

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS Y AMBIENTALES

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a large, circular emblem in the background. It features a central shield with a figure on horseback, surrounded by various heraldic symbols like castles, a lion, and a crown. The Latin motto "LETTERAS ORBIS CONSPICUA CAROLINA ACCADEMIA COACTEMALENSIS INTER" is inscribed around the perimeter of the seal.

EVALUACIÓN DE PROCEDIMIENTOS DE DESINFECCIÓN DE EXPLANTE DE HOJA Y MEDIOS DE CULTIVO PARA LA INDUCCIÓN DE ORGANOGÉNESIS Y DE CALLO EN VALERIANA (*Valeriana prionophylla* Standl).

GUATEMALA, MARZO 2019

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS Y AMBIENTALES

TESIS

EVALUACIÓN DE PROCEDIMIENTOS DE DESINFECCIÓN DE EXPLANTE DE HOJA Y MEDIOS
DE CULTIVO PARA LA INDUCCIÓN DE ORGANOGÉNESIS Y DE CALLO EN VALERIANA

(*Valeriana prionophylla* Standl).

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA DE
LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

KARLA LIZBETH CHINCHILLA PADILLA

En el acto de investidura como

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE

LICENCIADO

GUATEMALA, MARZO 2019

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

RECTOR

Ing. M.Sc. Murphy Olympto Paiz Recinos

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	Ing. Agr. Mario Antonio Godínez López
VOCAL I	Dr. Tomás Antonio Padilla Cámara
VOCAL II	Dra. Lily Gricelda Gutiérrez Álvarez
VOCAL III	Ing. Agr. M.A. Jorge Mario Cabrera Madrid
VOCAL IV	P. Elec. Carlos Waldermar de León Samayoa
VOCAL V	P. Agr. Marvin Orlando Sicajaú Pec
SECRETARIO	Ing. Agr. Juan Alberto Herrera Ardón

Guatemala, marzo de 2019

**Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala
Presente**

Honorables miembros:

De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración el trabajo de Graduación titulado:

**EVALUACIÓN DE PROCEDIMIENTOS DE DESINFECCIÓN DE EXPLANTE DE HOJA Y
MEDIOS DE CULTIVO PARA LA INDUCCIÓN DE ORGANOGÉNESIS Y DE CALLO EN
VALERIANA (*Valeriana prionophylla* Standl).**

Como requisito previo a optar el Título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

Esperando que el mismo llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato suscribirme.

Atentamente,

KARLA LIZBETH CHINCHILLA PADILLA

ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS: Por ser mi Josué 1:9, Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo.

MI PAPÁ: Cesar Chinchilla, te admiro por tu ejemplo de responsabilidad de confianza de paciencia por tu gran amor, hoy agradezco tu gran esfuerzo y la confianza que mantuviste en mí, por enseñarme a soñar junto a ti por desear y anhelar lo mejor para mi vida hoy estamos haciendo realidad uno de nuestros sueños te dedico mis éxitos y victorias te amo papá.

MI MAMÁ: Iliana de Chinchilla, por ser mi mejor amiga gracias por levantarme el ánimo en los momentos difíciles de mi vida estudiantil y personal y no dejarme desmayar en el camino gracias por esas palabras sabias que siempre tienes en mis momentos de enojos de tristezas de felicidad, gracias por mostrarme que las cosas se deben hacer con amor, paciencia, dedicación, perseverancia, disciplina y esfuerzo gracias mami por ayudarme alcanzar un sueño más y ser cada día mejor.

MI HERMANA: Fernanda Raquel por ser mi ángel enviado por Dios en el preciso momento para ser mi amiga, mi compañera, la persona que me enseña a ser mejor en cada escalón por motivarme a creer en mí y no dejarme caer.

Mishelita, hermanita cuando miro las estrellas pienso en ti sigues llenando mi vida con tus recuerdos.

POR LOS QUE NO ESTAN: Mamita Raquel López, por ser mi segunda madre, ya no está presente pero a ti te debo gran parte de mis logros me enseñaste hacer las cosas con fe tomada de la mano de Dios, con tu gran amor y sabios consejos me enseñaste a luchar por mis sueños gracias a ti he logrado alcanzar la meta que tanto soñaste, gracias por ayudarme a ser una excelente persona.

Abuelito Pablo, gracias por tus sabios consejos tengo grabado en mi mente y corazón cada aventura, cada sonrisa, las historias y los abrazos.

