

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias Agrícolas

Escuela Académico Profesional de Agronomía

**“EFECTO DE DOS CONCENTRACIONES DE MEDIO BASE
MURASHIGE & SKOOG Y CUATRO CONCENTRACIONES
DE CITOKININA EN EL CULTIVO *In vitro*
DEL TOMILLO (*Thymus vulgaris* L.)”**

TESIS

Presentada por:

Bach. LIZBETH MARISSA MONTALBÁN HINOJOSA

Para optar el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

TACNA - PERÚ

2009

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

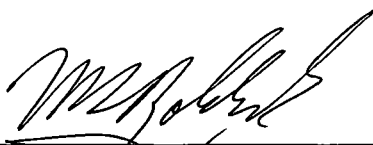
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

**“EFECTO DE DOS CONCENTRACIONES DE MEDIO BASE
MURASHIGE & SKOOG Y CUATRO CONCENTRACIONES
DE CITOKININA EN EL CULTIVO *In vitro*
DEL TOMILLO (*Thymus vulgaris* L.)”**

TESIS SUSTENTADA Y APROBADA EL 18 DE DICIEMBRE DEL 2009;

ESTANDO EL JURADO CALIFICADOR INTEGRADO POR:

PRESIDENTE:



MSc. Magno Robles Tello

SECRETARIO:



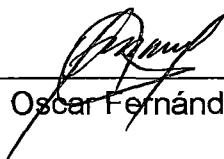
Dra. Rosario Zegarra Zegarra

VOCAL:



Ing. Rodi Alférez García

ASESOR:



Dr. Oscar Fernández Cutire

UNIVERSIDAD NACIONAL "JORGE BASADRE GROHMANN" DE TACNA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRICOLAS

TITULO PROFESIONAL

Tomo: 02

Folio N° 471

El Decano de la Facultad, GERTIFICA:

Que el Bachiller: MONTALBÁN HINOJOSA
LIZBETH MARISSA

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

Tacna, 2009 ENERO



[Handwritten Signature]
DECANO FCAG

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	4
MATERIALES Y MÉTODOS	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	44
RECOMENDACIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47
ANEXOS	54

RESUMEN

El presente trabajo de investigación que lleva por título **“Efecto de dos concentraciones de medio base Murashige & Skoog y cuatro concentraciones de citokinina en el cultivo *in vitro* del tomillo (*Thymus vulgaris* L.)”**, se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas – UNJBG.

El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar el efecto de las concentraciones del medio base Murashige & Skoog y de las concentraciones de citokinina en el cultivo *in vitro* del tomillo (*Thymus vulgaris* L.).

Los factores en estudio fueron: El factor “A”: medio de cultivo Murashige & Skoog (MS), constituido por dos niveles: a1: medio MS completo; a2: medio MS ½, factor “B”: citokinina (bencil aminopurina BAP), con cuatro niveles: b1: 0,5 mg / L; b2: 1,0 mg / L; b3: 1,5 mg / L; b4: 2,0 mg / L. El diseño experimental utilizado fue completamente aleatorio, en un arreglo factorial de 2 x 4.

El resultado para la variable sobrevivencia a los 7 días de siembra fue de 93,1%. En cuanto a la variable altura de explante en la etapa de

introducción, la combinación de medio MS completo y 1,5 mg / L de BAP, obtuvo la mayor altura de explante (18,2 mm); las combinaciones de medio MS $\frac{1}{2}$ con niveles de 0,5 mg / L; 1,0 mg / L; y 2,0 mg / L, obtuvieron la menor altura de explante (17,6 mm). En la etapa de micropropagación, las combinaciones de medio MS completo y 2,0 mg / L de BAP y medio MS $\frac{1}{2}$ y 0,5 mg / L, obtuvieron la mayor y menor altura de explante, 44,4 mm y 42,6 mm respectivamente.

Para la variable número de nudos por explante en la etapa de introducción y micropropagación, la combinación de medio MS completo y 1,5 mg / L de BAP, fue la que obtuvo mayor número de nudos por explante (7 y 10 respectivamente); la combinación de medio MS $\frac{1}{2}$ y 0,5 mg / L de BAP obtuvo el menor número de nudos por explante (6 y 9 respectivamente).

En la etapa de enraizamiento, para la variable longitud de raíz, las combinaciones de medio de cultivo MS completo y 1,5 mg / L de BAP y medio MS completo y 0,5 mg / L, obtuvieron la mayor y menor longitud de raíz 21,4 y 20,0 mm respectivamente.

I. INTRODUCCIÓN

El mercado internacional de hierbas aromáticas y medicinales tiene una demanda creciente; entre estas especies tenemos al tomillo, por sus usos culinarios, medicinales y aceites esenciales.

A nivel mundial los principales productores de tomillo son España, Francia, Israel, México, Colombia y Perú. El mayor productor mundial es España, que produce por encima de 2000 toneladas de tomillo por año. Estados Unidos y Europa (Francia, Alemania y Reino Unido), son los principales consumidores de tomillo a nivel mundial.

A nivel del Perú, existe cultivo de tomillo en la sierra de Arequipa (Puquina, Chiguata, Pocsi y Polobaya) y Moquegua, con rendimientos que han llegado a superar los 2 700 kg / há / año.

En la región de Tacna, el cultivo de tomillo ha sido incentivado en la provincia de Candarave, que cuenta con un área de 0,65 há., siendo el principal productor el distrito de Huanuara, con un rendimiento de 3 000 kg / há / año de tomillo en seco a partir del segundo año.

El precio internacional de tomillo para el año 2006 en los Estados Unidos osciló entre 5 a 8 dólares por libra. En la región de Tacna, la hoja deshidratada de tomillo puesto en chacra está cotizado en S/. 5,00 nuevos soles / kg. El tomillo, al igual que otras hierbas, cuenta con un mercado pequeño y un precio relativamente bueno todo el año, así también las condiciones comerciales para la agroexportación, propician un escenario interesante, que puede incentivar el desarrollo de este cultivo.

La región sur del Perú, tiene una diversidad de climas y suelos que se adaptan al cultivo del tomillo, que requiere para su desarrollo climas templados, cálidos y secos, altitudes entre 800 a 2500 m.s.n.m., se desarrolla en cualquier tipo de suelo, siempre que tengan buen drenaje, alta aireación y se adapta a un rango de pH entre 5,20 a 7,30. Es una especie poco exigente de agua, resiste bien los periodos de sequía. El exceso de humedad le es muy perjudicial.

En las comunidades altoandinas de la región de Tacna, es típica la existencia de pequeñas parcelas (minifundio), conocidas como "topos", en tales circunstancias, el cultivo de tomillo les ofrece una alternativa para mejorar el nivel de ingreso económico de estas áreas, por la posibilidad de exportación.

Dentro de los factores de producción que dificultan la ampliación de áreas de cultivo es el sistema de propagación. El uso de semillas se dificulta por las características de las mismas; siendo éstas de tamaño muy pequeño hace difícil su manejo para la propagación controlada, con su posterior trasplante o para la siembra directa.

