

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias Agrarias

Escuela de Agronomía

Cultivo *in vitro* de ruda (*Ruta graveolens* L.), toronjil (*Melissa officinalis* L.) y cedrón (*Aloysia tryphilla* (L`Hér.) Britton)

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Agronomía.

Profesor Patrocinante: Sr. Peter Seemann F. - Ing. Agr. Dr. Rer. Hort.

Alejandra Torres Schröder

Valdivia Chile 2002

Contenido

Profesores Informantes . .	1
RESUMEN .	3
SUMMARY .	4
1. INTRODUCCION .	7
2. REVISION BIBLIOGRAFICA . .	9
2.1.Descripción botánica de las especies. .	9
2.2. Composición química de ruda, toronjil y cedrón. . .	10
2.3. Propiedades medicinales de las especies. .	11
2.4.Propagación <i>in vitro</i> de plantas. .	12
2.5.Aspectos generales del cultivo <i>in vitro</i> . .	15
2.6. Antecedentes del cultivo <i>in vitro</i> de ruda, toronjil y cedrón. . .	15
3. MATERIAL Y METODO . .	19
3.1. Materiales. . .	19
3.2. Método. .	20
4. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS . .	23
4.1.Ensayo N° 1 de Ruda (<i>Ruta graveolens</i> L.). .	23
4.2. Ensayo N° 2 de toronjil (<i>Melissa officinalis</i> L.) .	30
4.3. Ensayo N° 3 de cedrón (<i>Aloysia tryphilla</i>). .	36
5. CONCLUSIONES . .	39
BIBLIOGRAFIA .	41
ANEXOS .	45
ANEXO 1. Necesidades nutricionales y hormonales de los cultivos de órganos y tejidos vegetales. .	45
ANEXO 2. Composición de soluciones (g/IL) utilizados en la preparación de medios de cultivo para micropropagación ^a . . .	46
ANEXO 3. Efecto principal de la concentración de BAP (mg/L) sobre el porcentaje de vitrificación de ruda a las cinco semanas de incubación. .	47
ANEXO 4. Efecto de la concentración de ANA y BAP (mg/L) en el porcentaje de callo de	48

ruda a las cinco semanas de incubación. . .

ANEXO 5. Efecto de la interacción entre ANA y BAP (mg/L) sobre el porcentaje de callo de ruda a las cinco semanas de incubación. . . 49

ANEXO 6. Efecto principal de la concentración de la fitohormona BAP (mg/L) sobre las variables número y longitud de brotes de ruda a las cinco semanas de incubación. . . 50

ANEXO 7. Efecto principal de la concentración de ANA (mg/L) sobre el porcentaje de callo de toronjil a las cinco semanas de incubación. . . 50

ANEXO 8. Efecto principal de la concentración de ANA y BAP (mg/L) sobre el número de brotes de toronjil a las cinco semanas de incubación. . 51

ANEXO 9. Efecto de la interacción entre ANA y BAP (mg/L) sobre el número de brotes de toronjil a las cinco semanas de incubación. . 52

ANEXO 10. Efecto principal de la concentración de ANA y BAP (mg/L) sobre la longitud de brotes de toronjil a las cinco semanas de incubación. . 53

ANEXO 11. Efecto de la interacción de ANA y BAP (mg/L) sobre el número de raíces de toronjil a las cinco semanas de incubación. . 54

ANEXO 12. Efecto de la concentración de ANA (0,1 mg/L) y BAP (1 mg/L) sobre el porcentaje de vitrificación de ápices y brotes axilares de cedrón a los treinta días de incubación. . 55

ANEXO 13. Efecto de la concentración de ANA (0,1 mg/L) y BAP (1 mg/L) sobre el porcentaje de senescencia de ápices y brotes axilares de cedrón a los treinta días de incubación. . 56

ANEXO 14. Efecto de la concentración de ANA (0,1 mg/L) y BAP (1 mg/L) sobre el porcentaje de contaminación de ápices y brotes axilares de cedrón a los treinta días de incubación. . 56

ANEXO 15. Efecto de la concentración de ANA (0,1 mg/L) y BAP (1 mg/L) sobre el número de brotes de explantes de ápices y brotes axilares de cedrón a los treinta días de incubación. . 57

ANEXO 16. Efecto de la concentración de ANA (0,1 mg/L) y BAP (1 mg/L) sobre la longitud de brotes de explantes de ápices y brotes axilares de cedrón a los treinta días de incubación. . 58

ANEXO 17. Efecto de la concentración de ANA (0,1 mg/L) y BAP (1 mg/L) sobre el número de raíces de explantes de ápices y brotes axilares de cedrón a los treinta días de incubación. . 58

ANEXO 18. Efecto de la concentración de ANA (0,1 mg/L) y BAP (1 mg/L) sobre la longitud de raíces de explantes de ápices y brotes axilares de cedrón a los treinta días de incubación. . 59

ANEXO 19. Vitrificación, senescencia y contaminación de ruda. . . 60

ANEXO 20. Porcentaje de callo de ruda. . 60

ANEXO 21. Número de brotes de ruda. . 61

ANEXO 22. Longitud de brotes de ruda. . .	62
ANEXO 23. Número de raíces de ruda. .	63
ANEXO 24. Longitud de raíces de ruda. . .	64
ANEXO 25. Vitrificación, senescencia y contaminación de toronjil. .	64
ANEXO 26. Porcentaje de callo de toronjil. .	65
ANEXO 27. Número de brotes de toronjil. .	66
ANEXO 28. Longitud de brotes de toronjil. . .	67
ANEXO 29. Número de raíces de toronjil. .	68
ANEXO 30. Longitud de raíces de toronjil. .	69
ANEXO 31. Número de brotes de cedrón. .	69
ANEXO 32. Longitud de brotes de cedrón. . .	69
ANEXO 33. Número de raíces de cedrón. .	70
ANEXO 34. Longitud de raíces de cedrón. . .	70
ANEXO 35. Vitrificación, senescencia y contaminación de cedrón. . .	70
ANEXO 36. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 1 (0 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de ruda. . .	71
ANEXO 37. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 1 (0 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de ruda. . .	71
ANEXO 38. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 2 (0 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de ruda. .	72
ANEXO 39. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 2 (0 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de ruda. .	73
ANEXO 40. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 3 (0 mg/L ANA y 2.0 mg/L BAP) de ruda. .	74
ANEXO 41. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 3 (0 mg/L ANA y 2.0 mg/L BAP) de ruda. .	75
ANEXO 42. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 4 (0.1 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de ruda. .	76
ANEXO 43. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 4 (0.1 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de ruda. .	77
ANEXO 44. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 5 (0.1 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de ruda. . .	78
ANEXO 45. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 5 (0.1 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de ruda. . .	79

ANEXO 46. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 6 (0.1 mg/L ANA y 2.0 mg/L BAP) de ruda. . .	80
ANEXO 47. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 6 (0.1 mg/L ANA y 2.0 mg/L BAP) de ruda. . .	81
ANEXO 48. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 7 (0.2 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de ruda. . .	82
ANEXO 49. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 7 (0.2 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de ruda. . .	83
ANEXO 50. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 8 (0.2 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de ruda. . .	84
ANEXO 51. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 8 (0.2 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de ruda. . .	85
ANEXO 52. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 9 (0.2 mg/L ANA y 2.0 mg/L BAP) de ruda. . .	86
ANEXO 53. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 9 (0.2 mg/L ANA y 2.0 mg/L BAP) de ruda. . .	87
ANEXO 54. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 1 (0 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de toronjil. . .	88
ANEXO 55. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 1 (0 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de toronjil. . .	89
ANEXO 56. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 2 (0 mg/L ANA y 0.1 mg/L BAP) de toronjil. . .	90
ANEXO 57. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 2 (0 mg/L ANA y 0.1 mg/L BAP) de toronjil. . .	91
ANEXO 58. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 3 (0 mg/L ANA y 0.2 mg/L BAP) de toronjil. . .	92
ANEXO 59. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 3 (0 mg/L ANA y 0.2 mg/L BAP) de toronjil. . .	93
ANEXO 60. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 4 (0.1 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de toronjil. . .	94
ANEXO 61. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 4 (0.1 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de toronjil. . .	95
ANEXO 62. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 5 (0.1 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de toronjil. . .	96
ANEXO 63. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 5 (0.1 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de toronjil. . .	97
ANEXO 64. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 6 (0.1 mg/L ANA y 2.0 mg/L BAP) de toronjil. . .	98

ANEXO 65. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 6 (0.1 mg/L ANA y 2.0 mg/L BAP) de toronjil. . .	99
ANEXO 66. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 7 (0.2 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de toronjil. . .	100
ANEXO 67. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 7 (0.2 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de toronjil. . .	101
ANEXO 68. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 8 (0.2 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de toronjil. .	102
ANEXO 69. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 8 (0.2 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de toronjil. .	103
ANEXO 70. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 9 (0.2 mg/L ANA y 2.0 mg/L BAP) de toronjil. .	104
ANEXO 71. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 9 (0.2 mg/L ANA y 2.0 mg/L BAP) de toronjil. .	105
ANEXO 72. Medición de los parámetros evaluados para explantes provenientes de segmentos nodales en cedrón. . .	106
ANEXO 73. Medición de los parámetros evaluados para explantes provenientes de ápices en cedrón. . .	108

Profesores Informantes

Sra. Nancy Andrade S. – Ing. Agr. M. Sc.

Sra. Ximena Henzi G. – Ing. Agr. Ph. D.

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Universidad Austral de Chile.

El objetivo de esta investigación fue determinar la factibilidad de propagar *in vitro* las especies medicinales ruda (*Ruta graveolens* L.), toronjil (*Melissa officinalis* L.) y cedrón (*Aloysia tryphilla* (L' Her) Britton) y determinar el mejor medio de crecimiento para cedrón. El objetivo específico fue determinar la mejor combinación de fitohormonas a utilizar en los medios de cultivo de ruda, cedrón y toronjil.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar para cada especie, ordenado como experimento factorial de dos factores: la concentración de ANA (3) y la concentración de BAP (3).

En los tres ensayos de micropropagación, se evaluaron los siguientes parámetros: número y longitud de brotes, número y longitud de raíces, senescencia, vitrificación, porcentaje de callo y contaminación.

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples de Tukey, fijando un nivel de probabilidades del 1 y 5%. Los datos porcentuales fueron modificados mediante la Ecuación de Bliss ($\arcsen \sqrt{\% / 100}$).

En el ensayo de ruda, los mejores resultados para las variables número y longitud de brotes se obtuvo con 1 mg/L de BAP. Para número y longitud de raíces, las mejores combinaciones de fitohormonas se obtuvieron en los tratamientos 0,1 mg/L de ANA y 0 mg/L de BAP o 0,2 mg/L de ANA y 0 mg/L de BAP.

En el ensayo de toronjil, para la variable número de brote, la mejor combinación fue 0 mg/L de ANA y 1,0 mg/L de BAP. Para longitud de brote, la mejor respuesta fue la combinación 0 mg/L de ANA y 0 mg/L de BAP. Los tratamientos con 0,1 mg/L de ANA y 0 mg/L de BAP o con 0,2 mg/L de ANA y 0 mg/L de BAP fueron superiores en formación de raíces. Para longitud de raíces, la combinación 0,1 mg/L de ANA y 0 mg/L de BAP obtuvo los mejores resultados.

En el ensayo de cedrón, el único resultado obtenido fue para la variable número de raíces, que fue mayor en explantes provenientes de ápices. La contaminación fue mayor en explantes provenientes de brotes. No hubo diferencias significativas entre explantes de brotes axilares o ápices para las demás variables.

SUMMARY

A research was carried out at the Plant Tissue Culture Laboratory of the Institute of Plant Production and Sanity of Universidad Austral de Chile, in order to resolve the feasibility of propagating *in vitro* the medicinal species rue (*Ruta graveolens* L.), lemon balm (*Melissa officinalis* L.) and lemon verbena (*Aloysia tryphilla* (L' Her) Britton) and to find the best growth medium for lemon verbena. The specific objective was to determine the best combination of plant growth regulators to be use in the culture media of the three species.

A completely randomized experimental design was used, arranged as a factorial experiment, with two factors: NAA concentration (3) and BAP concentration (3).

In the three experiments, corresponding to micropropagation, the parameters number and length of buds, number and length of roots, ageing, vitrification, callus percentage and contamination was evaluated.

Results were subjected to an analysis of variance and to Tukey 's multiple comparison test, with a probability level of 1 and 5%. The percentage data were transformed by means of Bliss 's Equation ($\arcsen \sqrt{\% / 100}$).

In the test of rue, the best results for the variables number and length of buds was obtained with 1 mg/L of BAP. For number and length of roots, the best combinations of plant growth regulators were obtained in the treatments 0,1 mg/L of NAA and 0 mg/L of BAP or 0,2 mg/L of NAA and 0 mg/L of BAP.

In the experiment with lemon balm, for the variable number of buds, the best combination was 0 mg/L of NAA and 1,0 mg/L of BAP. For length of buds, the best response was combination 0 mg/L of NAA and 0 mg/L of BAP. The treatments using 0,1 mg/L of NAA and 0 mg/L of BAP or 0,2 mg/L of NAA and 0 mg/L of BAP were top in formation of roots. For length of roots, the combination 0,1 mg/L of ANA and 0 mg/L of BAP obtained the best results.

In the experiment with lemon verbena, the only obtained result was for the variable number of roots, which was major by using shoot apexes. The contamination was major in explants of axillary buds. There were no significant differences between axillary shoots or

apexes for the other variables.

1. INTRODUCCION

Desde la antigüedad el hombre ha utilizado métodos para combatir las enfermedades. En un comienzo se creía que las enfermedades tenían causas sobrenaturales. Como resultado, el hombre comenzó a aprender sobre la actividad curativa de algunas sustancias que presentaban un valor terapéutico, principalmente de origen vegetal, hierbas que contenían poderosos principios activos. Estos principios activos tienen la capacidad de alterar o modificar el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano. Así, la investigación química y farmacológica ha permitido descubrir una variada gama de plantas que presentan estos principios activos con valor medicinal.

Es sabido que las industrias farmacológicas, cosméticas y alimenticias, han utilizando plantas con características aromáticas, medicinales y culinarias, dentro de las cuales es posible nombrar a ruda (*Ruta graveolens* L.), toronjil (*Melissa officinalis* L.) y cedrón (*Aloysia tryphilla* (L'Hér.) Britton). De esta manera, se ha generado la necesidad de intensificar el cultivo de estas especies para proveer a aquellos que demandan estos productos.

La flora chilena presenta especies tanto silvestres como asilvestradas (especies que han sido introducidas desde sus respectivos lugares de origen), las que destacan por su riqueza y diversidad. De éstas, muy pocas especies son cultivadas con algún fin determinado. El punto inicial es, por tanto, el desarrollo de sistemas de propagación vegetativa.

Plantas que presentan propiedades útiles para el hombre, por contener principios activos de valor terapéutico, son ruda, toronjil y cedrón. Una posibilidad para multiplicar

estas especies vegetales corresponde la micropropagación. Esta es una importante alternativa a las técnicas de propagación vegetativa convencionales,

ya que permite una producción en masa de plantas a partir de pequeñas porciones de material vegetal y con la posibilidad de obtener plantas adultas conservando las características genéticas de la planta madre.

Por ello, se plantea como hipótesis de este trabajo que es posible multiplicar las tres especies por medio de técnicas de cultivo *in vitro*, y que la composición de los medios de cultivo presenta una marcada influencia en la organogénesis.

Los objetivos generales del presente trabajo son determinar la factibilidad de propagar *in vitro* las especies medicinales ruda (*Ruta graveolens* L.), toronjil (*Melissa officinalis* L.) y cedrón (*Aloysia tryphilla*(L`Hér.) Britton) y determinar el mejor medio basal de crecimiento para cedrón.

El objetivo específico es determinar la mejor combinación de fitohormonas a utilizar en los medios de cultivo de ruda, cedrón y toronjil.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1.Descripción botánica de las especies.

En los siguientes puntos se señala la descripción botánica de ruda, toronjil y cedrón.

2.1.1. Ruda (*Ruta graveolens* L.). La Ruda pertenece a la familia de las rutáceas que comprende 161 géneros y unas 1650 especies cosmopolitas, especialmente de ambientes tropicales. El género *Ruta* incluye siete especies de arbustos muy aromáticos. La ruda es una planta medicinal originaria de la cuenca mediterránea y usada como tal desde tiempos antiguos. En Chile escapa de los huertos donde se cultiva y se torna silvestre, en bordes de caminos y potreros (HOFFMANN *et al.*, 1992).

Es un arbusto que mide desde 60 cm hasta un metro de altura, de base leñosa y ramas blandas, de color verde blanquecino. Sus hojas están muy divididas en segmentos ovalados, la cara superior es verde amarillenta y la inferior es verde azulada y contienen abundantes aceites esenciales de olor muy característico y sabor amargo. Las flores, de ocho a diez mm de diámetro están dispuestas en cimas terminales. La corola tiene cuatro o cinco pétalos amarillos, convexos, de borde finamente recortado, de alrededor de medio centímetro de largo. Las hojas de la flor son cóncavas, dentadas en los bordes o lisas, de color puro amarillo en el interior y amarillo verdoso exteriormente. Despide un intenso olor nauseabundo. Floración: agosto a noviembre. El fruto es una cápsula que

contiene semillas lisas, negras. Se cultiva en huertas y jardines, en terrenos bien soleados y pedregosos. Se recolecta durante su floración (HOFFMANN *et al.*, 1992; CUADERNOS POPULARES N° 1, 1987 y KNEIPP, 1894).

2.1.2. Toronjil (*Melissa officinalis* L.). Pertenece a las Labiadas (o Lamiáceas), que son una familia amplia y cosmopolita. Agrupa 224 géneros y unas 5600 especies, de las cuales muchas se cultivan con fines ornamentales, culinarios o medicinales, todas ellas muy aromáticas. El género *Melissa* comprende tres especies, originarias de Europa meridional y el cercano oriente (HOFFMANN *et al.*, 1992; RENGADE, 1887).

El toronjil es una hierba perfumada propia de la Europa meridional y del Asia central, en Chile se encuentra en cultivos y en forma silvestre. Es una hierba perenne, mide desde 60 cm a un metro de altura. Presenta un tallo recto y bien ramificado provisto de pelos glandulosos y con hojas poco tupidas. Sus hojas son anchas, opuestas, pecioladas, aovadas, de base ligeramente acorazonada, de borde dentado y la lámina está finamente abollada. Presenta pecíolos largos en las hojas superiores y cortos en las inferiores, con sabor parecido a limón y muy aromático. Inflorescencia en espigas de unos 20 cm de largo, en las cuales las flores están agrupadas cada cierto trecho. La corola es blanco amarillenta rojiza y bilabiada, con el labio superior ancho tridentado, terminando los dientes en punta fina espinosa, el inferior bipartido con los cortes muy estrechos y puntiagudos (HOFFMANN *et al.*, 1992; CUADERNOS POPULARES N° 2, 1987; KNEIPP, 1894 y RENGADE, 1887).

2.1.3. Cedrón (*Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton) (syn: *Lippia citriodora* Kunt). Es un arbusto que pertenece a la familia *Verbenaceae* y es originario del Perú, sus hojas son en forma de punta de lanza, delgadas y se ubican en los tallos de a tres, a la misma altura. Las flores son pequeñas, blancas y están agrupadas en gran número en ramitas especiales; al comienzo del verano pueden entonces llegar a cubrir el arbusto. Sus hojas despiden un aroma alimonado muy agradable (CUADERNOS POPULARES N° 7, 1987).

2.2. Composición química de ruda, toronjil y cedrón.

A continuación se describe la composición química de las especies en estudio y los compuestos que les confieren la característica de “medicinal”.

2.2.1. Principios activos. Los principios activos son compuestos derivados del metabolismo secundario que se encuentran en las distintas partes u órganos de la planta y que alteran o modifican el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano, permitiendo sostener que las plantas poseen ciertos principios activos que, a su vez, pueden tener un valor medicinal. La investigación química y farmacológica ha permitido descubrir una variada gama de principios activos, de los cuales, los más importantes desde el punto de vista medicinal, son los alcaloides, los aceites esenciales, los glucósidos, los taninos y los mucílagos. Existen además, otros principios activos relevantes, como las vitaminas, los ácidos orgánicos, las sustancias minerales, azúcares diversos, entre otros (HOFFMANN *et al.*, 1992).

2.2.1.1. Principios activos de la familia de las Rutáceas. Esta familia presenta distintos tipos de principios activos. De ellos destacan dos: un aceite esencial y un glucósido flavónico. También posee vitamina C. De los dos derivan sus cualidades terapéuticas más importantes. El aceite esencial está compuesto principalmente por dos cetonas que constituyen cerca del 90% de él, metilheptilcetona y metilhnilcetona. En menores concentraciones presenta pineno, cineol y limoneno (Schauemberg, 1972; Thomson, 1981; Font Quer, 1982; Valnet, 1984; citados por HOFFMANN *et al.*, 1992).

Además, la familia de las Rutáceas presenta alcaloides como furanocumarinas y furoquinolina que son de importancia toxicológica por sus propiedades fotosintetisantes. Después de la absorción cutánea o por vía oral, el efecto de la luz es ocasionar ciertas lesiones a la piel (FROHNE, 1984).

2.2.1.2. Principios activos de la familia de las Labiadas. El principal componente activo es un aceite esencial, compuesto por distintos aldehídos y alcoholes sesquiterpénicos como citral, citronelal, geraniol y linalol. Además de este aceite, se encuentran presentes en la planta una sustancia amarga, mucílago, resina y una saponina ácida. De dichos compuestos, el aceite esencial es el principal responsable de las propiedades sedantes de esta planta. También presenta un flavonoide, en gran cantidad (luteolina 3' -glucuronida) (HOFFMANN *et al.*, 1992 y HEITZ *et al.*, 2000).

2.2.1.3. Principios activos de la familia de las Verbenáceas. La familia de las verbenáceas presentan un aceite esencial, conocido como aceite de verbena que presenta compuestos fenólicos, el cual contiene citral, metilheptenona, carvona, 1-limomeno, dipenteno, geraniol, borneol, terpineol, nerol, linalol, luteolina (7-diglucuronida), el mayor compuesto flavonoide presente y otros constituyentes como β -mirceno, mircenona y α -tujona (SIMON *et al.*, 1984; CARNAT *et al.*, 1995; PASCUAL *et al.*, 2001; VALE *et al.*, 1999 y ZYGADLO *et al.*, 1994).

2.3. Propiedades medicinales de las especies.

En los siguientes puntos se señalan las propiedades medicinales de ruda, toronjil y cedrón.

2.3.1. Propiedades medicinales de la ruda. La ruda es muy frecuentemente usada para el dolor de estómago y resfrío (mezclada con limón). También se cree que posee propiedades abortivas porque produce contracciones de útero, preservativa de enfermedades contagiosas, antiespasmódica (trastornos estomacales y ayuda a la digestión, mal aliento), en varias afecciones nerviosas graves, sudorífica, antihelmíntica y diaforética. También es utilizada para fortalecer la vista, emoliente y vulneraria, promotora del apetito (HOFFMANN *et al.*, 1992; CUADERNOS POPULARES N° 1, 1987; KNEIPP, 1894).

2.3.2. Propiedades medicinales del toronjil. El toronjil se usa junto a otras hierbas medicinales para "el mal nervioso y reumático, es decir, para la pena". Figura entre las plantas de mayor uso en afecciones neuropsiquiátricas y para el susto, además de casos

del corazón, fiebre, insomnio, dolores de cabeza (neuralgias), ansiedad, vértigo, histerismo, reglas dolorosas, presenta actividad antimicrobial, contra el ardor de las picaduras de insectos y estimula la secreción biliar. El toronjil también tiene un importante efecto tónico y estimulante de las funciones síquicas, de lo que deriva su nombre de "toronjil para la pena". En forma paralela se le describe una virtud sedante sobre estados de tensión. Por esta segunda propiedad, se indica para tratar aquellos problemas del corazón y del sistema digestivo (flatulencia, gastroenteritis). En la antigüedad se usó mucho para la rehabilitación de desmayos. Por último, como todas las plantas que poseen aceites esenciales, es carminativa y antiespasmódica (HOFFMANN *et al.*, 1992; CUADERNOS POPULARES N° 2, 1987 y LARRONDO *et al.*, 1995).

