

IX. ANEXOS

Anexo 1

Cuadro 1. Composición de Medios de Cultivo de Tejidos (mg/l)

<i>Componentes</i>	<i>Murashige & Skoog (MS 1962)</i>	<i>Woody Plant Medium WPM (1980)</i>	<i>Schenk and Hildebrandt (1972)</i>
M A C R O N U T R I E N T E S			
NH ₄ NO ₃	1650	400	-
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	300
CaCl ₂ .2H ₂ O	332.2	96	151
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	556	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370	400
KNO ₃	1900	-	2500
K ₂ SO ₄	-	990	-
KH ₂ PO ₄	170	170	-
M I C R O N U T R I E N T E S			
HBO ₃	6.2	6.2	5
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	-	0.1
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.25	0.2
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	20.1
FeSO ₂ .7H ₂ O	27.8	27.8	15
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9	22.3	10.0
KI	0.83	-	0.1
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	0.1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	8.6	1.0
O R G A N I C O S			
Myo-inositol	100	100	1000
Glycine	2.0	2.0	-
AcidoNicotínico	0.5	0.5	5.0
Pyridoxina	0.5	0.5	0.5
Tiamina	0.1	1.0	5.0

Anexo 2. Desinfección de los explantes

Dada la estructura de los tratamientos se utilizó un Diseño Completamente Aleatorizado, con 34 tratamientos y 3 repeticiones en una unidad experimental de 4 explantes, haciendo un total de 408 explantes.

i). El modelo matemático fue: $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$

Donde Y_{ij} = variable de respuesta

μ = media general

τ_i = i-ésimo tratamiento $i = T_1, T_2, T_3, \dots, T_{34}$

ϵ_{ij} = error experimental del i-ésimo tratamiento en la j-ésima observación

ii). El análisis realizado consistió en:

- ANDEVA para comparar las medias de tratamientos. Se corrió el programa SAS con la siguiente sintaxis: Proc glm;

Classes trat;

Model y=trat;

- CONTRASTES ORTOGONALES. Para hacer comparaciones entre grupos de tratamientos. Utilizamos la instrucción contrast en el procedimiento GLM.

iii). Los resultados obtenidos muestran que:

Analisis de Variancia

Cuadro 1. ANDEVA para tratamientos de desinfección de explantes nodales con diferentes productos

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Trat	33	7.71	0.23	2.95	0.0001
Error	68	539	0.079		
Total	101	13.11			

El análisis de variancia indica que hay diferencia altamente significativa entre las medias de los tratamientos ($P < 0.0001$).

Cuadro 2. Prueba de Rangos Múltiples de Duncan para el ensayo de desinfección de explantes nodales de Caoba. Alpha 5% .

TRATAMIENTO	MEDIA (%)
6	66.67 A
16	58.33 AB
1	50.0 ABC
3	50.0 ABC
18	50.0 ABC
5	41.67 ABCD
30	41.67 ABCD
11	33.33 ABCDE
9	33.33 ABCDE
8	33.33 ABCDE
13	33.33 ABCDE
10	33.33 ABCDE
17	33.33 ABCDE
2	33.33 ABCDE
7	25.0 BCDE
12	25.0 BCDE
15	25.0 BCDE
19	25.0 BCDE
29	25.0 BCDE
31	25.0 BCDE
34	16.67 CDE
27	16.67 CDE

4	8.33	DE
20	8.33	DE
32	8.33	DE
22	8.33	DE
25	8.33	DE
28	8.33	DE
21	8.33	DE
14	8.33	DE
23	0.00	E
24	0.00	E
33	0.00	E
26	0.00	E

Cuadro 3. Contrastes para grupos de Tratamientos de Desinfección.

Contrastes	GL	SC	CM	Valor de F	Prob> F
HPC vs HPN	1	0.43421829	0.43421829	5.48	0.0222 *
HPC vs H ₂ O ₂	1	2.56100173	2.56100173	32.30	< 0.0001**
HPN vs H ₂ O ₂	1	0.97477574	0.97477574	12.29	0.0008 **
6 vs Dentro	1	0.58486545	0.58486545	7.38	0.0084 **
16 vs Dentro	1	0.54277286	0.54277286	6.85	0.0109 *
6 vs 16	1	0.04569261	0.04569261	0.58	0.4504 ns
6 vs 1	1	0.10280838	0.10280838	1.30	0.2588 ns
6 vs 18	1	0.10280838	0.10280838	1.30	0.2588 ns

Cuadro 4. Formulario de evaluación de incidencia de contaminantes en explantes nodales de Caoba.