De allí que, en el presente trabajo se busca una alternativa de la producción de plántulas, a través de la técnica de micropropagación *in vitro*; lo que permitiría lograr uniformidad del material, además de contar con material vegetal libre de virus. Este tipo de material permitiría un crecimiento uniforme tanto en el sistema radicular como en el aéreo.

El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar el efecto de las concentraciones del medio base Murashige & Skoog y de las concentraciones de citocinina en el cultivo *in vitro* del tomillo (*Thymus vulgaris* L.).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen

El tomillo es una planta nativa de Europa, el norte de África y Asia. Pertenece a la familia Lamiaceae y corresponde al género *Thymus*, el cual está ampliamente representado en la península ibérica con numerosas especies, muchas de ellas endémicas. (10)

2.2. Producción mundial.

El tomillo es ampliamente sembrado en casi todo el mundo por sus usos culinarios, medicinales y aceites esenciales. España produce por encima de 2 000 toneladas de tomillo por año y es actualmente el mayor productor mundial. (3)

Israel, España, México, Colombia y Perú son los principales productores de tomillo al mercado de Estados Unidos, el cual importa alrededor de 1500 t de planta seca/año, siendo su principal proveedor España con el 59,20 % y Perú con 0,17 % que va en incremento. (18)

2.3. Ubicación taxonómica del tomillo (*Thymus vulgaris* L). (7)

Reino: Vegetal

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliópsida

Sub clase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Subfamilia: Nepetoideae

Tribu: Mentheae

Género: *Thymus*

Especie: *Thymus vulgaris* L.

2.4. Importancia de la propagación en el proceso productivo del tomillo.

La propagación de plantas ha sido ampliamente reconocida como una práctica fundamental en el campo de las ciencias agrícolas ya que de la calidad de la semilla botánica o material vegetativo que se utilice, va a depender el resto del proceso productivo. Es común el uso de semilla en la mayoría

de cultivos agrícolas, pero ello depende fundamentalmente de las características genéticas de la especie.

En la agricultura claramente se distingue la propagación por semilla y la propagación vegetativa.

A. Propagación por semilla en la producción de tomillo:

La semilla es la unidad biológica básica para la reproducción de la mayoría de las plantas. Cada semilla combina genes masculinos y femeninos en el embrión y da lugar al vástago, que difiere genéticamente de las plantas parentales. El cigoto no es sino un embrión que encierra un nuevo individuo en miniatura que al colocarse en condiciones óptimas dará origen a una plántula que encierra caracteres de ambos progenitores.

La multiplicación por semilla tiene el inconveniente que combina los genes de sus progenitores; es decir, es de particularidades heterogéneas y en las sucesivas generaciones se pueden perder buenas características de sus padres (proceso de segregación). (13)

De acuerdo a los ensayos realizados en campo por los docentes de la Facultad de Ciencias Agrícolas, se pudo establecer, se cuenta con un alto porcentaje de germinación cuando la semilla de tomillo es cosechada en plena maduración y se emplea sustrato especialmente preparado en bandejas de germinación. (10)

Las dificultades en el uso de semillas en tomillo radica en que éstas son de tamaño muy pequeño y de difícil manejo; no obstante otra alternativa sería la siembra directa; pero las limitaciones son evidentes por la excesiva pérdida que se provocaría y la heterogeneidad del material genético instalado en campo. (28)

Se ha podido verificar que en condiciones de campo, la germinación de semillas de tomillo no es uniforme, viéndose afectada esta por los cambios bruscos de temperatura y en general de las condiciones medioambientales.

Consecuentemente, las posibilidades de uso de la semilla se limitan y se deberá buscar alternativas de mejor uso u otro sistema de propagación.

B. Propagación vegetativa en tomillo:

El principio biológico de la propagación vegetativa se fundamenta en que "cada célula somática encierra la información genética del organismo en su conjunto (totipotencia), y está en la capacidad de regenerar un nuevo organismo idéntico a la planta madre. (10)

La propagación vegetativa explota esta habilidad natural a través de la separación de partes vegetativas de tejido vegetal. Los agricultores pueden así multiplicar un buen número de plantas a partir de un simple ejemplar y mantener en los vástagos características del original. (13)

Entre los tipos de propagación vegetativa que destacan en plantas aromáticas tenemos: la división de planta madre, por esquejes y por hijuelos.

- **División de la planta madre.** Consiste en separar una planta en varios ejemplares autónomos, técnica que se vale del hábito de muchas plantas de producir una masa de vástagos, formando una mata en crecimiento. La mata o corona puede dividirse en

secciones, cada una de ellas con al menos un vástago y sus propias raíces.

Tiene la ventaja que permite trasplante directo al campo definitivo. Se trata de un método rápido y fácil, aunque el número de plantas nuevas que produce no es muy elevado. (10)

- **Por esquejes:** especies como el romero y la salvia, enraízan a partir de esquejes de forma fácil y rápida. El proceso de obtención de esquejes es relativamente sencillo, pero, el éxito depende de la condición de los progenitores influye en la calidad del esqueje enraizado. (16)

Los esquejes deben ser obtenidos de plantas sanas y vigorosas. Se cortan esquejes de 11 cm, eliminando las hojas del medio inferior, dejando las hojas del medio superior. Los esquejes deben ser desinfectados con un fungicida, luego tratados con un enraizante comercial, posteriormente son plantados en camas de almácigo con sustrato suelto donde

permanecerán 60 días, para luego ser trasladados y plantados en el campo definitivo.(10)

- **Por hijuelos:** se obtienen cortándolos en el punto de unión con el tallo principal, cuando se observe desarrollo de raíces. Es ventajoso, porque permite trasplante directo al campo definitivo, propagación de plantas grandes y la primera cosecha es precoz. (16)

No obstante ser un medio de propagación bastante importante, las limitaciones de la misma radica en que al aplicarse masivamente, se constituye en un medio de proliferación de enfermedades que provienen de la planta madre. (13)

Consecuentemente, nuestro objetivo es salvar estas dificultades, mediante otro sistema de propagación, en el presente trabajo se ha considerado a la técnica de micropropagación *in vitro* como una alternativa para la producción de plántulas.

2.5. Micropropagación *in vitro*:

El cultivo de tejidos, células, órganos vegetales abarca un grupo de técnicas que consisten en el cultivo bajo condiciones asépticas (cultivo *in vitro*) de las diferentes partes de la planta. Estas técnicas tienen gran potencial para estudios básicos y aplicados en la micropropagación de especies económicamente importantes.

La técnica de propagar plántulas *in vitro* es llamada **micropropagación**; la que fue establecida por Boxus en 1974 como un sistema orientado a lograr el desarrollo de nuevas plántulas en medio artificial, en condiciones asépticas y a partir de porciones vegetales muy pequeñas tales como fracciones de tallos o semillas; ápices caulinares o radicales, callos, células aisladas, granos de polen, etc. (9).