2.3.3. Propiedades medicinales del cedrón. Esta especie es utilizada mayormente como tratamiento de desórdenes gastrointestinales y respiratorios. Algunas especies del género también muestran actividades antimalarias, espasmolíticas, sedativas, hipotensivas, antiinflamatorias, diuréticas y estomáticas (PASCUAL *et al.*, 2001; CUADERNOS POPULARES N° 7, 1987 y GUERRERA *et al.*, 1995).

2.4. Propagación *in vitro* de plantas.

La micropropagación se relaciona con la multiplicación de un genotipo específico sin que presente segregación de características genéticas. A menudo incluso se la relaciona con la propagación masal de determinadas plantas a un precio competitivo, como técnica de intensificación de la producción de material vegetativo. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* tiene una amplia gama de aplicaciones, según el objetivo que se desee lograr, e implica, en forma más amplia, la utilización de células, tejidos u órganos de las más diversas procedencias dentro de la planta (SEEMANN, 1993).

El cultivo de tejidos está basado en el principio de la totipotencia, en el cual, cada célula viviente posee el potencial para reproducirse en un organismo completo. La habilidad para regenerar por la totipotencia de la célula vegetal, ofrece una oportunidad notable para la propagación de muchas especies en forma rápida y a gran escala (HARTMANN y KESTER, 1997).

2.4.1. Usos más frecuentes del cultivo de tejidos. Actualmente se reconocen los siguientes usos en relación a la aplicación de técnicas de cultivo de tejidos:

Mejoramiento genético. En la mejora vegetal el cultivo de tejidos juega un papel determinante, ya que a través del cultivo *in vitro* es posible la obtención de individuos haploides, cuya duplicación posterior de su número cromosomal dará origen a diploides, triploides, etc. Homocigóticos. Es frecuente además la obtención de mutantes que pueden constituir una gran perspectiva en el mejoramiento. Los híbridos interespecíficos que dan como resultado embriones que abortan rápidamente, pueden lograrse por la técnica de recuperación. La ingeniería genética (para la obtención de plantas transgénicas) y la fusión de protoplastos, son también una gran ayuda para la mejora de plantas, al igual que la selección por resistencia a un agente determinado.

Obtención de material sano (libre de virus y otros patógenos), fundamentalmente cuando se utiliza meristema como explante.

Conservación e intercambio de germoplasma.

Micropropagación. El uso más frecuente de la técnica es el de la rápida multiplicación de individuos vegetales. Esta rapidez se debe, entre otros factores, a la posibilidad de obtener un elevado número de explantes a partir de una planta donante y a la velocidad de regeneración de éstos, debida al control tanto del medio, como de las condiciones ambientales en las cuales se lleva a cabo la multiplicación.

Estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica, histología, organografía y ciencias afines.

Bioconservación y producción de compuestos útiles (metabolitos). Es el caso de fermentaciones y en ocasiones la producción de metabolitos de uso en farmacia, cosmetología, distintos productos biológicos, etc.

Incremento de la variabilidad genética (SEEMANN, 1993; MONTOYA, 1991; ROCA y MROGINSKI, 1991).

2.4.2. Ventajas de la micropropagación. Las ventajas de la micropropagación son las siguientes:

- Los cultivos se inician de partes muy pequeñas de las plantas (explantes) y posteriormente se propagan los brotes. La micropropagación implica que solamente se necesita un espacio pequeño para mantener o multiplicar un gran número de plantas.

Permite la producción en masa de clones específicos. Pueden producirse clones de muchas clases de plantas que de otra manera serían lentas y difíciles (o imposibles), por medio de propagación vegetativa.

- Se logra un incremento acelerado del número de plantas derivadas de un genotipo. Como es posible un ajuste de los factores que influyen en la propagación vegetativa, tales como nutrientes y niveles de reguladores de crecimiento, se consigue una tasa de propagación mayor que la propagación convencional. Lo anterior, puede acelerar la producción de nuevas variedades (HARTMANN y KESTER, 1997; MONTOYA, 1991 y SEEMANN, 1993).

- Hace posible la producción de plantas libres de patógenos. La propagación se lleva a cabo en condiciones asépticas, libres de patógenos. Una vez que los cultivos se han iniciado no se presentan pérdidas debidas a enfermedades y las plantas producidas serán libres de bacterias y hongos y en algunos casos de virus.

- Posibilita la propagación clonal de un grupo de padres para la producción de semilla híbrida.

- Permite la producción anual de plantas. La producción de plantas puede hacerse durante todo el año, pues es independiente de los cambios estacionales.

- Contribuye a la preservación de germoplasma. El material producido vegetativamente puede almacenarse por largos períodos.

- Se puede multiplicar un gran número de plantas en un espacio reducido. Se

requiere menos espacio de invernadero para fines de propagación y mantención de plantas madres.

- Permite facilidad de transporte del material propagado *in vitro* (HARTMANN y KESTER, 1997; MONTOYA, 1991 y SEEMANN, 1993).

2.4.3. Desventajas de la micropropagación. Algunas de las desventajas que se presentan con este sistema son las siguientes:

Son técnicas costosas, sofisticadas que requieren de personal calificado.

Presentan altos costos de producción de producción que resulta de procesos de alto input.

Se requiere de adecuados sistemas de almacenaje y un sistema continuo de distribución para altos volúmenes. Para el éxito se requieren buenas habilidades en el manejo del material.

La contaminación por hongos o bacterias, o la infestación por insectos puede causar grandes pérdidas en un corto tiempo.

La producción y variabilidad de individuos fuera de tipo, puede causar riesgos en los productos emergentes de la micropropagación. Pueden producirse aumentos en los daños de genes fundamentalmente por aberraciones (HARTMANN y KESTER, 1997 y MONTOYA, 1991).

- Las plantas obtenidas inicialmente no son autotróficas y tienen que someterse a un período transicional antes que sean capaces de crecimiento independiente.

- Aunque se puede producir gran número de plantas su tamaño es pequeño (HARTMANN y KESTER, 1997 y MONTOYA, 1991).

2.4.4. Preparación del medio de cultivo. Los ingredientes del medio de cultivo varían con el tipo de planta y estado de propagación con que se está trabajando. El medio de cultivo puede realizarse con reactivos puros o comprados como medios comerciales previamente mezclados (HARTMANN y KESTER, 1997).

Los componentes principales de un medio de cultivo son:

2.4.4.1. Sales inorgánicas. Proveen los macroelementos (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio) y los microelementos como son boro, cobalto, cobre, manganeso, yodo, hierro y zinc (HARTMANN y KESTER, 1997).

2.4.4.2. Compuestos orgánicos. Dentro de los compuestos orgánicos se encuentran los carbohidratos (sucrosa, glucosa, fructosa, maltosa y almidón han sido utilizados ocasionalmente), las vitaminas (la tiamina (0.1 a 0.5 mg/L), el ácido nicotínico (0.5 mg/L) y la piridoxina (0.5 mg/L), el inositol (100 mg/L), el ácido pantoténico (0.1 mg/L) y la biotina (0.1 mg/L) son usualmente aplicados), los reguladores de crecimiento (en el cual existen dos clases muy importantes para el control del desarrollo de órganos y tejidos y son las auxinas y las citoquininas. Las giberelinas han sido también usadas para promover la elongación del brote (HARTMANN y KESTER, 1997).

En el Anexo1 se observan las necesidades nutricionales y hormonales del cultivo *in vitro*.

2.4.4.3. Soportes inertes. La efectividad de un cultivo depende tanto de los ingredientes básicos -nutrimentos, azúcar y hormonas- como del agente gelatinizador. Dentro de los soportes inertes de tipo sólido es posible encontrar el agar y sus sustitutos (como gelrite) y soportes líquidos (SZABADOS *et al.*, 1991 y HARTMANN y KESTER, 1997).

En el Anexo 2 se observa algunos tipos de medios de cultivo y sus componentes principales.

2.5. Aspectos generales del cultivo *in vitro*.

A continuación se presentan diversos aspectos que describen las etapas del trabajo de cultivo *in vitro* que son comunes para las especies en general.

2.5.1. Material vegetal base para propagar. Los cultivos *in vitro* pueden iniciarse prácticamente a partir de cualquier parte de la planta o explante (ORGANIZACION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION (FAO), 1990 y HARTMANN y KESTER, 1997).

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. Es muy frecuente la utilización de ápices o meristemas caulinares, hojas, entrenudos, cotiledones, raíces, anteras e inclusive tejidos altamente diferenciados como los provenientes de frutos (ROCA y MROGINSKI, 1991).

2.5.2. Desinfección de tejidos vegetales. En lo relacionado con la asepsia del material vegetal son muchos los productos utilizados para separar de las superficies vegetales el gran número de microorganismos, que pueden llegar a contaminar el medio de cultivo (MONTROYA, 1991).

Para la desinfección del material vegetativo, se utiliza comúnmente el hipoclorito de calcio y sodio (FAO, 1990).

Algunos alcoholes etílicos e isopropílicos son también utilizados como desinfectante de superficies y generalmente el tiempo de exposición a éstos es menor que a los hipocloritos (no debe utilizarse metanol). Otros productos usados frecuentemente son el agua oxigenada (peróxido de hidrógeno), nitrato de plata, cloruro de mercurio, antibióticos y algunos desinfectantes en base de yodo. Durante la desinfección es común adicionar a las soluciones de los productos usados, algún producto surfactante (detergente) que permita una mayor penetración para la eliminación de los microorganismos debida a la disminución de la tensión superficial (MONTROYA, 1991).

2.6. Antecedentes del cultivo *in vitro* de ruda, toronjil y

cedrón.

A continuación se señalan los antecedentes obtenidos del cultivo *in vitro* de las especies mencionadas.

2.6.1. Micropropagación de ruda. Según JOHN *et al.* (1997), los protocolos para la multiplicación *in vitro* de *R. graveolens* L. fueron establecidos para el cultivo de segmentos nodales e internodales, brotes y segmentos de hojas. Se utilizó un medio Murashige y Skoog (MS) conteniendo 0,01 a 0,03 mg/L de ácido indol acético (AIA), 3 mg/L de kinetina y 4 mg/L de benziladenina (BA o BAP) al usar como explantes segmentos nodales e internodales. Se obtuvo una gran proliferación de yemas axilares y organogénesis sobre la superficie de los cortes. En el caso de la utilización de brotes, se requirió de un medio MS más 0,5 mg/L de AIA y 4 mg/L de BAP. El resultado fue la formación de brotes de los explantes. En el caso del uso de segmentos de hojas como material para propagar *in vitro*, se utilizó un medio MS conteniendo 2 mg/L de AIA, 2 a 6 mg/L de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), 0,3 mg/L de kinetina/L y 4 mg/L de sulfato de adenina (como suplemento), obteniéndose como resultado callo organogénico. Los brotes del callo se transfirieron a un medio con 0,8 mg/L de AIA y 8 mg/L de kinetina. El callo derivado de pecíolos llegó a ser embriogénico en el mismo medio y las plántulas fueron recuperadas cuando se transfirieron a un medio MS con 2 mg/L de BA solamente. Los brotes aislados fueron enraizados en un medio basal fuerte de MS y después de cosechar, las plántulas fueron creciendo en el suelo.

Al utilizar un medio MS que contiene 1 mg/L de ácido naftalén acético (ANA), 0,1 mg/L de kinetina y 1 mg/L de 2,4-D se puede obtener como resultado la formación de callo (RAMAWAT *et al.*, 1987).

CASTRO *et al.* (1999), utilizaron un medio de cultivo ½ MS con 0,1 mg/L de BAP, y obtuvieron como resultado plántulas más grandes y con un mayor número de hojas que un medio sin BAP.

2.6.2. Micropropagación de toronjil. Se utilizó como material de propagación hipocótilos y cotiledones de plantas madres estériles, en un medio MS con 0,1 mg/L de 2,4-D y 0,1 mg/L de BAP. Las plántulas fueron regeneradas del callo en un medio MS suplementado con 0,1 mg/L de ANA y BAP. El número de callos formados fue menor que el medio suplementado con 2,4-D y BAP. La mejor formación de callo se logró en un medio MS más isopenteniladenina (2iP), también citoquininas, pero solamente indujo la regeneración de plántulas desde callo. Se formó callo de plantas madres jóvenes de una a tres semanas después de su germinación. Los callos más pesados fueron obtenidos (en orden descendente) a partir de: cotiledones, seguido por hipocótilo y raíces (MATSUBARA *et al.*, 1996).

Múltiples brotes fueron diferenciados en nudos cotiledonares de 10 días de edad cultivados en un medio MS más 0 a 4 mg/L de BAP. El mayor promedio de brotes se obtuvo con 2 mg/L de BAP con dos inoculaciones: 24 brotes axilares/explante, siete en la primera inoculación y 17 en la segunda. La mayor elongación de brote se obtuvo con 0,2 mg/L de BAP, mayores concentraciones indujo la disminución en el tamaño del brote. Un rango de concentración de BAP entre 0,2 y 0,5 mg/L permitió la producción de más brotes

con un tamaño capaz de enraizar. Las raíces desde brotes fueron inducidas en 30 días en un medio MS individualmente, suplementado con ácido indol butírico (AIB) o ANA (0,4 mg/L). Las plantas micropropagadas fueron exitosamente transferidas al suelo (TAVARES *et al.*, 1996).

ABOU MANDOUR *et al.* (1994), utilizaron explantes de hojas y tallos de plantas y segmentos de raíces asépticos que fueron cultivados en un medio MS y Abou-Mandour suplementado con kinetina, BAP, AIB, AIA, ANA y 2,4-D individualmente o en varias combinaciones en concentraciones de 0,3 a 10 mg/L. La mejor inducción de callo fue en un medio MS más uno a dos mg/L de AIB. Aunque los explantes de hoja y tallo fueron la mejor fuente de compacto, callos nodulados, solamente los callos generados de los segmentos de raíces se diferenciaron. Raíces derivadas de raíces del callo se desarrollaron en presencia de ANA y de ellas se formaron plántulas intactas en un medio MS con AIB (ABOU MANDOUR *et al.*, 1994).

2.6.3. Micropropagación de cedrón. SANSBERRO y MROGINSKI (1996), estudiaron la regeneración de *Aloysia polystachia*, especie emparentada al cedrón, utilizando segmentos nodales. Las plántulas fueron obtenidas de explantes con una a tres yemas axilares. Se cultivó asépticamente en un medio $\frac{1}{4}$ MS semisólido y 0,5% de sucrosa pero desprovisto de reguladores de crecimiento. Las condiciones de incubación fueron 27 ± 2 °C y 14 horas de fotoperíodo. Los mejores resultados fueron obtenidos de explantes con tres yemas.

Lippia alba (Mill.) N. E. Br., que pertenece a la familia *Verbenaceae*, es otra especie muy emparentada al cedrón. Esta planta fue estudiada para obtener un método de multiplicación rápida *in vitro*. Los segmentos nodales fueron inducidos a formar brotes en un medio basal MS con 2 mg/L de BAP. Estos brotes posteriormente enraizaron fácilmente al ser transferidos a un medio basal MS (GUPTA *et al.*, 2001).

3. MATERIAL Y METODO

3.1. Materiales.

Para el desarrollo de la siguiente investigación se requirieron diversos materiales e instalaciones, las que se mencionan a continuación:

3.1.1. Ubicación del ensayo. Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, ubicado en el Campus Isla Teja de la Universidad Austral de Chile, en Valdivia.

3.1.2. Material vegetal. El material vegetal utilizado en los ensayos correspondió a segmentos mononodales de tres especies vegetales con características medicinales: Ruda (*R. graveolens* L.), cedrón (*A. tryphilla* (L`Hér.) Britton) y toronjil (*M. Officinalis* L.).

3.1.3. Material de laboratorio. El material utilizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales fue el siguiente: vasos y frascos de vidrio, probetas, pipetas, pinzas, bisturí, cámara de flujo laminar, balanzas, soluciones requeridas para la elaboración de los medios de cultivo, pH-metro, horno microondas, autoclave, cámara de incubación.

3.2. Método.

El método utilizado para la realización de este estudio fue el siguiente:

3.2.1. Descripción de los ensayos. Para cada especie en cuestión, se realizó un ensayo para evaluar la mejor combinación de dos fitohormonas, la auxina sintética ácido naftalenacético (ANA) y la citoquinina benzilaminopurina (BA; BAP), utilizando como medio basal el de Murashige & Skoog (MS).

En el caso del cedrón, se realizaron dos ensayos, el primero estuvo basado en determinar el mejor medio de crecimiento de los explantes sembrados:

- Medio A1: Medio MS completo + 20 g/L sacarosa + 0.1 de ANA y 1.0 de BAP + gelrite
- Medio A2: Medio MS ½ + 20 g/L sacarosa + 0.1 de ANA y 1.0 de BAP + gelrite
- Medio A3: Medio MS ¼ + 20 g/L sacarosa + 0.1 de ANA y 1.0 de BAP + gelrite
- Medio Aw: Medio WPM + 20 g/L sacarosa + 0.1 de ANA y 1.0 de BAP + gelrite

Cada tratamiento presentó un número de 25 repeticiones.

El segundo ensayo determinó la mejor combinación de las fitohormonas mencionadas anteriormente.

3.2.2. Selección del material vegetal. El material vegetal usado para los ensayos, correspondió a los nudos de los tallos que contenían yemas axilares en crecimiento. Para las tres especies en cuestión, los explantes utilizados presentaron uno a tres brotes.

En el caso de ruda y toronjil, los explantes utilizados para los ensayos se obtuvieron de material vegetal de plantas previamente micropropagadas en medio MS con 0.1 mg/L de ANA y 1.0 mg/L de BAP con un pH regulado a 5,7.

3.2.3. Preparación de los medios de cultivo. Se utilizó un medio basal Murashige &

Skoog (MS), incluyendo 20 g/L de sacarosa, 2 g/L de gelrite con un pH regulado a 5,8.

Se prepararon 9 tratamientos formados por la combinación de las dos fitohormonas anteriormente mencionadas a diferentes niveles de concentración:

- Tratamiento 1 (0 mg de ANA y 0 mg de BAP)
- Tratamiento 2 (0 mg de ANA y 1.0 mg de BAP)
- Tratamiento 3 (0 mg de ANA y 2.0 mg de BAP)
- Tratamiento 4 (0.1 mg de ANA y 0 mg de BAP)
- Tratamiento 5 (0.1 mg de ANA y 1.0 mg de BAP)
- Tratamiento 6 (0.1 mg de ANA y 2.0 mg de BAP)

Tratamiento 7 (0.2 mg de ANA y 0 mg de BAP)

Tratamiento 8 (0.2 mg de ANA y 1.0 mg de BAP)

Tratamiento 9 (0.2 mg de ANA y 2.0 mg de BAP)

3.2.4. Desinfección del material vegetal. En primer lugar el material fue lavado con agua corriente más un detergente líquido comercial (Quix). Luego, en la cámara de flujo laminar, se sumergieron los tallos con entrenudos por diez segundos en etanol al 70% y luego por 15 minutos en hipoclorito de sodio al 10% de producto comercial (clorinda). Finalmente, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril para su enjuague.

Para el cedrón, se realizó un pre-tratamiento de desinfección por una hora en que el material vegetal fue sumergido en una mezcla de los fungicidas Captan (2,7 g/L) y Benlate (1,8 g/L). Luego se realizó la desinfección usual.

3.2.5. Siembra. Luego de la desinfección, el material vegetal de cedrón fue trozado, donde se obtuvo explantes con una sola yema, cada uno de aproximadamente 5 x 7 mm, donde partes dañadas, hojas y ápices de los tallos fueron extraídos.

Para ruda los explantes tuvieron un tamaño similar al cedrón. En el caso de toronjil, su tamaño fue mayor, aproximadamente de 7 x 10 mm, más que nada, esto dependió del tamaño de los tallos de las especies.

3.2.5.1. Siembra de toronjil. La siembra de toronjil fue realizada el día 14 de noviembre del 2000.

3.2.5.2. Siembra de ruda. Para el ensayo de toronjil, su siembra fue realizada el día 22 de noviembre del 2000.

3.2.5.3. Siembra de cedrón. La siembra fue realizada el día 1 de marzo del 2001.

3.2.6. Condiciones ambientales. Las condiciones ambientales de la cámara de incubación fueron las siguientes:

La temperatura ambiental fue de 23 ± 1 °C

El cultivo se mantuvo con un fotoperíodo de 16 horas

La intensidad lumínica fue de 2500 lux

3.2.7. Diseño experimental. Para los ensayos de combinación de fitohormonas se aplicó un diseño completamente al azar, ordenado como experimento factorial de dos factores: la concentración de auxinas (3) y la concentración de citoquininas (3). Cada ensayo contó con nueve tratamientos y se utilizaron para cada tratamiento un número de 20 repeticiones, correspondientes a un explante cada una. Los ensayos fueron separados por especie.

3.2.8. Parámetros de evaluación. Los parámetros de evaluación fueron los siguientes:

Contaminación, porcentaje

Formación de callo, porcentaje

Formación de brotes, número y longitud

Formación de raíces, número y longitud

Vitrificación, porcentaje

Senescencia, porcentaje

3.2.9. Fecha de evaluación. Para cada ensayo, antes de comenzar con su evaluación, se dejó un período de crecimiento de aproximadamente 15 días después de la siembra. En el caso de ruda y toronjil, se realizaron cuatro evaluaciones en las que había aproximadamente una semana de diferencia entre cada una, para cedrón se realizó solamente una evaluación; en las que fueron medidos el número y longitud de brotes y raíces y número de plantas que presentaron vitrificación, senescencia, contaminación y formación de callo.

Para evaluar el efecto de los distintos tratamientos hormonales en cuanto a las variables número y tamaño de brotes y raíces y porcentaje de callo se utilizó tres niveles de concentración de ANA (nivel 1= 0 mg/L; nivel 2= 0.1 mg/L y nivel 3= 0.2 mg/L) y tres niveles de concentración de BAP (nivel 1= 0 mg/L; nivel 2= 1.0 mg/L y nivel 3= 2.0 mg/L) para los ensayos de ruda y toronjil.

3.2.9.1. Fechas de evaluación de ruda. Se realizaron cuatro evaluaciones en este ensayo:

Primera evaluación: 07 de diciembre del 2000

Segunda evaluación: 12 de diciembre del 2000

Tercera evaluación: 19 de diciembre del 2000

Cuarta evaluación: 27 de diciembre del 2000

3.2.9.2. Fechas de evaluación de toronjil. Las siguientes fueron las fechas de evaluación de este ensayo:

Primera evaluación: 27 de noviembre del 2000

Segunda evaluación: 06 de diciembre del 2000

Tercera evaluación: 11 de diciembre del 2000

Cuarta evaluación: 18 de diciembre del 2000

3.2.9.3. Fecha de evaluación de cedrón. La fecha de evaluación del cedrón fue realizada un mes después de su siembra, es decir, el día 01 de abril del 2001.

3.2.10. Análisis estadístico. El análisis estadístico utilizado fue el Análisis de Varianza (ANDEVA) y el Test de Tukey al 1 y 5%. Los datos porcentuales fueron modificados mediante la Ecuación de Bliss ($\sqrt{\% / 100}$).

4. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

En los siguientes puntos se presentan y discuten los resultados obtenidos en los ensayos de micropropagación de las tres especies con características medicinales, ruda (*Ruta graveolens* L.), toronjil (*Melissa officinalis* L.) y cedrón (*Aloysia tryphilla*).

4.1. Ensayo N° 1 de Ruda (*Ruta graveolens* L.).

Para evaluar el efecto de los distintos tratamientos hormonales para las variables número y longitud de brotes y raíces y porcentaje de callo se utilizó tres niveles de ANA (nivel 1= 0 mg/L; nivel 2= 0.1 mg/L y nivel 3= 0.2 mg/L) y tres niveles de BAP (nivel 1= 0 mg/L; nivel 2= 1 mg/L y nivel 3= 2 mg/L).

4.1.1. Vitrificación, senescencia y contaminación. En cuanto a la senescencia y contaminación, no se encontraron diferencias significativas en ningún sentido, lo que se aprecia en el Cuadro 1.

CUADRO 1. Porcentaje de senescencia y contaminación de ruda a las cinco semanas de incubación.

