

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

EL USO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

PARA LA MICROPROPAGACION DE

Tillandsia ionantha scaposa* y *Tillandsia magnusiana

Rosemarie Bressani Herman



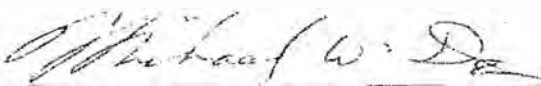
**Trabajo de investigación presentado para optar
al grado de Licenciatura en Biología**

Guatemala

1994

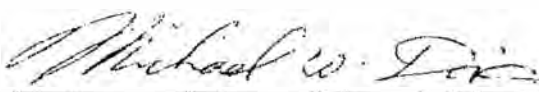
**EL USO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES
PARA LA MICROPROPAGACION DE
Tillandsia ionantha scaposa y *Tillandsia magnusiana***

Vo. Bo. :

(f): 

Dr. Michael Dix

Tribunal:

(f): 

Dr. Michael Dix

(f): 

Dr. Margaret Dix

(f): 

Lic. Margarita Palmieri de Mata

Fecha de aprobación: 27 de septiembre de 1994

DEDICATORIA:

A Dios

A mis padres

A mis hermanos

A Gustavo

A mis familiares y amigos

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Michael Dix por su valiosa ayuda e interés en la asesoría del presente trabajo, por su confianza y por todo lo que me enseñó durante mi carrera.

A la Dra. Margaret Dix por la orientación que me brindó a lo largo de mi carrera y en todo el desarrollo de esta investigación.

A la Lic. Margarita P. de Mata por sus sugerencias y apoyo.

Al Lic. Rony Perez por su desinteresada ayuda en la interpretación del análisis estadístico, sus cursos de computación, y por todo el tiempo que utilizó en ayudarme.

Al Lic. Francois Herrera y MsC. Helda Morales por su ayuda en el análisis de resultados.

A mis padres por su apoyo, confianza y paciencia brindados a lo largo de mi vida.

Al Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala por facilitarme sus instalaciones para el desarrollo del presente trabajo.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCION	1
II. JUSTIFICACION	18
III. MATERIALES Y METODOS	19
IV. RESULTADOS	28
V. DISCUSION	36
VI. CONCLUSIONES	46
VII. LITERATURA CITADA	47
APENDICES	
1. Lista de las especies del género <i>Tillandsia</i> que existen en Guatemala.	49
2. Limpieza de la cristalería.	51
3. Preparación de las cajas de Petri y del agua destilada estéril.	52
4. Componentes de los medios de cultivo de Murashige y Skoog (1962) y Knudson C (1946).	53
5. Preparación de las soluciones madre de los medios de cultivo utilizados y de la benciladenina.	54
6. Descripción de la preparación de los medios de cultivo para cada tratamiento.	57
7. Análisis estadístico.	59

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro	Página
1. Grupos del género <i>Tillandsia</i> según su peligrosidad de extinción.	6
2. Tratamientos empleados para evaluar los efectos de concentración de medio de cultivo MS y benciladenina sobre la altura y número de brotes de <i>Tillandsia spp.</i>	20
3. Porcentaje de contaminación de los cultivos de <i>Tillandsia ionantha scaposa</i> y <i>Tillandsia magnusiana</i> .	29
4. Comparación de la altura alcanzada por <i>Tillandsia ionantha scaposa</i> (N=14/trat) según la concentración del medio de cultivo y de la benciladenina.	30
5. Comparación del número de brotes producidos en <i>T. ionantha scaposa</i> (N=14/trat) según la concentración del medio de cultivo y de la benciladenina.	32
6. Comparación de la altura alcanzada por brotes de <i>T. ionantha scaposa</i> trasladados a medios MS/2 sin regulador de crecimiento, según la concentración original del medio de cultivo y de benciladenina.	33
7. Comparación del número de brotes producidos en <i>T. ionantha scaposa</i> trasladados a medio MS/2 sin regulador de crecimiento, según la concentración original del medio de cultivo y la concentración de benciladenina.	34

Figura	Página
1. Diagrama de flujo de la metodología.	24
2. Comparación de la altura alcanzada por brotes de <i>T. ionantha scaposa</i> según la concentración del medio de cultivo y la benciladenina.	40
3. Comparación del número de brotes producidos en <i>T. ionantha scaposa</i> según la concentración del medio de cultivo y benciladenina.	41
4. Comparación de la altura alcanzada por brotes de <i>T. ionantha scaposa</i> trasladados a medio MS/2 sin regulador de crecimiento, según la concentración inicial del medio de cultivo y benciladenina.	43
5. Comparación del número de brotes producidos en <i>T. ionantha scaposa</i> trasladados a medio MS/2 sin regulador de crecimiento, según la concentración inicial del medio de cultivo y benciladenina.	44

RESUMEN

Se sembraron ápices meristemáticos de *Tillandsia ionantha scaposa* y *Tillandsia magnusiana* con el objeto de desarrollar un método de micropropagación para éstas especies y así mismo ayudar en su conservación.

Para la desinfección de los ápices, se utilizaron dos concentraciones de cloro comercial (5.25% NaOCl), siendo éstas, cloro al 50% y cloro al 100%. Se recomienda el uso del tratamiento con cloro al 100%, ya que fue el más seguro para evitar la contaminación de los ápices meristemáticos de *Tillandsia ionantha scaposa* y *Tillandsia magnusiana*. Debido a la falta de material uniforme, por contaminación y falta de reproducción, se eliminó del estudio a la *Tillandsia magnusiana*.

Los ápices meristemáticos de *T. ionantha scaposa*, se sembraron en medio de cultivo de Murashige y Skoog completo y diluido a la mitad y a un cuarto de su concentración original. Cada una de éstas diluciones fueron suplementadas con 0, 0.5 y 1.0mg/l de la hormona benciladenina, con el fin de evaluar el efecto del medio de cultivo y de la benciladenina en la producción de brotes y en el crecimiento de éstos.

Bajo condiciones de luz y temperatura controlados, se obtuvo mayor producción de brotes en los medios con alguna concentración

de benciladenina especialmente en los medios que contenían 0.5mg/l de benciladenina. Los tratamientos sin benciladenina produjeron menor número de brotes, pero estos crecieron más en altura. El efecto del medio de cultivo, no fue consistente. Sin embargo, para fines comerciales, se recomienda el uso del medio diluído a un cuarto de su concentración. Se observó que al pasar los brotes producidos en los diferentes tratamientos a un medio diluído a la mitad y sin reguladores de crecimiento, éstos conservaron su comportamiento en cuanto a producción de brotes y crecimiento, es decir, se habituaron.

Para iniciar el estudio, se utilizaron 86 plantas de *T. ionantha scaposa* y al final del mismo, tres meses, se tenían 6641 plantas, lo que indica que la micropropagación es un método de propagación más rápido que el convencional para la multiplicación de esta especie.

I. INTRODUCCION

A. El género *Tillandsia* y sus características.

Tillandsia es el género de la familia Bromeliaceae con el mayor número de especies. Se puede encontrar desde la parte sur de los Estados Unidos, hasta el sur de la Argentina (Padilla, 1973). La mayoría de especies son nativas de América Latina y a pesar de que la mayoría prosperan en habitats húmedos, las especies de *Tillandsia* más populares proliferan en ambientes sujetos a sequía y/o aridez. Generalmente se les encuentra creciendo expuestas a la luz solar, adheridas, solas o en grupos en varios tipos de cactus, arbustos espinosos viejos o árboles, rocas, riscos o directamente en suelo rocoso o arenoso (Isley, 1987).

Son plantas cuyo mantenimiento es fácil. Almacenan una provisión de agua entre un centro natural, en forma de vaso, formado por su follaje duradero. Su sistema radicular les sirve mayormente como un medio de adhesión a árboles, rocas u otro hospedero. Mientras reciban la humedad necesaria a través del embudo central, podrán pasar sin raíces por un período considerable de tiempo (Graf, 1982). Tienen escamas en sus hojas que sirven como un sistema notable de absorción (Padilla, 1973).

Las tilansias varían grandemente en tamaño, forma y textura. La cubierta peluda de las hojas consiste en pelos foliares llamados tricomas o escamas de piel. A pesar de que los tricomas están presentes en muchas formas de vida de las plantas, están altamente desarrolladas en especies xéricas de *Tillandsia*. Cuando llueve o hay niebla en el aire, estas escamas rápidamente transfieren el agua de la superficie de la hoja a unas células internas agrandadas. Las escamas ayudan a las plantas en un número de otras funciones importantes. En algunas especies que reciben humedad a intervalos frecuentes, las alas tricómicas son verticales a la superficie de la hoja, a manera de facilitar que la epidermis se seque. En otras, las alas están paralelas a la epidermis para aislar a las hojas del calor extremo. Otra función valiosa llevada a cabo por los tricomas, es el de reflejar el exceso de luz solar que puede dañar la hoja.

Una de las características más interesantes de este género, es que tiene una increíble diversidad de especies. Probablemente ningún otro género y pocas familias, son tan distintas morfológicamente (en apariencia) (Isley, 1987).

Otra característica importante de estas plantas, es la belleza de sus flores. La intensidad y riqueza de los morados, rojos, rosados, amarillos y verdes, es verdaderamente algo digno de contemplar. El tiempo de duración de la espiga floral para las especies de crecimiento rápido, puede

ser sólo de dos o tres semanas. Para la mayoría es de un mes o dos, y para algunas de las más xéricas, especies lentas en crecer, puede ser hasta de un año (Isley, 1987).

Durante y después de la floración las tilansias, producen desde una, a una docena de plántulas llamadas retoños o brotes. Muchos producen retoños basitonaes, desde la base de las plantas (p.e. *T. ionantha* spp.); mientras que otros producen retoños acrotonales, de la base de la inflorescencia (p.e. *T. plumosa*). Algunas especies, producen retoños desde las axilas foliares a lo largo del tallo. Otras los producen en la inflorescencia y otras producen retoños como que fueran estolones (Isley, 1987).

Los retoños, gradualmente crecen a tamaño adulto, de uno a cuatro años, mientras que la planta madre, gradualmente se muere en el espacio de una generación a dos. De esta manera, igual que con la producción de semilla, la especie se perpetúa, incrementando su número a través de las generaciones. A pesar de que la planta madre se muere eventualmente, en muchas especies, mantiene su apariencia hasta que los retoños están lo suficientemente grandes (Isley, 1987).