MI ABUELITA: Gracias abuelita Mina por tu tiempo, paciencia y amor, has compartido conmigo todos los valores que te hacen tan especial y que me ayudan a creer como persona.

MIS TÍOS (AS): Por el ánimo, el apoyo y el amor que me brindaron a pesar de la distancia.

MIS PRIMOS: Elvis, Deisy y Adelky Padilla por sus oraciones, por sus palabras de aliento y por motivarme cuando yo no podía seguir, gracias por esas llamadas inesperadas y por su gran amor.

MINISTERIO DE LOS FRÁGILES: Licda. Thelma Cajas, Bryan y Dany Cajas, Carlos Arenales, hermanos Mario y David Castañón, Jose Miguel Del Vecchio, gracias por su amistad es algo muy valioso para mí, estoy agradecida con Dios por haberlos puesto en mi camino, gracias por sus oraciones, por sus alegrías y por su amor y su entusiasmo.

MAESTRAS DE PRIMARIA: Evelyn Rivas de Urizar y Lizbeth de Del Valle, agradezco las enseñanzas brindadas, por todo el apoyo durante mis estudios, gracias por esas palabras de aliento por estar siempre cerca de mi cuando sentía que no podía más, son dos ángeles especiales que han marcado mi vida.

MIS AMIGOS: Rocío Guzmán, Douglas Socoy, Fredy Cruz, Yasmin Veliz, Jairo Chali, Yadira Fuentes, Dillan Tepeu, Pablo Yancos, Alejandro Samayoa, Analucia Cano, Katy Godoy, Aby Morales, Irma González, Reyna Sinay, Carlos Tum, Abner Sagastume, Lety Pablo, Miguel Sandoval, Blanca Merida y Vander Sian, por los buenos momentos disfrutados durante mi ciclo universitario.

Maysa Santos, Marisol Monzón, Leslie de León y Karlita Cruz por la amistad tan duradera y linda que hemos compartido desde los básicos, las quiero mucho.

MIS PADRINOS Licda. en Pedagogía y Administración Educativa Iliana Padilla de Chinchilla

Ingeniero Agrónomo Gustavo Álvarez

Por darme el ejemplo por sus sabios consejos y por el apoyo en mi formación profesional.

TESIS QUE DEDICO

A:

GUATEMALA:

Por ser el país que me vio nacer y me ha dado la oportunidad de prepararme profesionalmente con todos sus bellos recursos.

USAC:

Por permitirme pertenecer a esta alma mater que me ha preparado profesionalmente. Orgullosamente san carlista.

FAUSAC:

Por haberme dado la oportunidad de formarme académicamente y ser egresada y pertenecer a la gloriosa Facultad de Agronomía.

AGRADECIMIENTOS

A:

MI ASESOR:

Inge. Agr. Edgar Franco, por su apoyo incondicional y conocimiento aportado durante el desarrollo de esta investigación.

MI SUPERVISOR:

Ing. Agr. Gustavo Álvarez, por haberme apoyado y por la confianza brindada durante toda formación y especialización durante mi formación académica, y permitirme continuar obteniendo más conocimientos.

Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales C-16

Por permitirme realizar la presente investigación.

EVALUACIÓN DE PROCEDIMIENTOS DE DESINFECCIÓN DE EXPLANTE DE HOJA Y MEDIOS DE CULTIVO PARA LA INDUCCIÓN DE ORGANOGÉNESIS Y DE CALLO EN VALERIANA (*Valeriana prionophylla* Standl).

EVALUATION OF PROCEDURES FOR LEAF EXPLANT DESINFECTION AND MEDIA EVALUATION FOR ORGANOGENESIS AND CALLUS INDUCTION IN VALERIANA (*Valeriana prionophylla* Standl).