Fecha de estab.:

No. de tratamientos : 34

Diseño: DCA

Unidad experim. : 4 exp.

Rep. : 3

Total explantes : 408 exp.

Evaluación de explantes de Caoba por diferentes contaminantes.

F. de estab : 1ro/Marzo/2001

A los 5 días

Trat	R 1					R 2					R 3				
	1	2	3	4	% S	1	2	3	4	% S	1	2	3	4	% S
1	H	B	H	F		S	S	H	B		S	S	S	M	
2															
3															
4															
5															
6															
7															
8															
9															
10															
11															
12															
13															
14															
15															
16															
17															
18															
19															
20															
21															
22															
23															
24															
25															
26															
27															
28															
29															
30															
31															
32															
33															
34															

H = Hongos; B = Bacterias; F = Fenoles; S = Sanos ; M = muerto ; R = reiteraciones ; * = con brote

Cuadro 5. Estructura de tratamiento para el ensayo de desinfección de explantes nodales de Caoba.

Producto	Tipo de desinfección	Concentración (%)	Tiempo (min)	Vacío	Tratamientos
Hipoclorito de Calcio	Doble	10 y 8	20 y 15	Si	T1
				No	T2
	Simple	10 y 8	30 y 20	Si	T3
				No	T4
		10	20	Si	T5
				No	T6
		30	20	Si	T7
				No	T8
		40	20	Si	T9
				No	T10
Hipoclorito de Sodio	Simple	25	15	Si	T11
				No	T12
		25	15	Si	T13
				No	T14
		50	15	Si	T15
				No	T16
		25	15	Si	T17
				No	T18
		75	15	Si	T19
				No	T20
		25	15	Si	T21
				No	T22
Peróxido de Hidrógeno	Simple	25	15	Si	T23
				No	T24
		25	15	Si	T25
				No	T26
		50	15	Si	T27
				No	T28
		25	15	Si	T29
				No	T30
		75	15	Si	T31
				No	T32
		25	15	Si	T33
				No	T34

Cuadro 6. ANDEVA para prueba de adición de Antibióticos al medio de cultivo, para explantes nodales de Caoba.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	Valor de F	Pro>F
Trat	3	11680.00	3893.33	7.08	0.0030 *
Error	16	8800.000	550.000		
Total	19	20480.00			

Cuadro 7. Prueba Rangos Mult. de Tukey para el ensayo de adición de Antibióticos al medio de cultivo. α 5%

TRATAMIENTO	MEDIAS
3	68.00 A
1	64.00 A
2	36.00 AB
4	08.00 B

Anexo 3. Influencia de Sales Inorgánicas en el Medio de Cultivo

Los tres medios de cultivo (MS, WPM y SH), fueron distribuidos en un Diseño Completamente Aleatorizado con un arreglo factorial de tratamientos de 3 x 4 con 4 repeticiones, la unidad experimental consta de 8 explantes.

i). El modelo matemático es: $Y_{ijk} = \mu + M_i + C_j + MC_{ij} + \epsilon_{ijk}$

Donde Y_{ijk} es la variable de respuesta

M_i = i-ésimo medio de cultivo, con $i=1,2,3$.

C_j = j-ésima concentración, con $j=1,2,3,4$.

$K=1,2,3,4$ repeticiones.

ii). El análisis se realizó:

- ANDEVA, para observar efectos principales y la interacción entre medias de tratamientos.
- Prueba Duncan
- LSMeans (Prueba de T) para calcular interacciones.

iii). Los resultados muestran ...

Cuadro 1. ANDEVA para el ensayo con sales minerales. Var. **Número de brote.**

Fuente	GL	SC	CM	F	Prob ? F
Sales	2	0.51819962	0.25909981	3.05	0.0796
Conc.	1	0.08905158	0.08905158	1.05	0.3234
Sales x Conc.	2	0.75379472	0.0322	4.43	0.0322 *

Para la variable, número de brote, se encontró diferencia significativa en la interacción entre niveles y medios de cultivo ($Pr?0,0322$).

Cuadro 2. ANDEVA para el ensayo con sales minerales. Var. **Longitud de brote.**

Fuente	GL	SC	CM	F	Prob ? F
Sales	2	0.12115315	0.06057657	1.36	0.2882
Conc.	1	0.37127873	0.37127873	8.34	0.0119*
Sales x Conc.	2	0.14402856	0.07201428	1.62	0.2332

Para la variable altura de brote, se encontró diferencia significativa entre niveles ($Prob ? 0.0119$)

Cuadro 3. Prueba Duncan para el Factor sales minerales a un alfa 5%.