Unas pocas especies de *Tillandsia* (p.e. *T. guatemalensis*) producen espigas florescipientes muy grandes con miles de semillas. La energía total de las plantas, está destinada a este esfuerzo por lo que no produce

retoños. Los retoños pueden desprenderse de la planta, cuando tienen la mitad del tamaño de la planta madre (Isley, 1987). Como se mencionó previamente, las tilansias se reproducen por semillas y brotes. En su habitat natural, se han adaptado a condiciones de movimientos de aire fresco y luz solar intensa. Si las tilansias produjeran semillas como muchas otras plantas, muchas de ellas caerían al suelo y la especie gradualmente se extinguiría. Pero las plantas han desarrollado una atadura como peluza algodonada en la cubierta de la semilla, que recibe el nombre de coma. Este aparato, tipo paracaídas, permite a la semilla que flote en corrientes de aire por distancias largas, permitiendo así que mantenga sus habitats arriba en los árboles, riscos, etc. También les permite colonizar nuevos sitios para habitar. El establecimiento de estas poblaciones, es uno de los factores importantes involucrados en la gran diversidad morfológica (física) entre el género. El pelo coma, así como el tricoma, indican un alto grado de especialización.

B. Las Tilansias en Guatemala.

En Guatemala existen 58 especies (Apéndice I) de *Tillandsia* distribuidas en los diferentes departamentos (Standley and Steyermark, 1952). Hay estudios que muestran que existe un número mayor (PRODECORP, 1990).

Las tilansias que se encuentran en Guatemala tienen

gran demanda en países como Alemania, Australia, Bélgica, Canadá, España, Estados Unidos, Francia, Holanda, Italia, Japón, Inglaterra, Suecia y Suiza, por su uso como plantas ornamentales. En 1991, se exportaron hacia esos países aproximadamente 474,657.20 kg de tilansias por un valor de Q4,100,557.61 (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, 1991).

En Guatemala hay 17 empresas o viveros registrados que cultivan y/o comercializan algunas de las 58 especies. La mayoría, se iniciaron en el negocio recolectando las plantas en el campo (CONAP, 1990). Generalmente, después de recolectadas, las colocan en los viveros sobre camas de sarán, y bajo sarán de 62% de sombra. A éstas, les llaman "maternidad". Estas plantas producen generalmente, después de la floración, 4 ó 5 hijos basales, que se separan de la planta madre cuando tienen la mitad del tamaño de ésta. Estos se colocan en otras camas y se separan por tamaños. A esta sección, se le llama "de crecimiento". En esta sección se mantienen, hasta que alcanzan el tamaño adecuado para ser comercializadas. Uno o dos hijuelos quedan en el vivero para luego transformarse en plantas madres y continuar así el ciclo de reproducción. Sin embargo, se hace esto únicamente con las especies que se reproducen y crecen en corto tiempo. En las variedades de ciclo corto, se ha logrado que después de haber obtenido el "stock" original del bosque, no sea necesario seguir haciendo extracciones de éste

(PRODECORP, 1990).

Algunos viveristas están reproduciendo sus plantas por semilla y aunque éstas germinan, las plantitas se mueren al poco tiempo (PRODECORP, 1990).

Las exportaciones, la falta de reproducción, la falta de conciencia de algunas personas y la "necesidad" de otras, son las causas por las cuales algunas especies de este género están en peligro de extinguirse. Existen ahora algunas leyes para protegerlas y los exportadores deben demostrar que reproducen estas plantas en sus viveros.

En base a los productores o exportadores, supervisores de la Comisión Nacional de Areas Protegidas y del botánico austriaco Werner Rauh, se han separado las tilandsias en tres grupos, según su estado de peligrosidad, siendo éstos:

Cuadro 1. Grupos del género *Tillandsia* según su peligrosidad de extinción.

Grupo 1

Incluye especies endémicas o muy restringidas, cuyas poblaciones están en peligro inmediato de extinción y que están amenazadas por el comercio internacional.

Tillandsia harrisii
T. ionantha scaposa
T. magnusiana
T. matudae
T. oaxacana

T. seleriana
T. streptophylla
T. velickiana
T. xerographica

Grupo 2

Incluye especies registradas que se encuentran en peligro mediato de extinción y que están amenazadas por el comercio.

<i>Tillandsia argentea</i>	<i>T. plagiotropica</i>
<i>T. bulbosa</i>	<i>T. pruinosa</i>
<i>T. brachycaulos multiflora</i>	<i>T. punctulata</i>
<i>T. filifolia</i>	

Grupo 3

Incluye especies de amplia distribución que son comercializadas a nivel internacional.

<i>Tillandsia acostae</i>	<i>T. ionantha ssp.</i>
<i>T. baileyi</i>	<i>T. juncea</i>
<i>T. balbisiana</i>	<i>T. juncifolia</i>
<i>T. brachycaulos abdita</i>	<i>T. macollana</i>
<i>T. butzii</i>	<i>T. melanocrater</i>
<i>T. caput medusae</i>	<i>T. polita</i>
<i>T. circinnata</i>	<i>T. schiedeana</i>
<i>T. fasciculata</i>	<i>T. sphaerocephala</i>
<i>T. festucoides</i>	<i>T. usneoides</i>
<i>T. guatemalensis</i>	<i>T. vicentina</i>

C. El cultivo de tejidos vegetales y sus posibles aplicaciones.

El cultivo de tejidos vegetales es la producción de plantas a partir de pequeñas partes de éstas, tejidos o células, cultivadas ascépticamente *in vitro*, donde el ambiente y la nutrición pueden ser estrictamente controlados.

Hay cuatro áreas en donde las aplicaciones de cultivo de tejidos vegetales son posibles, ya sea ahora, o en un futuro cercano: 1) producción de fármacos u otros productos naturales; 2) mejoramiento genético de los cultivos; 3) la obtención de clones libres de enfermedades y la conservación de germoplasmas valiosos; y 4) la

multiplicación clonal rápida (micropropagación) de variedades seleccionadas (Murashige, 1974).

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales ofrecen ventajas que podrían ser aprovechadas para la micropropagación de tilansias, evitando así su desaparición.

En la última década, la micropropagación por cultivo de tejidos vegetales, ha sido uno de los métodos más importantes para reproducir cultivos que son dificultosos de propagar por métodos convencionales, por ejemplo, semillas o estacas. La velocidad de la tecnología de cultivo de tejidos, se ha acelerado debido a su comercialización práctica en el mercado. La micropropagación por cultivo de tejidos, ofrece muchas ventajas únicas, comparadas con otros métodos de propagación, entre éstas:

- multiplicación rápida de material clonal único
- uniformidad del producto por el control total del sistema de producción
- alto volumen de propagación en un corto período de tiempo
- comercialización de plantas heterocigóticas
- comercialización de productos genéticamente modificados
- almacenaje de germoplasma para producción y bancos genéticos
- mejoramiento del fenotipo por manipulación en laboratorio
- plantas libres de enfermedades por cultivo de meristemas y/o combinación con otras técnicas
- movimiento fácil de productos certificados libres de

patógenos

- producción de plantas fuera de época por el control total del sistema de producción.

Por estas razones, la micropropagación por cultivo de tejidos, será el método a utilizar para industrializar la producción de plantas (Chu, 1989).

Sin embargo, el cultivo de tejidos vegetales tiene sus desventajas entre estas:

- las facilidades son costosas, y la propagación comercial de muchas plantas por este método puede no ser rentable
- hay necesidad de uso de personal calificado para el proceso
- pueden ocurrir variaciones genéticas y pasar desapercibidas
- hay necesidad de tener metodologías de verificación de la pureza de los cultivos (genética y patogénica) (Hartmann y Kester, 1983).

1. Las etapas en el cultivo de tejidos vegetales.

Murashige (1974) definió tres pasos o etapas para la multiplicación *in vitro* de plantas. Sin embargo, no necesariamente se utilizan para todas las plantas y algunos investigadores como Maene y Debergh (1981) han hecho la variante de agregar una etapa 0 y también una 4. Las etapas son las siguientes:

Etapa 0: Selección de la planta madre y su preparación

Antes de empezar con la micropropagación, debe ponerse mucha atención a la selección de la planta madre que es típica de la variedad y libre de patógenos.

Etapa 1: Establecimiento de un cultivo ascéptico

El paso inicial en el proceso de micropropagación es el de obtener un cultivo ascéptico de un material vegetal seleccionado.

Etapa 2: Producción de propágulos satisfactorios

El objeto de esta etapa es el de multiplicar los órganos y estructuras que están disponibles para desarrollar nuevas plantas intactas.

Etapa 3: Preparación para crecimiento en su ambiente natural

Los tallos o propágulos derivados de la etapa 2 son muy pequeños y no son capaces de crecer solos en el suelo. En esta etapa se les prepara para desarrollar plántulas individuales que pueden llevar a cabo fotosíntesis y sobrevivir sin un suplemento artificial de carbohidratos. Algunas plántulas deben ser tratadas especialmente en esta etapa para evitar que se queden pequeñas o que entren en etapa de dormancia, cuando se les saca del ambiente de cultivo. Se trata de enraizar los brotes antes de su transferencia al suelo. Para reducir costos de micropropagación, algunos laboratorios comerciales remueven

los brotes sin raíces del ambiente *in vitro* y los enraizan fuera del recipiente de cultivo.

Etapa 4: Transferencia del material a un ambiente natural

En esta etapa, las plántulas son transferidas de la forma *in vitro* al ambiente externo y, es extremadamente importante. Si no se hace con cuidado, la transferencia puede resultar en una pérdida significativa de plantas. Hay dos razones principales para esto:

- Los brotes desarrollados en cultivo generalmente han sido producidos en alta humedad y a baja intensidad de luz. Esto resulta en el hecho de que haya menos cera epicuticular en la hoja que en plantas cultivadas en cámaras de crecimiento o invernadero. Las plantas cultivadas *in vitro* pierden agua rápidamente, cuando se trasladan a condiciones externas, según Sutter y Langhans, 1980.

- Cuando se les sule con sucrosa (o algún otro carbohidrato) y se mantienen en condiciones de luz baja, las plántulas no son dependientes de su propia fotosíntesis. Necesitan un período de varios días para volverse completamente capaces de producir su propia fuente de carbono y nitrógeno reducido, antes de volverse capaces de alimentarse por sí mismas (George y Sherrington, 1984).

2. Composición de los medios nutritivos.

El éxito que se obtenga de un cultivo de tejidos vegetales, depende del uso del medio nutritivo adecuado, como también del empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, etc. Usando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes, así como su forma química adecuada, ha sido posible establecer cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales (Hurtado y Merino, 1987).