RESUMEN

La flora de Guatemala es diversa, esta incluye plantas ornamentales, plantas comestibles y plantas medicinales, éstas últimas desde la antigüedad han sido usadas ya que contienen propiedades curativas y otras suelen ser terapéuticas, por eso personas que no tienen recursos para la compra de medicamentos utilizan estas plantas, una de ellas es *Valeriana prionophylla* Standl., la cual es una planta medicinal nativa de Guatemala, la que es extraída de su hábitat natural, lo cual está provocando la extinción de sus poblaciones. Con la finalidad de buscar alternativas para su propagación se evaluó la desinfección de hojas para ser utilizadas como explantes, se evaluaron medios de inducción de organogénesis y medios de inducción de callo en explantes de hoja

En el procedimiento de desinfección de hojas se realizaron diferentes tratamientos, se utilizó jabón antibacterial, hipoclorito de sodio comercial, benomyl, en algunos de ellos se incluyó tetraciclina, las hojas fueron sometidas a procesos de desinfección para conocer cuál de los tratamientos presentaba menos contaminación. El mejor tratamiento fue el lavado de hojas con jabón antibacterial, luego inmersión en una solución de benomyl por 30 min, seguida de tres lavados con agua estéril para eliminar restos de benomyl, luego inmersión en hipoclorito de sodio comercial al 10 % por 10 min retirando nuevamente los residuos de hipoclorito con tres lavados con agua estéril.

El rizoma de valeriana no pudo ser utilizado como explante debido que éste contiene exudados viscosos, los cuales producen alta oxidación además de dificultar la desinfección.

Se evaluaron hojas como explantes para inducir organogénesis, para ello se evaluaron los reguladores de crecimiento ANA y BAP, el primero en rango de concentraciones de 1 mg/l a 10 mg/l y el segundo en rango de concentraciones de 0.5 mg/l a 2 mg/l, en medio basal MS, no se observó organogénesis en los medios de inducción evaluados, las hojas permanecieron verdes y turgentes por 15 días luego se tornaron de color café hasta necrosarse completamente.

Se evaluó la inducción de callos en hojas de valeriana, se utilizó como medio basal MS y los reguladores del crecimiento 2, 4-D, solo o combinado con Kinetina o IBA. En los medios evaluados no se observó la formación de callo. De igual manera las hojas permanecieron turgentes y verdes por 15 a 30 días; cuando se utilizó 2,4-D solo o en combinación con Kinetina las hojas permanecieron turgentes y se tornaron de color café oscuro, cuando se utilizó IBA solo o combinación con 2,4-D las hojas después de 15 días perdieron brillo y mostraron áreas amarillas y verdes, posteriormente se necrosaron.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. MARCO CONCEPTUAL	3
2.1.1. Descripción botánica, morfológica y clasificación de valeriana	3
2.1.2. Distribución geográfica de valeriana.....	4
2.1.3. Hábitat de la especie <i>Valeriana Prionophylla</i> Standl.....	4
2.1.4. Usos medicinales de valeriana	4
2.1.5. Composición química de valeriana	5
2.1.6. Propagación de valeriana.....	5
A. Propagación por semilla	5
B. Propagación por rizomas	6
2.1.7. Micropropagación	6
A. Etapas de la micropropagación.....	6
B. Cultivo de tejidos vegetales.....	7
2.1.8. Tipos de cultivos de tejidos vegetales	7
A. Cultivo de meristemos.....	7
B. Cultivo de células	7
C. Cultivo de callos.....	7
D. Cultivos de protoplastos	8
E. Cultivo de anteras.....	8
F. Organogénesis	8
2.1.9. Tipos de medios de cultivo.....	10
A. Medio líquido	10
B. Medio sólido.....	10
2.1.10. Medio de cultivo.....	10
2.1.11. Componentes del medio de cultivo	10
A. Nutrientes inorgánicos.....	10
a. Macronutrientes.....	11
b. Micronutrientes	11

	Página
B. Complementos orgánicos	11
C. Vitaminas	11
D. Aminoácidos.....	11
E. Reguladores del crecimiento	12
F. Auxinas naturales	12
G. Auxinas sintéticas.....	12
H. Citoquininas	13
a. Citoquininas naturales	13
b. Citoquininas sintéticas.....	13
I. Ácido Giberélico	13
J. Substancias naturales.....	13
K. Materiales inertes	14
a. Agar.....	14
b. Carbón activado.....	14
c. Intercambio gaseoso.....	14
L. Condiciones de los cultivos in vitro.	15
a. Humedad	15
b. La luz.....	15
c. El pH	15
d. Fotomorfogénesis	15
e. Fotoperíodo	16
M. Diseño completamente al azar.....	16
a. Ventajas del diseño completamente al azar.....	16
b. Inconvenientes de diseño completamente al azar.....	16
c. Supuestos para validar análisis de varianza	17
N. Prueba de Kruskal-Wallis.....	17
O. Software para el análisis estadístico.....	18
a. Infostat.....	18
P. Plantas recalcitrantes al cultivo de tejidos.....	18
2.2. Marco referencial.....	21
2.2.1. Ubicación geográfica.....	21
2.2.2. Facilidades del laboratorio	21