Permite una multiplicación rápida en condiciones que las mantienen libres de enfermedades. (13)

La porción pequeña de planta que se utiliza para iniciar un cultivo de tejidos se llama **explante**. (9)

Las aplicaciones principales de la micropropagación son:

- Establecer plantas libres de organismos patógenos.
- Aislar células o líneas de células genéticamente extraordinarias que pueden convertirse en nuevas variantes de plantas.
- Permitir una multiplicación rápida en condiciones que las mantienen libres de enfermedades. (13)

El proceso de micropropagación incluye varias etapas:

- **Etapas I: Del establecimiento de cultivos asépticos** (introducción al cultivo *in vitro*); es la etapa de iniciación o de establecimiento, en la cual se establece el cultivo inicial o primario.

En esta etapa se inoculan los explantes en los tubos de cultivo; a los pocos días se observan si hay proliferación de organismos contaminantes (hongos o bacterias); los tubos de cultivo contaminados deben eliminarse y los que se mantienen sanos deben evaluarse periódicamente para observar el desarrollo de lo que será la futura planta (formación de hojas, tallos, etc.).

- **Etapa II: Propagación de propágulos sanos, sub cultivos** (*micropropagación propiamente dicha*); es la etapa de multiplicación de brotes, o multiplicación simplemente. (8)

En esta etapa, se deben separar los propágulos obtenidos y pasarlos a un medio fresco para la proliferación de nuevos brotes y para el desarrollo de los mismos. De acuerdo con la cantidad de material que se necesite, serán los sub cultivos que deben hacerse.

- **Etapa III: Enraizamiento;** en esta etapa se procede al enraizamiento de los propágulos obtenidos para la obtención de plantas completas. Tiene como objetivo producir una planta autotrófica que pueda sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo. Este periodo dura de dos a cuatro semanas.

Además de las tres etapas propuestas inicialmente por Murashige (1974), puede considerarse otra como parte del procedimiento:

- **Etapa IV: Trasplante a suelo y acondicionamiento a invernadero;** en esta etapa la textura, pH y la composición

del sustrato estarán dados en las condiciones específicas de la especie que se trate. (24)

Las plantas identificadas como libres de virus (en su material nuclear) serán propagadas *in vitro* para obtener el material de inicio o plantas patrones. Las mismas que se propagarán por los métodos tradicionales para obtener plantas registradas y, finalmente, plantas de calidad certificada (14).

2.6. Medios de cultivo *in vitro*:

El crecimiento de las plántulas *in vitro* depende principalmente de los medios de cultivo utilizados, y por lo tanto de las soluciones preparadas. El medio base Murashige & Skoog – MS es ampliamente utilizado en los laboratorios de producción de plántulas, las concentraciones de sales y vitaminas que contiene son las adecuadas para un normal crecimiento de las plantas en condiciones *in vitro*. (27)

En la actualidad, los medios base se obtienen fácilmente en su forma comercial, sin embargo, la posibilidad de utilizar soluciones stock permite la disponibilidad el medio de cultivo

por muchos años y reduce los costos de producción de plántulas. Además en el cultivo *in vitro* se requiere de la utilización de reguladores de crecimiento, los cuales deben ser preparados y conservados adecuadamente para su mejor efecto. (9)

Los nutrientes presentes en el medio base MS son sales orgánicas, vitaminas, aminoácidos, carbohidratos, reguladores de crecimiento y suplementos orgánicos. Los compuestos usados para la preparación de medios de cultivo contienen el medio base, además de un stock de vitaminas y otras sustancias adicionales, como por ejemplo ácido giberélico, el cual rompe la dormancia de las yemas y acelera el crecimiento del explante. Las vitaminas participan en las funciones enzimáticas de las células, estimulando el crecimiento de los explantes. (24)

El agua que se utiliza para la preparación de los medios de cultivo debe estar desprovista de sustancias orgánicas o minerales, pues podrían interferir en el normal desarrollo de las plántulas, principalmente en la nutrición. Por esta razón se utiliza agua destilada. El medio cuenta con los minerales

necesarios (N, S, P, Ca, K, Mg), agregados en forma de sales. Los hidratos de carbono, que se agregan de manera adicional al medio, le sirven como fuente de carbono al explante, ya que *in vitro* las plántulas apenas elaboran clorofila, aún incluso si se les ilumina adecuadamente. Por esta razón su fotosíntesis es débil y no son completamente autótrofos. (26)

Aún cuando se utiliza el medio base MS para el cultivo *in vitro*, es necesario agregar una pequeña cantidad de una solución stock de vitaminas, además del ácido giberélico, ácido indolbutírico (AIB), la fuente carbonada (sucrosa o glucosa) y el gelificante (phytagel o agar). De esta manera, se le da al explante un ambiente adecuado para que se desarrolle como una planta completa (27).

2.7. Reguladores de crecimiento

Los reguladores del crecimiento y el desarrollo de las plantas actualmente se agrupan en cinco categorías: auxinas, giberelinas, citokininas, ácido abscísico y etileno. Además de estas sustancias naturales (reguladores endógenos) existen

numerosos productos de síntesis que pueden utilizarse como reguladores del crecimiento en el cultivo *in vitro*. (26)

En los métodos de propagación *in vitro* se emplean ampliamente las auxinas; en la organogénesis y las aplicaciones a la multiplicación vegetativa está ampliamente ligada a la utilización conjunta de auxinas y citokininas. (24)

A. Auxinas:

La principal auxina es el ácido 3-indolacético (AIA), pero también se puede emplear el ácido 3- indol butírico (AIB), aunque son auxinas relativamente débiles.

Otros compuestos sintéticos pueden comportarse como auxinas muy débiles (ácido fenilacético) o fuertes: ácido naftalenacético (ANA), el ácido 3 naftoxiacético (NOA), etc. El 2,4 D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) es una auxina muy fuerte. (34)

El ANA es una auxina fuerte que se utiliza para inducir la rizogénesis, a veces en asociación con el AIB. (28)

El efecto de las auxinas está estrechamente ligado al alargamiento celular, que se explica por sus efectos sobre la celulosa – sintetasa, el aumento de la plasticidad parietal y el aumento de la absorción de agua. También tienen un efecto marcado sobre la división celular. (34)

B. Giberelinas:

Las giberelinas se emplean poco en cultivo *in vitro* ya que hay numerosas experiencias que indican un efecto inhibitorio sobre la organogénesis y, particularmente, la rizogénesis. Sus efectos varían según su concentración y el material vegetal. (28)

Las giberelinas provocan el alargamiento celular; eliminan el enanismo de las plantas; estimulan la germinación de la semilla de cereales mediante la inducción de la producción de la α – amilasa; inducen la floración de plantas de días largos; eliminan la dormancia de yemas y semillas; etc. (34)

C. Citokininas:

Las citokininas son derivados purínicos, en especial derivados de la adenina, que se han reportado en pequeñas cantidades en el agua de coco, jugo de tomate, extractos de flores, tubérculos y nódulos radiculares, etc. (9)

Entre las citokininas naturales tenemos la zeatina, la isopentenil-adenina (IPA), etc. Son citocininas sintéticas la kinetina (KIN: 6-furfunil aminopurina) el **BAP** (N-6- bencil aminopurina). Recientemente se ha descrito que la **N-6-bencil aminopurina (BAP)** ha sido aislada de plantas y constituye también una citokinina natural. (28)

En cultivos de tejidos, el BAP y las citokininas sintéticas son las más frecuentemente usadas. El BAP se emplea con frecuencia debido a su gran actividad y su bajo costo. (34)

Las citokininas estimulan la división celular (cariocinesis) en cultivo de tejidos vegetales y regulan la diferenciación en los tejidos cortados. También provocan la elongación de algunas hojas y la elongación de

segmentos de tallos etiolados. Estas respuestas se deben, en gran parte, a la expansión celular. Otro efecto, es retrasar el envejecimiento de los tejidos vegetales. (28)

Además, las citokininas inducen la formación de órganos en una gran variedad de cultivos de tejidos *in vitro*; controlan la formación de proplastidios en cloroplastos. (13)

Skoog y Miller (1957) descubren en cultivos de callos de tabaco, que una relación citokinina / auxina elevada inducía la formación de yemas, mientras que una relación baja favorecía la formación de raíces; niveles intermedios favorecían la proliferación del callo. (13)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del experimento.

