas a los 32 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	26	32	32	8	42	14	38	28	22	20
R ₂	26	30	40	32	12	16	28	48	22	18
R ₃	20	34	40	32	22	24	28	28	20	10
R ₄	36	32	36	28	4	26	14	36	24	8
R ₅	24	40	36	22	14	16	40	22	20	18
R ₆	38	36	32	20	14	20	38	20	12	16
R ₇	28	30	36	32	38	8	40	14	2	10
R ₈	26	32	32	38	3	22	10	28	28	28
R ₉	38	36	32	32	20	32	34	28	8	22
R ₁₀	20	30	20	34	10	12	46	12	18	9

Fuente: Elaboración propia

Anexo 19:

Datos transformados de número de hojas a los 22 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	5,09	5,16	5,16	2,82	6,48	3,74	6,16	5,49	4,69	4,47
R ₂	5,09	5,48	6,32	5,16	3,45	4,00	5,29	6,93	4,69	4,24
R ₃	4,47	5,83	6,32	5,16	4,69	4,90	5,29	5,29	4,47	3,16
R ₄	6,00	5,16	6,00	5,29	5,09	5,09	3,74	6,0	4,90	2,82
R ₅	4,90	6,32	6,00	4,69	4,00	4,00	6,32	4,69	4,47	4,24
R ₆	6,16	6,00	5,16	4,47	4,47	4,47	6,16	4,47	3,45	4,00
R ₇	5,29	5,48	6,00	5,16	2,82	4,47	6,32	3,74	1,41	3,16
R ₈	5,09	5,16	5,16	6,08	4,69	2,82	3,16	5,29	5,29	5,29
R ₉	6,16	6,00	5,16	5,16	5,16	4,69	5,83	5,29	2,82	4,69
R ₁₀	4,47	5,48	4,47	5,83	3,45	5,16	6,78	3,45	4,24	3,00

Fuente: Elaboración propia

Anexo 20:

Número de brotes a los 52 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	28	32	64	20	64	22	48	28	22	24
R ₂	36	30	66	58	22	32	30	72	32	20
R ₃	32	38	66	62	64	26	28	44	30	10
R ₄	36	32	72	30	56	52	16	42	28	10
R ₅	24	58	52	32	16	20	48	24	24	24
R ₆	38	36	68	28	16	30	38	22	18	18
R ₇	48	40	42	40	66	12	50	18	4	14
R ₈	30	34	38	40	16	36	14	48	18	22
R ₉	38	58	38	32	26	36	34	36	12	22
R ₁₀	28	48	38	52	12	16	52	16	32	12

Fuente: Elaboración propia

Anexo 21:

Datos transformados de número de hojas a los 52 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	5,29	5,16	8,00	4,47	8,00	4,69	6,93	5,29	4,69	4,90
R ₂	6,00	5,48	8,12	7,61	4,69	5,16	5,48	8,49	5,16	4,47
R ₃	5,16	6,16	8,12	7,87	8,00	5,09	5,29	6,63	5,48	3,16
R ₄	6,00	5,16	8,49	5,48	7,48	7,48	4,00	6,48	5,29	3,16
R ₅	4,90	7,61	7,21	5,16	4,00	4,47	6,93	4,90	4,90	4,90
R ₆	6,16	6,00	8,25	5,29	4,00	5,48	6,16	4,69	4,24	4,24
R ₇	6,93	6,32	6,48	5,29	8,12	3,45	7,07	4,24	2,00	3,74
R ₈	5,48	5,83	6,16	6,32	4,00	6,00	3,74	6,93	4,24	4,69
R ₉	6,16	7,61	6,16	6,32	5,09	6,00	5,83	6,00	3,45	4,69
R ₁₀	5,29	6,93	6,16	7,21	3,45	4,00	7,35	4,00	5,16	3,45

Fuente: Elaboración propia

Anexo 22:

Vigor del follaje a los 22 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	9	5	7	7	3	5	3	3	5	5
R ₂	7	5	7	5	1	5	3	3	3	3
R ₃	1	5	7	5	5	3	3	3	3	5
R ₄	5	3	7	3	1	3	3	5	5	5
R ₅	5	5	5	3	5	5	3	3	5	5
R ₆	5	5	5	5	3	3	3	3	3	7
R ₇	1	3	5	5	7	7	3	3	1	5
R ₈	5	3	5	7	3	7	3	3	5	5
R ₉	7	5	5	7	3	3	1	5	3	5
R ₁₀	3	3	5	7	1	3	3	7	3	3