Tratamiento (mg/L)	Senescencia (%/100)	Valor transformado	Contaminación (%/100)	Valor transformado
0 ANA / 0 BAP	0,38	0,66	0	0
0 ANA / 1 BAP	0,50	0,79	0	0
0 ANA / 2 BAP	0,50	0,79	0	0
0,1 ANA / 0 BAP	0,27	0,55	0	0
0,1 ANA / 1 BAP	0,50	0,79	0,1	0,32
0,1 ANA / 2 BAP	0,41	0,69	0	0
0,2 ANA / 0 BAP	0,42	0,71	0	0
0,2 ANA / 1 BAP	0,31	0,59	0	0
0,2 ANA / 2 BAP	0,36	0,64	0	0

Nota: Valor transformado mediante $\arcsen \sqrt{\% / 100}$

En el caso de porcentaje de senescencia en ruda, los tratamientos fluctuaron entre un 27 y un 50%. En cuanto al porcentaje de contaminación, sólo se obtuvo un 10% en el tratamiento 5 (0,1 mg/L ANA y 1 mg/L BAP), es decir, como resultado de este ensayo, se obtuvo casi el 100% de plantas vivas.

SEEMANN (1993), establece que la contaminación es uno de los principales problemas en el establecimiento de cultivos *in vitro* como en su posterior propagación clonal.

CUADRO 2. Efecto principal de la concentración de BAP (mg/L) sobre el porcentaje de vitrificación de ruda a las cinco semanas de incubación.

Efecto principal	Vitrificación (%)	
	Valor real (%/100)	Valor transformado*
Factor B (Conc. BAP mg/L)		
0	0,38 b	0,66
1	0,69 a	0,98
2	0,70 a	0,99
DHS=0,01		0,08

*= Valor transformado mediante $\arcsen \sqrt{\% / 100}$

4.1.2. Porcentaje de callo. RAMAWAT *et al.* (1987), establecen que en un medio MS que contiene una concentración considerable de auxina (1 mg/L de ANA) y una concentración más bien baja de citoquinina (0.1 mg/L), se puede obtener como resultado la formación de callo organogénico.

En la primera medición aparecieron diferencias significativas debidas a ambos tratamientos hormonales. La presencia de ANA produjo un porcentaje de callo significativamente mayor que en su ausencia y con la dosis de esta hormona de 0.2 mg/L fue significativamente mayor que con 0.1 mg/L. En cuanto a BAP, en ausencia de hormona se produjo porcentajes de callo significativamente mayores.

En la segunda medición sólo hubo diferencias atribuibles a ANA en el mismo sentido que en la primera medición, es decir, aquellos tratamientos que contienen ANA, en ausencia de BAP, presentan mayor porcentaje de callo (Cuadro 3).

CUADRO 3. Efecto principal de la concentración de ANA y BAP (mg/L) sobre el porcentaje de callo de ruda a las cinco semanas de incubación.

Efecto principal	Porcentaje de callo	
	Valor real (%/100)	Valor transformado*
Factor A (Conc. ANA mg/L)		
0	0,15 c	0,40
0,1	0,64 b	0,93
0,2	0,82 a	1,13
DHS=0,01		0,18
Factor B (Conc. BAP mg/L)		
0	0,67 a	0,96
1	0,44 b	0,73
2	0,50 ab	0,79
DHS=0,01	0,18	

*= Valor transformado mediante $\arcsen \sqrt{\% / 100}$

En la tercera medición, la única diferencia detectable fue que en presencia de ANA, el porcentaje de callo fue significativamente mayor que en su ausencia.

En cuanto a la interacción entre ANA y BAP en el porcentaje de callo, se diferencian por sobre los demás aquellos tratamientos que presentan ANA, como es el caso del tratamiento 4 con 0,1 mg/L y los tratamientos 7, 8 y 9 con la mayor concentración de ANA del ensayo.

En la Figura 1 se observa la interacción entre las dos fitohormonas y su efecto sobre el porcentaje de callo de ruda.

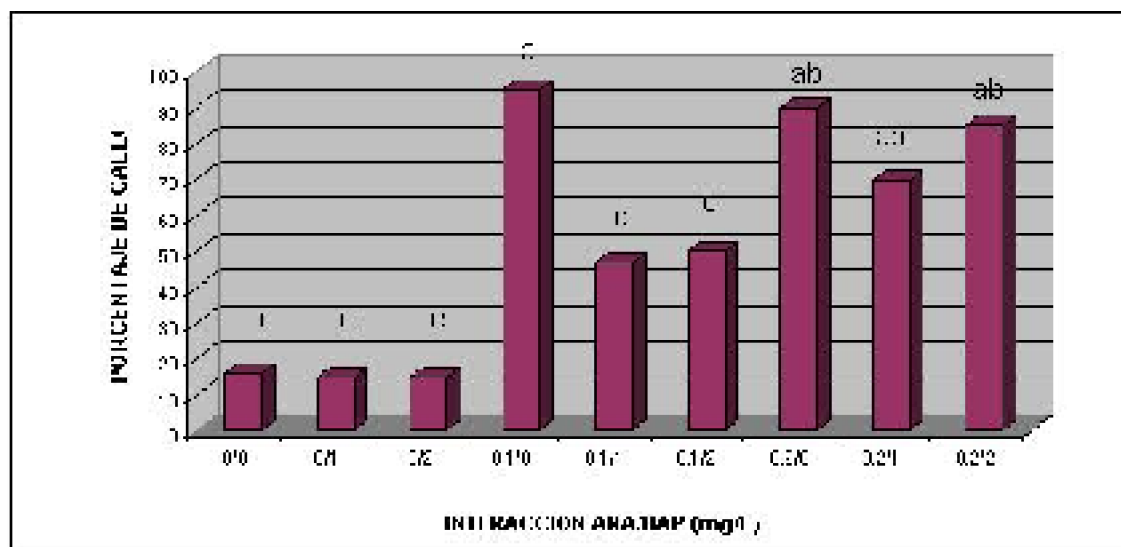


FIGURA 1. Efecto de la interacción entre ANA y BAP (mg/L) sobre el porcentaje de callo de ruda a las cinco semanas de incubación.

En la cuarta medición, los tratamientos con ANA tuvieron un porcentaje de callo

significativamente mayor que sin la hormona. En cuanto a BAP, la dosis de 2.0 mg/L obtuvo un porcentaje significativamente mayor de callo que la dosis 1.0 mg/L, al ir combinada con ANA. El mayor porcentaje de callo se produjo con 0,1 mg/L ANA y 0 mg/L BAP combinados, con un 95%.

4.1.3. Número y longitud de brotes. JOHN *et al.* (1997), determinaron que los mejores explantes a utilizar en ruda para la obtención de brotes son los segmentos nodales. De esta manera, los resultados obtenidos indican que una mayor producción de brotes y de mayor longitud, se producen necesariamente en presencia de tejido meristemático.

Para el número de brotes, se detectaron diferencias significativas atribuibles a ambos tratamientos hormonales en la primera medición. Para ambas hormonas, su presencia produjo un número de brotes significativamente mayor que en su ausencia. No se detectaron diferencias entre las dosis hormonales aplicadas.

Desde la segunda a la cuarta medición no se detectó diferencias significativas atribuibles a la presencia de ANA. En cuanto a BAP, en su presencia se produjo un número significativamente mayor de brotes. No se detectaron diferencias entre las dosis utilizadas (Figura 2).

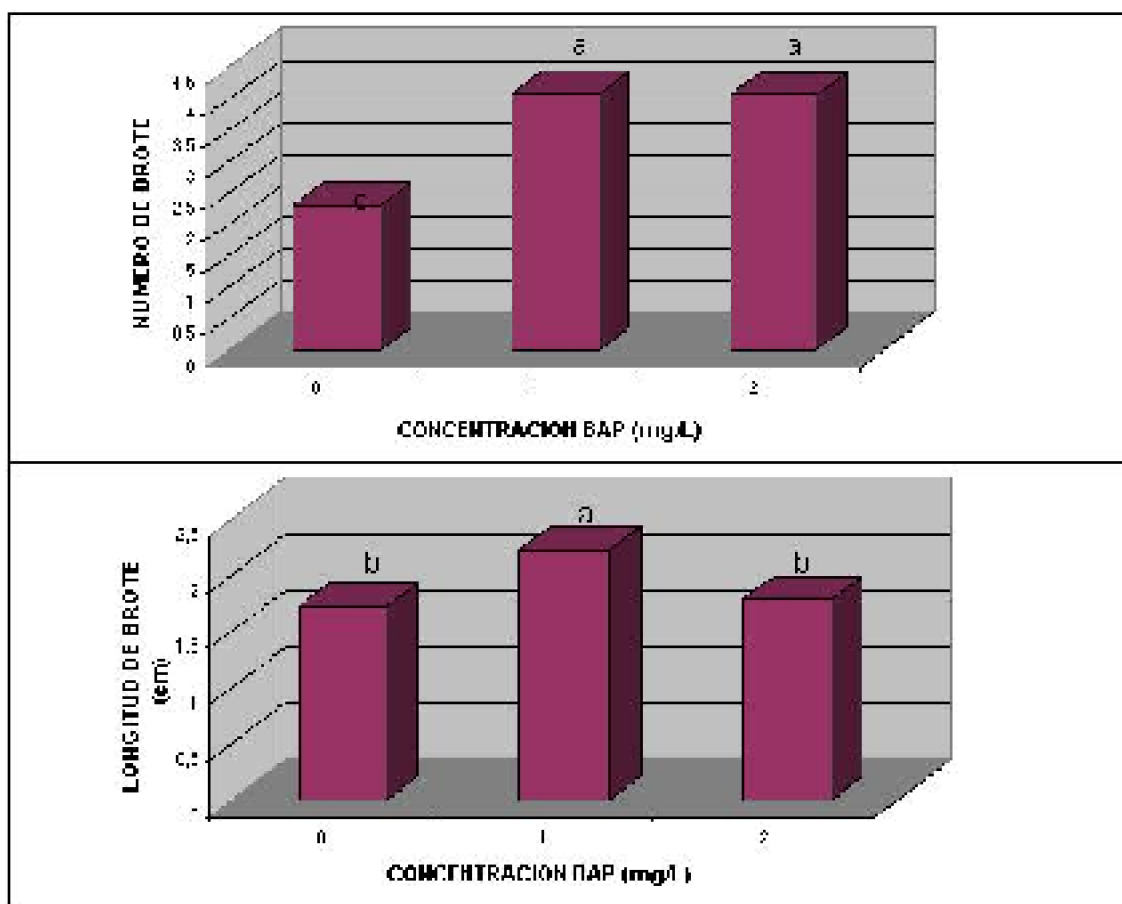


FIGURA 2. Efecto de la concentración de BAP (mg/L) en el número y longitud de brotes de ruda a las cinco semanas de incubación.

Durante el mes de incubación en cámara de ambiente controlado, fue posible la elongación de los brotes. Los valores numéricos no son impresionantes, pero tomando en cuenta el corto tiempo transcurrido se debe considerar como un desarrollo exitoso.

No se presentaron diferencias significativas en cuanto a la concentración de ANA para la formación de brotes.

Durante las dos primeras mediciones no se detectaron diferencias significativas en la longitud de brotes. Los tratamientos se comportan en forma similar.

En la tercera medición apareció una diferencia significativa atribuible a BAP. Al examinarla en detalle, no hubo diferencias entre los tratamientos con y sin hormona, la diferencia se produjo entre los niveles 2 y 3 de BAP, siendo significativamente mayor el tamaño de los brotes con el nivel 2 (de 1 mg/L de BAP).

En la cuarta medición nuevamente aparece la diferencia atribuible a BAP. En este caso, la presencia de esta hormona produjo brotes significativamente mayores que en su ausencia, además el nivel 2 de BAP produjo brotes significativamente mayores que el nivel 3. Los mejores resultados obtenidos en cuanto a los parámetros de número y longitud de brotes fueron producidos por la concentración de BAP de 1 mg/L, con 4,1 brotes por explante y 2,23 cm por brote.

4.1.4. Número y longitud de raíces. En los casos número y longitud de raíces, no se obtuvieron datos cuantificables en todos los tratamientos, ya que en las primeras mediciones no se obtuvo formación ni crecimiento de raíces, porque después de la siembra, se comenzó a formar un tejido cicatrizante que luego derivó a callo organogénico. Después de la formación de callo, se produjeron raíces. Por esta razón, el análisis más completo posible fue considerando sólo dos niveles de ANA (0.1 mg/L y 0.2 mg/L) en la tercera y cuarta mediciones. Es así que se pudo determinar que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos. Los tratamientos se comportaron de forma similar.

En las dos mediciones analizadas, no se detectaron diferencias significativas en la longitud de las raíces atribuibles a los tratamientos hormonales.

Aunque los tratamientos se comportan en forma similar, es posible destacar dos tratamientos que presentan un número y longitud de raíces considerablemente mayor a los demás. Ellos son los tratamientos 4 (0,1 mg/L de ANA y 0 mg/L de BAP) y 7 (0,2 mg/L de ANA y 0 mg/L de BAP), que presentan las mayores concentraciones de auxina. El tratamiento 4 presentó 1,47 raíces/explante y 0,37 cm/raíz y el tratamiento 7 presentó 1,8 raíces/explante y 0,43 cm/raíz. Estos resultados quedan claramente demostrados en el Cuadro 4.

CUADRO 4. Número y longitud de raíces de ruda a las cinco semanas de incubación.

Concentración ANA/BAP (mg/L)	Nº Raíces	Long. raíces (cm)
0/0	0,21	0,14
0/1	0	0
0/2	0	0
0,1/0	1,47	0,37
0,1/1	0,05	0,05
0,1/2	0,05	0,04
0,2/0	1,8	0,43
0,2/1	0,2	0,08
0,2/2	0,05	0,04

A continuación se presentan en las Figuras 3, 4 y 5, el cultivo *in vitro* de ruda en cámara de incubación.

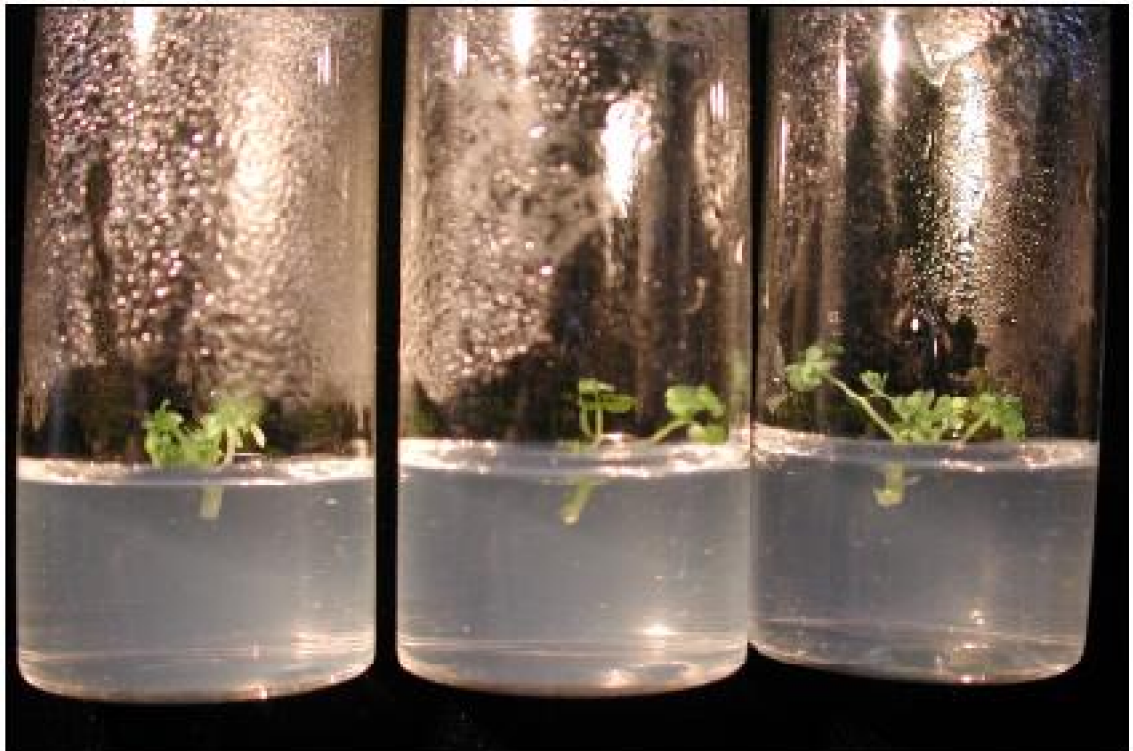


FIGURA 3. Cultivo in vitro de ruda con 12 días de incubación.

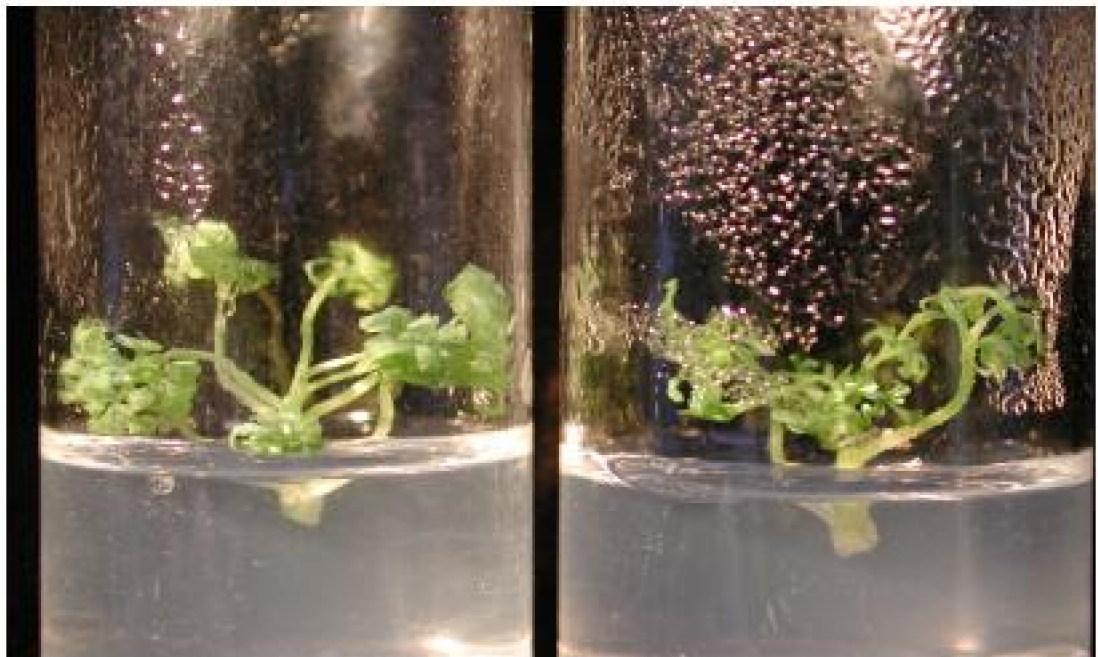


FIGURA 4. Cultivo de Ruda con 25 días de incubación.



FIGURA 5. Plantas adultas de Ruda con 40 días de incubación.

4.2. Ensayo N° 2 de toronjil (*Melissa officinalis* L.)

Para evaluar el efecto de los distintos tratamientos hormonales en cuanto a las variables número y tamaño de brotes y raíces y porcentaje de callo se utilizó tres niveles de ANA (nivel 1= 0 mg/L; nivel 2= 0.1 mg/L y nivel 3= 0.2 mg/L) y tres niveles de BAP (nivel 1= 0 mg/L; nivel 2= 1 mg/L y nivel 3= 2 mg/L).

4.2.1. Vitrificación, senescencia y contaminación. La proporción de vitrificación fue significativamente mayor en los tratamientos con ANA que en su ausencia. A continuación, en la Figura 6 se aprecian los porcentajes de los parámetros anteriormente nombrados.

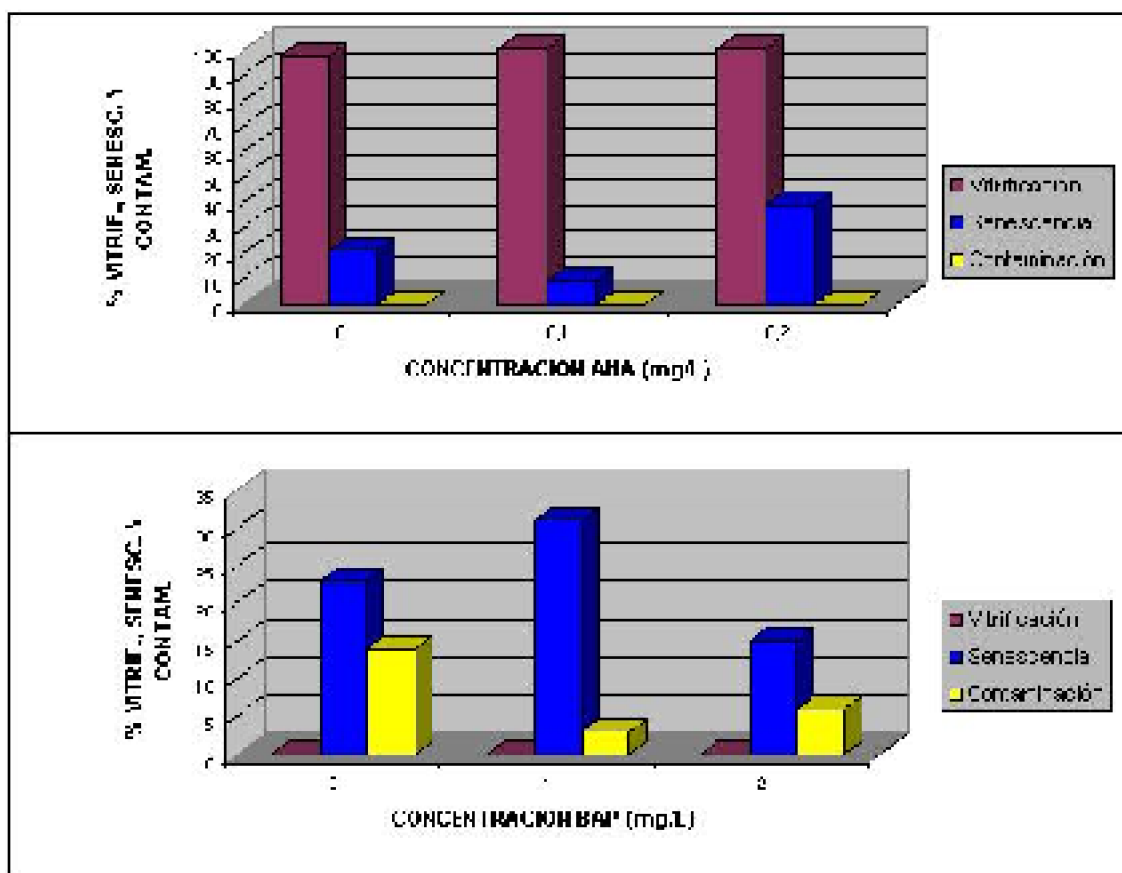


FIGURA 6. Efecto de la concentración de ANA y BAP (mg/L) en el porcentaje de vitrificación, senescencia y contaminación de toronjil a las cinco semanas de incubación.

En cuanto a la senescencia, la única diferencia encontrada se debió a que en el tratamiento 8 (0.2 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) la proporción fue significativamente mayor que en todos los otros.

El porcentaje de contaminación fue significativamente menor en los tratamientos con BAP que en su ausencia. No se presentaron plantas contaminadas en presencia de ANA.

Aunque es muy ventajoso propagar material vegetal limpio y libre de patógenos, el material vegetal contaminado puede ser multiplicado sin que la presencia de los contaminantes sea conocida. Es necesario entonces, llevar a cabo métodos y controles con el fin de obtener plantas madres libres de enfermedades y seguir con una asepsia previa al cultivo *in vitro* propiamente tal (GEORGE y SHERRINGTON, 1984).

4.2.2. Porcentaje de callo. ABOU MANDOUR *et al.* (1994), establecieron que la mejor inducción de callo en toronjil se produce en un medio enriquecido con auxina.

Por falta de datos cuantificables en algunos tratamientos, sólo se pudo analizar la tercera y la cuarta medición (Figura 7).