El experimento se llevó a cabo en el área de frutales del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, propiedad de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna, se encuentra ubicado geográficamente a 17°59'38" de latitud sur y a 70°14'22" de longitud oeste y a una altitud de 550 m.s.n.m.

3.2. Material experimental

- Explantes de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). obtenidos de plantas madre de dos años de edad, mantenidas en condiciones de invernadero.
- Citokinina (N - 6 - bencil aminopurina BAP)
- Medio base Murashige & Skoog (MS)

El tomillo (*Thymus vulgaris* L.) es una planta herbácea, pequeña, que alcanza los 40 cm de altura, de aspecto grisáceo.

El sistema radicular se presenta con una raíz principal leñosa y diversas raíces secundarias.

Los tallos son cuadrangulares, y muy ramificados, de color verde grisáceo. Cuando la planta se vuelve añosa (vieja) hay un aumento general de su lignificación.

Las hojas son ovoides, opuestas, peciolo pequeño, éste es corto en relación con el limbo o lámina de la hoja, de color verde grisáceo más oscuro en el haz y pubescente en el envés. Su tamaño varía en longitud de 4 a 10 mm y 2 a 6 mm en anchura.

Las flores son pequeñas, zigomorfas, hermafroditas, color rosado o blanco, producidas en cimas axilares y en espigas terminales con semillas muy pequeñas.

La flor presenta una corola labiada. La fórmula floral en esta familia suele ser $K_{(5)} (C_{(5)} A_{(4)} G^{(2)})$, los signos abreviados indican la estructura fundamental de la flor: en donde $K_{(5)}$ indica

que el cáliz está compuesto por 5 sépalos ; la $C_{(5)}$ indica que la corola se compone de 5 pétalos ; $A_{(4)}$ indica que lo componen 4 estambres ; $G^{(2)}$ indica que el gineceo es súpero constituido por 2 carpelos. El fruto es un tetraquenio, de color marrón. (7)

3.3. Factores en estudio:

- **Factor A:** Medio de cultivo (medio base MS)

a1: MS a un $\frac{1}{2}$ (50% de concentración)

a2: MS completo (100% de concentración)

- **Factor B:** concentración de citokinina (BAP)

b1: 0,5 mg / L

b2: 1,0 mg / L

b3: 1,5 mg / L

b4: 2,0 mg / L

Cuadro 1: **Combinación de los factores en estudio.**

Tratamientos	Factor A medio de cultivo	Factor B concentración de citokinina	Combinación
T ₁	a ₁	b ₁	a ₁ b ₁
T ₂	a ₁	b ₂	a ₁ b ₂
T ₃	a ₁	b ₃	a ₁ b ₃
T ₄	a ₁	b ₄	a ₁ b ₄
T ₅	a ₂	b ₁	a ₂ b ₁
T ₆	a ₂	b ₂	a ₂ b ₂
T ₇	a ₂	b ₃	a ₂ b ₃
T ₈	a ₂	b ₄	a ₂ b ₄

Fuente: Elaboración propia.

3.4. Variables de respuesta:

- **Sobrevivencia.** Se contó el número explantes sobrevivientes por tratamiento a los siete días de la siembra.
- **Altura de explante.** Se realizó a la sexta semana, se midió la altura de los explantes, sacando un promedio por tratamiento. Se evaluó la altura de explante al final de la etapa de introducción y de la etapa de micropropagación.
- **Número de nudos por explante.** Se realizó a la sexta semana, se contó los nudos de los explantes, sacando un promedio por tratamiento. Se evaluó el número de nudos por

explante al final de la etapa de introducción y de la etapa de micropropagación.

- Longitud de raíz. Se realizó a la sexta semana, donde se tuvo que medir las raíces formadas en cada explante, luego promediándolo por tratamiento.

3.5. Diseño experimental:

Se empleó el diseño completamente aleatorio con arreglo factorial de 2 x 4. El factor medio de cultivo con dos niveles y el factor citokinina con cuatro niveles. Se tuvo ocho combinaciones de tratamientos y cinco repeticiones.

La prueba experimental consistió en someter a los explantes de tomillo a dos concentraciones de medio MS de cultivo y cuatro concentraciones de citokinina (BAP). Un medio MS con la mitad de stock A y stock B, y un medio MS con stock A y stock B completo, y diferentes concentraciones 0,5; 1,0; 1,5; y 2,0 mg de citokinina por litro de medio MS y someterlos a evaluación en la etapa de introducción y la etapa de micropropagación.

3.6. Conducción del experimento:

A. Preparación de soluciones stock:

Las soluciones concentradas para el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), se prepararon combinando varias sales y productos según el grado de solubilidad o estabilidad de los mismos.

La preparación de soluciones stock, se realizó según el manual de Toledo (1998) de cultivo de tejidos. Donde los solutos indicados se disolvieron uno a uno en agua destilada, formando así las soluciones concentradas: stock A, stock B, stock C, stock D.

- **Preparación de stock A:** de sales para lo que se pesaron: NH_4NO_3 35,0 g, KNO_3 40,0 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10,3 g, KH_2PO_4 3,5 g, H_3BO_3 0,1 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,4 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, KI 0,02 g, NaMoO_4 0,004 g, para ser disueltos en 200 ml de agua destilada, lo que se puede conservar, debidamente etiquetado a 4°C.

En segundo lugar se pesaron 5 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y se disolvió en 100 ml de agua destilada. Finalmente a un litro de la solución anterior se le adicionó 200 ml. de agua destilada; para conservarlos debidamente etiquetado a 4°C.

- **Preparación de stock B:** Se pesó 3,7 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y se disolvió en 100 ml. de agua destilada, posteriormente se etiquetó y conservó a 4°C.
- **Preparación de stock C:** Primero se pesaron 0,75 g de Na_2EDTA y se disolvió en 20 ml. de agua destilada caliente, se dejó enfriar. En segundo lugar se pesó 0,55 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y se disolvió en 20 ml. de agua destilada, finalmente se mezclaron las soluciones anteriores y completaron hasta 100 ml. con agua destilada, se conservó en un frasco oscuro, debidamente etiquetado a 4°C.
- **Preparación de stock D:** Para este stock de vitaminas se pesaron: tiamina 20 mg, glicina 100 mg, ácido nicotínico 25 mg, y piridoxina 25 mg. Se disolvió en

500 ml de agua destilada, mezcló y repartió en frascos de 200 ml, se rotuló y se mantuvieron a 0°C.