Fuente de Variación	Número de brotes (prom.)	Longitud de brotes (cm)
SH	1.4929 a	1.0991 a
MS	1.4267 a	1.0548 a
WPM	1.0690 b	0.9465 a

Medias con la misma letras no son significativamente diferentes.

Cuadro 4. Prueba LSMeans (Prueba de t) calculo de interacciones/combinaciones para el ensayo con diferentes Sales Minerales.

Interacciones	Número de brote (Prob)	Altura de brote (Prob)
SH 100 – WPM 50	0.0020 **	0.0299*
MS 100 – SH 100	0.0308*	ns
SH 50 – SH 100	0.0150*	ns
SH 100 – WPM 100	0.0400	ns

Cuadro 5. Medias ajustadas de la Prueba LSMeans para las Sales inorgánicas y sus diferentes niveles.

SALES	NIVEL	NUMERO DE BROTE	ERROR STANDAR	ALTURA DE BROTE	ERROR ESTÁNDAR
MS	50	1.6094	0.1683	0.9232	0.1217
MS	100	1.2440	0.1683	0.9697	0.1217
SH	50	1.2071	0.1457	0.9477	0.1054
SH	100	1.7785	0.1457	1.2504	0.1054
WPM	50	1.0000	0.1457	0.8899	0.1054
WPM	100	1.2071	0.2061	0.9900	0.1491

Anexo 4. Influencia de la concentración de sacarosa

Se estableció un Diseño Completamente Aleatorizado con 6 tratamientos y 5 repeticiones donde la unidad experimental son 5 explantes.

i). El modelo matemático es de: $Y_{ij} = \mu + C_i + \epsilon_{ij}$

Donde Y_{ij} es la variable de respuesta

μ = media general

C_i = i-ésimo nivel de sacarosa con $i=1,1.5,2,3,4,5$

ϵ_{ij} = error experimental del i-ésimo tratamiento en la j-ésima observación.

ii). El análisis se realizó mediante:

- ANDEVA, para comparar las medias de tratamientos
- Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey

iii). Los resultados obtenidos muestran ...

Cuadro 1. ANDEVA para la variable *Longitud de brote* del ensayo con Niveles de Sacarosa

Fuente de Variación	GL	SC	CM	Valor de F	Pr > F
Trat	5	1.0755	0.2151	1.71	0.1696 ns
Error	24	3.0108	0.1254		
Total	29	4.0863			

Cuadro 2. ANDEVA para la variable *Altura de ápice* del ensayo con Niveles de Sacarosa

Fuente de Variación	GL	SC	CM	Valor de F	Pr > F
Trat	5	0.2109	0.4221	2.37	0.0697 ns
Error	24	0.4262	0.0177		
Total	29	0.6368			

Cuadro 3. Prueba de Tukey para la variable *Número de brote* del ensayo con Niveles de Sacarosa

Tratamientos	Medias
2	2.800 A
5	2.800 A
6	2.800 A
3	2.400 A
4	2.400 A
1	2.200 A

Cuadro 4. Prueba de Tukey para la variable *Longitud de brote* del ensayo con Niveles de Sacarosa

Tratamientos	Medias
2	1.1780 A
3	1.1100 A
6	1.0240 A
5	0.8760 A
4	0.7280 A
1	0.6680 A

Cuadro 5. Prueba de Tukey para la variable Altura de ápice del ensayo con Niveles de Sacarosa

Tratamientos	Medias
6	0.2720 A
2	0.2100 AB
5	0.1480 AB
4	0.1100 AB
3	0.0960 AB
1	0.0100 B

Anexo 5. Influencia de los Reguladores de Crecimiento.

Para el análisis de la relación Auxina-Citocinina, se planteó un Diseño Completamente Aleatorizado con arreglo factorial 4 x 4, con 3 repeticiones y 4 explantes como unidad experimental.

i). El modelo matemático es de: $Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + AB_{IJ} + \epsilon_{ijk}$

Donde Y_{ijk} es la variable de respuesta

A_i = i-ésimo nivel de 2-ip, con $i=1.23, 2.46, 4.92, 7.38$

B_j = j-ésimo nivel de AIB, con $j=1.23, 2.46, 4.92, 7.38$

ii). El análisis que se realizó es:

- ANDEVA, para observar efectos principales y la interacción entre medias de tratamientos
- Prueba de Comparaciones Múltiples de Duncan.

iii). Los resultados muestran que ...