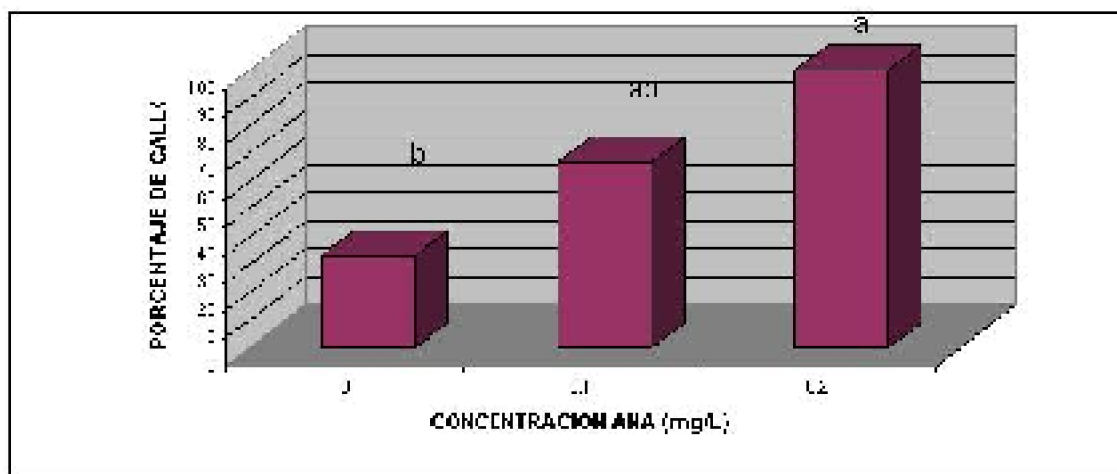


FIGURA 7. Efecto de la concentración de ANA (mg/L) en el porcentaje de callo de toronjil a las cinco semanas de incubación.

En la tercera medición, en presencia de ANA se produjo un porcentaje significativamente mayor que en su ausencia y con la dosis 0.2 mg/L fue mayor que con 0.1 mg/L de ANA.

En la cuarta medición no se registraron diferencias significativas debidas a las concentraciones de ANA.

En presencia de la fitohormona ANA se produjo un mayor número de callos que en su ausencia, donde se destacan aquellos tratamientos que presentaron su mayor concentración (0,2 mg/L ANA) con el mayor porcentaje (100%). No se produjo ningún efecto de BAP sobre el número de callos en toronjil. Tampoco se registró formación de callos en presencia de esta fitohormona.

4.2.3. Número y longitud de brotes. En la primera medición aparecen diferencias atribuibles a ambas hormonas, pero además la interacción entre ambas es altamente significativa. Al examinar detenidamente esta situación, se observó que la combinación 0 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP produjo un número significativamente mayor de brotes que todas las otras, no registrándose ninguna otra diferencia.

Desde la segunda a la cuarta medición aparecieron diferencias significativas atribuibles a ANA y BAP. La presencia de ANA determinó un número de brotes significativamente menor que en su ausencia. En cuanto a BAP, en su presencia el número de brotes fue significativamente mayor. Para ambas hormonas, no hubo diferencias entre las dosis de hormona aplicada.

Para la longitud de brotes, en la primera medición aparecieron diferencias significativas atribuibles a la presencia de ambas hormonas. En ambos casos fue significativamente mayor que en su ausencia. En las siguientes mediciones, estas diferencias se mantuvieron.

GEORGE y SHERRINGTON (1984), señalan que es necesaria la presencia de las citoquininas junto a las auxinas para la elongación celular.

Para la interacción de las fitohormonas ANA y BAP a la tercera semana de incubación (Figura 8), se diferencian los tratamientos en los que se presentó BAP como aquellos con un mayor número de brotes en promedio, alcanzando hasta 4,91 brotes por explante.

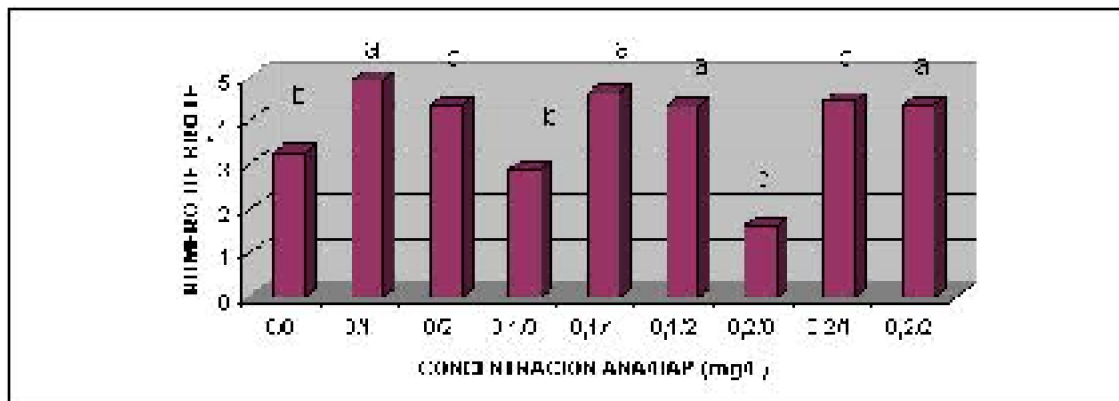


FIGURA 8. Efecto de la interacción entre ANA y BAP (mg/L) sobre el número de brotes de toronjil a las tres semanas de incubación.

Existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos, donde los mejores resultados fueron para aquellos en que presentaban la fitohormona BAP. De este modo, el mayor efecto fue producido con la concentración 1 mg/L para el parámetro de número de brotes (Cuadro 5).

CUADRO 5. Efecto principal de la concentración de ANA y BAP (mg/L) sobre el número y longitud de brotes de toronjil a las cinco semanas de incubación.

Efecto principal	Nº de brotes	Long. de brotes (cm)
Factor A (Conc. ANA mg/L)		
0	4,18 a	3,06 ab
0,1	3,96 ab	3,51 a
0,2	3,47 b	2,62 b
DHS=0,01	0,56	0,45
Factor B (Conc. BAP mg/L)		
0	2,60 b	4,28 a
1	4,66 a	2,89 b
2	4,35 a	2,02 c
DHS=0,01	0,56	0,45

En cuanto al parámetro de longitud de brotes, el mayor efecto fue con 0 mg/L de BAP. Cabe destacar que en ausencia de la fitohormona ANA se presentó un mayor número de brotes.

4.2.4. Número y longitud de raíces. Para el número y longitud de raíces sólo fue posible analizar la cuarta medición, en la cual se obtuvieron datos en todos los tratamientos. Se encontró una diferencia significativa atribuible a BAP. Los tratamientos sin BAP tuvieron un número significativamente mayor de raíces que los tratamientos con

esta hormona. También la interacción fue significativa debido a que dentro de los tratamientos sin BAP, el tratamiento sin ANA tuvo un número de raíces significativamente menor que los tratamientos con esta hormona.

El enraizamiento ocurre dentro de las cuatro semanas de incubación. Sin embargo, ésta se da en menor medida que la brotación para el mismo período y en iguales condiciones.

En el Cuadro 6 se distinguen los tratamientos 4 (0.1 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) y 7 (0.2 mg/L ANA y 0 mg/L BAP), los cuales fueron significativamente superiores en la formación de raíces que los demás tratamientos, esta diferencia es atribuible a que en estos dos tratamientos, los medios de cultivo estaban enriquecidos solo por auxinas.

CUADRO 6. Efecto principal de la concentración de ANA y BAP (mg/L) sobre las variables número y longitud de raíces de toronjil a las cinco semanas de incubación.

Efecto principal	Nº de raíces	Long. de raíces (cm)
Factor A (Conc. ANA mg/L)		
0	2,24 b	0,67 b
0,1	3,48 a	1,06 a
0,2	3,62 a	1,04 a
DHS=0,5	0,72	0,34
Factor B (Conc. BAP mg/L)		
0	8,4 a	2,23 a
1	0,74 b	0,41 b
2	0,19 b	0,13 b
DHS=0,01	0,91	0,43

Del mismo modo, aquellos tratamientos que contenían citoquinina, en algunos casos se obtuvo un muy bajo resultado o simplemente, no hubo formación de raíces.

Para la variable longitud de raíces, se encontró una diferencia significativa atribuible a BAP. Los tratamientos sin BAP tuvieron raíces de un tamaño mayor que los tratamientos con esta hormona. Si bien los resultados numéricos son inferiores que para la característica número de raíces, la tendencia se repite mostrando que para los tratamientos empleados, la mejor relación de ANA/BAP en mg/L para el enraizamiento es de 0,1/0. Es decir, para esta variable la concentración de fitohormonas ANA/BAP (mg/L), el mejor resultado lo presenta aquel medio de cultivo que sólo se enriquece de 0,1 mg/L ANA como regulador de crecimiento. Como se explicó anteriormente, esto se debe a la capacidad rizogénica de las auxinas, como es el caso de ANA (VILLALOBOS y THORPE, 1991).

CONGER (1981), también señala que uno de los efectos de la presencia de auxinas es el aumento de la rizogénesis.

En el Cuadro 7 se aprecia el efecto de la interacción entre las dos hormonas sobre el número de raíces.

CUADRO 7. Efecto de la interacción entre ANA y BAP (mg/L) sobre la variable número de raíces de toronjil a

las cinco semanas de incubación.

Efecto principal	N ^o de raíces
Interacción ANA/BAP (mg/L)	
0/0	6,18 c
0/1	0,45 d
0/2	0,09 d
0,1/0	9,80 a
0,1/1	0,57 d
0,1/2	0,07 d
0,2/0	9,23 ab
0,2/1	1,21 d
0,2/2	0,41 d
DHS=0,01	1,98

En las Figuras 9, 10 y 11, se aprecia el crecimiento del toronjil en cámara de incubación.

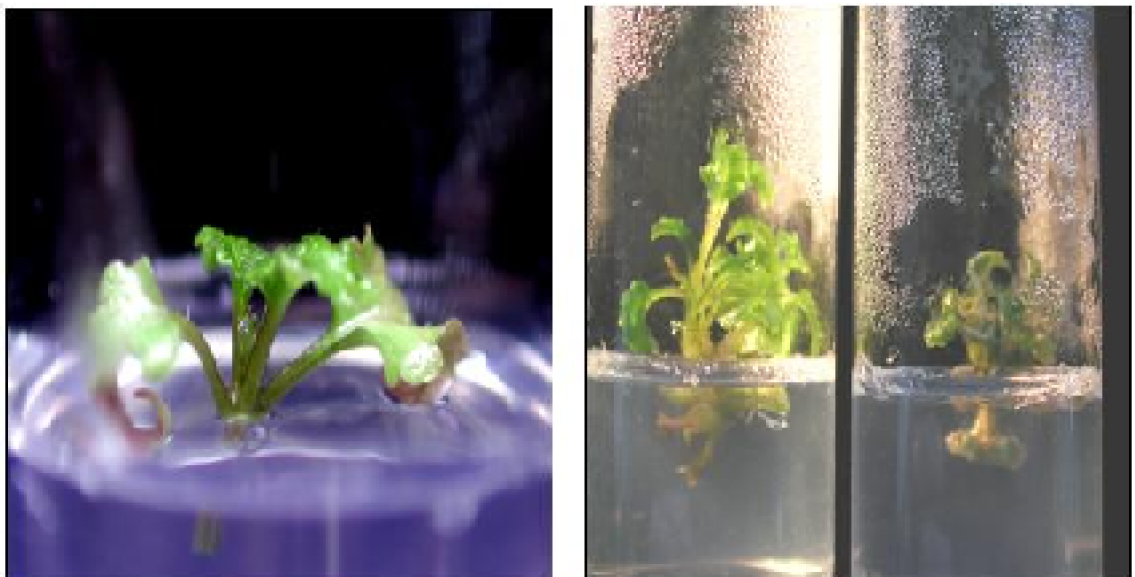


FIGURA 9 y 10. Toronjil con 10 días de incubación (A) y con 25 días de incubación (B).



FIGURA 11. Toronjil con 30 días de incubación.

4.3. Ensayo N° 3 de cedrón (*Aloysia tryphilla*).

Se realizó la siembra para el primer ensayo luego de la desinfección del material el día 30 de noviembre de 2000.

Como se obtuvo gran cantidad de material vegetal desinfectado, se procedió a realizar una siembra de los explantes sobrantes en un medio MS con agar más 0,1 mg de ANA y 1,0 mg de BAP a pH 5,7 de segmentos de brotes mononodales y ápices de cedrón.

Se aprovechó al máximo el material, ya que se sembraron dos explantes por frasco de medio de cultivo. Como resultado del primer ensayo de cedrón, no se obtuvo ninguna planta viva.

Sin embargo, solamente se obtuvo formación de órganos de aquellos explantes sobrantes sembrados en agar, ya que en el primer ensayo no se presenció crecimiento alguno. Este material, se repicó el día 23 de enero de 2001, obteniéndose una pequeña cantidad de plantas *in vitro* de cedrón. Nuevamente se repicó el material el día 01 de marzo de 2001 en un medio MS de agar más 0,1 mg de ANA y 1,0 mg de BAP a pH 5,8 con un número de 110 frascos. Cabe destacar, que en esta nueva siembra, los explantes utilizados fueron de ápices (con un número de 40 frascos) y de segmentos mononodales de brotes (con 70 frascos sembrados).

Se evaluó un mes después de la última siembra. El análisis realizado se basó en determinar la existencia de diferencias significativas entre explantes provenientes de ápices y brotes para las variables: número y tamaño de brotes y número y tamaño de raíces.

Muchos de los sistemas de cultivo ensayados son afectados por la naturaleza del agente gelatinizador empleado (SZABADOS *et al.*, 1991).

En cuanto a las variables vitrificación, senescencia y contaminación (Cuadro 8), solamente se detectó una diferencia significativa en la proporción de contaminación, la que fue mayor en aquellos explantes provenientes de segmentos nodales, que presentó casi el 100% de explantes contaminados con hongos y bacterias.

CUADRO 8. Vitrificación (% V), senescencia (% S) y contaminación (% C) para el ensayo de cedrón en un medio basal de 0,1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP a los treinta días de incubación.

Tejido	% Vitrificación V. real. V. transf.* (%/100)		% Senescencia V. real. V. transf.* (%/100)		% Contaminación V. real. V. transf.* (%/100)	
Apices	0,48	0,77 a	0,70	0,99 a	0,43	0,72 b
Brotes	0,63	0,92 a	0,64	0,93 a	0,63	0,92 a

Nota: El % de vitrificación y senescencia se calculan a partir de las repeticiones no contaminadas.

*= Valor transformado mediante $\arcsen \sqrt{\% / 100}$

Al analizar las cuatro variables principales de este ensayo, se detectó que el número de raíces obtenidas fue significativamente mayor para los explantes provenientes de ápices con 1,23 raíces/explante, lo que significa más del doble obtenido por explantes provenientes de segmentos mononodales de brotes. Los resultados de este ensayo están representados en el Cuadro 9.

CUADRO 9. Número y longitud de brotes y raíces según el tipo de explante de cedrón a los treinta días de incubación.

Tejido	M. cultivo (ANA/BAP)	Núm. Brotes	Long. Brotes	Núm. Raíces	Long. Raíces
Apices	0,1/1 mg/L	2,88 a	1,49 a	1,23 a	0,64 a
Brotes	0,1/1 mg/L	2,35 a	1,55 a	0,52 b	0,37 a

Para las demás variables, incluyendo porcentaje de callo, no se encontró diferencias significativas entre explantes de brotes o ápices.

Según LITZ y JARRET (1991), usualmente se induce la formación de callos a partir de explantes en medios que contengan auxinas o una proporción alta de auxina:citoquinina.

En las Figuras 12 y 13 se aprecia el crecimiento del cedrón en cámara de incubación.



FIGURA 12. Cultivo in vitro de Cedrón con 15 días de incubación.



FIGURA 13. Cultivo de Cedrón con 28 días de incubación.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos y bajo las condiciones en que se llevaron a cabo los experimentos, se puede concluir lo siguiente:

Se acepta la hipótesis planteada del trabajo, ya que efectivamente es posible multiplicar las tres especies por medio de las técnicas de cultivo *in vitro* y la composición de los medios de cultivo presenta una influencia en la formación de órganos.

En lo específico se concluye que:

Ensayo de ruda:

- Para la variable formación de callo, la mejor respuesta se obtuvo con 0,2 mg/L de ANA.

- La mejor formación y longitud de brotes se obtuvo en los tratamientos con 1 mg/L de BAP.

- Los mejores resultados para las variables número y longitud de raíces se obtuvieron en presencia de los medios de cultivo con 0,1 y 0,2 mg/L de ANA y en ausencia de BAP.

Ensayo de toronjil:

- Se encontraron mayores respuestas de vitrificación y contaminación en los tratamientos libres de BAP. Se obtuvo mayor porcentaje de senescencia con 0,2 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP.

- Toronjil presentó una marcada respuesta en la formación de callo con la dosis de 0,2 mg/L de ANA.

- La dosis de 0 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP y ausencia de fitohormonas, destacan en los parámetros de formación y longitud de brotes respectivamente, a las cinco semanas de incubación.

- El mejor enraizamiento de toronjil se obtuvo en presencia de los medios suplementados con 0,1 y 0,2 mg/L de ANA y 0 mg/L de BAP.

- Para la longitud de brotes, el medio suplementado con 0,1 mg/L de ANA y 0 mg/L BAP obtuvo las mejores respuestas.

Ensayo de cedrón:

- La contaminación fue mayor en explantes provenientes de segmentos nodales.

- El único resultado obtenido para la variable número de raíces, se obtuvo en explantes provenientes de ápices.

- Se hace necesario continuar con experimentos para cedrón, ya que no se obtuvo información en cuanto a los medios de cultivos que son efectivamente favorables para su crecimiento.

BIBLIOGRAFIA

- ABOU-MANDOUR, A.; CZYGAN, F. y VAN DEN BERG, T. 1994. Regeneration of plants and production of volatiles from callus cultures of *Melissa officinalis* L. *Angewandte Botanik* 68:5-6, 163-167 (Original no consultado). Compendiado en CAB Abstract AN 951604211
- CARNAT, A. P.; CHAVIGNON, O.; HEITZ, A.; WILDE, R. y LAMAISSON, J. L. 1995. Luteolin 7-diglucuronide, the major flavonoid compound from *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis*. *Plant Med.* 61:5, 490 (Original no consultado). Compendiado en CAB Abstract AN 960300318
- CASTRO, R. L.; BARROS, I. B.; GIBERTI, G.; CRAKER, L.; LORENZ, M.; MATHE, A. y GIULETTI, A. 1999. Micropropagation of rue (*Ruta graveolens* L.) *Acta Horticulturae* 502, 325-328. (Original no consultado). Compendiado en CAB Abstract AN 20000309740
- CONGER, B. 1981. Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. CRC Press. Boca Ratón, Florida. 273 p.
- CUADERNOS POPULARES. 1987. Plantas medicinales N° 1: Descripción de 12 plantas usuales. CETAL Ediciones. Valparaíso, Chile. 55 p.
- _____. 1987. Plantas medicinales N° 2: Descripción de 24 plantas usuales. CETAL Ediciones. Valparaíso, Chile. 79 p.
- _____. 1987. Plantas medicinales N° 7. Plantas para los nervios. CETAL Ediciones. Valparaíso, Chile. 22 p.

- FROHNE, S. y PFÄNDER, H. J. 1984. A colour atlas of poisonous plants. A Wolfe Science Book. London. 291 p.
- GEORGE, E. y SHERRINGTON, P. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd. Eversley, England. 709 p.
- GUERRERA, P. M.; LEPORATTI, H. L.; FODDAI, S.; MORETTO, D. y MERCANTINI, R. 1995. Antimycotic activity of the essential oil of *Lippia citriodora* Kunt (*Aloysia triphylla* Britton). Rivista Italiana (EPPOS) 15, 23-25. (Original no consultado). Compendiado en CAB Abstract AN 950308714
- GUPTA, S. K.; KHANUJA, S. P. y SUSHIL-KUMAR, S. 2001. In vitro micropropagation of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Current Science India 81:2,206-210. (Original no consultado). Compendiado en CAB Abstract AN 20013112204
- HARTMANN, H. y KESTER, D. 1997. Plant propagation: Principles and practices. (Sixth edition) Prentice-Hall, Inc. New Jersey, United States of America. 770 p.
- HEITZ, A.; CARNAT, A.; FRAISSE, D.; CARNAT, A. P. y LAMAISSON, J. L. 2000. Luteolin 3'-glucuronide, the major flavonoid from *Melissa officinalis* subsp. *officinalis*. Fitoterapia 71:2, 201-2. (Original no consultado). Compendiado en BioMedNet.com (bmn.com)
- HOFFMANN, A.; FARGA, C.; LASTRA, J. y VEGHAZI, E. 1992. Plantas medicinales de uso común en Chile. Fundación Claudio Gay. Santiago, Chile. 273 p.
- JOHN, S.; ISSAC, C. G.; NAIR, G. M. y EAPEN, S. J. 1997. Micropropagation of *Ruta graveolens* L. through organogenesis and somatic embryogenesis. Indian Society for spices. Calcuta, India. 15:70-78 (Original no consultado). Compendiado en CAB Abstract AN 98306684
- KNEIPP, S. 1894. Atlas de botánica para el método de hidroterapia. Kempten. España. 69 p.
- LARRONDO, J. V.; AQUT, M. y CALVO TORRAS, M. A. 1995. Antimicrobial activity of essences from Labiates. Microbios 82:332, 171-2. (Original no consultado). Compendiado en BioMedNet.com (bmn.com)
- LITZ, R. E. y JARRET, R. L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. In: Roca, W. y Mroginski, L. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali, Colombia. pp: 144-172
- MATSUBARA, S.; INO, M.; MURAKAMI, K.; ISHIHARA, I. y KAMADA, M. 1996. Callus formation and plant regeneration of herbs in *Perilla* family. Scientific Reports of the Faculty of Agriculture 85:23-30 (Original no consultado). Compendiado en CAB Abstract AN 961611229
- MONTOYA, L. 1991. Cultivo de tejidos vegetales. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Agricultura. Medellín, Colombia. 77 p.
- ORGANIZACION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION (FAO). 1990. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Estudio FAO, Producción y Protección Vegetal Nº 5. Roma, Italia. 112 p.
- PASCUAL, M. E. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review.

- Journal of Ethnopharmacology 76:3, 201-214. (Original no consultado). Compendiado en BioMedNet.com (bmn.com)
- PIERIK, R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 p.
- RAMAWAT, K. G. R.; SHIVANA, K. R.; JOHRI, B. M.; KOUL, A. K. y SHARMA, B. D. 1987. Quaternary alkaloid production in *Ruta graveolens*: suspension culture and habituation of some strains. Indian Journal of Experimental Biology 25:7, 471-475 (Original no consultado). Compendiado en CAB Abstract AN 880351078
- RENGADE, D. 1887. Las plantas que curan y las plantas que matan. Montaner y Simon (eds.). Barcelona, España. 228 p.
- ROCA, W. y MROGINSKI, L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 970 p.
- SANSBERRO, P. A. y MROGINSKI, L. A. 1996. Micropropagation of *Aloysia polystachia*. AgriScientia 12:83-86 (Original no consultado). Compendiado en CAB Abstract AN 970310892
- SEEMANN, P. 1993. Utilización de técnicas de micropropagación. In: Barriga, P. y Neira, M. (eds.). Avances en Producción y Sanidad Vegetal. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. Valdivia, Chile. pp: 87-145
- SIMON, J. E.; CHADWICK, A. F. y CRAKER, L. E. 1984. Herbs: An indexed bibliography 1971-1980. The scientific literature on selected herbs, and aromatic and medicinal plants of the temperate zone. Archon Books. Hamden, Connecticut. 770 p.
- SZABADOS, L.; NUÑEZ, V. M.; TELLO, L. M.; MAFLA, G.; ROA, J. y ROCA, W. M. 1991. Agentes gelatinizadores en el cultivo de tejidos. In: Roca, W. y Mroginski, L. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali, Colombia. pp: 80-95
- TAVARES, A. C.; PIMENTA, M. C. y GONCALVES, M. T. 1996. Micropropagation of *Melissa officinalis* L. Through proliferation of axillary shoots. Plant Cell Reports 15:6,441-444 (Original no consultado). Compendiado en CAB Abstract AN 961603361
- VALE, T. G.; MATOS, F. J.; DE LIMA, T. C. y VIANA, G. S. 1999. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown chemotypes. Journal of Ethnopharmacology 67:2, 127-133. (Original no consultado). Compendiado en BioMedNet.com (bmn.com)
- VILLALOBOS, V. y THORPE, P. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: Roca, W. y Mroginski, L. (Eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali, Colombia. pp: 126-141
- ZYGADLO, J. A.; LAMARQUE, A. L.; MAESTRI, D. M.; GUZMAN, C. A. LUCINI, E. I.; GROSSO, N. R. y ARIZA-ESPINAR, L. 1994. Volatile constituents of *Aloysia tryphilla* (L' Herit.) Britton. Journal of Essential Oil Research Cordoba, Argentina. 6:4,407-409. (Original no consultado). Compendiado en CAB Abstract AN 940311773

ANEXOS

ANEXO 1. Necesidades nutricionales y hormonales de los cultivos de órganos y tejidos vegetales.