- **Preparación de solución de bencil aminopurina BAP**
solución concentrada de BAP 1000 ppm: Se pesó 0,2 g de BAP y se disolvió con algunas gotas de NaOH 1N, luego se añadió 200 ml de agua destilada. Se guardó en un frasco debidamente rotulado y se conservó a 0 °C. Un ml de la solución concentrada (1000 ppm) contiene 1mg de BAP.

B. Preparación de medios de cultivo:

- **Preparación de medio base MS 1/2:** se mezcló 50 ml de solución de stock A, 5 ml de solución stock B, 5 ml de solución stock C, 10 ml de solución stock D, 100 mg de mioinositol, 30 g de sucrosa. Luego se completó y enrrasó en una fiola de 1000 ml con agua destilada. se repartió en cuatro vasos de precipitados, y se agregó la bencil aminopurina a 0,5; 1,0; 1,5; y 2,0 mg/L respectivamente. Se procedió a medir el pH y ajustar a 5,6. Posteriormente se agregó el gelificante y se disolvió

en caliente. Finalmente se repartió en tubos de ensayo, para luego ser esterilizados en autoclave (121,1°C; 15 lb. de presión por 20 minutos).

- **Preparación de medio base MS completo:** se mezcló 100 ml de solución de stock A, 10 ml de solución stock B, 5 ml de solución stock C, 10 ml de solución stock D, 100 mg de mioinositol, 30 g de sucrosa. Luego se completó y enrrasó en una fiola de 1000 ml con agua destilada. se repartió en cuatro vasos de precipitados, y se agregó la bencil aminopurina a 0,5; 1,0; 1,5; y 2,0 mg / L respectivamente. Se procedió a medir el pH y ajustar a 5,6. Posteriormente se agregó el gelificante y se disolvió en caliente. Finalmente se repartió en tubos de ensayo, para luego ser esterilizados en autoclave (121,1°C, 15 lb. de presión por 20 minutos).

C. Introducción a condiciones *in vitro*:

Este proceso consta de dos etapas y su éxito depende principalmente de la fase de desinfección del explante.

- **Desinfección en el invernadero:** En esta etapa se recolectó los esquejes de la planta madre. Estos esquejes se lavaron con Benlate a 1000 ppm y se les quitó las hojas marchitas o dañadas con ayuda de un bisturí.

- **Desinfección en el laboratorio:** En esta etapa se realizó dos procesos de desinfección.

La primera desinfección; se realizó en la sala de esterilización propiamente dicha, donde se extrajeron las yemas recolectadas y se las lavó con detergente, inmediatamente se procedió a enjuagar cada uno de los esquejes con abundante agua. Luego se colocó los esquejes en una solución de Benlate 1000 ppm por 15 minutos, se pasó luego en alcohol de 70% (por cuatro segundos), se lavó en una solución de hipoclorito de sodio al 20% y se mantuvieron allí por diez minutos. (Al finalizar cada paso se enjuagó con abundante agua destilada).

La segunda desinfección; se realizó en la cámara de flujo laminar; donde primero se pusieron los explantes (yemas) en alcohol de 70% por cuatro segundos, se enjuagó con agua destilada, luego se pasó a hipoclorito de sodio 20% por 5 minutos y se enjuagó tres veces en agua destilada estéril.

Se esterilizó las placas petri, la cámara de flujo laminar, se limpió la mesa de trabajo con alcohol de 96%, se desinfectó las manos y esterilizó los instrumentos de metal (pinzas, bisturís, escalpelo, etc.) a llama del mechero. Así también se flameó la boca de los tubos o frascos cada vez que se destapó o tapó cualquiera de éstos. Se destapó un tubo con el medio fresco estéril y se procedió a colocar el nudo en el interior de tubo; tratando de hundir ligeramente en el medio por un extremo, haciendo que la yema esté siempre hacia arriba. Se flameó y tapó el tubo. Se selló el tubo con parafilm; se rotuló correctamente y se llevó a incubar.

D. La micropropagación:

La micropropagación es un procedimiento que se realiza para obtener un mayor número de plantas.

El procedimiento consiste:

- En esterilizar las placas petri, la cámara de flujo laminar, la mesa de trabajo. Luego, se esteriliza los instrumentos de metal a llama de mechero y se colocó todo el material metálico en una placa petri estéril. Así también se flameó la boca de los tubos cada vez que se destapó o tapó cualquiera de éstos.
- Posteriormente se destapó el tubo que contiene el explante; se extrajo el explante y se colocó sobre una placa petri, con ayuda de pinza y bisturí. Luego se quitaron las hojas y cortaron en los entrenudos, teniendo cuidado en no dañar al explante.
- Se destapó un tubo con medio fresco estéril y se procedió a colocar el nudo en el interior de tubo; tratando de hundir ligeramente en el medio por un extremo,

haciendo que la yema esté siempre hacia arriba. Se flameó y tapó el tubo.

- Se selló el tubo con parafilm; se rotuló correctamente y se llevó a incubar.

3.7. Análisis estadístico:

Los resultados se sometieron analizaron mediante análisis de varianza bajo el modelo de diseño completamente aleatorio con arreglo factorial a una prueba de F de 0,05 y 0,01 de probabilidad.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Supervivencia

La evaluación de supervivencia en la introducción al sistema de cultivo *in vitro* se realizó a los siete días de la siembra. Los resultados se presentan en el cuadro 2, en el cual se muestra el total de explantes supervivientes, encontrándose un promedio de 93,1% de explantes supervivientes.

Cuadro 2: Porcentaje de supervivencia de explantes de tomillo. Tacna 2009.

Trat.	Explantos introducidos	Explantos contaminados	Explantos fenolizados	Explantos supervivientes	Supervivencia (%)
a1b1	20	0	0	20	100
a1b2	20	0	1	19	95
a1b3	20	0	0	20	100
a1b4	20	1	2	17	85
a2b1	20	0	0	20	100
a2b2	20	2	1	17	85
a2b3	20	0	0	20	100
a2b4	20	2	2	16	80
				Total	93,1

Fuente: Elaboración propia

La evaluación de acuerdo al trabajo de investigación de Centeno (2009) obtuvo 72% de sobrevivencia, esto puede ser debido a que la extracción de material vegetativo (yemas uninodales) fueron de plantas madres cultivadas en condiciones de vivero, sin embargo, en el presente trabajo de investigación se obtuvo un 93,1% de sobrevivencia, debido a que las plantas madres de donde se extrajeron los explantes uninodales se encontraban en condiciones de invernadero, donde existe un mayor control fitosanitario, por ello se obtuvo un mayor porcentaje de sobrevivencia.

4.2. Altura de plántula de tomillo en la etapa de introducción al cultivo *In vitro*.

De acuerdo al análisis de varianza frente a la influencia de las concentraciones de medio de cultivo y de citokinina, no existe diferencias significativas para los factores A y B.

Cuadro 3. Análisis de varianza para altura de plántula (mm) en la introducción a cultivo *in vitro* del tomillo. Tacna 2009.