Cuadro 1. ANDEVA para la var. **Número de brote** en el ensayo Reg. de Crec. para explantes nodales de Caoba.

Fuente de Variación	de	GL	SC	CM	Valor de F	Prob > F
Niveles de 2-ip		3	0.06250000	0.02083333	0.05	0.9849
Niveles de AIB		3	3.56250000	1.18750000	2.85	0.0528
2-ip x AIB		9	2.85416667	0.31712963	0.76	0.6520

Cuadro 2. ANDEVA para la var. **longitud de brote** en el ensayo Reg. de Crec. para explantes nodales de Caoba.

Fuente de Variación	de	GL	SC	CM	Valor de F	Prob > F
Niveles de 2-ip		3	0.07464167	0.02488056	0.34	0.7976
Niveles de AIB		3	0.09729167	0.03243056	0.44	0.7252
2-ip x AIB		9	0.61319167	0.06813241	0.93	0.5155

Cuadro 3. ANDEVA para la var. **Altura de ápice** en el ensayo Reg. de Crec. para explantes nodales de Caoba.

Fuente de Variación	de	GL	SC	CM	Valor de F	Prob > F
---------------------	----	----	----	----	------------	----------

Variación					
Niveles de 2-ip	3	0.01411667	0.00470556	1.12	0.3552
Niveles de AIB	3	0.00771667	0.00257222	0.61	0.6117
2-ip x AIB	9	0.02580000	0.00286667	0.68	0.7185

Cuadro 4. Prueba Duncan para la variable **Número de brotes** del **Factor 2-ip** en el ensayo con Reg. de Crecimiento para explantes nodales de Caoba. A un alpha 5%.

Niveles	Descripción(mg/l)	Medias
3	1.0	3.5 a
2	0.5	3.41 a
1	0.0	3.41 a
4	2.0	3.41 a

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 5. Prueba Duncan para la variable **longitud de brote** del **Factor 2-ip** en el ensayo con Reg. de Crecimiento para explantes nodales de Caoba. Alfa 5%

Niveles	Descripción(mg/l)	Medias
4	2.0	1.15 a
2	0.5	1.0958 a
3	1.0	1.0800 a
1	0.0	1.0450 a

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

Cuadro 6. Prueba Duncan para la variable **Altura de ápice** del **Factor 2-ip** en el ensayo con Reg. de Crecimiento para explantes nodales de Caoba. Alfa 5%

Niveles	Descripción(mg/l)	Medias
3	1.0	0.19083 a
4	2.0	0.17250 a
2	0.5	0.15167 a
1	0.0	0.14833 a

Cuadro 7. Prueba Duncan para la variable **Número de brote** del **Factor AIB** en el ensayo con Reg. de Crecimiento para explantes nodales de Caoba. Alfa 5%

Niveles	Descripción(mg/l)	Medias
2	0.5	3.8333 a
1	0.0	3.5000 ab
3	1.0	3.3333 ab
4	2.0	3.0833 b

Cuadro 8. Prueba Duncan para la variable **longitud de brote** del **Factor AIB** en el ensayo con Reg. de Crecimiento para explantes nodales de Caoba. Alfa 5%

Niveles	Descripción(mg/l)	Medias
2	0.5	1.1500 a
1	0.0	1.1250 a
3	1.0	1.0583 a
4	2.0	1.0417 a

Cuadro 9. Prueba Duncan para la variable **Altura de ápice** del **Factor AIB** en el ensayo con Reg. de Crecimiento para explantes nodales de Caoba. Alfa 5%

Niveles	Descripción(mg/l)	Medias
2	0.5	0.17833 a

1	0.0	0.17750 a
4	2.0	0.15917 a
3	1.0	0.14833 a

Cuadro 10. Prueba Duncan (5%) para determinar el nivel óptimo de niveles de Auxina-Citocinina.