Agua					pH
Sustancias orgánicas		Macr	Micr		
		elementos			
Reguladores	{	Azúcares	N	Fe	Cu
		Aminoácidos	P	Zn	Ni
		Vitaminas	K	B	Al
		Auxinas	Ca	Mn	Mu
		Citoquininas	Mg	Cu	I
		Giberelinas	S		
		Ac. Abscísico			
		Etileno			
Complejo de ingredientes naturales	{	Extracto de levadura			
		Leche de leche			
		Extractos vegetales			
		Hidrolizado de caseína			
		Peptona y toptona			

FUENTE: PIERIK (1987).

ANEXO 2. Composición de soluciones (g/L) utilizados en la preparación de medios de cultivo para micropropagación^a.

Compuesto	Murashige & Skoog (MS)	Medio para plantas leñosas (WPM)	Anderson (AND)	Gamborg B5
NH_4NO_3	165.00	40.00	40.00	—
KNO_3	190.00	—	48.00	250.00
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	—	55.6	—	—
K_2SO_4	—	99.00	—	—
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37.00	37.00	37.00	25.00
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.69	2.23	1.69	1.00
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.86	0.86	0.86	0.20
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0025	0.0025	—	0.0025
NH_4SO_4	—	—	—	13.4
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44.00	9.60	44.00	15.00
KI	0.083	—	0.083	0.075
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025	—	0.083	0.0025
KH_2PO_4	17.00	17.00	—	—
H_3BO_3	0.62	0.62	0.62	0.30
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025	0.025
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	^b —	—	38.00	15.00
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.784	2.78	5.57	2.78
$\text{Na}_2 \times \text{EDTA}$	3.724	3.73	7.45	3.725
Tiamina x HCl	0.10	0.10	0.04	1.00
Acido nicotínico	0.05	0.05	—	0.10
Piridoxina x HCl	0.05	0.05	—	0.10
Glicina	0.20	0.20	—	—
Mfo-inositol	10.00	10.00	10.00 ^c	10.00

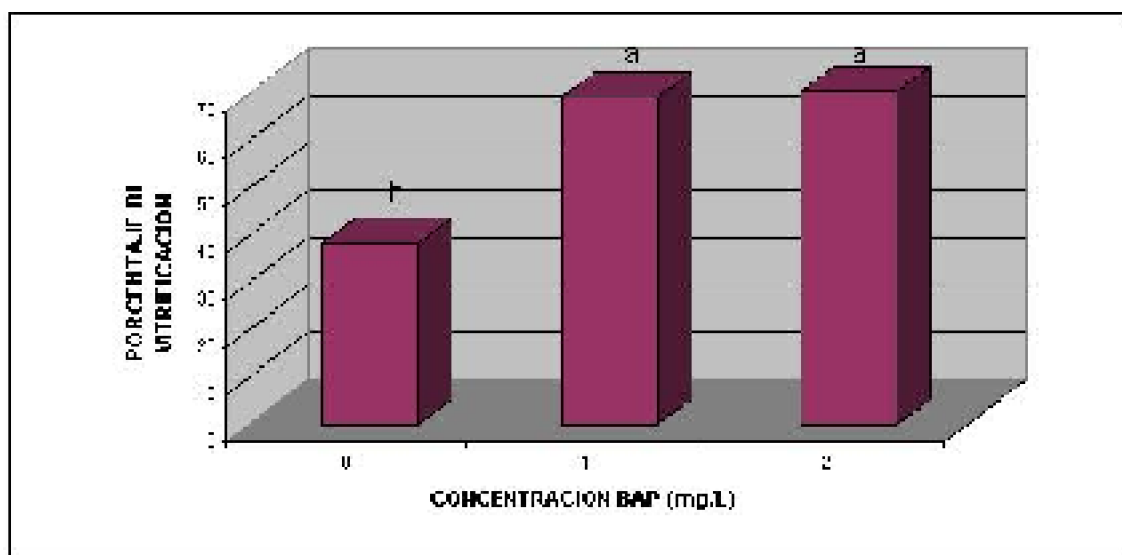
FUENTE: HARTMANN y KESTER (1997).

^a 100 * solución final. Usar 10 ml de cada stock de solución para preparar 1 litro de medio de cultivo

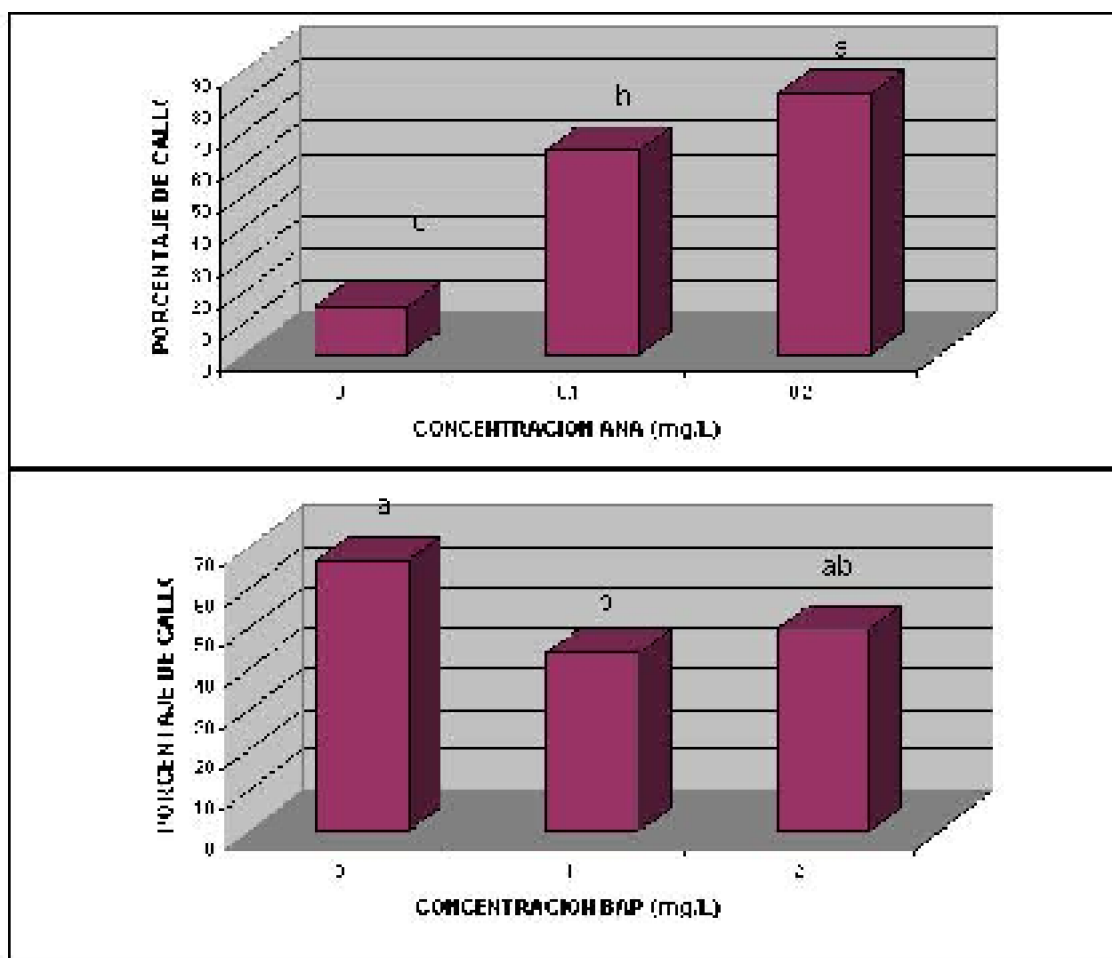
^b Comúnmente adicionado como suplemento al medio de cultivo de 85 a 255 mg/L

^c Aplicación de sulfato de adenina, 80 mg/L

ANEXO 3. Efecto principal de la concentración de BAP (mg/L) sobre el porcentaje de vitrificación de ruda a las cinco semanas de incubación.



ANEXO 4. Efecto de la concentración de ANA y BAP (mg/L) en el porcentaje de calo de ruda a las cinco semanas de incubación.



ANEXO 5. Efecto de la interacción entre ANA y BAP (mg/L) sobre el porcentaje de callo de ruda a las cinco semanas de incubación.

Efecto principal	Porcentaje de callo	
	Valor real (%/100)	Valor transformado*
Interacción (Conc. ANA/BAP mg/L)		
0/0	0,16 e	0,41
0/1	0,15 e	0,40
0/2	0,15 e	0,40
0,1/0	0,95 a	1,35
0,1/1	0,47 d	0,76
0,1/2	0,50 c	0,79
0,2/0	0,90 ab	1,25
0,2/1	0,70 ab	0,99
0,2/2	0,85 ab	1,17
DHS=0,01		0,39

*= Valor transformado mediante $\arcsen \sqrt{\% / 100}$

ANEXO 6. Efecto principal de la concentración de la fitohormona BAP (mg/L) sobre las variables número y longitud de brotes de ruda a las cinco semanas de incubación.

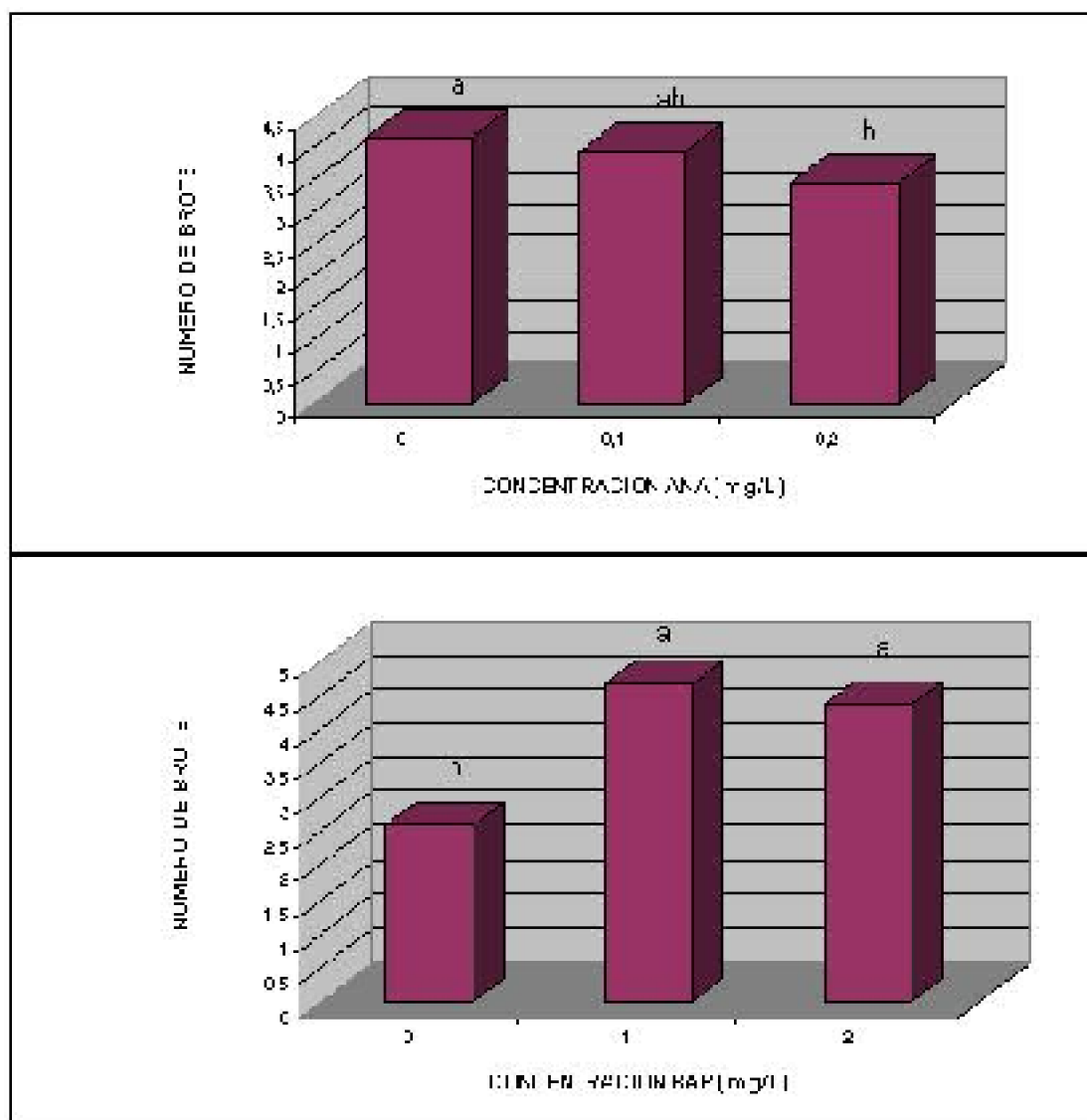
Efecto principal	Nº de brotes	Long. de brotes (cm)
Factor B (Conc. BAP mg/L)		
0	2,32 b	1,72 b
1	4,10 a	2,23 a
2	4,08 a	1,78 b
DHS=0,01	0,75	0,44

ANEXO 7. Efecto principal de la concentración de ANA (mg/L) sobre el porcentaje de callo de toronjil a las cinco semanas de incubación.

Efecto principal	Porcentaje de callo	
	Valor real (%/100)	Valor transformado*
Factor A (Conc. ANA mg/L)		
0	0,33 b	0,61
0,1	0,67 ab	0,96
0,2	1,0 a	1,57
DHS=0,01		0,66

*= Valor transformado mediante $\arcsen \sqrt{\% / 100}$

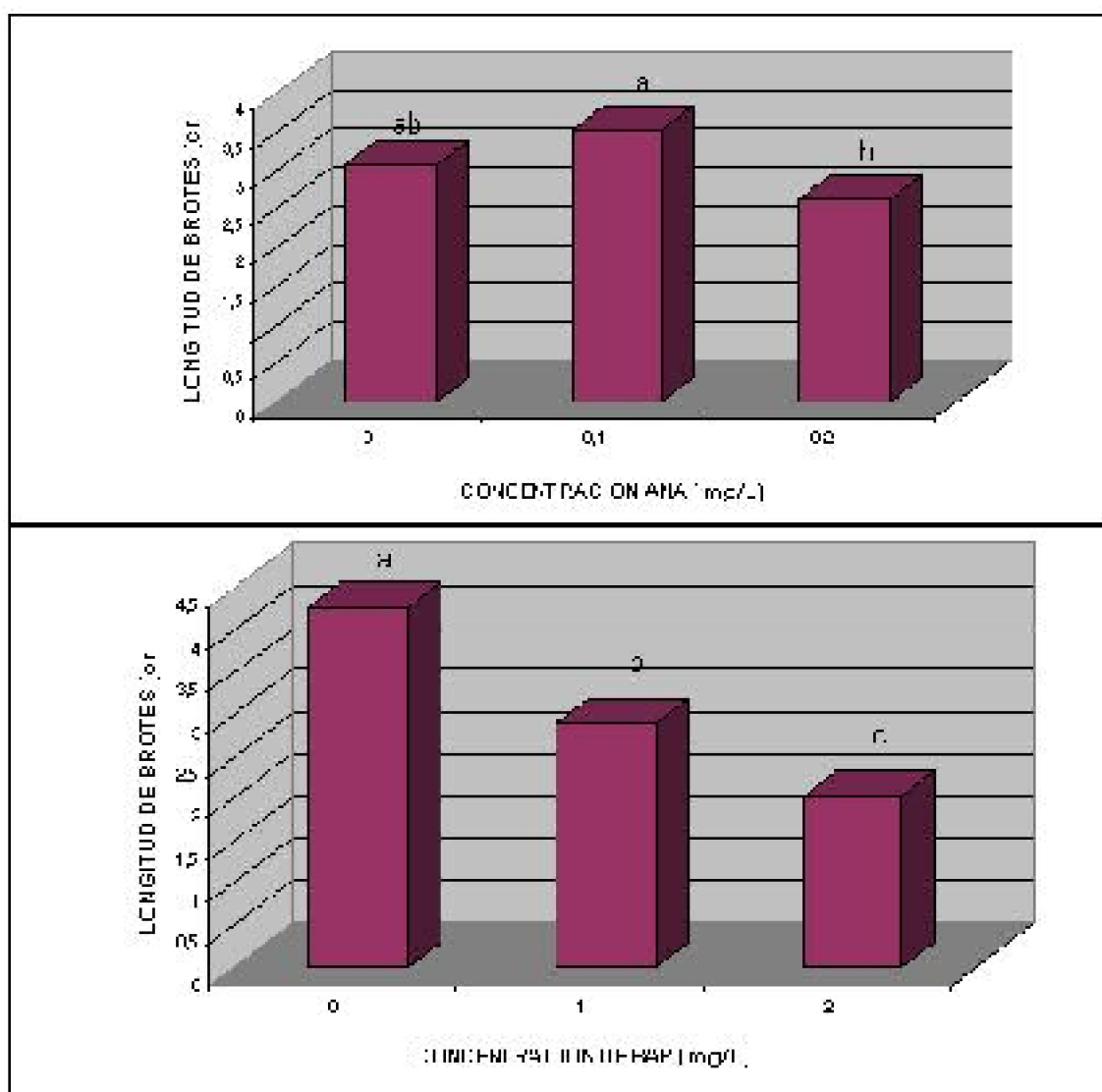
ANEXO 8. Efecto principal de la concentración de ANA y BAP (mg/L) sobre el número de brotes de toronjil a las cinco semanas de incubación.



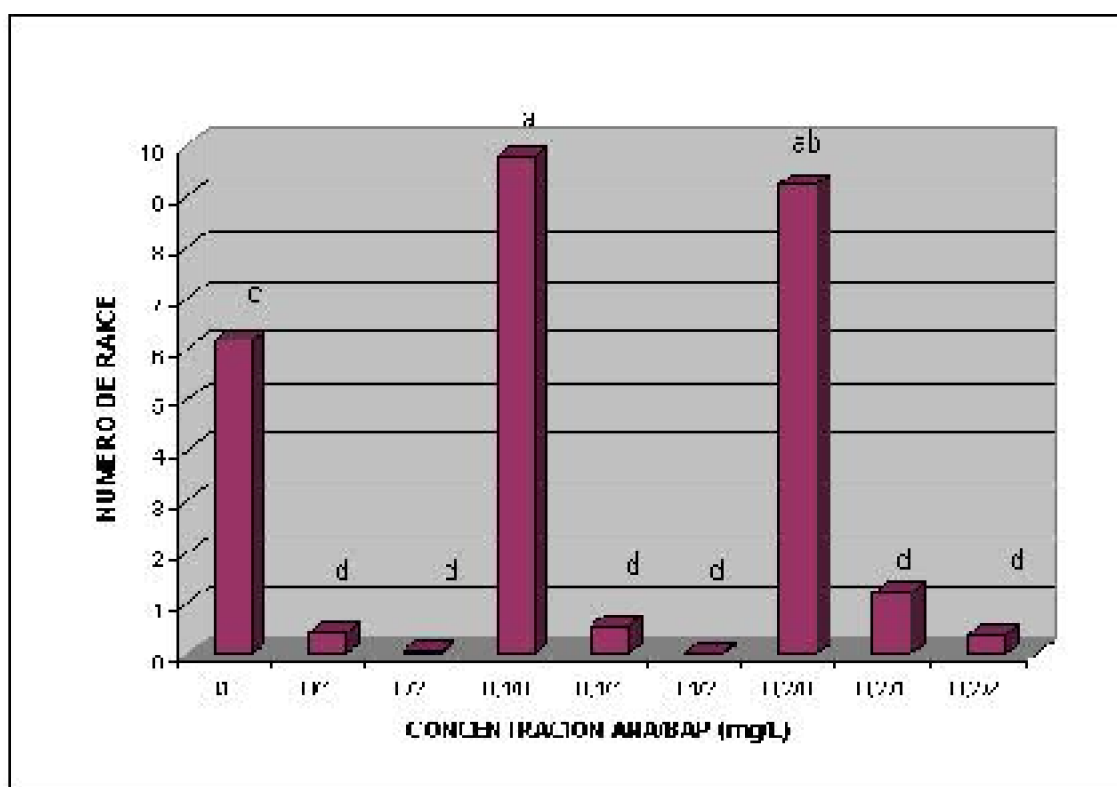
ANEXO 9. Efecto de la interacción entre ANA y BAP (mg/L) sobre el número de brotes de toronjil a las cinco semanas de incubación.

Efecto principal	Nº de brotes
Interacción ANA/BAP (mg/L)	
0/0	3,27 b
0/1	4,91 a
0/2	4,36 a
0,1/0	2,90 b
0,1/1	4,64 a
0,1/2	4,33 a
0,2/0	1,62 c
0,2/1	4,43 a
0,2/2	4,35 a
DHS=0,01	0,98

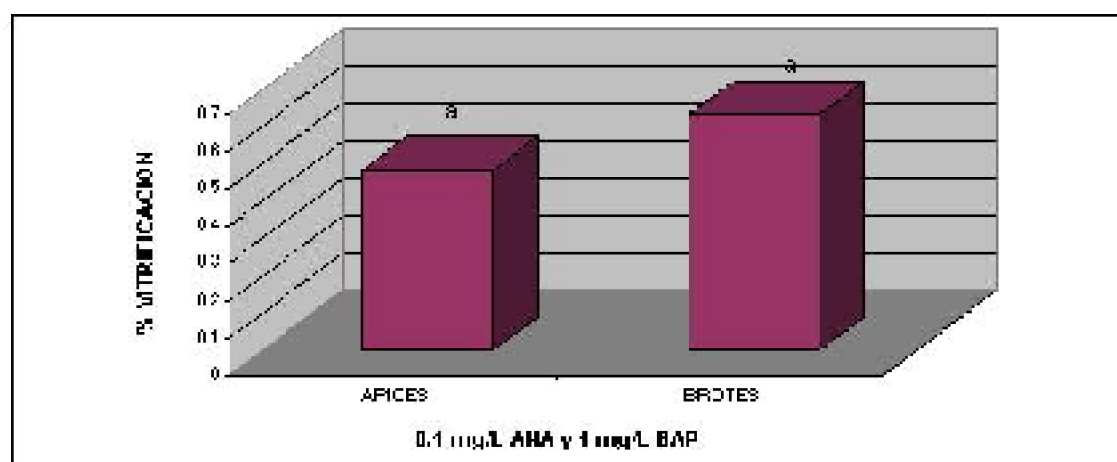
ANEXO 10. Efecto principal de la concentración de ANA y BAP (mg/L) sobre la longitud de brotes de toronjil a las cinco semanas de incubación.



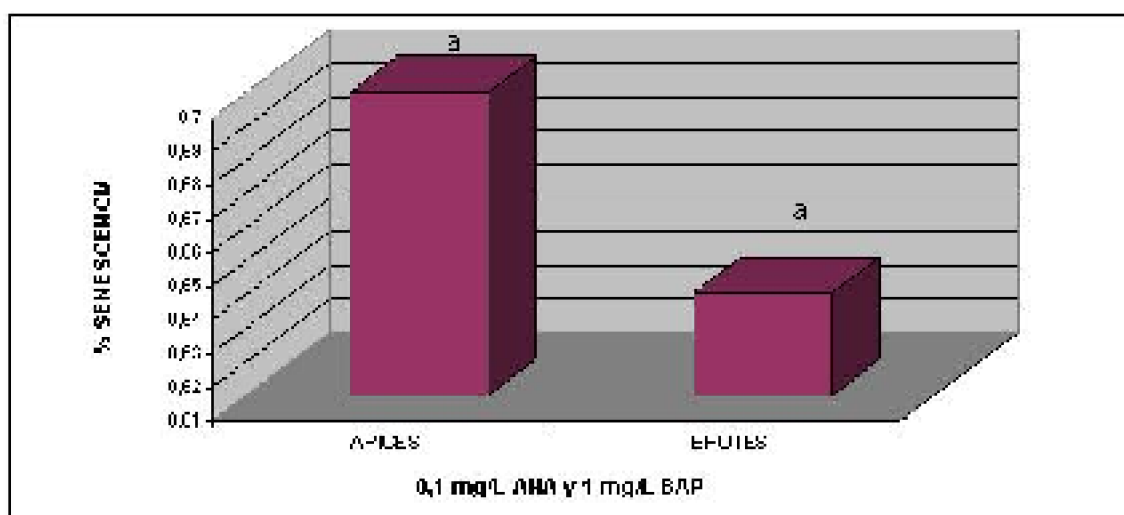
ANEXO 11. Efecto de la interacción de ANA y BAP (mg/L) sobre el número de raíces de toronjil a las cinco semanas de incubación.