Diversos medios de cultivo han sido utilizados incluyendo formulaciones diseñadas por Knudson (1946), Murashige y Skoog (1962), White (1963), Gamborg et al. (1968), etc. La formulación de Murashige y Skoog (MS) es la que más se utiliza, pues ha demostrado que es el medio adecuado para una gran variedad de especies, así como para diferentes partes de una planta (Hurtado y Merino, 1987). Para el crecimiento vigoroso y saludable, las plantas deben adquirir del suelo, cantidades relativamente altas de algunos iones inorgánicos, los macronutrientes: sales de nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio y azufre; y pequeñas cantidades de otros iones, los micronutrientes o elementos trazas: sales de hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, molibdeno y cobalto. Los medios de cultivo no sólo proveen estos nutrientes, sino también un carbohidrato, usualmente sucrosa, para reemplazar el carbón que la planta normalmente fija de la atmósfera por fotosíntesis. Se

obtienen también buenos resultados por proveer cantidades pequeñas de ciertos compuestos orgánicos, como vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento (George y Sherrington, 1984).

Los reguladores de crecimiento, particularmente las auxinas y citoquininas, son componentes muy importantes del medio de cultivo, pero su selección y las concentraciones con que se usan dependen de las especies y del propósito del cultivo (George y Sherrington, 1984). Las auxinas (ácido indol-acético, ácido indol-butírico, ácido naftalen-acético y ácido 2,4-diclorofenoxi-acético) causan el alargamiento de las células, e hinchamiento de los tejidos, división celular (formación de callo), la formación de raíces adventicias, formación de tallos axilares y generalmente en suspensiones celulares causan embriogénesis. Las citoquininas (cinetina, benciladenina, 6-dimetilalilaminopurina, y bencilaminotetrahidropiraniipurina) generalmente se usan para estimular el crecimiento y desarrollo. Usualmente promueven la división celular, inducen la formación de brotes adventicios, promueven la formación de brotes axilares al disminuir la dominancia apical y retrasan el envejecimiento (Pierik, 1987).

Algunas veces, cuando se utilizan reguladores de crecimiento, especialmente auxinas y citoquininas, ocurre "habituación". La habituación es el fenómeno en el cual los

cultivos *in vitro* (que inicialmente requieren de algún regulador para crecer y/o la formación de órganos) después de un período de tiempo (después de algunos subcultivos) ya no requieren o requieren menor cantidad de regulador; es decir, muestran el mismo comportamiento que cuando estaban en un medio con regulador. Este fenómeno generalmente no es un cambio permanente, es decir que cuando se aíslan plantas formadas de tejidos habituados, necesitarán de reguladores para su cultivo (Pierik, 1987).

3. El medio nutritivo en las distintas etapas de crecimiento.

El medio nutritivo durante las tres etapas debe ser adecuado, tanto en su composición química, como en la física. Para la etapa 1, el medio de cultivo debe permitir la sobrevivencia del explante y un poco de crecimiento, siendo a veces necesario utilizar antioxidantes para evitar que los tejidos se tornen color café, y antibióticos para suprimir el desarrollo de microbios. En la etapa 2, debido a que es la etapa para la multiplicación del material, el medio de cultivo debe contener sustancias que faciliten la organogénesis (p. ej. reguladores de crecimiento), especialmente la formación de tallos o brotes. La composición del medio de cultivo de la etapa 3 debe tener sustancias que estimulen el enraizamiento (p. ej. auxinas), si se desea que este paso ocurra *in vitro*; generalmente su

composición es simple, especialmente cuando las necesidades en esta etapa sean condiciones que promuevan el crecimiento de plantas bien diferenciadas pero con poco crecimiento (Murashige, 1974).

D. La familia Bromeliaceae y el cultivo de tejidos vegetales.

Hay algunas especies de la familia Bromeliaceae que han sido reproducidas por cultivo de tejidos (entre estas especies de *Aechmea*, *Billbergia*, *Guzmania*, *Tillandsia*, *Vriesia* y *Ananas*). Las plantas son propagadas por el cultivo de ápices meristemáticos. Los brotes derivados de la Etapa 1 son generalmente defoliados antes de ser trasladados a la Etapa 2.

Se pueden desarrollar brotes con hojas por lo que la multiplicación de los brotes puede ocurrir tanto de brotes adventicios como axilares, en muchos casos. Mekers (1977) encontró que *Tillandsia*, *Guzmania* y *Vriesia* crecen mejor en sales de Murashige y Skoog (MS) a 1/2 ó 1/4 de concentración o en el medio de Knudson C (1946) que en MS completo. Las bromelias pueden tener un requerimiento general de poca sal en el medio (George y Sherrington, 1984).

A través del cultivo *in vitro* se pueden obtener proporciones mayores de propagación que las obtenidas por métodos convencionales (George y Sherrington, 1984).

Pierik et al. (1989) reportaron la propagación de

Aechmea fulgens in vitro. Utilizaron como explantes los ápices meristemáticos. A pesar de los cuidados utilizados a la hora de la desinfección, obtuvieron un 40% de contaminación. Utilizaron para iniciar, un medio sólido a base de sales de Murashige y Skoog. Luego transplantaron a un medio líquido para la multiplicación. Por último, trasladaron los brotes a un medio sólido para su enraizamiento. Usaron como reguladores de crecimiento, combinaciones de benciladenina y ácido naftalenacético.

Pierik y Sprenkeis (1991) propagaron *in vitro* la *Tillandsia cyanea*, utilizando las puntas de tallo aisladas de brotes axilares. Tuvieron un alto índice de contaminación. Iniciaron los cultivos en un medio sólido conteniendo las sales de Murashige y Skoog (1962) y combinaciones de benciladenina y ácido naftalenacético. Para la multiplicación, utilizaron un medio líquido conteniendo los mismos reguladores de crecimiento y, por último, para el enraizamiento utilizaron un medio sólido con ácido naftalenacético.

El objetivo general de este trabajo, fue desarrollar un método de micropropagación por cultivo de tejidos vegetales, para la obtención de plantas del género *Tillandsia*, con el fin de ayudar en la conservación de algunas especies de este género, que están en alto peligro de extinción.

Los objetivos específicos, fueron determinar un método

eficaz de desinfección, para plantas de este género y determinar un método más rápido que el convencional para multiplicar especies del género *Tillandsia*.

II. JUSTIFICACION

El método convencional de propagación de tilansias utilizado en Guatemala, es la reproducción de plantas utilizando retoños. El número de éstos oscila entre 2 y 15, dependiendo de la especie y del manejo recibido.

Considerando el problema de extinción, que especies de este género pueden sufrir, por la exportación y la tala de bosques entre otras, el presente trabajo pretende establecer un método alternativo de reproducción.

III. MATERIALES Y METODOS

A. Diseño experimental

En base a los objetivos del estudio, se hizo un diseño estadístico con los siguientes factores y niveles:

FACTOR	NIVELES
1. Medio de cultivo	1 = Medio de Murashige y Skoog (1962) completo (MS) 2 = Medio de Murashige y Skoog (1962) diluido a la mitad de su concentración original (MS/2) 3 = Medio de Murashige y Skoog (1962) diluido a un cuarto de su concentración original (MS/4)
2. Hormona	1 = 0mg/l de Benciladenina (0BA) 2 = 0.5mg/l de Benciladenina (0.5BA) 3 = 1.0mg/l de Benciladenina (1.0BA)

Un tratamiento está definido por las combinaciones de los dos factores descritos y sus distintos niveles, lo cual nos da un total de nueve tratamientos (3 concentraciones de medio de cultivo x 3 concentraciones de hormona). Estos se resumen en el cuadro 2, en el cual se indican además, las abreviaturas empleadas para referirse a cada tratamiento.

Cuadro 2

Tratamientos empleados para evaluar los efectos de concentración de medio de cultivo Murashige-Skoog (MS) y la Hormona benciladenina (BA) sobre la altura y número de brotes de *Tillandsia spp.*

MEDIO	HORMONA BENCILADENINA (mg/l)		
	0	0.5	1.0
Murashige-Skoog			
MS	MS 0BA	MS 0.5BA	MS 1.0BA
MS/2	MS/2 0BA	MS/2 0.5BA	MS/2 1.0BA
MS/4	MS/4 0BA	MS/4 0.5BA	MS/4 1.0BA

A este diseño corresponde un modelo de bloques al azar, de 2 vías con interacciones, que puede expresarse como:

$$Y_{ij} = Y + \text{Medio}_i + \text{Hormona}_j + (\text{Medio} * \text{Hormona}) + \text{Error}$$

Este modelo indica que cada dato (Y_{ij}) será igual al promedio aritmético (Y), más el efecto del medio de cultivo (Medio_i), más el efecto de la hormona (Hormona_j), más la interacción ($\text{Medio} * \text{Hormona}$) y un efecto aleatorio (Error).

Las principales variables a medir fueron: a) el número de brotes producidos y b) el cambio en altura (en mm).

Las hipótesis estadísticas a probar sobre las variables respuesta son:

1. No existen diferencias estadísticas en el crecimiento en altura debidas a la concentración del medio de cultivo.
2. No existen diferencias estadísticas en el crecimiento en altura debidas a la concentración de la hormona.
3. No existen diferencias estadísticas en la producción de brotes debidas a la concentración del medio de cultivo.
4. No existen diferencias estadísticas en la producción de brotes debidas a la concentración de la hormona.

Para probar estas hipótesis se utilizó un análisis de varianza en el programa SPSS Versión 4.0.

B. Cultivo de Tejidos

Se propagaron dos especies del género *Tillandsia* (*T. ionantha scaposa* y *T. magnusiana*). Se seleccionaron estas dos especies debido a que: 1) pertenecen al grupo 1 de la lista elaborada por CONAP y el Sr. Werner Rauh, en la cual indican que son especies endémicas, cuyas poblaciones, están en peligro inmediato de extinción y que están amenazadas por el comercio internacional y, 2) porque de las especies de este grupo, éstas eran las más disponibles para realizar el estudio.

Las plantas madres utilizadas, fueron seleccionadas al azar, en el vivero "La Cascada" de Teculután, Zacapa,

tratando de que fueran plantas floreadas que a corto plazo producirían retoños. Se mantuvieron en uno de los invernaderos de la Universidad del Valle, para utilizarlas cuando se requiriera.

El material, equipo y reactivos utilizados, fueron los indispensables en un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. La cristalería, se preparó como se indica en el Apéndice 2. El Apéndice 3 indica cómo se prepararon las cajas de Petri y el agua destilada estéril.

Los medios de cultivo utilizados, fueron el de Murashige y Skoog (1962) y el de Knudson C (1946). Se prepararon a partir de soluciones madre. En el Apéndice 4, están los componentes de los medios de cultivo utilizados, y en el Apéndice 5, la manera como se prepararon las soluciones madre, tanto de los medios de cultivo como de la solución de Benciladenina. En el Apéndice 6, se describe como se preparó el medio para cada tratamiento.