F.V.	G.L.	SC	CM	FC	FT		
A	1	0,4	0,4	1	4,15	7,50	N.S.
B	3	1,2	0,4	1	2,90	4,46	N.S.
AB	3	1,8E-12	6,1E-13	1,52E-12	2,90	4,46	N.S.
Error exp.	32	12,8	0,4				
total	39	14,4					

Fuente: Elaboración propia

C. V. 3,55 %

En promedio, la plántula alcanzó una altura de 17,8 mm en las diferentes combinaciones de niveles de medio de cultivo y de citokinina (BAP).

De acuerdo al comportamiento del material introducido *in vitro*, se pudo observar que el tomillo respondió positivamente a una organogénesis directa; es decir, la totipotencialidad se expresa mediante la formación de brotes directamente, sin la necesidad de la formación de callos como sucede en otras especies.

Se ha podido observar que los explantes colocados en el medio de cultivo tienen una respuesta sensorial positiva, ya que la exposición a una iluminación programada posibilita el

surgimiento de brotes con foliolos pigmentados de color verde, lo que evidencia la presencia de clorofila.

De acuerdo a las observaciones realizadas en el presente trabajo, se pudo establecer que el meristemo del explante nodal, no solamente reproduce el meristemo; sino también hojas, lo que nos indica que el meristemo apical tiene una estructura compleja.

Como se verá posteriormente la formación de hojas será un indicador para la formación de nudos en las nuevas plántulas y consecuentemente los entrenudos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la citocinina suministrada al medio no tuvo un efecto estimulante en el crecimiento y diferenciación de tallos, lo que es corroborado mediante el análisis de varianza para este indicador, lo más probable que tenga una relación directa con la poca presencia de raíces en la etapa de introducción del material.

4.3. Número de nudos por plántula en la etapa de introducción al cultivo *In vitro*.

De acuerdo al análisis de varianza para la variable número de nudos por plántula, en la etapa de introducción, las combinaciones de niveles de medio de cultivo MS y de citokinina no presentaron diferencias significativas estadísticamente.

Cuadro 4: Análisis de varianza para número de nudos por plántula en la etapa de introducción *in vitro* del tomillo. Tacna 2009.

F.V.	G.L.	SC	CM	FC	FT	
A	1	0,015	0,015	0,429	4,15	7,50 N.S.
B	3	0,058	0,019	0,541	2,90	4,46 N.S.
AB	3	0,005	0,002	0,048	2,90	4,46 N.S.
Error exp.	32	1,149	0,036			
Total	39	1,228				

Fuente: Elaboración propia

C.V. 4,67 %

Con relación al número de nudos se puede afirmar que en el caso de tomillo, como sucede en la mayoría de las especies; se requiere cierto espacio mínimo para el surgimiento

de los primordios foliares, consecuentemente los nudos y los espacios entre nudos; esto debe implicar un estudio a nivel del tejido vegetal, con la finalidad de conocer si este espacio responde a un número determinado de células o es la modificación que puede surgir producto de alargamiento celular o incremento de volúmenes de estructuras celulares, alargamiento del meristemo, etc. que no fue posible analizar por las características de requerirse protocolos específicos. Sin embargo, se puede presumir que es muy probable, también el efecto de promotores, dentro de los que se encuentran las citokininas.

El efecto de la citokinina en el presente trabajo, indica que a pesar de no haber tenido una influencia estimuladora en el espacio físico, se puede presumir que sí tuvo una incidencia atenuando el efecto de los inhibidores naturales, ya que el número de nudos formados comparando con los resultados de acuerdo al trabajo de investigación de Centeno (2009), para la variable número de nudos por plántula evaluados a los 35 días, se determinó que el 34% de los plántula presentó 4 a 10 nudos por plántula, en comparación al presente trabajo, se obtuvo de 12 a 16 nudos a los 42 días de evaluación.

4.4. Altura de plántula en la etapa de micropropagación *In vitro* de tomillo.

De acuerdo al análisis de varianza, no se encontró diferencias significativas para los factores medio de cultivo ni citokinina.

Cuadro 5: Análisis de varianza para altura de plántula (mm) en la micropropagación *in vitro* del tomillo. Tacna 2009.

F.V.	G.L.	SC	CM	FC	FT		
A	1	3,6	3,60	3,945	4,15	7,50	N.S.
B	3	2,1	0,70	0,767	2,90	4,46	N.S.
AB	3	6,2	2,07	2,264	2,90	4,46	N.S.
Error exp.	32	29,2	0,91				
total	39	41,1					

Fuente: Elaboración propia

C. V. 2,20 %

En promedio, la plántula alcanzó una altura de 43,5 mm en las diferentes combinaciones de los niveles de medio de cultivo y citokinina (BAP).

4.5. Número de nudos por plántula en la etapa de micropropagación *In vitro*.

De acuerdo al análisis de varianza frente a la influencia de los niveles de medio de cultivo MS y de citokinina, no se encontró diferencias significativas para el factor A medio de cultivo ni diferencias para el factor B citokinina,

Cuadro 6: Análisis de varianza para número de nudos por plántula en la micropropagación *in vitro* del tomillo.

Tacna 2009.

F.V.	g.l.	sc	cm	fc	FT	
A	1	0,004	0,0433	0,187	4,15	7,50 N.S.
B	3	0,010	0,0033	0,144	2,90	4,46 N.S.
AB	3	0,004	0,0016	0,069	2,90	4,46 N.S.
Error exp.	32	0,742	0,0232			
total	39	0,761				

Fuente: Elaboración propia

C. V. 3,23 %

La presencia del estimulante en la siguiente etapa, es decir la multiplicación, confirma nuestra presunción en el sentido que la citokinina, al parecer, disminuye el efecto de los inhibidores naturales promoviendo la formación de mayor

número de entrenudos, lo que facilitará sustancialmente una multiplicación masiva del material vegetal de tomillo.

4.6. Longitud de raíz

De acuerdo al análisis de varianza para la variable longitud de raíz frente a la influencia del medio de cultivo y la citokinina, no existen diferencias significativas.

Cuadro 7: Análisis de varianza para longitud de raíz (mm) en la micropropagación *in vitro* del tomillo. Tacna 2009.

F.V.	G.L.	SC	CM	FC	FT	
A	1	0,4	0,40	0,2735	4,15	7,50 N.S.
B	3	0,8	0,27	0,1823	2,90	4,46 N.S.
AB	3	8,4	2,80	1,9145	2,90	4,46 N.S.
Error exp.	32	46,8	1,46			
Total	39	56,4				

Fuente: Elaboración propia

C. V. 5,10%

En promedio, las raíces alcanzaron una longitud promedio de 20,8 mm en las diferentes combinaciones de niveles de medio de cultivo y citokinina.

Los resultados muestran que la presencia de citokinina es necesaria durante la formación de las raíces y de acuerdo a estos resultados muestra una incidencia en la velocidad de crecimiento del sistema radicular, transcurrido los 42 días las raicillas alcanzaron una longitud por encima de los 20 mm.

En el proceso de formación de raíces juegan un papel determinante la presencia de hojas ya que a partir de éstas se generan otros promotores, como auxinas que en combinación con las citokininas incidirán en la formación de raíces.