	Página
2.2.3. Condiciones del laboratorio.....	21
2.2.4. Obtención de plantas de <i>Valeriana prionophylla Standl.</i>	22
2.2.5. Medio de cultivo MS (Murashige y Skoog).....	22
2.2.6. Uso de reguladores del crecimiento en la inducción de organogénesis	22
2.2.7. Uso de reguladores del crecimiento en la inducción de callo.....	23
2.2.8. Benomyl en desinfección de explantes	24
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo General.....	25
3.2. Objetivos Específicos	25
4. HIPÓTESIS.....	26
5. METODOLOGÍA	27
5.1. Metodología Experimental	27
5.1.1. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas de valeriana	27
A. Descripción de los tratamientos	27
B. Unidad experimental	29
C. Diseño experimental.....	29
D. Variables de respuesta.....	30
E. Análisis de datos.....	30
5.1.2. Inducción de organogénesis en rizoma de valeriana	30
A. Tratamientos.....	30
B. Unidad experimental para la evaluación de inducción de organogénesis en rizomas.	31
C. Diseño experimental.....	31
D. Variables de respuesta	31
5.1.3. Inducción de organogénesis en hojas	32
A) Tratamientos para inducir organogénesis en hojas de valeriana.	32
a) Tratamientos evaluados en el primer experimento.....	32
b) Tratamientos evaluados en el segundo experimento.....	33
c) Tratamientos evaluados en el tercero experimento	33
d) Tratamientos evaluados en el cuarto experimento	34
e) Tratamientos evaluados en el quinto experimento	34
f) Tratamientos del sexto experimento.....	35
g) Tratamientos del séptimo experimento	36

	Página
B) Unidad experimental	36
C) Diseño experimental.....	37
D) Variable de respuesta.	37
5.1.4. Inducción de callo en hojas de valeriana.....	37
A) Tratamientos evaluados en los experimentos de inducción de callo.	37
a) Tratamientos evaluados en el primer experimento.....	37
b) Tratamientos evaluados en el segundo experimento.....	38
c) Tratamientos evaluados en el tercer experimento	38
d) Tratamientos evaluados en el cuarto experimento	39
B) Unidad experimental	40
C) Diseño experimental.....	40
D) Variable de respuesta.	40
5.2. Manejo del experimento	41
5.2.1. Materiales y equipo	41
5.2.2. Área experimental	42
5.2.3. Condiciones del cultivo.....	42
5.2.4. Determinación de la planta.....	42
5.2.5. Colecta, cultivo y acondicionamiento de plantas	42
5.2.6. Medios de cultivos	43
5.2.7. Preparación de medios de cultivo.....	43
5.2.8. Preparación de la cámara de flujo laminar	44
5.2.9. Control de patógenos en las plantas de valeriana.....	44
5.2.10. Aplicación de benomyl al medio de cultivo	44
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
6.1. Procedimiento de desinfección de hojas	45
6.1.1. Inducción de organogénesis en rizoma de valeriana	48
6.2. Inducción de organogénesis en hojas de valeriana.	49
6.2.1. Resultados del primer experimento.....	49
6.2.2. Resultados del segundo experimento	49
6.2.3. Resultados del tercer experimento	49
6.2.4. Resultados del cuarto experimento.....	51
6.2.5. Resultados del quinto experimento	51