Fuente: Elaboración propia

Anexo 23:

Vigor del follaje a los 22 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	9	5	7	7	3	5	3	3	5	5
R ₂	7	5	7	5	1	5	3	3	3	3
R ₃	1	5	7	5	5	3	3	3	3	5
R ₄	5	3	7	3	1	3	3	5	5	5
R ₅	5	5	5	3	5	5	3	3	5	5
R ₆	5	5	5	5	3	3	3	3	3	7
R ₇	1	3	5	5	7	7	3	3	1	5
R ₈	5	3	5	7	3	7	3	3	5	5
R ₉	7	5	5	7	3	3	1	5	3	5
R ₁₀	3	3	5	7	1	3	3	7	3	3

Fuente: Elaboración propia

Anexo 24:

Datos transformados de vigor del follaje a los 22 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	3,16	2,45	2,82	2,82	4,00	2,45	2,00	2,00	2,45	2,45
R ₂	2,82	2,45	2,82	2,45	1,73	2,45	2,00	2,00	2,00	2,0
R ₃	1,73	2,45	2,82	2,45	2,45	2,00	2,00	2,00	2,00	2,45
R ₄	2,45	4,00	2,82	2,00	1,73	2,00	2,00	2,45	2,82	2,45
R ₅	2,45	2,45	2,45	2,00	2,45	2,45	2,00	2,00	2,82	2,45
R ₆	2,45	2,45	2,45	2,45	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,82
R ₇	1,73	2,00	2,45	2,45	2,82	2,82	2,00	2,00	1,73	2,45
R ₈	2,45	2,00	2,45	2,82	2,00	2,82	2,00	2,00	2,45	2,45
R ₉	2,82	2,45	2,45	2,82	2,00	2,00	1,73	2,45	2,00	2,45
R ₁₀	4,00	2,00	2,45	2,82	1,73	2,00	2,00	2,82	2,00	2,00

Fuente: Elaboración propia

Anexo 25:

Vigor el follaje a los 52 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	9	5	7	9	7	7	7	5	5	5
R ₂	9	5	7	7	7	7	7	7	3	3
R ₃	1	5	7	7	7	7	5	5	5	5
R ₄	5	7	7	5	1	7	3	5	5	5
R ₅	9	7	7	7	9	7	7	5	5	7
R ₆	7	9	7	7	3	7	5	5	5	7
R ₇	5	7	7	7	7	7	7	5	1	7
R ₈	3	7	5	7	3	5	1	7	5	7
R ₉	7	7	7	7	7	7	3	5	3	7
R ₁₀	5	7	5	7	3	5	7	7	5	3

Fuente: Elaboración propia

Anexo 26:

Datos transformados de vigor del follaje a los 52 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	3,16	2,45	2,82	3,16	2,82	2,82	2,82	2,45	2,45	2,45
R ₂	3,16	2,45	2,82	2,82	2,82	2,82	2,82	2,82	2,00	2,00
R ₃	1,73	2,45	2,82	2,82	2,82	2,82	2,45	2,45	2,45	2,45
R ₄	2,45	2,82	2,82	2,45	1,73	2,82	2,00	2,45	2,45	2,45
R ₅	3,16	2,82	2,82	2,82	3,16	2,82	2,82	2,45	2,45	2,82
R ₆	2,82	3,16	2,82	2,82	2,00	2,82	2,45	2,45	2,45	2,82
R ₇	2,45	2,82	2,82	2,82	2,82	2,82	2,82	2,45	1,73	2,82
R ₈	2,00	2,82	2,45	2,82	2,00	2,45	1,73	2,82	2,45	2,82
R ₉	2,82	2,82	2,82	2,82	2,82	2,82	2,00	2,45	2,00	2,82
R ₁₀	2,45	2,82	2,45	2,82	2,00	2,45	2,82	2,82	2,45	2,00

Fuente: Elaboración propia

Anexo 27:

Grado de desarrollo a los 22 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	5	7	5	5	5	5	5	5	5	5
R ₂	5	7	5	7	5	5	5	7	5	5
R ₃	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
R ₄	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
R ₅	5	7	5	5	5	5	5	5	5	5
R ₆	5	7	5	7	5	5	5	7	5	5
R ₇	5	7	5	7	5	5	5	7	5	5
R ₈	5	7	5	5	5	5	5	5	5	7
R ₉	7	7	5	7	5	5	5	7	5	5
R ₁₀	5	5	5	7	5	5	7	7	5	5