En tubos de ensayo de 25 x 150mm se agregaron aproximadamente 12ml de medio de cultivo. Después de colocarles las tapaderas plásticas y de rotularlos debidamente, se esterilizaron en una autoclave por 15 minutos y a 120°C y 15psi.

1. Determinación de un método de desinfección eficaz.

Se limpiaron las plantas de tejido muerto y sucio, con un cepillo, agua y jabón. Se quitaron varias hojas

exteriores hasta dejar pedazos de planta como de aproximadamente una pulgada. Se dejaron lavando en agua de chorro corriente por una hora. Se trasladaron las porciones a un vaso de precipitar de 1000ml conteniendo alcohol etílico al 95%, y se dejaron reposar por 2 minutos. Luego se trasladaron a otro vaso de precipitar de 1000 ml con:

- a) 50% (v/v) de cloro comercial (5.25% de NaOCl) y 2 gotas de Tween 20
- b) 100% (v/v) de cloro comercial (5.25% de NaOCl) y 2 gotas de Tween 20.

Se colocaron sobre un agitador magnético por 20 minutos, y luego se trasladaron a la cámara de flujo laminar donde se lavaron 3 veces con agua destilada estéril.

Trabajando ascépticamente, se eliminaron otras hojas hasta obtener porciones de aproximadamente 1cm. Estas porciones, se colocaron en vasos de precipitar de 400ml con cloro comercial al 10% (v/v) por 10 minutos. Luego se lavaron otras 3 veces con agua destilada estéril. Con la ayuda de un estereoscopio se disectaron hasta obtener un domo meristemático con 2 o 3 primordios foliares (ápices de aproximadamente 3mm). Se inocularon en el medio de Murashige y Skoog diluido a la mitad y sin reguladores de crecimiento, (MS/2). Los tubos, se sellaron con plástico adhesivo (Saran Wrap) y se colocaron en gradillas plásticas con 45° de inclinación, en un cuarto de crecimiento con 16 horas de luz y 8 de oscuridad y con temperaturas de 20-25°C.

Se trabajó con *T. magnusiana* y *T. ionantha scaposa*. Se midió el porcentaje de contaminación a los 5, 10, 15, y 20 días.

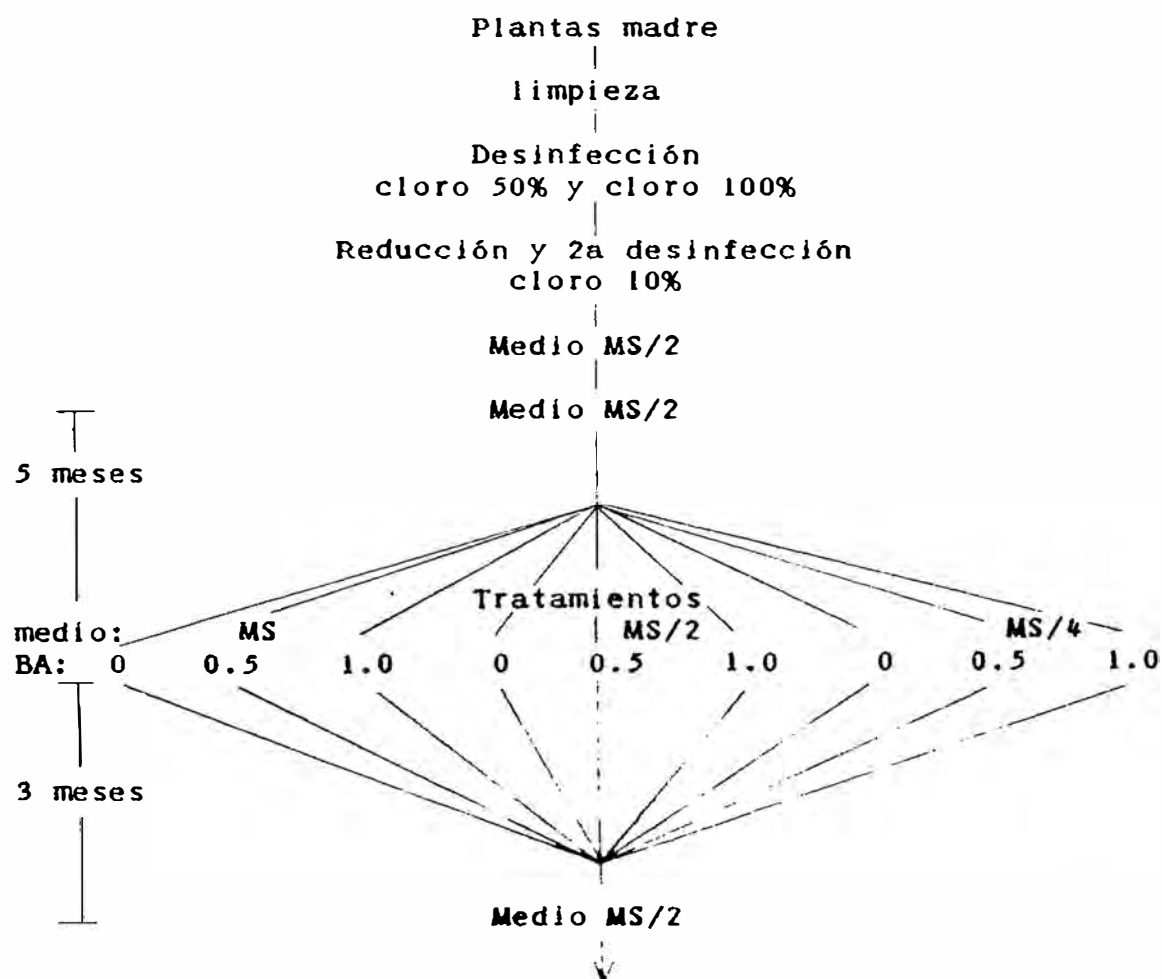


Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología.

2. Medio y condiciones de cultivo.

Se separaron los mejores brotes de las plantas cultivadas *in vitro* anteriormente, y se trasladaron a tubos de ensayo con 3 diferentes medios líquidos:

- a) Murashige y Skoog (1962) al 25%
- b) Murashige y Skoog (1962) al 50%
- c) Knudson C (1946);

suplementados con 0.5 y 1.0 mg/l de benciladenina (BA). El pH se ajustó a 5.7 antes de esterilizar el medio, durante 15 minutos a 121°C. Los tubos se colocaron en el cuarto de crecimiento, en una rueda agitadora a 45° y a 3 rotaciones por minuto. Semanalmente se midió el cambio en altura y el número de brotes producidos.

Se continuó cultivando más plantas de las dos especies anteriormente mencionadas. Las plantas se procesaron como se describe en el inciso 4 de esta sección, con la única modificación de utilizar únicamente el cloro comercial (5.25% NaOCl) al 100% (v/v). Se sembraron en tubos de ensayo con medio de Murashige y Skoog diluido a la mitad (MS/2). A las 8 semanas se trasladaron a medio fresco, separando los brotes existentes. Esta práctica se realizó cada 2 meses durante 10 meses.

Debido a la escasez de brotes de *T. magnusiana* y a la contaminación por hongos que hubo en los medios líquidos, se continuó trabajando únicamente con *T. ionantha scaposa* y con

medios sólidos, eliminando además el medio de Knudson C, quedando los siguientes tratamientos:

- 1) Murashige y Skoog completo sin benciladenina (MS 0BA);
- 2) Murashige y Skoog completo con 0.5mg/l de benciladenina (MS 0.5BA);
- 3) Murashige y Skoog completo con 1.0mg/l de benciladenina (MS 1.0BA);
- 4) Murashige y Skoog al 50% sin regulador de crecimiento (MS/2 0BA);
- 5) Murashige y Skoog al 50% con 0.5 mg/l de benciladenina (MS/2 0.5BA);
- 6) Murashige y Skoog al 50% con 1.0mg/l de benciladenina (MS/2 1.0BA);
- 7) Murashige y Skoog al 25% sin regulador de crecimiento (MS/4 0BA);
- 8) Murashige y Skoog al 25% con 0.5mg/l de benciladenina (MS/4 0.5BA);
- 9) Murashige y Skoog al 25% con 1.0mg/l de benciladenina (MS/4 1.0BA).

Se escogieron brotes de más o menos el mismo tamaño y se fueron colocando al azar en los tubos conteniendo los distintos medios, haciendo 14 réplicas por tratamiento o sea 126 tubos con un brote cada uno. Cada brote se midió al inicio y a los 7, 14, 21, 28, 35, 45, 60, 90, y 120 días, esperando que para este tiempo, los brotes tuvieran un tamaño adecuado (mas de 1cm). Además, se anotó el número de brotes producidos. A los 150 días, se trasladaron al medio de Murashige y Skoog al 50% y sin regulador de crecimiento. Se les midió la altura al inicio y cada 30 días por 3 meses. Además, se midió el número de brotes y se anotó la presencia

o no de raíces.

C. Análisis de los resultados

Los datos obtenidos, se tabularon, e ingresaron en una hoja electrónica Quattro Pro. Se corrieron análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con repeticiones, en el programa estadístico SPSS Versión 4.0. Las gráficas se realizaron con el programa Harvard Graphics.

Cuando existieron diferencias entre los diferentes tratamientos, se practicó la prueba de Tukey a las medias, indicando con ella cuales tratamientos son estadísticamente superiores.

IV. RESULTADOS

A. Determinación de un método de desinfección eficaz.

El Cuadro 3 presenta el porcentaje de contaminación, para las dos especies sembradas. Después de 20 días de iniciado el estudio, la contaminación que se observó fue relativamente baja. Para la *T. ionantha scaposa*, la concentración de cloro con la que se obtuvo menor porcentaje de contaminación fue la del cloro al 100% (v/v), en la cual se obtuvo solamente un 8%. Sin embargo no sucedió lo mismo con la *T. magnusiana*, ya que se obtuvo un mayor porcentaje de contaminación, un 17%, con la concentración de cloro al 100%.

La literatura reporta de 40-60% de contaminación en especies de *Tillandsia*. Este estudio, sugiere que la contaminación es estadísticamente menor en todos los tratamientos, debido a la desinfección con cloro.

Cuadro 3. Porcentaje de contaminación de los cultivos de *Tillandsia ionantha scaposa* y *Tillandsia magnusiana*.