	Página
6.2.6. Resultados del sexto experimento	52
6.2.7. Resultados del séptimo experimento.....	54
6.3. Inducción de callo en hojas de valeriana	55
6.3.1. Resultados del primer experimento de inducción de callo	55
6.3.2. Resultados del segundo experimento de inducción de callo	55
6.3.3. Resultados del tercer experimento de inducción de callo	56
6.3.4. Resultados del cuarto experimento de inducción de callo.....	57
6.4. Comportamiento general de explantes de hoja en medios para inducir organogénesis y callo.....	58
7. CONCLUSIONES	59
8. RECOMENDACIONES	60
9. BIBLIOGRAFÍAS	61
10. ANEXO.....	67
10.1. Anexo 1. Componentes del medio MS	67
10.2. Anexo 2. Preparación de Soluciones Concentradas.....	68
10.3. Anexo 3. Preparación de medios de cultivo	70
10.4. Anexo 4. Cantidad de antibióticos y fungicidas utilizados en la desinfección de hojas.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	A. Hojas y rizoma de Valeriana. B. Flores de valeriana. C. Tallo floral.	3
Figura 2.	Mapa de distribución de Valeriana prionophylla Standl en Guatemala.....	4
Figura 3.	Metodología de la evaluación de procesos de desinfección de hojas de valeriana. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.	29
Figura 4.	Comparación de los dos mejores tratamientos de desinfección en relación a la contaminación y la turgencia de los explantes. B, el mejor tratamiento de desinfección de hojas y Bm representa el segundo mejor tratamiento de desinfección de hojas. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.....	47
Figura 5.	Explantos de hoja de valeriana 15 días después de haber sido desinfectados con el mejor tratamiento. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.....	47
Figura 6.	Corte de rizoma de valeriana en donde se muestran los pliegues de la epidermis. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.	48
Figura 7.	Explantos de rizoma de valeriana en medios de cultivo para la inducción de yemas adventicias contaminados por bacterias y hongos. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.....	48
Figura 8.	A. Explantes de hoja de valeriana colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 10 mg/l de BAP y 2 mg/l ANA. B. Explantes de hoja de valeriana colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 10 mg/l de BAP. C. Explantes de hoja de valeriana en medios de inducción de organogénesis conteniendo 5 mg/l de BAP, 15 días después de la siembra. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.....	50

Figura 9.	A. Explantes, provenientes del medio que contenía 10 mg/l de BAP y 2 mg/l de ANA, necrosados cinco días después de su traslado a medios de desarrollo. B. Explantes provenientes del medio que contenía 10 mg/l de BAP, necrosados 10 días después de ser colocados en medios de desarrollo. C. Explantes, proveniente del medio que contenía 5 mg/l de BAP necrosados 25 días después de ser trasladados a medios de desarrollo. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.....	50
Figura 10.	A. Explantes en medios de inducción a los 15 días antes de su transferencia a medios de desarrollo. B. Explantes cinco días después de ser transferidos a medios de desarrollo. C. Explantes deshidratados, cinco días después de transferidos a medios de desarrollo. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.	51
Figura 11.	A. Explantes de hoja de valeriana colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 2 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de ANA. B. explantes de hoja de valeriana colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 5 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de de ANA. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.....	52
Figura 12.	Aspecto de los explantes de hoja 15 días después de haber sido transferidos a medios de desarrollo. A. Explantes de hoja de valeriana colocados en medios de desarrollo proveniente de 2 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de ANA. B. Explantes de hojas de valeriana proveniente de 5 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de ANA. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.	52
Figura 13.	Apariencia de los explantes de hoja de valeriana ocho días después de haber sido colocados en medios de inducción. A. Explantes colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 1 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de ANA. B. Explantes colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 2 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de ANA. C. Explantes colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 3 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de ANA. D. Explantes colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 5 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de ANA. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.....	53

- Figura 14. Apariencia de los explantes de hoja de valeriana 15 días después de su traslado a medios de desarrollo. A. Explantes provenientes de medio de inducción que contenía 1 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de ANA. B. Explantes proveniente de medio de inducción que contenía 2 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de ANA. C. Explantes proveniente de medio de inducción que contenía 3 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de ANA. D. Explantes proveniente de medio de inducción que contenía 5 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de ANA. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018..... 53
- Figura 15. Apariencia de los explantes de hoja de valeriana ocho días después de haber sido colocados en medios de inducción. A. Explantes colocados en medios e inducción de organogénesis conteniendo 0.25 mg/l de BAP. B. Explantes colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 0.5 mg/l de BAP. C. Explantes colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 1 mg/l de BAP. D. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018..... 54
- Figura 16. Apariencia de los explantes de hoja de valeriana ocho días después de su traslado a medios de desarrollo. A. Explantes provenientes de medio de inducción que contenía 0.25 mg/l de BAP. B. Explantes proveniente de medio de inducción que contenía 0.5 mg/l de BAP. C. Explantes proveniente de medio de inducción que contenía 1 mg/l de BAP. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018..... 54
- Figura 17. A. Explantes de valeriana en medio de inducción de callo una concentración de 0.1 mg/l de 2,4-D. B. Explantes de valeriana en medio de inducción a una concentración de 0.5 mg/l de 2,4-D. C. Explantes de valeriana en medio de inducción de callo a una concentración de 1.0 mg/l de 2,4-D. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018..... 55