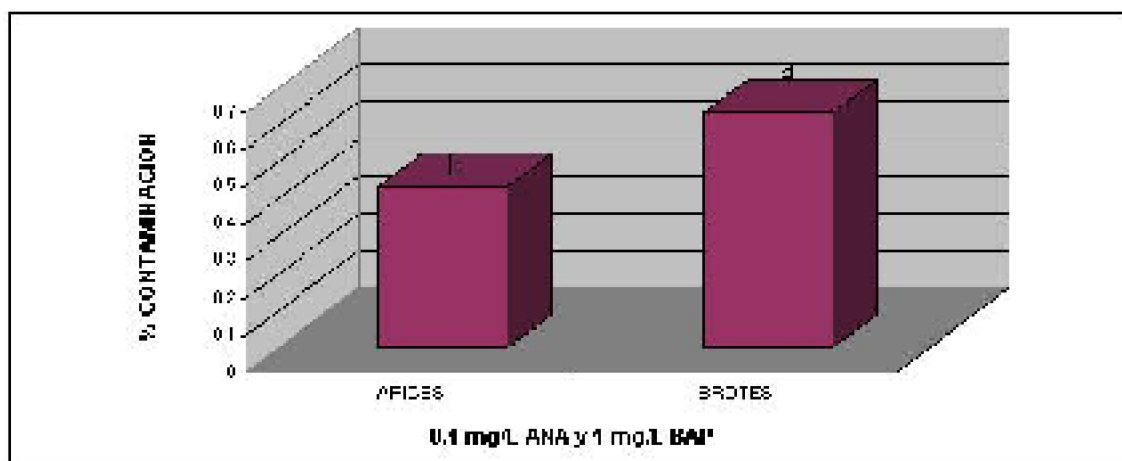
ANEXO 12. Efecto de la concentración de ANA (0,1 mg/L) y BAP (1 mg/L) sobre el porcentaje de vitrificación de ápices y brotes axilares de cedrón a los treinta días de incubación.



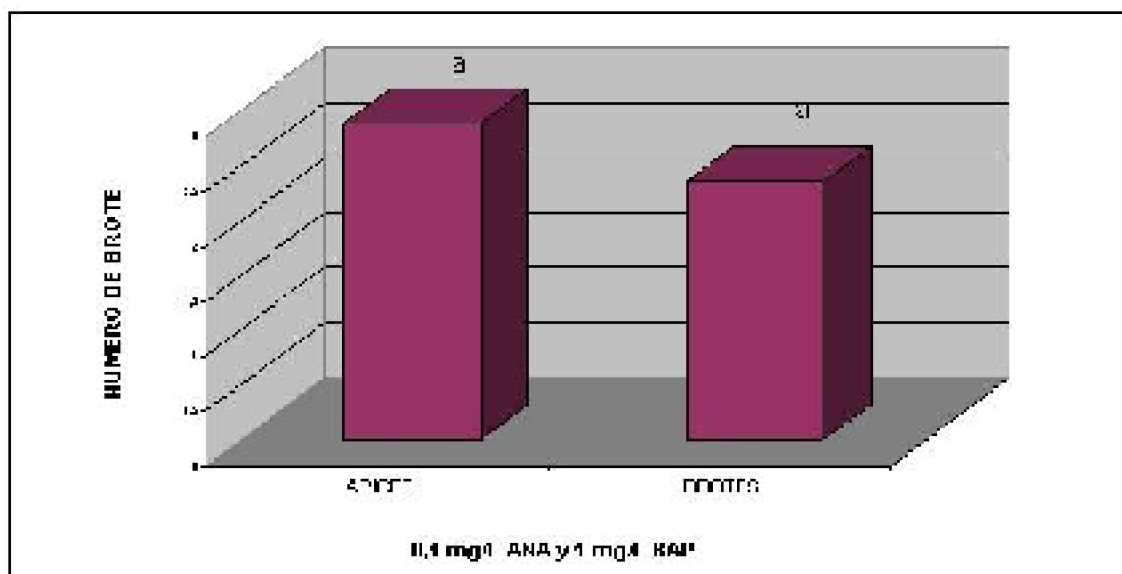
ANEXO 13. Efecto de la concentración de ANA (0,1 mg/L) y BAP (1 mg/L) sobre el porcentaje de senescencia de ápices y brotes axilares de cedrón a los treinta días de incubación.



ANEXO 14. Efecto de la concentración de ANA (0,1 mg/L) y BAP (1 mg/L) sobre el porcentaje de contaminación de ápices y brotes axilares de cedrón a los treinta días de incubación.

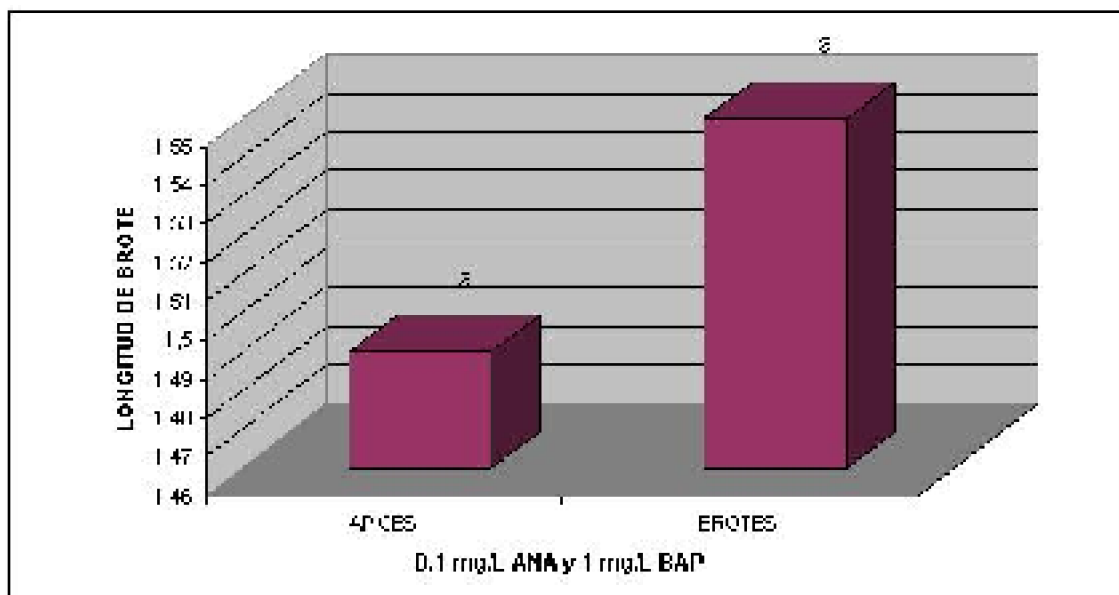


ANEXO 15. Efecto de la concentración de ANA (0,1 mg/L) y BAP (1 mg/L) sobre el número de brotes de explantes de ápices y brotes axilares de cedrón a los treinta días de incubación.

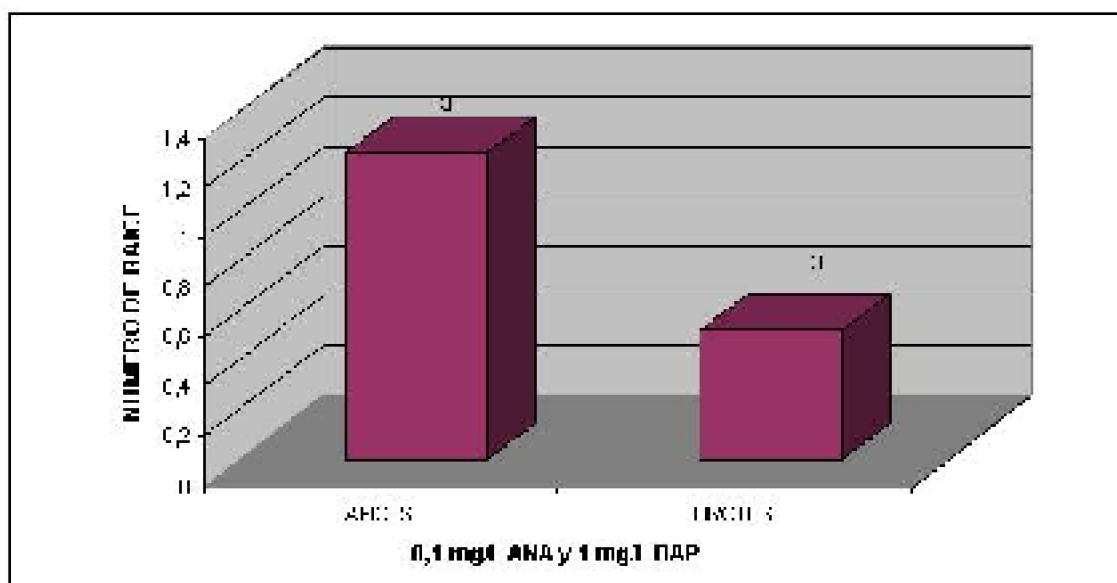


ANEXO 16. Efecto de la concentración de ANA (0,1 mg/L) y BAP (1 mg/L) sobre la longitud de brotes de

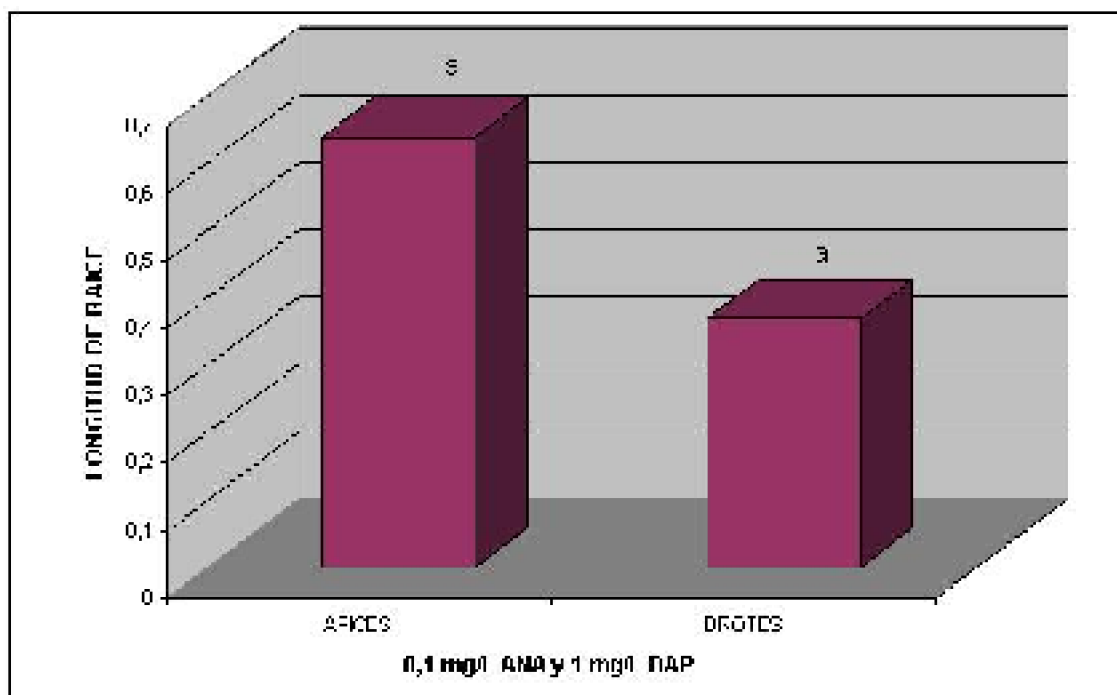
explantes de ápices y brotes axilares de cedrón a los treinta días de incubación.



ANEXO 17. Efecto de la concentración de ANA (0,1 mg/L) y BAP (1 mg/L) sobre el número de raíces de explantes de ápices y brotes axilares de cedrón a los treinta días de incubación.



ANEXO 18. Efecto de la concentración de ANA (0,1 mg/L) y BAP (1 mg/L) sobre la longitud de raíces de explantes de ápices y brotes axilares de cedrón a los treinta días de incubación.



ANEXO 19. Vitricación, senescencia y contaminación de ruda.

Vitrificación de ruda							
Sumario de todos los efectos, diseño: (ruda-alt.sta)							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-level	
ANA	2	0,0462	27	0,0194	2,3814	0,1116	
BAP	2	0,4307	27	0,0194	22,2030	0,0000	**
ANA/BAP	4	0,0140	27	0,0194	0,7236	0,5834	
Senescencia de ruda							
Sumario de todos los efectos, diseño: (ruda-alt.sta)							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-level	
ANA	2	0,0388	27	0,0246	1,5763	0,2252	
BAP	2	0,0415	27	0,0246	1,6844	0,2045	
ANA/BAP	4	0,0317	27	0,0246	1,2858	0,3002	
Contaminación de ruda							
Sumario de todos los efectos, diseño: (ruda-alt.sta)							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-level	
ANA	2	0,0002	27	0,0013	0,1621	0,8511	
BAP	2	0,0002	27	0,0013	0,1613	0,8518	
ANA/BAP	4	0,0010	27	0,0013	0,8034	0,5338	

Nota: gl= Grados de libertad; CM= Cuadrados medios

**= altamente significativo

ANEXO 20. Porcentaje de callo de ruda.

Sumario de todos los efectos, diseño: (ruda.sta)						Medición 1	
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	9,7854	83	0,9403	10,4071	0,0001	**
BAP	2	5,3186	83	0,9403	5,6565	0,0050	**
ANA/BAP	4	1,7144	83	0,9403	1,8233	0,1321	
Sumario de todos los efectos, diseño: (ruda.sta)						Medición 2	
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	5,3742	86	0,7372	7,2904	0,0012	**
BAP	2	2,0470	86	0,7372	2,7769	0,0678	
ANA/BAP	4	1,8398	86	0,7372	2,4958	0,0517	
Sumario de todos los efectos, diseño: (ruda.sta)						Medición 3	
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	3,5130	86	0,2310	15,2087	0,0000	**
BAP	2	0,4689	86	0,2310	2,0300	0,1376	
ANA/BAP	4	0,5714	86	0,2310	2,4737	0,0503	
Sumario de todos los efectos, diseño: (ruda.sta)						Medición 4	
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	1,7445	86	0,1040	16,7791	0,0000	**
BAP ANA/BAP	2 4 4	0,6060 0,4886 0,4886	86 86 86	0,1040 0,1040 0,1040	3,8285 4,6830 4,6830	0,0042 0,0018 0,0018	** ** *

Nota: gl= Grados de libertad; CM= Cuadrados medios

**= Altamente significativo

ANEXO 21. Número de brotes de ruda.

Sumario de todos los efectos, diseño: (ruda.sta) Medición 1							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	36,9756	157	2,2405	16,5035	0,0000	**
BAP	2	32,2679	157	2,2405	14,4023	0,0000	**
ANA/BAP	4	3,6885	157	2,2405	1,6463	0,1653	
Sumario de todos los efectos, diseño: (ruda.sta) Medición 2							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	1,2440	154	2,2877	0,5438	0,5817	
BAP	2	56,7052	154	2,2877	24,7872	0,0000	**
ANA/BAP	4	3,0410	154	2,2877	1,3293	0,2615	
Sumario de todos los efectos, diseño: (ruda.sta) Medición 3							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	1,6265	154	2,2161	0,7340	0,4817	
BAP	2	61,5169	154	2,2161	27,7593	0,0000	**
ANA/BAP	4	2,5593	154	2,2161	1,1549	0,3331	
Sumario de todos los efectos, diseño: (ruda.sta) Medición 4							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	0,9169	154	1,9863	0,4616	0,6311	
BAP	2	64,0751	154	1,9863	32,2578	0,0000	**
ANA/BAP	4	1,4710	154	1,9863	0,7405	0,5657	

Nota: gl= Grados de libertad; CM= Cuadrados medios

**= Altamente significativo

ANEXO 22. Longitud de brotes de ruda.

Sumario de todos los efectos, diseño: (ruda.sta) Medición 1							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	0,2576	157	0,3264	0,7893	0,4559	
BAP	2	0,4602	157	0,3264	1,4099	0,2472	
ANA/BAP	4	0,3664	157	0,3264	1,1226	0,3479	
Sumario de todos los efectos, diseño: (ruda.sta) Medición 2							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	1,1004	154	0,4504	2,4433	0,0902	
BAP	2	1,1668	154	0,4504	2,5907	0,0782	
ANA/BAP	4	0,4791	154	0,4504	1,0637	0,3765	
Sumario de todos los efectos, diseño: (ruda.sta) Medición 3							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	0,8847	154	0,5807	1,5235	0,2212	
BAP	2	2,4772	154	0,5807	4,2656	0,0157	*
ANA/BAP	4	0,7431	154	0,5807	1,2796	0,2804	
Sumario de todos los efectos, diseño: (ruda.sta) Medición 4							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	0,6702	154	0,6744	0,9937	0,3726	
BAP	2	5,5707	154	0,6744	8,2598	0,0004	**
ANA/BAP	4	0,4087	154	0,6744	0,6059	0,6589	

Nota: gl= Grados de libertad; CM= Cuadrados medios

**= Altamente significativa; *Significativa

ANEXO 23. Número de raíces de ruda.

Sumario de todos los efectos, diseño: (ruda.sta) Medición 3						
	gl	CM	GI	CM	F	
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor
ANA	1	0,1736	8	10,0625	0,0173	0,8987
BAP	2	8,2237	8	10,0625	0,8173	0,4754
ANA/BAP	2	0,0365	8	10,0625	0,0036	0,9964
Sumario de todos lo efectos, diseño: (ruda.sta) Medición 4						
	gl	CM	GI	CM	F	
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor
ANA	1	0,2555	22	6,4503	0,0396	0,8441
BAP	2	4,4882	22	6,4503	0,6958	0,5093
ANA/BAP	2	0,3182	22	6,4503	0,0493	0,9520

Nota: gl= Grados de libertad; CM= Cuadrados medios

ANEXO 24. Longitud de raíces de ruda.

Sumario de todos los efectos, diseño: (ruda.sta) Medición 3						
	gl	CM	GI	CM	F	
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor
ANA	1	0,0625	8	0,0950	0,6579	0,4408
BAP	2	0,0721	8	0,0950	0,7590	0,4991
ANA/BAP	2	0,0089	8	0,0950	0,0942	0,9111
Sumario de todos los efectos, diseño: (ruda.sta) Medición 4						
	gl	CM	GI	CM	F	
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor
ANA	1	0,0326	22	0,1233	0,2643	0,6123
BAP	2	0,0616	22	0,1233	0,4999	0,6133
ANA/BAP	2	0,0074	22	0,1233	0,0599	0,9420

Nota: gl= Grados de libertad; CM= Cuadrados medios

ANEXO 25. Vitrificación, senescencia y contaminación de toronjil.

Vitrificación de toronjil							
Sumario de todos los efectos, diseño: (toronjil.sta) Medición 4							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	0,2787	27	0,0166	16,8292	0,0000	**
BAP	2	0,0218	27	0,0166	1,3175	0,2845	
ANA/BAP	4	0,0578	27	0,0166	3,4920	0,0201	*
Senescencia de toronjil							
Sumario de todos los efectos, diseño: (toronjil.sta) Medición 4							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	0,1103	27	0,0067	16,4095	0,0000	**
BAP	2	0,0271	27	0,0067	4,0293	0,0294	*
ANA/BAP	4	0,0781	27	0,0067	11,6143	0,0000	**
Contaminación de toronjil							
Sumario de todos los efectos, diseño: (toronjil.sta) Medición 4							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	0,0081	27	0,0072	1,1160	0,3422	
BAP	2	0,0326	27	0,0072	4,5115	0,0204	*
ANA/BAP	4	0,0097	27	0,0072	1,3403	0,2806	

Nota: gl= Grados de libertad; CM= Cuadrados medios

**= Altamente significativo; *= Significativo

ANEXO 26. Porcentaje de callo de toronjil.

Sumario de todos los efectos, diseño: (toronjil.sta) Medición 3							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	7,5648	64	1,4177	5,3362	0,0072	**
BAP	1	0,5801	64	1,4177	0,4092	0,5246	
ANA/BAP	2	0,0270	64	1,4177	0,0191	0,9811	
Sumario de todos los efectos, diseño: (toronjil.sta) Medición 4							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	2,8295	66	1,0321	2,7416	0,0718	
BAP	1	0,6477	66	1,0321	0,6276	0,4311	
ANA/BAP	2	0,0654	66	1,0321	0,0634	0,9386	

Nota: gl= Grados de libertad; CM= Cuadrados medios

**= Altamente significativa

ANEXO 27. Número de brotes de toronjil.

Sumario de todos los efectos, diseño: (toronjil.sta) Medición 1							
	Gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	2,8680	142	0,7443	3,8532	0,0235	*
BAP	2	6,1442	142	0,7443	8,2549	0,0004	**
ANA/BAP	4	3,1025	142	0,7443	4,1682	0,0032	**
Sumario de todos los efectos, diseño: (toronjil.sta) Medición 2							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	6,6960	114	1,2860	5,2067	0,0069	**
BAP	2	19,4797	114	1,2860	15,1472	0,0000	**
ANA/BAP	4	0,1374	114	1,2860	0,1069	0,9799	
Sumario de todos los efectos, diseño: (toronjil.sta) Medición 3							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	4,0799	114	1,2736	3,2035	0,0443	*
BAP	2	50,1930	114	1,2736	39,4116	0,0000	**
ANA/BAP	4	1,4974	114	1,2736	1,1758	0,3253	
Sumario de todos los efectos, diseño: (toronjil.sta) Medición 4							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	7,1098	114	1,0840	6,5588	0,0020	**
BAP	2	57,8984	114	1,0840	53,4110	0,0000	**
ANA/BAP	4	1,7615	114	1,0840	1,6250	0,1728	

Nota: gl= Grados de libertad; CM= Cuadrados medios

**= Altamente significativo

*= Significativo

ANEXO 28. Longitud de brotes de toronjil.

Sumario de todos los efectos, diseño: (toronjil.sta) Medición 1							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-level	
ANA	2	0,3667	142	0,0680	5,3950	0,0055	**
BAP	2	0,6099	142	0,0680	8,9733	0,0002	**
ANA/BAP	4	0,0929	142	0,0680	1,3661	0,2487	
Sumario de todos los efectos, diseño: (toronjil.sta) Medición 2							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-level	
ANA	2	1,8646	114	0,3752	4,9689	0,0085	**
BAP	2	4,7404	114	0,3752	12,6330	0,0000	**
ANA/BAP	4	0,1984	114	0,3752	0,5288	0,7147	
Sumario de todos los efectos, diseño: (toronjil.sta) Medición 3							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-level	
ANA	2	3,6410	114	0,6958	5,2328	0,0067	**
BAP	2	12,5673	114	0,6958	18,0614	0,0000	**
ANA/BAP	4	0,8824	114	0,6958	1,2682	0,2867	
Sumario de todos los efectos, diseño: (toronjil.sta) Medición 4							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-level	
ANA	2	4,4044	114	1,1296	3,8990	0,0230	*
BAP	2	35,2312	114	1,1296	31,1882	0,0000	**
ANA/BAP	4	1,3271	114	1,1296	1,1748	0,3257	

Nota: gl= Grados de libertad; CM= Cuadrados medios

**= altamente significativo

*= significativo

ANEXO 29. Número de raíces de toronjil.