Especie de <i>Tillandsia</i>	Tratamiento	% de plantas contaminadas				
		Días				
		0	5	10	15	20
<i>Tillandsia ionantha scaposa</i>	50% cloro	0	0	8	15	23
	100% cloro	0	0	0	8	8
<i>Tillandsia magnusiana</i>	50% cloro	0	0	11	11	11
	100% cloro	0	0	0	0	17

($X^2 = 11.44$, X^2 ($\alpha = 0.01$, $k-1 = 3$ g1) = 11.34)

Es importante notar que con la concentración de cloro comercial (5.25% NaOCl) al 100%, la contaminación tardó unos 15 días en aparecer.

B. Medio y condiciones de cultivo.

1. Medios líquidos

El 90% del material en el medio líquido, se contaminó con hongos, por lo que se decidió descartar este paso, ya que anteriormente se habían contaminado otros medios líquidos. Se decidió además trabajar únicamente con el medio de Murashige y Skoog para facilitar la comparación.

2. Medios sólidos

Debido a que la *Tillandsia magnusiana* no produjo suficientes brotes, se trabajó únicamente con la *T. ionantha scaposa*. El Cuadro 4 muestra el crecimiento promedio en

altura por tratamiento durante 4 meses. En el Apéndice 7-1 está el análisis de varianza realizado, el cual indica (a) que si hay diferencias en las alturas alcanzadas en los diferentes tratamientos; (b) que no existe una interacción entre el medio de cultivo y la hormona con relación al crecimiento en altura y, (c) que el efecto de crecimiento, depende únicamente de la hormona, específicamente de su ausencia en el medio de cultivo.

Cuadro 4. Comparación de la altura (mm) alcanzada por brotes de *Tillandsia ionantha scaposa* (N=14/trat) según la concentración del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) y de la hormona benciladenina (mg/l) a los cuatro meses.

Concentración del medio de cultivo MS	Concentración de benciladenina (mg/l)			Media (MS)
	0.0	0.5	1.0	
	Altura (mm)			
MS	7.5 t1	3.2 t2	3.0 t3	4.6
MS/2	5.6 t4	2.8 t5	2.6 t6	3.6
MS/4	8.7 t7	3.2 t8	3.0 t9	5.0
Media (BA)	7.3	3.1	2.9	4.4

P efectos principales < .001

P medio = .146: t1≠t2=t3; t4=t5=t6; t7=t8=t9

P hormona < .001: t7≠t1≠t4; t8≠t2≠t5; t9≠t3≠t6

P medio-hormona = .503: t7≠t1=t4=t8=t2=t9=t3=t5=t6

Se observa en este cuadro, que los ápices que obtuvieron mayor altura, fueron todos aquellos que no tuvieron benciladenina como suplemento en el medio de cultivo. Los ápices que estuvieron en medios de cultivo suplementados con 1.0mg/l de benciladenina, fueron los que crecieron menos. Sin embargo, no están tan alejados en cuanto a crecimiento, de los ápices que estuvieron en medios de cultivo suplementados con 0.5mg/l de la hormona benciladenina.

El Cuadro 5 muestra la producción promedio de brotes por tratamiento durante 4 meses. En el Apéndice 7-2 puede encontrarse el análisis de varianza practicado, el cual indica que el efecto de la producción de brotes, es provocado por la combinación de la concentración del medio de cultivo y la de benciladenina o sea que, existe una interacción entre estos dos factores.

Se observa en el cuadro, 5 que los ápices cultivados en medios de cultivo suplementados con alguna concentración de Benciladenina, producen mas ápices que los que no contienen esta hormona, con excepción del medio diluido a la mitad.

Cuadro 5. Comparación del número de brotes producidos en *Tillandsia ionantha scaposa* (N=14/trat) según la concentración del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) y de la benciladenina (mg/l) durante 4 meses.

Concentración del medio de cultivo MS	Concentración de benciladenina (mg/l)			Media (MS)
	0.0	0.5	1.0	
	Número de brotes			
MS	5 t1	11 t2	8 t3	8
MS/2	7 t4	8 t5	6 t6	7
MS/4	6 t7	10 t8	12 t9	9
Media (BA)	6	10	9	8

P efectos principales = .006

P medio = .204: t2=t3=t1; t5=t4=t6; t9=t8=t7

P hormona = .003: t4=t7=t1; t2=t8=t5; t9=t3=t6

P medio-hormona = .072: t9=t2=t8=t3=t5=t4=t6=t7=t1

El Cuadro 6 muestra el crecimiento promedio en altura alcanzada por brotes de *T. ionantha scaposa* en el medio de Murashige y Skoog diluido a la mitad y sin reguladores de crecimiento. A este medio, se pasaron todos los brotes producidos en la etapa anterior.

El análisis de varianza practicado a estos datos, se encuentra en el apéndice 7-3 e indica que no hubo una interacción significativa entre el medio y la hormona con respecto al crecimiento de los brotes. Sin embargo, hubo un efecto tanto de la concentración del medio de cultivo como de la hormona.

Cuadro 6. Comparación de la altura (mm) alcanzada por brotes de *Tillandsia ionantha scaposa* trasladados a medio MS/2 sin regulador de crecimiento, según la concentración original del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) y de benciladenina (mg/l).

Concentración del medio de cultivo MS	Concentración de benciladenina (mg/l)			Media (MS)
	0.0	0.5	1.0	
	Altura (mm)			
MS	17.1 [N=62] t1	11.1 [N=140] t2	10.7 [N=109] t3	12.9
MS/2	16.3 [N=85] t4	10 [N=93] t5	7.3 [N=56] t6	11.2
MS/4	19 [N=87] t7	6.7 [N=132] t8	5.9 [N=117] t9	10.6
Media (BA)	17.5	9.3	8.0	11.6

P efectos principales < .001

P medio < .001: t1≠t2=t3; t4≠t5≠t6; t7≠t8=t9

P hormona < .001: t7=t1=t4; t2=t5≠t8; t3≠t6=t9

P medio-hormona < .001: t7=t1=t4≠t2=t3=t5≠t6=t8=t9

El Cuadro 7 muestra la producción promedio de brotes en el medio MS diluido a la mitad de su concentración original y sin reguladores de crecimiento.

El análisis de varianza practicado a estos datos se encuentra en el apéndice 7-4 y en éste, se indica que no hubo interacción significativa entre el medio y la hormona en cuanto a la producción de brotes. Los resultados dependieron tanto de la concentración del medio como de la hormona.

Cuadro 7. Comparación del número de brotes producidos en *Tillandsia ionantha scaposa* trasladados a medio MS/2 sin regulador de crecimiento, según la concentración original del medio de cultivo MS y de benciladenina (mg/l).

Concentración del medio de cultivo MS	Concentración de benciladenina (mg/l)			Media (MS)
	0.0	0.5	1.0	
	Número de brotes			
MS	2 [N=62] t1	6 [N=140] t2	7 [N=109] t3	5
MS/2	2 [N=85] t4	12 [N=93] t5	10 [N=56] t6	8
MS/4	2 [N=87] t7	11 [N=132] t8	13 [N=117] t9	9
Media (BA)	2	10	10	7

P efectos principales < .001

P medio < .001: t3=t2≠t1; t5=t6≠t4; t9=t8≠t7

P hormona < .001: t4=t1=t7; t5=t8≠t2; t9≠t6≠t3

P medio-hormona < .001: t9=t5=t8=t6≠t3=t2≠t4=t1=t7

Se observa en estos cuadros (6 y 7), que los resultados fueron muy parecidos en cuanto a que, en los medios sin regulador de crecimiento, no hubo mayor producción de brotes pero sí hubo mayor crecimiento. En los medios con alguna cantidad de benciladenina hubo mayor producción de brotes y menor crecimiento.

C. Análisis económico.

El experimento, se inició con 86 plantas de *T. ionantha scaposa*. Para la primera generación o, para comparar los 9 tratamientos, se utilizaron 126 explantes. En 4 meses se obtuvieron 938 plantas. Estas plantas fueron transferidas a medio MS diluído a la mitad de su concentración original y sin reguladores de crecimiento. Al final de tres meses, se obtuvieron 6641 plantas. Se utilizaron un total de 36 litros de medio de cultivo y 120 horas de trabajo. El valor promedio de las plantas de *Tillandsia ionantha scaposa* fue de Q0.33/unidad.

Los gastos se desglosaron de la siguiente manera:

1) Alquiler del laboratorio: (incluye cristalería y equipo)	Q 500.00
2) Reactivos (incluye medios, agua, cloro, etc.)	Q 175.00
3) Salario (120 hrs)	<u>Q1500.00</u>
TOTAL	Q2175.00

El costo de reproducción por el método tradicional de los viveros comerciales para la *Tillandsia ionantha scaposa* es de Q0.18 (equivalente a \$0.031) (Gustavo Samayoa, productor de tilansias). En el vivero esta especie produce unos 3-6 brotes por año.

V. DISCUSION

A. Determinación de un método de desinfección eficaz

El cultivo de meristemas de las tilansias, se complica por la presencia de los tricomas pero el lavado con cepillo, los elimina casi totalmente y ayuda a limpiar mejor la superficie. Cuando uno desinfecta, es preferible que la superficie sea lisa para que el desinfectante actúe. Al quitar las hojas para llegar al cono central, debe hacerse con mucho cuidado ya que a veces al desprender las hojas del cono central, se desprenden pedazos de éste y se puede romper el meristemo. Es más fácil trabajar con *T. ionantha scaposa* que con *T. magnusiana*, debido a que las hojas de la primera se desprenden fácilmente del cono central y permiten llegar al ápice meristemático, en cambio las otras se desprenden con todo y cono y lastiman el domo meristemático.

Se pensó trabajar con cloro comercial como desinfectante, porque es más fácil de conseguir, es decir, está al alcance de cualquiera. En este experimento, se utilizaron dos concentraciones de cloro comercial (50% y 100% v/v) utilizando además una Inmersión en alcohol etílico al 95% y agregando junto con el cloro, dos gotas de Tween 20. A ninguna concentración se notó que el cloro dañara los tejidos, únicamente se notó que los tejidos se tornaban

blandos, pero después se tornaban verdes. Como se observa en el Cuadro 3 hubo relativamente poca contaminación en los tratamientos, si se compara con el 40 - 60% que han obtenido otros investigadores.

El porcentaje de contaminación más alto fue de 23% en la "scaposa" desinfectada con 50% de cloro comercial (v/v); al 100% fue de 8%. Con la "magnusiana" la contaminación de las plantas desinfectadas con cloro comercial al 50% v/v fue de 11%, mientras que el porcentaje de contaminación de las plantas desinfectadas con cloro al 100% fue de 17%. La contaminación fue sólo por hongos. Se esperaba que con el cloro al 100% la contaminación hubiera sido menor o nula. Sin embargo, las plantas se pudieron haber contaminado durante la disección, por los instrumentos, respiración o algún otro factor. Se observa además, que con los tratamientos con cloro al 100%, la contaminación apareció hasta los 15 ó 20 días después de realizada la siembra, lo que indica que el cloro no penetró bien a los tejidos, o que existían algunas esporas que se manifestaron cuando las condiciones adecuadas se presentaron.