V. CONCLUSIONES

- En cuanto a la variable sobrevivencia, un 6,9% de explantes presentaron contaminación por bacterias y fenolización, obteniéndose un 93,1% de sobrevivencia de explante.

- En la etapa de introducción del tomillo (*Thymus vulgaris* L.) al sistema de cultivo *in vitro*, en relación a los factores "A" y "B" con sus diferentes niveles de concentración, se concluye que para la variable altura de plántula no presentó un efecto significativo, obteniéndose alturas de plántula entre 17,6 a 18,2 mm.

- En la etapa de introducción, para la variable altura de plántula, la combinación de medio de cultivo MS completo y 1,5 mg / L de BAP, fue la que obtuvo mayor altura de plántula (18,2 mm.); asimismo, las combinaciones de medio MS ½ y 0,5 mg / L; medio MS ½ y 1,0 mg / L; medio MS ½ y 2,0 mg / L obtuvieron la menor altura de plántula (17,6 mm.).

- En la etapa de micropropagación *in vitro* del tomillo (*Thymus vulgaris* L.), para la variable altura de plántula a la sexta semana de evaluación, la combinación de medio de cultivo MS completo y 2,0 mg / L de citokinina (BAP), fue la que obtuvo mayor altura de plántula (44,4 mm); asimismo, la combinación de medio MS ½ y 0,5 mg / L obtuvo la menor altura de plántula (42,6 mm).

- Para la variable número de nudos por plántula en la etapa de introducción y micropropagación, la combinación de medio de cultivo MS completo y 1,5 mg / L de citokinina (BAP), fue la que obtuvo mayor número de nudos por plántula (14 y 20 respectivamente); asimismo, la combinación de medio MS ½ y 0,5 mg / L de citokinina obtuvieron el menor número de nudos por plántula (12 y 18 respectivamente).

- Para la variable longitud de raíz, la combinación de medio de cultivo MS completo y 1,5 mg / L de BAP, fue la que obtuvo mayor longitud de raíz (21,4 mm); asimismo, la combinación de medio MS completo y 0,5 mg / L de BAP obtuvo la menor longitud de raíz (20,0 mm).

VI. RECOMENDACIONES.

- Es necesario contar con plantas madre donadores de explantes sanas y de buenas características agronómicas.
- Utilizar el medio de cultivo MS a 50% de concentración, en la etapa de introducción al cultivo *in vitro* de tomillo.
- En base a los resultados obtenidos se recomienda hacer ensayos con otros niveles de bencil aminopurina en cultivo *in vitro* de tomillo.
- Se recomienda hacer ensayos con diferentes dosis de ácido giberélico (AG3) para aumentar la altura de la planta, además de los tratamientos utilizados.
- Se recomienda hacer ensayos con diferentes dosis de ácido indol butírico (AIB) en la etapa de enraizamiento.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. BANDA C., Mercedes. 1998. Respuesta de la Vid (*Vitis vinífera* L.)
Var. R -99 a la Micropropagación *In vitro*.
Tesis. Tacna – Perú. 112 pp.
2. CENTENO T., Jhon. 2009. Evaluación del cultivo *in vitro* de tomillo
(*Thymus vulgaris* L.). Trabajo de
investigación. Tacna – Perú. 82 pp.
3. CENTRO DE AGRONEGOCIOS SANTA FÉ. 2007. Perfil del
Mercado del Tomillo. Boletín. Tegucigalpa -
Honduras. 14 pp.
4. CHAMBE CH., Elizabeth. 2008. Introducción al sistema de cultivo *in vitro* de cinco ecotipos de orégano
(*Origanum vulgare* L.) en condiciones de
laboratorio. Tesis. Tacna –Perú. 120 pp.
5. CHAVEZ A., René. 1991. Cultivo *In vitro* en el Mejoramiento
genético de las Plantas. Revista Nueva
Imagen- UNJBG. Tacna-Perú. 26 pp.

6. DELGADO DE LA FLOR, Francisco. 1986. Características básicas y económicas del cultivo de hierbas de sabor. Lima – Perú. 140 pp.
7. DI FABIO, Amanda. 2007. Aromáticas y Medicinales. Mendoza – Argentina. 190 pp.
8. ESCALANTE, B.; 1998. Cultivos *in vitro* de Papa-Principios y Metodología. 1º Edición. VOL. I. CONCYTEC. Lima-Perú. 14 pp.
9. FAO, Estudios y protección Vegetal. 1990. Fundamentos Teóricos-Prácticos del Cultivo de tejidos Vegetales ISBN 92-5-3002996-x. 125 pp.
10. FERNANDEZ C., O. y O. Ale. 2003. Cultivo de Plantas Aromáticas y Medicinales en la Región Tacna. Tacna – Perú. 56 pp.

11. FERNANDEZ-POLA, J. (1996): Cultivo de plantas medicinales, aromáticas y condimenticias, Ediciones Omega, S.A. Barcelona - España. 126 pp.
12. GAMBORG, O. L. And J. Shyluk. 1981. Nutrition media and characteristics of plant cell and tissue cultures. In: Plant Tissue Culture Pres, Nueva York - Estados Unidos. 155 pp.
13. HARTMANN, Hudson T. y D. Kester. 1980. Propagación de plantas: principios y prácticas. Editorial Continental S.A. D.F. – México. 815 pp.
14. HURTADO, M. Daniel; M. MERINO, 1994. Cultivo de Tejidos Vegetales. México. 256 pp.
15. JONES, Samuel. 1988. Sistemática Vegetal. 2º Edición. Universidad Autónoma de México. México. 335 pp.

16. MINISTERIO DE LA MUJER Y DESARROLLO SOCIAL. 2007.
Producción de Plantas Aromáticas y Medicinales. Ayacucho – Perú. 35 pp.
17. MIÑANO M., René F. 2003. Evaluación y selección de genotipos de papa (*Solanum tuberosum* L.) de calidad industrial para resistencia a *Phytophthora infestans* bajo condiciones *In vitro*. Tesis. Tacna – Perú. 110 pp.
18. MÓDULO DE SERVICIOS TACNA – CITE AGROINDUSTRIAL. 2009. Las plantas aromáticas y medicinales. Descripción de las especies. Boletín Setiembre. Tacna – Perú. 16 pp.
19. MONASTERIO P., Gladys. 1998. Evaluación del potencial de micropropagación masal de variedades mejoradas de papa (*Solanum tuberosum* L.) libre de patógenos. Tesis. Tacna – Perú. 122 pp.

20. MONTGOMERY, Douglas. 2006. Diseño y Análisis de Experimentos.
Editorial Limusa. México. 390 pp.
21. MUÑOZ LOPEZ DE B., Fernando. 1996. Plantas medicinales y
aromáticas. Editorial Mundi Prensa. Madrid –
España. 365 pp.
22. MUÑOZ V., Alberto. 1994. Plantas medicinales y su utilización
práctica. Editorial Ecoe. Bogotá – Colombia.
325 pp.
23. PADRÓN C., Emilio. 1996. Diseños Experimentales con aplicación a
la agricultura y ganadería. Editorial Trillas.
México. 415 pp.
24. PIERIK, R. L.; 1990. Cultivos *in vitro* de Plantas Superiores. 3º
Edición. Madrid-España. 326 pp.
25. PONCE N., Elio. 2008. Manual del cultivo de tomillo. Primera
Edición. El Taller. Arequipa – Perú. 36 pp.