Fuente: Elaboración propia

Anexo 28:

Datos transformados de grado de desarrollo a los 22 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	2,45	2,82	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45
R ₂	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,45	2,45	2,82	2,45	2,45
R ₃	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45
R ₄	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45
R ₅	2,45	2,82	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45
R ₆	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,45	2,45	2,82	2,45	2,45
R ₇	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,45	2,45	2,82	2,45	2,45
R ₈	2,45	2,82	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,82
R ₉	2,82	2,82	2,45	2,82	2,45	2,45	2,45	2,82	2,45	2,45
R ₁₀	2,45	2,45	2,45	2,82	2,45	2,45	2,82	2,82	2,45	2,45

Fuente: Elaboración propia

Anexo 29:

Grado de desarrollo a los 32 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	5	7	7	5	5	7	5	5	5	7
R ₂	5	7	5	7	5	7	7	7	5	5
R ₃	5	7	5	7	5	5	5	7	5	7
R ₄	7	7	5	7	9	7	5	7	5	7
R ₅	5	7	5	7	5	5	5	7	5	5
R ₆	5	7	5	7	5	5	5	7	5	5
R ₇	5	7	5	7	7	7	7	7	9	5
R ₈	5	7	5	7	5	7	3	7	5	7
R ₉	7	7	7	7	5	7	5	7	5	7
R ₁₀	5	7	5	7	5	7	1	7	5	5

Fuente: Elaboración propia

Anexo 30:

Datos transformados de grado de desarrollo a los 32 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	2,45	2,82	2,82	2,45	2,45	2,82	2,45	2,45	2,45	2,82
R ₂	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,82	2,82	2,82	2,45	2,45
R ₃	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,45	2,45	2,82	2,45	2,82
R ₄	2,82	2,82	2,45	2,82	3,16	2,82	2,45	2,82	2,45	2,82
R ₅	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,45	2,45	2,82	2,45	2,45
R ₆	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,45	2,45	2,82	2,45	2,45
R ₇	2,45	2,82	2,45	2,82	2,82	2,82	2,82	2,82	3,16	2,45
R ₈	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,82	2,00	2,82	2,45	2,82
R ₉	2,82	2,82	2,82	2,82	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,82
R ₁₀	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,82	1,73	2,82	2,45	2,45

Fuente: Elaboración propia

Anexo 31:

Grado de desarrollo a los 52 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	5	7	7	7	7	7	5	7	5	7
R ₂	5	7	7	7	5	7	7	7	5	5
R ₃	5	7	7	7	5	5	5	5	7	7
R ₄	7	7	5	7	9	5	5	7	5	7
R ₅	5	7	5	7	5	7	5	7	5	7
R ₆	5	7	5	7	5	7	5	7	5	7
R ₇	5	7	5	7	7	7	7	7	5	5
R ₈	5	7	5	7	5	7	5	7	5	7
R ₉	7	7	7	7	5	7	5	7	5	7
R ₁₀	5	7	5	7	5	7	7	7	5	5

Fuente: Elaboración propia

Anexo 32:

Datos transformados de grado de desarrollo a los 52 días

Ecotipos	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄		E ₅	
	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI	MC	MI
R ₁	2,45	2,82	2,82	2,82	2,82	2,82	2,45	2,45	2,45	2,82
R ₂	2,45	2,82	2,82	2,82	2,45	2,82	2,82	2,82	2,45	2,45
R ₃	2,45	2,82	2,82	2,82	2,45	2,45	2,45	2,45	2,82	2,82
R ₄	2,82	2,82	2,45	2,82	3,16	2,45	2,45	2,82	2,45	2,82
R ₅	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,82
R ₆	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,82
R ₇	2,45	2,82	2,45	2,82	2,82	2,82	2,82	2,82	2,45	2,45
R ₈	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,82
R ₉	2,82	2,82	2,82	2,82	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,82
R ₁₀	2,45	2,82	2,45	2,82	2,45	2,82	2,82	2,82	2,45	2,45

Fuente: Elaboración propia

Anexo 33:

Ecotipo proveniente de Susapaya



Anexo 34:

Ecotipo proveniente de Ilabaya



Anexo 35:

Ecotipo proveniente de Ticaco



Anexo 36:

Ecotipo proveniente de Borogueña



Anexo 37:

Ecotipo proveniente de Tarata