Se sugiere utilizar el cloro comercial (5.25% NaOCl) al 100% para desinfectar plantas del género *Tillandsia* que provengan del campo. Se les podría aplicar, unas dos semanas antes de la siembra, algún fungicida de amplio espectro como Beniate.

En los medios líquidos, hubo un problema grande de contaminación. Los tubos con el medio líquido, se colocaron en una rueda giratoria inclinada. Al poco tiempo de estar allí, los tubos se llenaron de hongo. Aunque la cantidad de medio no era tanta como para derramarse, al estar inclinada, el líquido llegaba hasta unos 2cms de la boca del tubo, donde podrían estar los contaminantes. La agitación probablemente ayudaba a que estos proliferaran y al poco tiempo ya habían arruinado el cultivo. Debido a que con otros cultivos líquidos se había tenido este mismo problema, se decidió ya no trabajar más con éstos. Además se decidió trabajar únicamente con los medios de Murashige y Skoog y sólo con la "scaposa" porque el material de la "magnusiana" que se usaría para probar los 9 tratamientos no se propagó lo suficiente.

Los medios líquidos, son utilizados en la micropropagación de muchas plantas, debido a que todo el explante, está en contacto con el medio y produce en éste, mas brotes que en los medios sólidos. Se sugiere que se hagan otras pruebas con este tipo de medio y que se tomen las medidas necesarias para evitar la contaminación.

B. Medio y condiciones de cultivo

Para la iniciación, se usó el medio de MS diluido al 50% ya que se pensó que el requerimiento nutricional de las tilansias, no era tan alto como para usar el medio completo.

Estando en este medio, se observó que los ápices respondían bien, creciendo en altura y produciendo pequeñas yemas, lo que significaba que el material también se estaba multiplicando. Para poder tener suficiente material uniforme para probar los tratamientos, se decidió utilizar este medio para continuar multiplicando el material. Se mantuvieron las plantas en este medio por 10 meses, dividiéndolas y colocándolas en medio fresco cada 2 meses. Al tener suficiente material, se separaron los brotes de más o menos el mismo tamaño y se sembraron al azar en los tubos que contenían los distintos medios. Se sembraron 14 réplicas por tratamiento.

En el Cuadro 4 se puede observar el crecimiento de las plantas en los diferentes tratamientos. Si se observan los promedios de los tratamientos 1 (MS OBA), 4 (MS/2 OBA) y 7 (MS/4 OBA) se ve claramente que la ausencia de la benciladenina provoca que las plantas aumenten su altura, llegando a crecer de 7.6, 6.7 y 8.7mm respectivamente. En los medios de cultivo con cierta concentración de hormona (tratamientos 2, 3, 5, 6, 8 y 9) el crecimiento es menor (Figura 2). El análisis de varianza practicado a estos datos, Apéndice 7-1, muestra que no existe una interacción entre el medio de cultivo y la hormona, con relación al crecimiento en altura, y que este efecto de crecimiento, depende únicamente de la hormona, específicamente de la ausencia de benciladenina en el medio de cultivo.

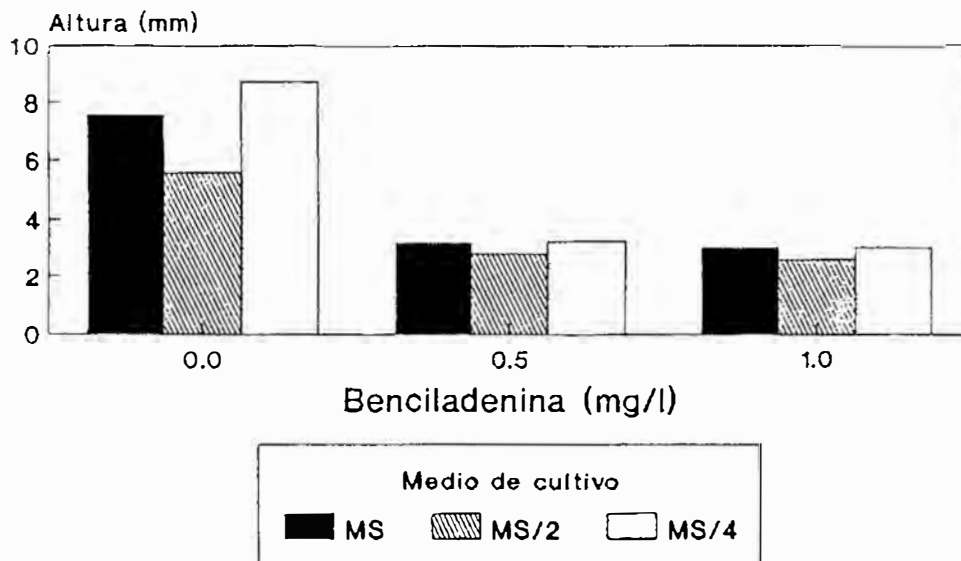


Figura 2. Comparación de la altura alcanzada por brotes de *Tillandsia ionantha scaposa*, según la concentración del medio de cultivo de Murashige y Skoog y benciladenina.

En el Cuadro 5 se observa que el número de brotes aumenta en los tratamientos que contienen alguna concentración de benciladenina. Sin embargo, al aumentar de 0.5mg/l a 1.0mg/l, la producción de brotes permanece igual o disminuye (Figura 3), a excepción del tratamiento 9 (MS/4 1.0BA) donde se obtiene el mayor número de brotes (11.7). El análisis de varianza practicado a estos datos (Apéndice

7-2.) muestra que el efecto es provocado por la combinación de la concentración del medio de cultivo y la de benciladenina o sea que existe una interacción entre estos dos factores.

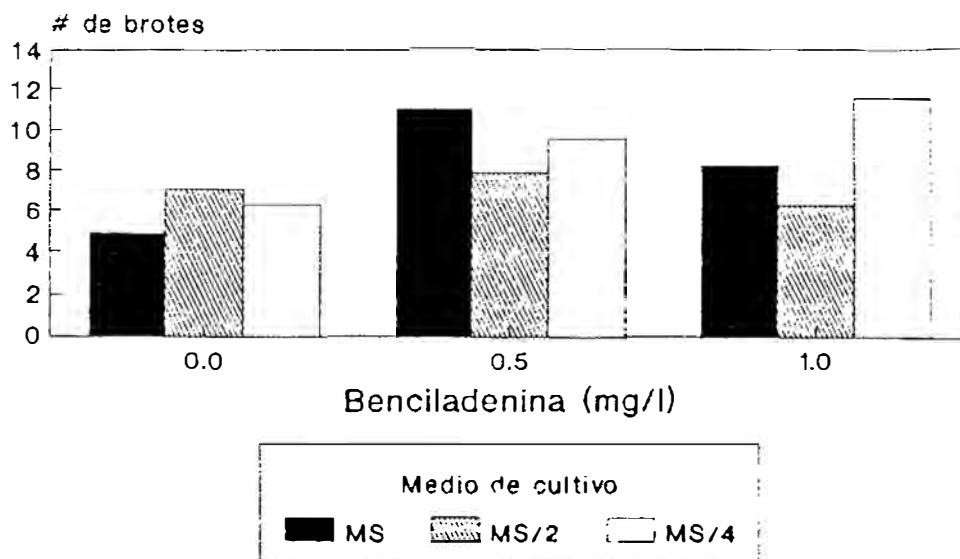


Figura 3. Comparación del número de brotes producidos en *Tillandsia ionantha scaposa* según la concentración del medio de cultivo de Murashige y Skoog y la hormona benciladenina.

Si se observan ambas figuras (2 y 3) se ve que la altura de los brotes disminuye cuando el número de estos aumenta. Se puede pensar que esto es probablemente por la competencia que los brotes tienen por los nutrientes del medio de cultivo. Aunque, si se toma en cuenta, el efecto

de las citoquininas (en este caso de la benciladenina) esto puede deberse a que éstas disminuyen la dominancia apical para promover la formación de brotes axilares.

Los tratamientos 1 (MS OBA), 4 (MS/2 OBA) y 7 (MS/4 OBA) tuvieron el menor número de brotes, 5, 7 y 6 respectivamente y crecieron más 7.6, 6.7 y 8.7mm respectivamente.

Al concluir 5 meses en este medio se pasaron al medio de Murashige y Skoog al 50% sin reguladores de crecimiento. Se dividieron todos los brotes de un tubo y se colocaron en suficientes tubos a manera de que quedara un brote por tubo, quedando al final 938 tubos con un brote. En este medio, también se anotó la altura alcanzada y la producción de brotes, ya que se quería observar si los medios anteriores tendrían algún efecto sobre éste. En el Cuadro 6 se puede observar el crecimiento promedio (de 3 meses) de las plantas en los diferentes tratamientos y, en el Cuadro 7, se puede observar la producción promedio de brotes en 3 meses, en los distintos tratamientos. La figura 4 muestra que la altura fue mayor para los brotes que venían de tratamientos sin benciladenina y que ésta disminuía en los brotes que venían de tratamientos que contenían alguna concentración de benciladenina.

En la figura 5, se observa que los brotes que provenían de medios sin benciladenina, produjeron pocos brotes y que los brotes que venían de medios con cierta concentración de benciladenina, produjeron más brotes.