26. QUOIRIN, Margarita. 1990. Los Cultivos de Tejidos Y Células Vegetales. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú.

27. ROCA, William y L. Mroginski. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura - Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali-Colombia. 970 pp.

28. ROJAS GARCIDUEÑAS, Manuel. 1993. Control Hormonal del Desarrollo de las Plantas. 2da. Edición. Editorial Limusa. México. 273 pp.

29. SARAY SIURA. 2002. Cultivo de hierbas aromáticas. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima – Perú. 25 pp.

30. SCHAUBENBERG, Paul. 1980. Guía de las Plantas Medicinales. Editorial Omega. Barcelona – España. 145 pp.

31. STEEL, D. 1986. Bioestadística: principios y procedimientos. 2º Edición. Editorial Mc Graw Hill. Estados Unidos. 445 pp.

32. TOLEDO, J.; N. Espinoza y A. Golmirzaie, 1998. Cultivo de tejidos. Centro Internacional de la papa. Lima – Perú. 46 pp.

33. VÁSQUEZ A., Víctor. 1990. Experimentación Agrícola. Amaru Editores. Lima – Perú. 365 pp.

34. WEAVER, Robert J. 1976. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. Editorial Trillas. México. 545 pp.

ANEXOS

Anexo 1:

Costos de producción de 5000 plantas en 3,5 meses

RUBRO	Unidad	Cantidad	Precio Unitario	Total
Insumos				
Medio de cultivo	L	18,50	11,0	203,50
Hojas de bisturí		4,00	1,0	4,00
Algodón	kg	0,25	20,0	5,00
Alcohol 96°	L	4,00	6,0	24,00
Papel aluminio	Rollo	2,00	8,0	16,00
Parafilm	Rollo	2,00	8,0	16,00
Turba	Saco	3,00	20,0	60,00
Detergente	kg	0,50	8,0	4,00
Lejía	L	3,00	3,8	11,40
Fungicida	kg	0,50	200,0	100,00
			SUB TOTAL	443,90
Materiales				
Speedling		37,00	8,0	296,00
Marcadores		3,00	2,5	7,50
Vasos descartables	Ciento	50,00	3,0	150,00
				453,50
Mano de obra				
Laboratorista	Jornales	30,00	25,0	750,00
Obrero	Jornales	30,00	15,0	450,00
			SUB TOTAL	1 200,00
Otros				
Energía eléctrica		130	4,0	520,00
Agua		30	4,0	120,00
			SUB TOTAL	640,00
TOTAL				2737,40

Fuente: Elaboración propia

Análisis económico

Valor bruto de la producción:		SI. 10 000
Costos variables	:	SI. 2 737,4
Costos fijos	:	SI. 273,74
Costo total de la producción:		SI. 3 011,14
Utilidad bruta	:	SI. 6 988,86
Rentabilidad	:	2,3
Costo unitario	:	SI. 0,55

Anexo 2:

Composición del Medio Murashige & y Skoog

Constituyentes	Concentración (mg/L)	
	Completo	1/2
Sales menores		
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
	4530	2265
Sales menores		
H ₃ BO ₃	6,200	3,1000
MnSO ₄ .H ₂ O	16,800	8,4000
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,600	4,3000
KI	0,840	0,4200
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250	0,1250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,0125
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,0125
	32,740	16,3700
Hierro		
Na ₂ EDTA	37,300	18,650
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,800	13,900
	65,100	32,550
mg/L	4627,84	2313,92

Fuente: Elaboración propia

Anexo 3:

Componentes orgánicos del medio de cultivo

Componentes orgánicos	Concentración	
Tiamina	0,1	mg/L
Mioinositol	100,0	mg/L
Glicina	2,0	mg/L
Ácido nicotínico	0,5	mg/L
Piridoxina	0,5	mg/L
Agar	3,8	g/L
Azúcar	30,0	g/L

Fuente: Elaboración propia

Anexo 4:

Altura de plántula en la etapa de introducción *In vitro* del tomillo a los 42 días (mm)

T1 a1b1	T2 a1b2	T3 a1b3	T4 a1b4	T5 a2b1	T6 a2b2	T7 a2b3	T8 a2b4
17	18	19	17	19	18	19	18
18	17	18	18	18	18	18	18
17	18	18	18	18	18	18	19
18	18	18	18	17	17	18	17
18	17	17	17	17	18	18	17
17,6	17,6	18,0	17,6	17,8	17,8	18,2	17,8

Fuente: Elaboración propia

Anexo 5:

Número de nudos por plántula en la etapa de introducción al sistema de cultivo *In vitro* del tomillo a los 42 días

T1 a1b1	T2 a1b2	T3 a1b3	T4 a1b4	T5 a2b1	T6 a2b2	T7 a2b3	T8 a2b4
12	14	12	16	12	12	12	16
14	14	14	14	14	14	14	14
12	12	16	12	14	16	16	14
12	12	12	12	12	12	14	12
14	14	14	14	14	14	14	12
12,8	13,2	13,6	13,6	13,2	13,6	14,0	13,6

Fuente: Elaboración propia

Anexo 6:

Altura de plántula en la etapa de micropropagación *In vitro* de tomillo a los 42 días (mm)

T1 a1b1	T2 a1b2	T3 a1b3	T4 a1b4	T5 a2b1	T6 a2b2	T7 a2b3	T8 a2b4
44	44	43	42	44	44	43	44
43	43	43	42	43	43	45	43
43	44	43	44	43	42	42	44
44	43	42	43	42	45	44	45
43	42	42	44	42	44	45	46
43,4	43,2	42,6	43,0	42,8	43,6	43,8	44,4

Fuente: Elaboración propia

Anexo 7:

Número de nudos por plántula en la etapa de micropropagación *In vitro* del tomillo a los 42 días

T1 a1b1	T2 a1b2	T3 a1b3	T4 a1b4	T5 a2b1	T6 a2b2	T7 a2b3	T8 a2b4
18	20	18	20	18	18	22	20
20	18	22	18	18	18	18	20
20	18	20	22	20	20	20	18
18	20	20	20	22	22	20	20
18	20	18	18	18	18	18	18
18,8	19,2	19,6	19,6	19,2	19,2	19,6	19,2

Fuente: Elaboración propia

Anexo 8:

Longitud de raíz de plántula en la etapa de enraizamiento en el cultivo *In vitro* del tomillo a los 42 días (mm)

T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
a1b1	a1b2	a1b3	a1b4	a2b1	a2b2	a2b3	a2b4
20	19	19	19	20	21	22	21
21	21	21	21	19	22	23	22
22	22	20	20	20	21	21	22
23	22	22	21	23	20	20	21
20	21	19	21	18	21	21	20
21,2	21,0	20,2	20,4	20,0	21,1	21,4	21,2

Fuente: Elaboración propia