TRATAMIENTOS	MEDIAS (cm)	DESCRIPCIÓN
7	0.24333 A	1.0 2-ip + 0.5 AIB
4	0.21000 A	2.0 + 0.0
8	0.19667 A	2.0 + 0.5
1	0.19000 A	0.0 + 0.0
15	0.18000 A	1.0 + 2.0
11	0.17333 A	1.0 + 1.0
3	0.16667 A	1.0 + 0.0
13	0.16000 A	0.0 + 2.0
6	0.15667 A	0.5 + 0.5
10	0.15667 A	0.5 + 1.0
14	0.15000 A	0.5 + 2.0
16	0.14667 A	2.0 + 2.0
2	0.14333 A	0.5 + 0.0
12	0.13667 A	2.0 + 1.0
9	0.12667 A	0.0 + 1.0
5	0.11667 A	0.0 + 0.5

Anexo 6. Niveles de Citocininas

Se estableció un Diseño Completamente Aleatorizado con arreglo factorial de 3 x 4 con 3 repeticiones y 3 explantes como unidad experimental.

i). El modelo matemático fue: $Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \epsilon_{ijk}$

Donde Y_{ijk} es la variable de respuesta

A_i = i-ésimo citocinina, con $i=2$ -ip, BAP, Kinetina

B_j = j-ésimo nivel de citocinina, con $j=2,2, 4,4, 8,8, 17,6$ uM.

ii). El análisis fue mediante:

- ANDEVA, para observar efectos principales y la interacción entre medias de tratamientos.
- POLINOMIOS ORTOGONALES, para estudiar el comportamiento de los trat. Cuantitativos.
- COMPARACIONES MULTIPLES, utilizando la prueba TUKEY.

iii). Los resultados muestran ...

Cuadro 1. ANDEVA para la variable Número de brotes por explante en el ensayo con Niveles de Citocinina.

FUENTE DE VARIACION	GL	SC	CM	Valor de F	Prob>F
Trat	11	10.55138889	0.959221717	3.64	0.0039 **
Error	24	6.32666667	0.26361111		
Total	35	16.87805556			

Cuadro 2. Prueba de comparaciones Múltiples de TUKEY. Alfa 5% para el ensayo con niveles de citocininas

TRATAMIENTO	MEDIA
5	2.3333 A
8	1.9333 AB
6	1.8667 AB
7	1.6667 AB
3	1.2667 AB
1	1.1000 AB
9	1.1000 AB
11	1.0000 AB
12	0.9000 AB
2	0.8667 AB
10	0.6500 B
4	0.4833 B

Cuadro 3. Prueba de Rangos Múltiples de Tukey para la variable Número de brotes/explante del factor Citocinina. Alfa 5%

Citocinina	Media
BAP	1.9500 A
2-IP	0.9292 B
KINETINA	0.9125 B

Cuadro 4. Prueba de Rangos Múltiples de Tukey para la variable Número de brotes/explante del factor Niveles. Alfa 5%

NIVELES	Media
0.5	1.5111 A
2.0	1.3111 A
1.0	1.1278 A
4.0	1.1056 A

Anexo 7. Productos utilizados

Cuadro 1. Productos utilizados en el desarrollo de los diferentes experimentos.

producto	Descripción
----------	-------------

Desinfección de explantes.	
- Hipoclorito de Calcio[Ca(OCL) ₂]	Granular.Con 65 de i.a. Se utilizó al 10% de concentración solubilizados en agua y agitados por 15 minutos, luego filtrados con papel.
- Hipoclorito de Sodio (NaOCl)	Se tomó de un blanqueador comercial “Los conejos” a concentraciones de 25, 50 y 75% (v/v) de su concentración original (3.5% de i.a.)
- Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂)	Se utilizó de una solución con 30 Vol. de concentración, a 25, 50 y 75% v/v de su concentración original.
Antibióticos	
- Agry-micin16,5 WP	bactericida, antibiótico, oxitetracilina. Producto comercial compuesto por Estreptomicina (Sulfato) 15%, Terramicina (oxitetracilina) 1,5% é ingredientes inertes 83,5%. Contiene 165 g de i.a./kg. de prod. comercial.
- Sulfato de Estreptomicina	producto de SIGMA CHEMICAL CO. USA. Cell Culture Tested.
- Sulfato de Gentamicina	producto de SIGMA CHEMICAL CO. USA. Cell Culture Tested
Sales minerales	
- MS solución stock	Macronutrientes a conc. 50 ml/l, Micronutrientes 5 ml/l y vit. 5 ml/l.
- WPM solución stock	Macro a conc. de 50 ml/l, Micro 5 ml/l y Vit. 5 ml/l.
- SH solución stock	Macro 50 ml/l y Micro 5 ml/l y Vit. 100 ml/l.
Reguladores de Crecimiento	
2-ip AIB Kinetina BAP	Los Reguladores de Crecimiento se obtuvieron de soluciones stock preparados a una concentración 1:1.
Gelificante	
agar-agar	de SIGMA CHEMICAL CO. USA