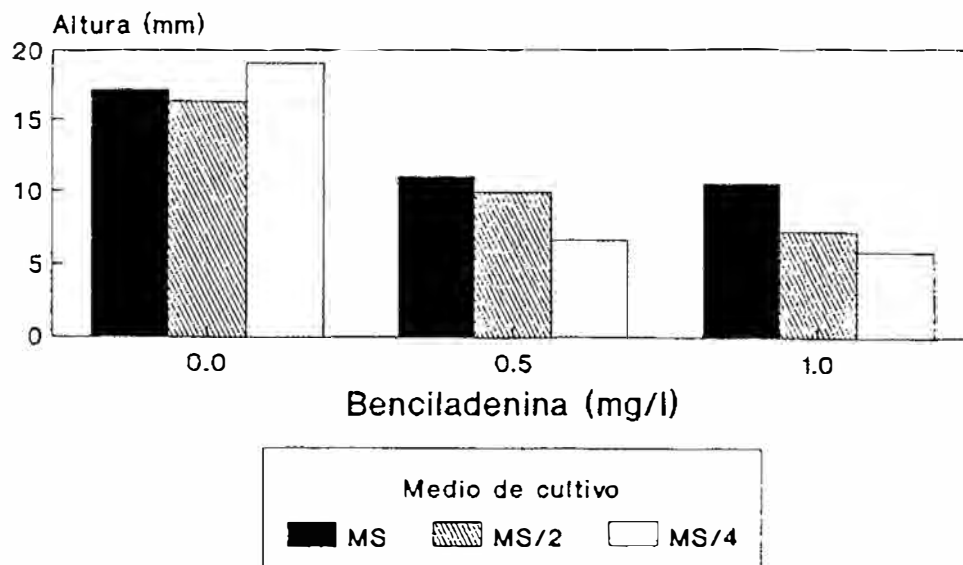


Figura 4. Comparación de la altura alcanzada por brotes de *Tillandsia ionantha scaposa*, trasladados a medio MS/2 sin regulador de crecimiento, según la concentración inicial del medio de cultivo de Murashige y Skoog y benciladenina.

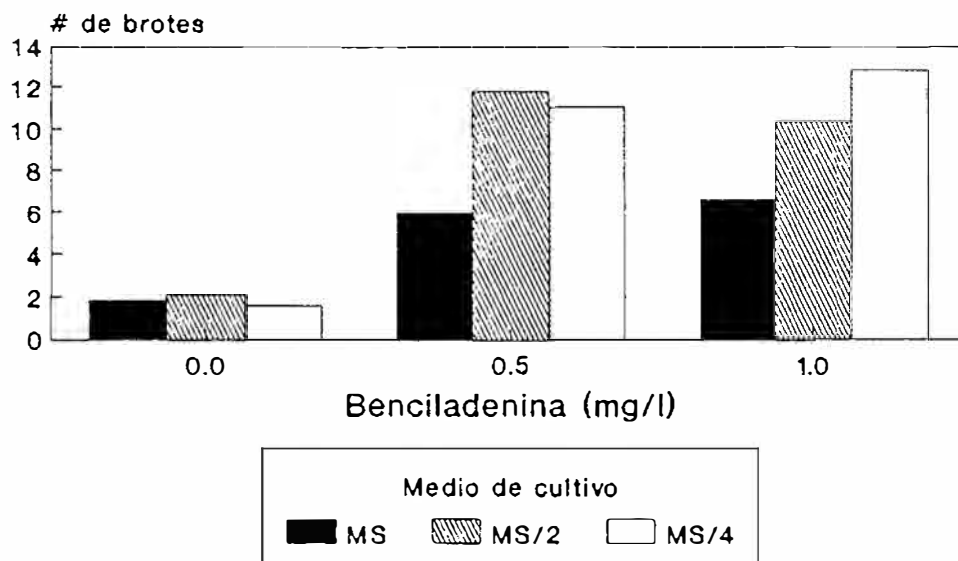


Figura 5. Comparación del número de brotes producidos en *Tillandsia ionantha scaposa* trasladados a medio MS/2 sin regulador de crecimiento, según la concentración inicial del medio de cultivo de Murashige y Skoog y benciladenina.

Los análisis de varianza (Apéndice 7-3 y 7-4) para estos datos, muestran que hubo una interacción no significativa entre los dos factores, medio y hormona, tanto para la producción de brotes como para el crecimiento de éstos. Indican además, que los resultados dependieron tanto de la concentración del medio de cultivo como de la concentración de hormona. Como en este paso, los brotes

fueron pasados a un medio sin hormona, puede ser que los tejidos se hayan "habituado" a las concentraciones de hormona donde estuvieron por cinco meses y que los resultados sean por el efecto del paso anterior.

C. Análisis económico.

La producción de plantas de *Tillandsia ionantha scaposa* in vitro es más caro que producirla convencionalmente en el vivero, sin embargo, se producen mucho mas plantas y en menor tiempo in vitro que por los métodos convencionales. Desafortunadamente la inversión para un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales es alta y requiere personal especializado para que ésta sea eficiente.

VI. CONCLUSIONES

- Se determinó que la desinfección con cloro comercial al 100% v/v (5.25% NaOCl) reduce el porcentaje de contaminación en brotes jóvenes de *Tillandsia ionantha scaposa* y *Tillandsia magnusiana*.
- Es importante que el cloro penetre en los tejidos, lo cual se logró con efectividad, eliminando los tricomas de los brotes jóvenes de *Tillandsia ionantha scaposa* y *Tillandsia magnusiana*.
- Las plantas de *Tillandsia ionantha scaposa*, cultivadas in vitro, con mayor número de brotes tienen menor altura promedio.
- Existen diferencias en el número de brotes y altura de la planta debidas a la dosis de benciladenina. Las plantas en los tratamientos sin benciladenina (0 mg/l) tienen menor número de brotes y mayor altura que las plantas en los tratamientos con benciladenina (0.5 y 1.0 mg/l).
- No existe un efecto consistente de los medios de cultivo. En la primera generación, los resultados son similares para las tres concentraciones del medio de Murashige y Skoog. En la segunda generación, el medio completo presenta menor número de brotes y mayor altura promedio que los medios diluidos.

VII. LITERATURA CITADA

- Chu, I.Y.E. 1989. The Role of Micropropagation in Commercialization of Plant Biotechnology. En: Proceedings of the Third Conference of International Plant Biotechnology Network (IPBNet): The role of Tissue Culture and Novel Genetics Technologies in Crop Improvement. TCCP, Colorado.
- Comisión Nacional de Areas Protegidas. 1990. Registros de Permisos de Exportación. Archivos de CONAP.
- George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Eastern Press, Great Britain. 709pp.
- Graf, A.B. 1982. Exotica. Series 4. Volumen 1. Roehrs Company Publishers, New Jersey. 1282pp.
- Hartmann, H. y D. Kester. 1983. Plant Propagation, Principles and Practices. Prentice-Hall, Inc., New Jersey. 727pp.
- Hurtado, D. y M.E. Merino. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas, Mexico. 232 pp.
- Isley III, P.T. 1987. Tillandsia. Botanical Press, California. 256pp.
- Maene L.J. y Debergh, P.C. 1981. En: Plant propagation by Tissue Culture. George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984. Eastern Press, Great Britain. 709pp.
- Mekers, O. 1977. En: Plant Propagation by Tissue Culture. George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984. Eastern Press, Great Britain. 709pp.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, 1989. Programa de Exportación e Importación de Productos Agrícolas del Comercio Internacional. 67pp.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.

- Murashige, T. 1974. Plant cell and organ culture methods in the establishment of pathogen-free stock. Department of Plant Sciences, University of California, Riverside. 31pp.
- Padilla, V. 1973. Bromeliads. Crown Publishers Inc., New York. 131pp.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. 344pp.
- Pierik, R.L.M., and P.A. Sprenkels. 1991. Micropropagation of *Tillandsia cyanea*. Journal of Bromeliad Society. 41:9-12.
- Pierik, R.L.M., P.A. Sprenkels and J.M. van der Velden. 1989. Vegetative Propagation of *Aechmea fulgens* "in vitro". Journal of Bromeliad Society. 39:210-213.
- PRODECORP, 1990. Estudio de diagnóstico sobre la producción y exportación de plantas ornamentales de follajes en Guatemala. Gremial de Exportadores de Productos no tradicionales. 40pp.
- Samayoa, Gustavo. 1994. Comunicación personal.
- Standley, P. y Julian A. Steyermark. 1952. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany. Chicago Natural History Museum. Vol 24. Part 1. 478pp.
- Sutter, E. y R.W. Langhans. 1980. En: Plant Propagation by Tissue Culture. George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984. Eastern Press, Great Britain. 709pp.

Apéndice 1.

Lista de las especies del género *Tillandsia* que existen en Guatemala, según Standley y Steyermark, en Flora de Guatemala (1952). Los nombres en paréntesis, son los otros nombres con los que se les concocen.

- T. acostae*
- T. adscendens*
- T. anceps* (*Phytarrhiza anceps*; *Vriesea schlechtendalii*;
T. lineatifolia)
- T. argentea*
- T. baileyi*
- T. balbisiana*
- T. brachycaulos* (*T. cryptantha*; *T. bradeana*; *T. flammea*)
- T. brachycaulos* var. *multiflora*
- T. bulbosa*
- T. butzii* (*T. variegata*)
- T. capitata*
- T. capitata* var. *guzmanioides*
- T. caput medusae*
- T. chlorophylla*
- T. circinnata* (*T. paucifolia*; *T. yucatanana*; *T. intermedia*)
- T. dasyliriifolia* (*T. drepanoclada*; *T. geniculata*; *T. pulvinata*)
- T. deflexa*
- T. deppeana* (*T. paniculata*; *T. leiochlamys*; *T. rubra*)
- T. elongata* var. *subimbricata*
- T. excelsa* (*T. costaricana*)
- T. fasciculata* (*T. compressa*; *T. setacea*; *Vriesea glaucophylla*; *T. glaucophylla*; *T. pungens*)
- T. fasciculata* var. *convexispica*
- T. fasciculata* var. *rotundata*
- T. festucoides* (*T. caricifolia*)
- T. filifolia*
- T. flabellata*
- T. ghiesbreghtii*
- T. grandis* (*Platystachys viridiflora*; *T. macropetala*;
T. viridiflora; *T. orizabensis*; *T. longiflora*; *T. virginialis*)
- T. guatemalensis* (*T. cyanea*; *Allardtia cyanea*; *T. excelsa*)
- T. ionantha* (*T. scopus*; *T. rubentifolia*; *T. erubescens*)
- T. ionantha* var. *scaposa*
- T. juncea* (*Bonaparteia juncea*; *T. quadrangularis*; *T. juncifolia*; *T. setacea*)
- T. lampropoda*

- T. leiboldiana* (*T. xiphophylla*; *T. phylliostachya*;
T. aschersoniana; *T. rhodochlamys*; *T. sparsiflora*;
T. coccinea; *T. lilacina*)
T. lucida
T. makoyana (*T. cucaensis*)
T. monadelpha (*Phytarrhiza monadelpha*; *T. graminifolia*;
T. monobotrya; *T. digitata*)
T. multicaulis (*T. caespitosa*; *Vriesea schlechtendalii*)
T. plumosa (*T. magnusiana*)
T. polita
T. polystachia (*Renealmia polystachia*; *T. angustifolia*;
T. acroleuca)
T. ponderosa
T. pruinosa
T. punctulata (*T. tricolor*; *T. melanopus*)
T. recurvata (*Renealmia recurvata*; *Diaphoranthema recurvata*)
T. rodrigueziana
T. schiedeana (*T. vestita*)
T. seleriana
T. standleyi
T. streptophylla
T. tenuifolia (*Renealmia recurvata*; *R. disticha*; *T. disticha*; *T. setacea*; *T. remota*)
T. tricolor (*Vriesea xiphostachys*; *Platystachys complanata*)
T. tricolor var. *melanocrater* (*T. melanocrater*; *T. melanopus*)
T. tricolor var. *picta*
T. usneoides (*Renealmia usneoides*; *Dendropogon usneoides*;
Strepsia usneoides)
T. utriculata
T. valenzuelana (*T. sublaxa*)
T. vicentina
T. yunckeri

A. 1-1 Otras especies de Tillandsia de Guatemala descritas por Paul T. Isley (1987).

- T. xerographica*
T. matudae
T. prodigiosa

Apéndice 2.