Sumario de todos los efectos, diseño: (toronjil.sta) Medición 4							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	0,8884	53	2,7218	0,3264	0,7230	
BAP	2	212,8684	53	2,7218	78,2073	0,0000	**
ANA/BAP	4	14,2450	53	2,7218	5,2336	0,0013	**

Nota: gl= Grados de libertad; CM= Cuadrados medios

**= Altamente significativo

ANEXO 30. Longitud de raíces de toronjil.

Sumario de todos los efectos, diseño: (toronjil.sta) Medición 4							
	gl	CM	gl	CM	F		
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor	
ANA	2	0,4828	53	0,5996	0,8053	0,4524	
BAP	2	7,0654	53	0,5996	11,7838	0,0001	
ANA/BAP	4	0,3880	53	0,5996	0,6471	0,6314	

Nota: gl= Grados de libertad; CM= Cuadrados medios

**= Altamente significativo

ANEXO 31. Número de brotes de cedrón.

Sumario de todos los efectos, diseño: (cedrón.sta)						
	gl	CM	Gl	CM	F	
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor
1	1	2,6256	102	1,2548	2,0925	0,1511

Nota: gl= Grados de libertad; CM= Cuadrados medios

ANEXO 32. Longitud de brotes de cedrón.

Sumario de todos los efectos, diseño: (cedrón.sta)						
	gl	CM	gl	CM	F	
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor
1	1	0,6002	102	1,4864	0,4038	0,5265

Nota: gl= Grados de libertad; CM= Cuadrados medios

ANEXO 33. Número de raíces de cedrón.

Sumario de todos los efectos, diseño: (cedrón.sta)						
	gl	CM	gl	CM	F	
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor
1	1	15,3064	44	1,2534	12,2118	0,0011 **

Nota: gl= Grados de libertad; CM= Cuadrados medios

**= Altamente significativo

ANEXO 34. Longitud de raíces de cedrón.

Sumario de todos los efectos, diseño: (cedrón.sta)						
	gl	CM	gl	CM	F	
	Efecto	Efecto	Error	Error	cal	p-valor
1	1	1,5282	44	0,3969	3,8502	0,0561

Nota: gl= Grados de libertad; CM= Cuadrados medios

ANEXO 35. Vitrificación, senescencia y contaminación de cedrón.

Apice-brote	n_1	N_1	p_1	n_2	N_2	p_2	p_{12}	z	p_z	
vitrificación	19	40	0,4750	44	70	0,6286	0,5727	-1,5663	0,1173	
senescencia	28	40	0,7000	45	70	0,6429	0,6636	0,6102	0,5417	
contaminación	17	40	0,4250	44	70	0,6286	0,5545	-2,0665	0,0388	*

Nota: *= Diferencia significativa

ANEXO 36. Medición de los parámetros número y

longitud de brotes y raíces para el tratamiento 1 (0 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de ruda.

Explante	Brotes								Raíces				
	7 Dic. 2000		12 Dic. 2000		19 Dic. 2000		27 Dic.2000		7 Dic. 2000		12 Dic. 2000		19 Dic. 2000
	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº
1													
2	1	0.7	1	1.1	1	1.2	1	1.4					
3	2	0.6	4	1.3	4	1.8	4	2.2					
4	2	1.1	2	1.7	2	2.4	3	2.9					
5	2	0.7	2	1.7	2	2.0	2	2.7					
6	1	1.1	6	1.4	6	1.8	6	2.5					
7	1	1.7	1	2.5	2	2.8	6	3.2					
8	1	0.2	1	0.3	1	0.4	1	0.5					
9	1	0.9	1	1.1	1	1.2	1	1.3					
10													
11	1	0.5	1	0.6	1	0.6	1	0.7					
12	1	0.7	1	1.1	1	1.4	1	1.6					
13	1	0.1											
14	1	1.5	1	1.8	1	2.3	1	2.7					
15	1	0.6	1	1.0	1	1.1	1	1.2					
16	1	0.9	1	1.3	1	1.7	1	1.8	3	0.5	3	0.7	3
17													
18	1	1.8	3	2.1	3	2.3	3	2.6					
19	1	0.7	6	1.2	7	1.5	7	1.7					
20	1	1.7	1	2.0	1	2.4	1	2.6					

ANEXO 37. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 1 (0 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de ruda.

Expl.	Callo				Vitrificación				Senescencia				0
	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	
1									☐				☐
2					☐	☐	☐	☐					
3					☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
4					☐	☐	☐	☐					
5	☐	☐	☐	☐									
6												☐	
7					☐	☐	☐	☐					
8						☐	☐	☐		☐	☐	☐	
9	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐			☐	☐	
10									☐	☐	☐	☐	
11					☐	☐	☐	☐					
12	☐	☐	☐	☐								☐	
13									☐	☐	☐	☐	
14													
15												☐	
16					☐	☐	☐	☐					
17									☐	☐	☐	☐	
18						☐	☐	☐	☐				
19										☐	☐	☐	
20													

ANEXO 38. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 2 (0 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de ruda.

Explante	Brotes								Raíces				
	7 Dic. 2000		12 Dic. 2000		19 Dic. 2000		27 Dic.2000		7 Dic. 2000		12 Dic. 2000		19 Dic. 2000
	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº
1													
2													
3	2	1.1	6	1.7	6	2.5	6	3.0					
4	1	1.0	6	1.6	7	2.0	7	2.3					
5	1	1.1	6	2.3	6	3.6	6	3.9					
6	1	1.0	3	1.7	3	1.9	3	2.2					
7	1	2.1	2	2.3	2	3.1	2	3.6					
8	1	0.9	6	1.3	6	1.8	6	2.1					
9	1	0.4	7	0.6	8	0.7	8	0.8					
10	2	1.3	7	2.1	7	2.5	8	3.1					
11													
12	5	0.4	7	0.7	8	1.2	8	1.9					
13	4	1.8	6	2.4	8	2.8	9	3.2					
14													
15	6	0.7	8	0.8	8	1.2	8	2.6					
16	3	2.3	6	2.8	7	3.2	9	3.5					
17	2	1.3	6	1.9	6	2.7	6	2.9					
18	1	1.7	1	2.7	1	2.9	6	3.2					
19	7	0.9	6	1.4	6	1.9	7	2.4					
20	3	2.0	8	2.6	8	2.8	8	3.1					

ANEXO 39. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 2 (0 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de ruda.

Expl.	Callo				Vitrificación				Senescencia				O
	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	
1									☐	☐			
2									☐	☐			
3						☐			☐				
4						☐			☐	☐			
5					☐	☐			☐	☐			
6					☐	☐			☐	☐			
7					☐	☐			☐				
8	☐	☐	☐	☐	☐	☐				☐			
9					☐	☐			☐	☐			
10						☐							
11									☐	☐			
12	☐	☐	☐	☐	☐	☐				☐			
13	☐	☐	☐	☐		☐							
14									☐	☐			
15					☐	☐							
16					☐	☐							
17					☐	☐							
18						☐							
19					☐	☐							
20					☐								

ANEXO 40. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 3 (0 mg/L ANA y 2.0 mg/L BAP) de ruda.

Explante	Brotes								Raíces				
	7 Dic. 2000		12 Dic. 2000		19 Dic. 2000		27 Dic.2000		7 Dic. 2000		12 Dic. 2000		19 Dic. 2000
	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº
1	1	0.7	1	0.9	1	1.1	5	1.6					
2	1	0.8	6	1.1	6	1.7	7	1.9					
3	5	0.7	6	0.9	6	1.2	8	1.2					
4	1	0.8	1	0.9	1	1.1	1	1.4					
5	1	0.4	1	1.1	1	1.3	1	2.0					
6	1	0.8	7	0.9	7	1.2	8	1.4					
7	1	2.0	7	2.6	8	2.7	8	2.8					
8	4	1.0	6	1.3	7	1.6	9	2.3					
9	3	0.8	6	1.0	9	1.2	11	1.7					
10	1	0.9	1	1.6	1	2.2	1	2.3					
11	6	0.9	6	1.3	7	1.6	10	1.9					
12													
13	6	0.3	6	0.6	7	1.0	9	1.2					
14	1	0.4	2	0.6	2	1.1	2	1.4					
15	1	0.5	3	0.8	5	1.1	8	1.5					
16	5	1.6	6	1.9	6	2.3	12	2.7					
17	1	1.8	2	2.1	2	2.2	4	2.7					
18	1	0.3	1	0.6	1	0.7	4	0.8					
19	1	1.3	3	1.7	6	2.3	8	2.7					
20	2	1.5	7	1.8	7	2.3	8	2.7					

ANEXO 41. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 3 (0 mg/L ANA y 2.0 mg/L BAP) de ruda.

Expl.	Callo				Vitrificación				Senescencia				O
	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	
1	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
2						☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
3									☐	☐	☐	☐	
4					☐	☐	☐	☐		☐			
5					☐	☐	☐	☐	☐		☐		
6		☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐			☐		
7					☐	☐	☐	☐					
8					☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
9						☐	☐	☐	☐	☐		☐	
10						☐	☐	☐				☐	
11					☐	☐	☐	☐	☐		☐	☐	
12									☐	☐	☐	☐	
13						☐	☐	☐	☐				
14						☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
15						☐	☐	☐		☐			
16		☐	☐	☐		☐	☐	☐			☐		
17													
18												☐	
19					☐	☐	☐	☐		☐			
20						☐	☐	☐					

ANEXO 42. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 4 (0.1 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de ruda.

Explante	Brotes								Raíces				
	7 Dic. 2000		12 Dic. 2000		19 Dic. 2000		27 Dic.2000		7 Dic. 2000		12 Dic. 2000		19 Dic. 2000
	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº
1	1	1.2											
2	1	1.8	1	2.2	1	2.3	1	2.4			4	0.6	7
3	1	1.4	2	1.8	2	2.0	2	2.6					
4	2	0.3	2	0.4	2	0.5	2	0.7					
5	1	0.4	1	0.6	1	0.8	1	1.1					
6	1	1.3	1	1.5	1	2.5	2	2.8					
7	6	0.7	6	1.1	7	1.4	9	1.6					
8	1	1.8	1	2.2	1	2.6	1	3.3					
9	1	0.2	1	0.2	1	0.3	1	0.3					
10	7	0.7	7	1.2	8	1.7	9	1.9					
11	6	0.7	8	1.0	10	1.2	11	1.6					
12	6	0.3	9	0.5	12	0.7	12	1.0					
13	2	0.4	2	0.9	2	1.1	2	1.4			1	0.2	1
14	1	1.5	1	1.9	1	2.1	1	2.2					
15	6	0.4	7	0.8	9	1.4	10	1.8					
16	6	0.3	7	0.9	8	1.2	10	1.3					
17	1	1.2	1	2.1	1	2.3	1	2.8					
18	2	1.7	2	2.3	2	2.6	2	2.9					
19	2	0.6	2	1.2	2	1.7	2	1.8			2	0.4	2
20	1	0.7	1	1.0	3	1.1	3	1.3					

ANEXO 43. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 4 (0.1 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de ruda.

Expl.	Callo				Vitrificación				Senescencia				O
	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	
1	☐								☐				☐
2	☐	☐	☐	☐						☐	☐	☐	
3	☐	☐	☐	☐						☐	☐	☐	
4	☐	☐	☐	☐					☐	☐	☐	☐	
5	☐	☐	☐	☐									
6	☐	☐	☐	☐					☐	☐	☐	☐	
7	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐			☐	☐	
8	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
9	☐	☐	☐	☐									
10	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
11	☐	☐	☐	☐									
12	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
13	☐	☐	☐	☐									
14	☐	☐	☐	☐									
15	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
16	☐	☐	☐	☐							☐	☐	
17	☐	☐	☐	☐									
18	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐			☐	☐	
19	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
20					☐	☐	☐	☐					

ANEXO 44. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 5 (0.1 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de ruda.

Explante	Brotes								Raíces				
	7 Dic. 2000		12 Dic. 2000		19 Dic. 2000		27 Dic.2000		7 Dic. 2000		12 Dic. 2000		19 Dic. 2000
	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº
1	1	0.9											
2													
3	6	1.3	7	1.8	9	1.9	11	2.2			1	0.2	1
4	4	0.2	4	0.3	4	0.7	4	0.9					
5	2	0.8	4	1.9	5	2.6	6	2.9					
6	1	0.2	1	0.3	1	0.4	1	0.5					
7	1	2.1	1	2.9	1	3.6	1	3.2					
8	2	1.7	2	1.9	3	2.7	5	3.5					
9	2	1.8	2	2.1	2	2.6	6	2.9					
10	7	0.3	7	0.9	8	2.0	9	3.1					
11	2	0.4	2	0.5	2	0.5	2	0.8					
12	7	0.3	8	0.6	9	0.8	10	1.1					
13	1	0.1	1	0.1	1	0.1	1	0.3					
14	1	1.1	6	1.3	7	1.7	7	2.1					
15	6	0.4	7	0.7	7	1.6	9	2.3					
16	1	1.3	7	1.6	8	2.5	12	2.8					
17	8	1.9	9	2.5	11	2.9	13	3.2					
18	7	1.5	9	1.7	13	2.0	14	2.7					
19	4	2.2	6	2.9	7	3.8	7	4.2					
20	1	1.5	6	1.6	6	2.0	7	2.8					

ANEXO 45. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 5 (0.1 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de ruda.

Expl.	Callo				Vitrificación				Senescencia				0
	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	
1					☐								☐
2							☐		☐	☐	☐	☐	
3		☐	☐	☐			☐		☐	☐	☐	☐	
4	☐	☐	☐	☐		☐		☐					
5						☐		☐	☐				
6						☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
7							☐		☐	☐	☐	☐	
8	☐	☐	☐	☐			☐				☐		
9	☐	☐	☐	☐						☐			
10	☐	☐	☐	☐		☐		☐					
11						☐	☐	☐	☐		☐	☐	
12					☐	☐		☐				☐	
13							☐		☐	☐	☐	☐	
14	☐	☐	☐	☐	☐					☐			
15					☐	☐	☐	☐	☐		☐	☐	
16					☐	☐		☐				☐	
17	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
18		☐	☐	☐	☐	☐		☐					
19	☐	☐	☐	☐	☐	☐		☐		☐			
20					☐	☐		☐					

ANEXO 46. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 6 (0.1 mg/L ANA y 2.0 mg/L BAP) de ruda.

Explante	Brotes								Raíces				
	7 Dic. 2000		12 Dic. 2000		19 Dic. 2000		27 Dic.2000		7 Dic. 2000		12 Dic. 2000		19 Dic. 2000
	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº
1	6	1.3	6	1.7	7	2.0	9	2.3					
2	6	0.5	6	0.8	7	0.9	9	1.0					
3	6	0.5	7	0.9	7	1.1	8	1.4					
4	2	0.5	2	0.7	2	1.4	8	2.0					
5	4	0.8	5	1.1	6	2.1	11	2.3					
6	2	2.1	4	2.3	6	2.7	11	2.8					
7	5	0.4	5	0.6	6	1.1	13	1.8			1	0.2	1
8	6	1.9	6	2.4	7	2.8	7	3.1					
9	3	2.2	3	2.4	3	2.8	3	2.9					
10	3	1.2	5	1.6	7	1.9	8	2.2					
11	1	0.2	2	0.3	2	0.5	2	0.7					
12	6	0.9	6	1.4	8	2.4	10	2.6					
13	1	0.2	1	0.2	1	0.2	1	0.3					
14	7	1.4	7	1.5	8	2.0	8	2.2					
15	7	0.8	7	1.1	9	1.9	12	2.5					
16													
17	2	1.3	2	1.3	2	1.9	5	2.1					
18	6	1.9	6	2.1	6	2.4	6	2.5					
19	5	1.2	6	1.4	8	1.6	8	1.8					
20	6	1.6	7	1.7	8	2.0	8	2.2					

ANEXO 47. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 6 (0.1 mg/L ANA y 2.0 mg/L BAP) de ruda.

Expl.	Callo				Vitrificación				Senescencia				O
	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	
1									☐	☐	☐	☐	
2					☐	☐	☐	☐			☐		
3					☐	☐	☐	☐					
4					☐	☐	☐	☐					
5					☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
6	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
7	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
8	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐	
9	☐	☐	☐	☐	☐								
10	☐	☐	☐	☐								☐	
11	☐	☐	☐	☐					☐	☐	☐	☐	
12					☐	☐	☐	☐	☐				
13	☐	☐	☐	☐					☐	☐	☐	☐	
14	☐	☐	☐	☐									
15					☐	☐	☐	☐					
16									☐	☐	☐	☐	
17	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐		☐			
18	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐			☐	☐	
19					☐	☐	☐	☐					
20	☐				☐	☐	☐	☐					

ANEXO 48. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 7 (0.2 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de ruda.

Explante	Brotos								Raíces				
	7 Dic. 2000		12 Dic. 2000		19 Dic. 2000		27 Dic.2000		7 Dic. 2000		12 Dic. 2000		19 Dic. 2000
	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº
1													
2	4	0.8	4	0.9	4	1.1	5	1.3					
3	1	1.6	1	2.1	1	3.2	1	3.5					
4	1	0.1	1	0.1	1	0.1	1	0.1			1	0.1	1
5	1	0.7	1	1.5	1	1.8	1	1.9			2	0.6	2
6	6	0.7	7	0.7	9	1.1	11	1.2					
7	3	0.3	3	0.3	3	0.4	3	0.5					
8	5	1.8	7	2.3	10	2.8	11	3.1			2	0.2	5
9	4	0.6	4	0.7	4	0.9	4	1.1			3	0.8	10
10	2	0.3	2	0.5	2	0.7	2	0.8			3	0.2	3
11	1	1.0	1	1.5	1	2.2	1	2.4					
12	3	1.5	3	2.8	3	3.1	5	3.4					
13	1	1.3	1	1.7	1	2.4	1	2.9					
14	2	0.3	2	0.6	2	0.9	2	1.0					
15													
16	3	0.4	3	0.6	3	0.9	3	1.1			1	0.1	1
17	1	1.1	1	1.4	1	1.6	1	1.8					
18	1	1.5	1	1.7	1	2.3	1	2.4					
19	1	1.7	1	1.9	1	2.0	5	2.1					
20	2	2.1	2	2.5	2	2.9	2	3.0					

ANEXO 49. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 7 (0.2 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de ruda.

Expl.	Callo				Vitrificación				Senescencia				O
	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	
1									☐	☐	☐	☐	
2	☐	☐	☐	☐						☐	☐	☐	
3	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
4	☐	☐	☐	☐									
5	☐	☐	☐	☐					☐				
6	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
7	☐	☐	☐	☐					☐	☐	☐	☐	
8	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
9	☐	☐	☐	☐					☐	☐	☐	☐	
10	☐	☐	☐	☐					☐	☐	☐	☐	
11	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
12	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐					
13	☐	☐	☐	☐									
14	☐	☐	☐	☐					☐	☐	☐	☐	
15									☐	☐	☐	☐	
16	☐	☐	☐	☐									
17	☐	☐	☐	☐									
18	☐	☐	☐	☐							☐	☐	
19	☐	☐	☐	☐									
20	☐	☐	☐	☐	☐								

ANEXO 50. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 8 (0.2 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de ruda.

Explante	Brotes								Raíces				
	7 Dic. 2000		12 Dic. 2000		19 Dic. 2000		27 Dic.2000		7 Dic. 2000		12 Dic. 2000		19 Dic. 2000
	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº
1	2	0.2	2	0.4	2	1.1	3	1.4					
2	6	0.7	6	1.2	7	1.4	8	2.6					
3	5	0.7	6	0.9	7	1.4	9	2.0					
4	2	0.6	2	0.7	2	1.3	5	1.8			1	0.4	1
5	2	1.1	2	1.3	5	2.3	8	2.7			1	0.8	2
6	5	0.9	6	1.1	7	1.6	10	2.3					
7	5	2.2	7	2.3	9	2.6	12	3.1					
8	6	0.9	7	1.0	8	1.4	9	2.5					
9	4	1.6	5	1.9	6	2.2	7	3.6					
10	5	0.7	6	0.9	9	1.6	13	1.9					
11	3	0.3	3	0.4	3	0.8	3	1.1					
12	6	1.3	7	1.4	8	2.0	11	3.5					
13	6	0.3	7	0.5	8	1.3	10	1.9					
14	5	0.5	6	1.9	8	2.6	11	3.2					
15	4	1.2	4	1.6	5	1.9	6	2.3					
16	6	0.3	7	0.8	9	1.1	9	1.6					
17	5	1.4	7	1.7	10	2.2	11	2.7					
18	3	1.6	4	2.6	6	2.8	7	3.2					
19	2	0.8	2	1.1	2	1.2	2	1.4					
20	5	0.8	6	1.2	9	1.5	11	1.6					

ANEXO 51. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 8 (0.2 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de ruda.

Expl.	Callo				Vitrificación				Senescencia				O
	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	
1					☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
2									☐	☐	☐	☐	
3		☐	☐	☐	☐								
4					☐	☐	☐	☐					
5					☐	☐	☐	☐	☐			☐	
6	☐	☐	☐	☐									
7	☐	☐	☐	☐									
8	☐	☐	☐	☐					☐	☐	☐	☐	
9	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐				☐	
10					☐	☐	☐	☐		☐			
11						☐	☐	☐	☐				
12	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
13	☐	☐	☐	☐	☐		☐	☐		☐	☐	☐	
14	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐					
15	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐			☐	☐	
16	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐					
17	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
18	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐	
19	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
20	☐	☐	☐	☐									

ANEXO 52. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 9 (0.2 mg/L ANA y 2.0 mg/L BAP) de ruda.

Explante	Brotes								Raíces				
	7 Dic. 2000		12 Dic. 2000		19 Dic. 2000		27 Dic.2000		7 Dic. 2000		12 Dic. 2000		19 Dic. 2000
	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº
1	3	0.2	3	0.4	3	0.9	5	1.1					
2	6	1.3	7	1.5	8	1.8	8	2.0					
3	3	0.5	3	0.7	6	1.1	7	1.7					
4	6	1.1	6	1.7	9	2.1	11	2.6					1
5	1	0.6	1	0.8	2	0.9	2	1.4					
6	5	0.5	5	0.8	6	1.7	7	2.5					
7	5	0.6	6	0.8	7	1.1	7	1.4					
8													
9	6	0.2	6	0.4	7	0.6	8	0.9					
10	5	1.1	6	1.2	8	1.7	10	2.0					
11	5	0.4	6	0.7	9	0.8	9	1.5					
12	1	0.7	1	0.8	1	0.9	1	1.0					
13	7	1.7	7	1.8	7	2.0	8	2.2					
14	6	1.3	8	1.6	9	2.4	13	2.7					
15	3	0.9	3	1.0	3	1.1	3	1.3					
16													
17	5	0.4	6	0.6	6	1.5	8	2.3					
18	6	0.4	7	0.8	8	1.2	8	1.6					
19	6	1.5	7	2.0	9	2.2	11	2.4					
20	6	0.3	8	0.6	11	0.9	12	1.2					

ANEXO 53. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 9 (0.2 mg/L ANA y 2.0 mg/L BAP) de ruda.

Expl.	Callo				Vitrificación				Senescencia				O
	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	7 Dic	12 Dic	19 Dic	27 Dic	
1	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
2	☐	☐	☐	☐	☐				☐	☐	☐	☐	
3	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐	
4	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
5	☐	☐	☐	☐	☐				☐	☐	☐	☐	
6	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
7	☐	☐	☐	☐			☐	☐	☐	☐	☐	☐	
8									☐	☐	☐	☐	
9	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
10	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
11						☐							
12	☐	☐	☐	☐	☐							☐	
13	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
14	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐	
15	☐	☐	☐	☐	☐								
16									☐	☐	☐	☐	
17	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
18	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
19	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
20	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐			☐	☐	

ANEXO 54. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 1 (0 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de toronjil.