Limpieza de la cristalería.

Se utilizaron tubos de ensayo de 25 x 150mm con tapaderas plásticas, vasos de precipitar, balones aforados, pipetas, probetas y cajas de Petri. La limpieza de la cristalería se realizó de la siguiente manera:

- lavado con agua y detergente
- lavado con agua
- lavado con agua destilada y desionizada
- secado.

Apéndice 3.

Preparación de las cajas de Petri y del agua destilada estéril.

A las cajas de Petri se les introdujo dos hojas de papel filtro, de filtración rápida y de 9mm, para facilitar la disección del material.

Se agregaron 700ml de agua destilada y desionizada en erlenmeyers de 1000ml y se taparon con papel de aluminio y cinta adhesiva, para utilizarla en el lavado del material vegetal.

La esterilización de las cajas de Petri y del agua se realizó en una autoclave por 20 minutos a 120°C y 15psi.

Las cajas se colocaron en un horno a 70°C para su secamiento y el agua se colocó en un refrigerador mientras se utilizaba.

Apéndice 4

Componentes de los medios de cultivo de Murashige y Skoog (1962) y Knudson C (1946).

Componente	MS (mg/l)	KC (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650	
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O		1000
KNO ₃	1900	
(NH ₄) ₂ SO ₄		500
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	250
KH ₂ PO ₄	170	250
KI	0.83	
H ₃ BO ₃	6.2	0.056
MnSO ₄ ·4H ₂ O	15.6	7.5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	0.331
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	
MoO ₃		0.016
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.0624
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	
NaEDTA	37.3	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	25
Mio-inositol	100	
Acido nicotínico	0.5	
Piridoxina.HCl	0.5	
Tiamina.HCl	0.1	
Sucrosa	3%	2%

Apéndice 5.

Preparación de las soluciones madre de los medios de cultivo utilizados, y de la solución de benciladenina.

A-5.1 Medio de Murashige y Skoog (1962).

MACROELEMENTOS (Solución madre 10X)

	g/l
Nitrato de amonio	16.5
Nitrato de potasio	19.0
Cloruro de calcio dihidratado	4.4
Sulfato de magnesio heptahidratado	3.7
Fosfato de monopotasio	1.7

- agregar estas cantidades en un balon de 1000ml con 500ml de agua destilada. Mezclar bien hasta que estén bien disueltas. Completar el volumen con agua destilada. Utilizar 100ml de esta solución para preparar un litro de medio.

MICROELEMENTOS (Solución madre 100X)

	g/l
Sulfato de manganeso tetrahidratado	2.23
Acido Bórico	0.62
Sulfato de zinc heptahidratado	0.86
Ioduro de potasio	0.083
Molibdato de sodio dihidratado	0.025
Sulfato de cobre pentahidratado	0.0025
Cloruro de cobalto hexahidratado	0.0025

- agregar estas cantidades en un balon de 1000ml con 500ml de agua destilada. Mezclar bien hasta que estén bien disueltas. Completar el volumen con agua destilada. Utilizar 10ml de esta solución para preparar un litro de medio.

VITAMINAS (Solución madre 200X)

	g/l
Acido nicotínico	0.1
Piridoxina HCl	0.1
Tiamina HCl	0.02
Glicina	0.4
Mio-inositol	20.0

- agregar estas cantidades en un balon de 1000ml con 500ml de agua destilada. Mezclar bien hasta que estén bien disueltas. Completar el volumen con agua destilada. Utilizar 5ml de esta solución para preparar un litro de medio.

HIERRO (Solución madre 200X)

	g/l
Sulfato de hierro heptahidratado	5.56
Na ₂ EDTA	7.46

- Disolverlas en agua hirviendo, cada una por separado. Unirlas y calentarlas de nuevo, dejarlas enfriar a oscuras. Ajustar el volumen con agua destilada cuando estén frías. Utilizar 5ml de esta solución para preparar un litro de medio.

A-5.2 Medio Knudson C

Para este medio se prepararon soluciones madre de todos sus componentes como se indica a continuación:

MACROELEMENTOS

Componente	Solución Madre SM	Volumen de SM utilizado para preparar lit de medio
Nitrato de calcio	100g/l	10ml
Fosfato de monopotasio	25g/l	10ml
Sulfato de magnesio	25g/l	10ml
Sulfato de amonio	50g/l	10ml
Sulfato de hierro	2.5g/l	10ml
Sulfato de manganeso	750mg/l	10ml

MICROELEMENTOS (una solución)

Acido bórico	56mg/l	1ml
Acido molibdico	16mg/l	
Sulfato cúprico	62mg/l	
Sulfato de zinc	331mg/l	

A-5.3 Solución madre de Benciladenina (BA) (1mg/ml).

Se pesan exactamente 100mg de benciladenina y se agregan a un balón aforado de 100ml. Se le agrega 2-5ml de NaOH IN para disolverla y después, se le agrega agua destilada hasta llegar a 100ml.

Apéndice 6

Descripción de la preparación de los medios de cultivo para cada tratamiento utilizando las soluciones madre del apéndice 5.

Medio MS completo

	Benciladenina (mg/l)		
	0	0.5	1.0
Macroelementos (ml)	100	100	100
Microelementos (ml)	10	10	10
Vitaminas (ml)	5	5	5
Hierro (ml)	5	5	5
Benciladenina [1mg/ml] (ml)	0	0.5	1.0
Sucrosa (g)	30	30	30
Agua, llevar a: (ml)	1000	1000	1000
pH	5.7	5.7	5.7
Agar	8	8	8

Medio MS diluido a la mitad de su concentración original

	Benciladenina (mg/l)		
	0	0.5	1.0
Macroelementos (ml)	50	50	50
Microelementos (ml)	5	5	5
Vitaminas (ml)	2.5	2.5	2.5
Hierro (ml)	2.5	2.5	2.5
Benciladenina [img/ml] (ml)	0	0.5	1.0
Sucrosa (g)	30	30	30
Agua, llevar a: (ml)	1000	1000	1000
pH	5.7	5.7	5.7
Agar	8	8	8

Medio MS diluido a un cuarto de su concentración original

	Benciladenina (mg/l)		
	0	0.5	1.0
Macroelementos (ml)	25	25	25
Microelementos (ml)	2.5	2.5	2.5
Vitaminas (ml)	1.75	1.75	1.75
Hierro (ml)	1.75	1.75	1.75
Benciladenina [img/ml] (ml)	0	0.5	1.0
Sucrosa (g)	30	30	30
Agua, llevar a: (ml)	1000	1000	1000
pH	5.7	5.7	5.7
Agar	8	8	8

Apéndice 7

ANALISIS ESTADISTICO

A.7-1 Análisis de varianza de dos vías, practicado a los datos del cuadro 4 (Comparación de la altura (mm) alcanzada por *Tillandsia ionantha scaposa*, según la concentración del medio de cultivo de Murashige y Skoog y de benciladenina).

Fuente de Variación	SC	gl	MC	F	P
EFFECTOS PRINCIPALES	535.318	4	133.829	14.560	.000
Medio	36.011	2	18.005	1.959	.146
Hormona	489.219	2	244.609	26.613	.000
INTERACCIONES	30.891	4	7.723	.840	.503
Medio Hormona	30.891	4	7.723	.840	.503
Error Explicado	566.209	8	70.776	7.700	.000
Error Residual	974.278	106	9.191		
Total	1540.49	114	13.513		

A.7-2 Análisis de varianza de dos vías, practicado a los datos de cuadro 5 (Comparación del número de brotes producidos por *Tillandsia ionantha scaposa*, según la concentración del medio de cultivo Murashige y Skoog y de benciladenina).

Fuente de Variación	SC	gl	MC	F	P
EFFECTOS PRINCIPALES	324.436	4	81.109	3.824	.006
Medio	68.410	2	34.205	1.613	.204
Hormona	262.856	2	131.428	6.197	.003
INTERACCIONES	187.987	4	46.997	2.216	.072
Medio Hormona	187.987	4	46.997	2.216	.072
Error Explicado	512.424	8	64.053	3.020	.004
Error Residual	2248.15	106	21.209		
Total	2760.57	114	24.216		

A.7-3 Análisis de varianza de dos vías, practicado a los datos del cuadro 6 (Comparación de la altura (mm) alcanzada por brotes de *Tillandsia ionantha scaposa* trasladados a medio MS/2 sin regulador de crecimiento, según la concentración original del medio de Murashige y Skoog y de benciladenina).

Fuente de Variación	SC	gl	MC	F	P
EFFECTOS PRINCIPALES	15049.8	4	3762.44	231.828	.000
Medio	1494.8	2	747.41	46.052	.000
Hormona	13922.9	2	6961.43	428.939	.000
INTERACCIONES	1513.6	4	378.40	23.316	.000
Medio Hormona	1513.6	4	378.40	23.316	.000
Error Explicado	16563.4	8	2070.42	127.572	.000
Error Residual	14152.1	872	16.23		
Total	30715.4	880	34.90		

A.7-4 Análisis de varianza de dos vías, practicado a los datos del cuadro 7 (Comparación del número de brotes producidos por *Tillandsia ionantha scaposa* trasladados a medio MS/2 sin regulador de crecimiento, según la concentración original del medio de cultivo Murashige y Skoog y de benciladenina).

Fuente de Variación	SC	gl	MC	F	P
EFFECTOS PRINCIPALES	13889.7	4	3472.42	109.613	.000
Medio	3473.1	2	1736.56	54.817	.000
Hormona	11447.2	2	5723.58	180.674	.000
INTERACCIONES	1265.3	4	316.31	9.985	.000
Medio Hormona	1265.3	4	316.31	9.985	.000
Error Explicado	15154.9	8	1894.36	59.799	.000
Error Residual	27624.1	872	31.67		
Total	42778.9	880	48.61		