Expl.	Brotos								Raíces				
	27 Nov. 2000		6 Dic. 2000		11 Dic. 2000		18 Dic.2000		27 Nov. 2000		6 Dic. 2000		11 Dic. 2000
	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº
1	1	1.2							2	0.9			
2	2	1.4											
3	2	0.9											
4	2	1.2											
5	2	1.0											
6	1	0.4	1	1.1	1	1.7	1	2.8	2	1.2	3	3.6	3
7	1	0.1	2	0.2	3	0.4	3	0.5					
8	1	0.6	1	1.5	3	2.4	3	4.8					7
9	2	0.9	2	2.2	2	3.3	2	4.9					3
10	1	0.4	1	0.8	1	1.4	1	2.6			2	2.5	3
11	2	0.6	4	1.8	4	2.6	4	4.0			2	1.3	7
12	2	0.5	3	1.6	3	1.8	6	4.1					2
13	2	1.2	3	2.9	3	5.1	5	5.4	3	1.3	12	1.8	10
14	1	0.7	4	1.1	4	2.4	4	4.7			1	0.8	4
15	2	1.3	2	3.0	3	4.5	5	5.7					2
16	1	0.9	3	2.6	3	4.4	3	5.8					2
17*													
18*													
19*													
20*													

* Explantes se retiraron antes de su primera medición por encontrarse contaminadas con hongo y/o bacteria.

ANEXO 55. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 1 (0 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de toronjil.

Expl.	Callo				Vitrificación				Senescencia				20 Dic
	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	
1					☐								☐
2					☐								☐
3					☐								☐
4					☐								☐
5					☐								☐
6							☐	☐					
7					☐	☐	☐	☐			☐	☐	
8					☐	☐	☐	☐					
9						☐	☐	☐					
10					☐	☐	☐	☐				☐	
11					☐	☐	☐	☐					
12					☐	☐	☐	☐				☐	
13					☐	☐	☐	☐				☐	
14					☐	☐	☐	☐				☐	
15					☐	☐	☐	☐					
16					☐	☐	☐	☐					
17													
18													
19													
20													

ANEXO 56. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 2 (0 mg/L ANA y 0.1 mg/L BAP) de toronjil.

Expl.	Brotos								Raíces				
	27 Nov. 2000		6 Dic. 2000		11 Dic. 2000		18 Dic.2000		27 Nov. 2000		6 Dic. 2000		11 Dic. 2000
	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº
1	4	0.7											
2	1	0.4											
3	8	0.7											
4	4	0.8											
5	1	0.3	2	1.2	2	1.7	4	2.6					
6	3	0.8	4	2.2	5	2.4	6	3.5					
7	5	0.8	5	1.2	6	2.1	7	2.4					
8	2	0.8	4	1.1	4	2.1	5	2.8					
9	4	0.8	4	1.2	6	2.2	6	2.9					
10	4	0.7	5	1.3	7	2.2	8	3.4					
11	2	0.8	2	1.9	3	2.3	5	3.1					
12	3	0.6	4	1.3	4	1.4	6	2.6					
13	2	0.9	2	1.1	5	3.3	6	4.0					
14	2	0.9	3	1.8	4	2.2	6	3.3					
15	4	0.7	2	1.2	6	2.2	7	3.2					
16	1	0.8	2	1.9	5	3.4	8	3.6					
17	2	0.9	3	1.5	3	1.6	7	2.0					
18*													
19*													
20*													

* Explantes se retiraron antes de su primera medición por encontrarse contaminadas con hongo y/o bacteria.

ANEXO 57. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 2 (0 mg/L ANA y 0.1 mg/L BAP) de toronjil.

Expl.	Callo				Vitrificación				Senescencia				O
	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	
1					☐								
2					☐				☐				
3					☐								
4													
5		☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
6					☐	☐	☐	☐					
7					☐	☐	☐	☐					
8					☐	☐	☐	☐					
9					☐	☐	☐	☐					
10					☐	☐	☐	☐					
11			☐	☐	☐	☐	☐	☐					
12					☐	☐	☐	☐					
13			☐	☐	☐	☐	☐	☐					
14				☐	☐	☐	☐	☐					
15					☐	☐	☐	☐					
16			☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐			☐	
17					☐	☐	☐	☐					
18													
19													
20													

ANEXO 58. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 3 (0 mg/L ANA y 0.2 mg/L BAP) de toronjil.

Expl.	Brotos								Raíces				
	27 Nov. 2000		6 Dic. 2000		11 Dic. 2000		18 Dic.2000		27 Nov. 2000		6 Dic. 2000		11 Dic. 2000
	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº
1	3	0.8											
2	2	0.8											
3	2	0.5											
4	1	0.6	4	1.3	6	1.8	8	2.1					
5	1	0.6	5	1.0	6	1.4	8	2.4					
6	2	0.5	3	1.6	4	1.8	6	2.3					
7	2	0.6	4	1.1	6	1.9	7	2.3					
8	3	0.5	5	1.3	7	1.7	9	2.8					
9	2	0.4	3	1.1	5	1.3	8	1.5					
10													
11	2	0.5	6	1.1	7	1.7	10	1.9					
12	2	0.7	4	0.9	5	1.5	9	2.1					
13	1	0.9	2	2.1	2	2.4	4	2.3					
14	1	0.5	2	0.8	2	1.4	4	1.9					
15*													
16*													
17*													
18*													
19*													
20*													

* Explantes se retiraron antes de su primera medición por encontrarse contaminadas con hongo y/o bacteria.

ANEXO 59. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 3 (0 mg/L ANA y 0.2 mg/L BAP) de toronjil.

Expl.	Callo				Vitrificación				Senescencia				O
	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	
1					☐								☐
2					☐								☐
3					☐								☐
4					☐	☐	☐	☐					
5			☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐				
6			☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐				
7			☐	☐	☐	☐	☐	☐					
8					☐	☐	☐	☐	☐				
9					☐	☐	☐	☐					
10									☐	☐	☐	☐	
11			☐	☐	☐	☐	☐	☐					
12			☐	☐	☐	☐	☐	☐					
13				☐	☐	☐	☐	☐					
14					☐	☐	☐	☐					
15													
16													
17													
18													
19													
20													

ANEXO 60. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 4 (0.1 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de toronjil.

Expl.	Brotos								Raíces				
	27 Nov. 2000		6 Dic. 2000		11 Dic. 2000		18 Dic.2000		27 Nov. 2000		6 Dic. 2000		11 Dic. 2000
	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº
1	1	1.7							5	1.1			
2	2	0.9											
3	1	0.9	1	2.7	1	3.8	1	4.3	4	0.3	5	2.9	5
4	2	0.4	2	2.0	2	3.6	2	4.5	8	0.8	11	2.1	13
5	1	0.9	1	2.2	1	2.8	1	4.4	1	0.2	7	0.5	7
6	1	1.0	1	2.4	1	3.3	2	5.2	2	0.6	4	0.7	7
7	2	0.9	2	3.0	3	4.7	5	5.8	2	0.2	6	1.8	10
8	1	1.2	1	2.1	2	3.5	2	5.2			3	0.4	5
9	2	1.5	2	2.7	2	4.1	2	5.8			3	1.3	5
10	1	0.2	1	0.5	2	0.9	4	1.3	2	0.2	2	0.2	3
11	1	0.2	1	1.4	1	2.4	1	3.8	9	0.7	11	0.8	14
12	1	0.2	1	0.7	1	1.5	2	2.9	2	0.2	6	1.2	7
13	1	1.4	2	3.4	3	4.4	2	5.3	1	0.2	4	1.0	11
14	1	1.0	2	4.2	3	5.9	4	7.8	10	0.4	12	1.7	13
15	1	0.4	1	0.9	1	1.4	1	1.8	1	0.4	8	1.1	8
16	3	1.0	3	3.1	3	4.4	6	5.8	6	0.7	10	1.3	11
17	3	0.6	3	1.8	5	3.2	6	5.7	1	0.2	8	0.7	12
18	2	0.7	2	2.2	2	2.3	2	3.9	4	1.2	4	1.4	11
19*													
20*													

* Explantes se retiraron antes de su primera medición por encontrarse contaminadas con hongo y/o bacteria.

ANEXO 61. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 4 (0.1 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de toronjil.

Expl.	Callo				Vitrificación				Senescencia				O
	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	
1					☐								☐
2					☐								☐
3					☐	☐	☐	☐					
4					☐	☐	☐	☐					
5					☐	☐	☐	☐					
6					☐	☐	☐	☐					
7					☐	☐	☐	☐					
8					☐	☐	☐	☐					
9					☐	☐	☐	☐			☐	☐	
10					☐	☐	☐	☐	☐		☐	☐	
11					☐	☐	☐	☐			☐	☐	
12						☐	☐	☐	☐				
13					☐	☐	☐	☐					
14					☐	☐	☐	☐					
15					☐	☐	☐	☐	☐		☐	☐	
16					☐	☐	☐	☐					
17					☐	☐	☐	☐					
18					☐	☐	☐	☐			☐	☐	
19													
20													

ANEXO 62. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 5 (0.1 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de toronjil.

Expl.	Brotos								Raíces				
	27 Nov. 2000		6 Dic. 2000		11 Dic. 2000		18 Dic.2000		27 Nov. 2000		6 Dic. 2000		11 Dic. 2000
	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº
1	2	0.5											
2	1	0.2											
3	1	0.8											
4	1	0.6											
5	2	0.5	5	1.4	6	1.8	7	2.5					
6	4	0.6	6	1.8	6	2.3	7	2.7					
7	2	0.8	3	1.7	4	3.4	6	4.2					
8	2	0.9	2	2.0	3	2.5	5	2.8					
9	1	0.4	4	1.6	6	2.5	7	3.0					
10	1	0.3	2	1.5	2	1.9	4	2.3					
11	2	0.4	1	1.6	2	2.8	2	3.1					
12	2	0.3	2	1.7	4	2.1	7	3.0					
13	2	0.4	4	2.2	4	2.5	7	3.6					
14	2	0.4	2	0.8	2	1.1	2	1.4					
15	2	0.7	4	1.1	7	1.8	8	2.1					
16	2	0.6	4	2.2	5	2.4	6	3.1					
17	1	0.6	1	1.4	2	2.2	5	2.6					
18	1	0.7	1	1.8	2	2.1	3	3.2					1
19	2	0.7	2	1.4	4	2.0	4	2.6			1	0.8	1
20*													

* Explante se retiró antes de su primera medición por encontrarse contaminada con hongo y/o bacteria.

ANEXO 63. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 5 (0.1 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de toronjil.

Expl.	Callo				Vitrificación				Senescencia				O
	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	
1	☐				☐								
2	☐				☐								
3					☐								
4	☐				☐								
5		☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
6	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
7	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
8	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
9	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
10	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
11	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
12	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
13	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐		
14	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐		
15	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
16	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
17	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
18		☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
19	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
20													

ANEXO 64. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 6 (0.1 mg/L ANA y 2.0 mg/L BAP) de toronjil.

Expl.	Brotos								Raíces				
	27 Nov. 2000		6 Dic. 2000		11 Dic. 2000		18 Dic.2000		27 Nov. 2000		6 Dic. 2000		11 Dic. 2000
	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº
1	2	0.3											
2	2	0.6											
3	2	0.9											
4	1	0.3											
5	2	0.3	2	0.6	6	1.1	8	1.4					
6													
7	2	0.9	2	1.7	6	2.1	8	3.2					
8	1	0.3	2	0.7	4	1.0	4	1.9					
9	1	0.4	3	1.0	7	1.3	9	2.2					
10	1	0.2	2	0.8	2	0.9	2	1.1					
11	3	0.7	6	1.0	7	1.4	9	2.0					
12	2	0.7	2	1.8	3	2.1	4	2.9					
13	2	0.7	6	1.4	6	2.0	7	3.0					
14	2	0.4	3	1.0	7	1.9	7	2.1					
15	3	0.6	6	1.2	7	1.4	8	2.0					
16	2	0.9	2	2.4	5	2.6	6	2.8					
17	2	0.6	4	1.1	6	1.9	7	2.5					
18	2	0.4	3	1.3	3	1.6	5	2.0					
19	4	0.8	4	1.7	6	1.8	7	2.8					
20*													

* Explante se retiró antes de su primera medición por encontrarse contaminada con hongo y/o bacteria.

ANEXO 65. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 6 (0.1 mg/L ANA y 2.0 mg/L BAP) de toronjil.

Expl.	Callo				Vitrificación				Senescencia				O
	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	
1					☐				☐				
2													
3					☐								
4					☐				☐				
5	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
6		☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐				☐	
7	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
8	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
9		☐	☐	☐		☐	☐	☐	☐				
10		☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐				
11	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
12	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
13		☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
14		☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐				
15	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
16	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
17	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐				
18	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐			☐	☐	
19	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
20													

ANEXO 66. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 7 (0.2 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de toronjil.

Expl.	Brotos								Raíces				
	27 Nov. 2000		6 Dic. 2000		11 Dic. 2000		18 Dic.2000		27 Nov. 2000		6 Dic. 2000		11 Dic. 2000
	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº
1	2	0.3											
2	1	0.5							10	2.3			
3	1	0.8											
4									2	0.3			
5	2	0.4	2	1.0	2	1.4	2	2.8	2	0.4	11	0.8	13
6	1	0.8	2	1.6	2	2.4	3	4.0			3	0.3	5
7	1	0.8	1	1.8	1	2.8	1	4.0			10	0.8	12
8	1	0.5	1	1.1	1	1.8	1	3.6	3	0.2	11	0.6	12
9	2	0.7	2	2.5	2	3.1	2	6.0			2	0.2	5
10	2	0.8	2	2.5	2	3.2	2	4.7	2	0.3	12	2.3	13
11	1	0.9	1	2.1	1	2.4	1	2.4	4	1.2	4	1.7	4
12	1	0.9	1	2.1	1	2.3	1	3.4	1	0.1	1	0.3	7
13	1	0.3	1	0.9	1	1.2	1	2.7	2	0.2	6	0.6	10
14			1	0.2	1	0.3	1	0.4	4	0.5	6	0.6	11
15	2	0.4	2	1.2	2	1.4	2	2.9	1	0.1	3	0.7	5
16	2	0.7	2	1.9	2	2.6	2	3.0			4	0.6	11
17	2	0.4	2	2.1	2	3.0	2	3.3			1	0.4	5
18	2	0.5							2	1.2			
19													
20													

ANEXO 67. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 7 (0.2 mg/L ANA y 0 mg/L BAP) de toronjil.

Expl.	Callo				Vitrificación				Senescencia				O
	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	
1					☐								
2					☐								
3					☐								
4					☐				☐				
5	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
6			☐	☐	☐	☐	☐	☐					
7	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
8	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
9	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
10	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
11		☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐	
12	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
13	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
14	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐				☐	
15	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
16	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
17		☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐				☐	
18	☐				☐								
19													
20													

ANEXO 68. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 8 (0.2 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de toronjil.

Expl.	Brotos								Raíces				
	27 Nov. 2000		6 Dic. 2000		11 Dic. 2000		18 Dic.2000		27 Nov. 2000		6 Dic. 2000		11 Dic. 2000
	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº
1	2	0.5											
2	2	1.1											
3	2	0.6											
4	2	0.6											
5*													
6	2	0.6	4	1.1	5	1.8	5	2.7					
7	1	0.8	6	1.3	7	2.0	9	2.3					
8	2	0.7	3	1.7	5	3.1	6	3.9					
9	1	0.4	1	0.7	2	1.5	2	2.3					
10	2	0.6	2	0.8	2	1.1	5	1.7					
11	2	0.4	2	1.2	2	1.3	3	2.3					
12	2	0.5	2	0.9	3	1.7	4	2.6					
13	2	0.3	2	1.3	5	1.6	6	1.8					
14	2	0.7	2	1.8	5	2.1	6	2.5					
15	3	0.8	6	1.6	7	2.5	9	2.9					
16	1	0.5	1	1.6	4	1.8	5	2.4					
17	2	0.8	3	1.2	6	1.8	8	2.1					
18	1	0.4	1	1.6	2	2.8	3	4.0					
19	2	0.4	2	1.2	7	1.7	9	2.4					
20*													

* Explantes se retiraron antes de su primera medición por encontrarse contaminadas con hongo y/o bacteria.

ANEXO 69. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 8 (0.2 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de toronjil.

Expl.	Callo				Vitrificación				Senescencia				O
	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	
1	☐								☐				
2	☐				☐								
3	☐				☐				☐				
4	☐				☐								
5	☐												
6	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐		☐		☐	
7	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐		☐		
8	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐		☐		☐	
9	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
10	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐	
11	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐		☐		
12	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐				
13	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐	
14	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐		☐	
15	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐			☐	☐	
16	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐			☐	☐	
17	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐		
18	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐		☐		☐	
19		☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
20													

ANEXO 70. Medición de los parámetros número y longitud de brotes y raíces para el tratamiento 9 (0.2 mg/L ANA y 2.0 mg/L BAP) de toronjil.

Expl.	Brotos								Raíces				
	27 Nov. 2000		6 Dic. 2000		11 Dic. 2000		18 Dic.2000		27 Nov. 2000		6 Dic. 2000		11 Dic. 2000
	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº	Long.	Nº
1	1	0.8											
2	1	0.4	1	1.4	3	1.8	4	2.0					
3	2	0.3	3	1.2	5	2.0	6	2.5					
4	2	0.4	3	1.0	3	1.3	4	1.4					
5	2	0.6	4	1.2	4	1.9	4	3.3					
6	2	0.7	3	1.5	4	2.3	6	3.2					
7			2	0.8	3	1.1	6	2.0					
8	2	0.4	4	0.8	6	1.1	7	1.6					
9	1	0.3	2	0.6	3	1.3	3	1.5					
10			1	0.2	2	0.6	3	0.9					
11	2	0.3	3	0.6	6	0.8	7	1.5					
12	4	0.3	6	0.6	7	1.1	8	1.5					
13	2	0.6	4	0.8	5	1.2	6	1.4					
14	1	0.2	1	0.3	1	0.5	1	0.7					
15	2	0.5	2	0.9	4	1.1	5	1.4					2
16	2	0.3	4	0.7	6	1.2	7	1.4					
17	1	0.4	3	1.2	5	1.4	7	1.8					
18	2	0.6	2	2.4	3	3.0	5	5.6					
19*													
20*													

* Explantes se retiraron antes de su primera medición por encontrarse contaminadas con hongo y/o bacteria.

ANEXO 71. Medición de los parámetros de callo, vitrificación, senescencia y contaminación para el tratamiento 9 (0.2 mg/L ANA y 2.0 mg/L BAP) de toronjil.

Expl.	Callo				Vitrificación				Senescencia				O
	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	27 Nov	6 Dic	11 Dic	18 Dic	
1	☐				☐								☐
2	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
3	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
4	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
5	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
6	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
7	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐				
8	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐		☐	☐		
9	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
10	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
11	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐			☐		
12	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐		☐			
13	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐			☐	
14		☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
15	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐	
16	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
17	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐					
18		☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐			☐	
19													
20													

ANEXO 72. Medición de los parámetros evaluados para explantes provenientes de segmentos nodales en cedrón.

Expl.	Brotes		Raíces		Callo	Vitrific.	Senesc.	Contam.
	Nº	Long.	Nº	Long.				
1	3	1.3			☐		☐	
2	3	1.4			☐		☐	
3	1	1.3	3	0.9	☐	☐	☐	
4	1	1.4	2	1.2	☐		☐	☐
5	1	0.6			☐		☐	
6	3	2.7	2	3.1	☐		☐	
7	1	1.0			☐		☐	☐
8	1	2.7			☐			
9	5	2.2			☐	☐		
10	1	1.3	3	1.2	☐			
11	1	1.8	4	2.1	☐			
12	2	0.6			☐		☐	
13	1	0.9			☐		☐	☐
14	1	2.4	5	0.7	☐		☐	
15	1	0.5			☐		☐	☐
16	3	2.3	1	2.2	☐			
17	1	1.5	3	1.2	☐		☐	☐
18	3	1.8	5	1.1	☐	☐		
19	1	0.6			☐		☐	
20	3	1.6	4	1.2	☐			
21	3	1.3			☐			
22	2	0.4			☐	☐		
23	3	1.6			☐	☐		
24	2	1.5	3	1.2	☐	☐		
25	2	0.8	1	0.8	☐	☐	☐	
26	4	4.2			☐	☐	☐	☐
27	4	5.8			☐		☐	
28	3	1.2	1	2.4	☐	☐		
29	3	3.4	1	1.8	☐	☐	☐	
30	1	0.4	1	0.2	☐	☐	☐	☐
31	1	0.7	6	0.7	☐	☐	☐	☐
32	3	1.6			☐	☐	☐	☐
33	1	0.4	2	1.4	☐	☐	☐	☐
34	4	1.2	1	1.3	☐	☐	☐	☐
35	4	1.4			☐	☐	☐	☐
36	4	0.8	1	0.7	☐	☐	☐	☐
37	1	0.6			☐	☐	☐	☐
38	2	0.5			☐		☐	☐
39	1	2.0			☐	☐	☐	☐
40					☐		☐	☐

☐ = Presencia del parámetro medido.

ANEXO 73. Medición de los parámetros evaluados para explantes provenientes de ápices en cedrón.

Expl.	Brotes		Raíces		Callo	Vitrific.	Senesc.	Contam.
	Nº	Long.	Nº	Long.				
1	2	0.5			☐	☐	☐	☐
2	1	0.3	1	0.3	☐	☐		
3	1	3.2	1	0.4	☐		☐	
4	2	2.5			☐	☐		☐
5	2	1.7			☐	☐	☐	☐
6	2	2.3	2	0.8	☐	☐	☐	☐
7	1	0.6			☐		☐	☐
8	1	0.6	1	0.5	☐		☐	
9	3	1.1			☐		☐	☐
10					☐			
11	5	3.4			☐	☐		
12	3	1.9	1	0.7	☐		☐	
13	3	1.2	1	0.1	☐	☐		
14	3	3.8			☐	☐		☐
15	2	1.4			☐	☐		
16	2	1.1	1	0.3	☐		☐	
17	2	0.4	2	0.2	☐	☐		
18	4	2.3			☐	☐	☐	
19	3	0.8			☐	☐	☐	
20	2	1.4			☐		☐	☐
21	2	0.7			☐	☐		
22	4	1.9			☐	☐	☐	
23	4	0.6			☐	☐	☐	
24					☐		☐	
25	3	3.3			☐	☐	☐	☐
26	1	4.9	2	0.4	☐			
27	4	1.8			☐		☐	☐
28	4	1.0			☐	☐		
29	3	4.8			☐	☐		
30	1	2.3	2	1.4	☐		☐	
31	4	2.0	2	1.5	☐	☐	☐	☐
32	3	1.3	1	0.7	☐	☐	☐	☐
33	3	4.3	1	0.9	☐	☐	☐	
34	2	2.0	1	0.7	☐			
35			1	1.5	☐			
36	1	4.1	1	0.7	☐	☐	☐	
37	7	2.9			☐		☐	
38	3	5.4			☐		☐	☐
39					☐		☐	
40	2	0.8			☐	☐	☐	☐
41	5	0.5			☐	☐	☐	☐
42	1	0.2	2	1.1	☐		☐	☐
43	3	2.1	1	1.0	☐	☐		☐

Cultivo in vitro de ruda (*Ruta graveolens* L.), toronjil (*Melissa officinalis* L.) y cedrón (*Aloysia tryphilla* (L`Hér.) Britton)

☐ = Presencia del parámetro medido.

Expl.	Brotos		Raíces		Callo	Vitrific.	Senesc.	Contam.
	Nº	Long.	Nº	Long.				
44	1	0.1	1	1.5	☐		☐	☐
45	2	0.7	1	2.0	☐	☐	☐	☐
46	4	2.0			☐	☐	☐	☐
47	2	0.3			☐	☐	☐	☐
48	3	1.7			☐	☐		☐
49	2	0.2			☐	☐	☐	☐
50	3	0.4			☐	☐		☐
51	3	2.6			☐		☐	☐
52	2	1.2	2	2.5	☐	☐	☐	☐
53	3	2.5			☐	☐		☐
54	3	2.8			☐	☐	☐	☐
55	2	0.4			☐	☐	☐	☐
56	1	0.3			☐	☐		☐
57					☐			☐
58	3	1.1			☐	☐	☐	☐
59	3	0.3	1	0.6	☐			☐
60	2	0.4				☐		☐
61	2	2.1	1	1.1	☐			☐
62	2	1.8	2	1.1	☐	☐	☐	☐
63	3	0.9			☐		☐	☐
64	3	2.3			☐	☐	☐	☐
65	1	0.3			☐	☐	☐	☐
66	3	0.2			☐		☐	☐
67	3	2.0			☐		☐	☐
68	2	2.4	1	1.3	☐	☐		☐
69	1	1.0	2	1.4	☐	☐		☐
70	2	2.3	3	1.4	☐	☐	☐	☐

☐ = Presencia del parámetro medido.