- Figura 18. Aspecto de los explantes de valeriana 15 días después de haber sido colocados en medios de inducción de callo. A. Explantes en medio a una concentración de 2 mg/l de 2,4-D, B. Explantes en medio a una concentración de 5 mg/l de 2,4-D. C. Explantes en medio a una concentración de 2 mg/l de IBA. D. Explantes en medio a una concentración de 5 mg/l de IBA. E. Explantes en medio a una concentración de 2 mg/l de 2,4-D con 5 mg/l de IBA y F. Explantes en medio a una concentración de 5 mg/l de 2,4-D con 2 mg/l de IBA. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018..... 56
- Figura 19. Apariencia de explantes 15 días después de haber sido colocados en medios de inducción de callo. A. Medio que contenía 2 mg/l de 2,4-D y 0.1 mg/l de Kinetina. B. Medio que contenía 5 mg/l de 2,4-D y 0.1 mg/l de Kinetina y C. Medio que contenía 10 mg/l de 2,4-D y 0.1 mg/l de Kinetina. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018..... 57
- Figura 20. Apariencia de explantes después de 30 días en medios de inducción de callo con 5, 10 y 15 mg/l de 2,4-D. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018. 57

ÍNDICE DE CUADROS

		Página
Cuadro 1.	Tratamientos utilizados para la inducción de organogénesis en rizomas de valeriana. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.	31
Cuadro 2.	Tratamientos para evaluar la inducción de organogénesis en hojas de valeriana. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.	32
Cuadro 3.	Tratamientos para evaluar efecto de carbón activado en la inducción de organogénesis en hojas de valeriana. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.	33
Cuadro 4.	Tratamientos para evaluar la inducción de organogénesis en hojas de valeriana. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.	34
Cuadro 5.	Tratamientos evaluados para inducir organogénesis en hojas de valeriana. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.....	34
Cuadro 6.	Tratamientos evaluados para inducir organogénesis en hojas de valeriana. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.....	35
Cuadro 7.	Tratamientos utilizados de prueba para evaluar reguladores de crecimiento. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.....	36
Cuadro 8.	Tratamientos utilizados de prueba para evaluar reguladores de crecimiento. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.....	36
Cuadro 9.	Tratamientos para evaluar la respuesta de hojas de valeriana a la inducción de callo, primer experimento. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.	37

Página

Cuadro 10.	Tratamientos para evaluar la respuesta a la inducción de callo de hojas de valeriana, segundo experimento. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.	38
Cuadro 11.	Tratamientos evaluados para inducir callo en hojas de valeriana, en tercer experimento. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.....	39
Cuadro 12.	Tratamientos utilizados para evaluar la respuesta de hojas de valeriana a la inducción del callo, cuarto experimento. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.	39
Cuadro 13.	Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis en la evaluación de procesos de desinfección de explante de hoja de valeriana. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.....	46
Cuadro 14.	Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis en la evaluación de turgencia en explantes de hoja de valeriana según procedimiento de desinfección. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.....	47
Cuadro 15A.	Componentes del medio MS (Murashige y Skoog, 1962).....	67
Cuadro 16A.	Cantidad de componentes del medio MS agregada por volumen preparado de soluciones concentradas.	69
Cuadro 17A.	Volumen de soluciones concentradas utilizadas en la preparación de un litro de medio basal MS.....	71
Cuadro 18A.	Cantidad en gramos de fungicidas y antibióticos utilizados para la desinfección de hojas.	72

1. INTRODUCCIÓN

En Guatemala las plantas medicinales son importantes, ante la falta de recursos financieros para adquirir medicinas, éstas son utilizadas de forma confiable. Entre las plantas medicinales se encuentra *Valeriana prionophylla* Standl., la cual se distribuye en los departamentos de Chimaltenango, Guatemala, Huehuetenango, Quetzaltenango, Sacatepéquez, San Marcos, Sololá, Totonicapán; en México en el estado de Chiapas y en Costa Rica, es usada para tratar problemas de insomnio, estrés y ansiedad, contiene metabolitos activos, los que tienen propiedades que inducen el sueño.

Las plantas de valeriana son extraídas de sus poblaciones naturales, son recolectadas por poseer numerosas y valiosas propiedades medicinales, esto hace que no se encuentre esta especie con facilidad, Con el incremento de la población que hace uso de esta planta, la misma puede desaparecer paulatinamente.

Con el fin de contribuir al conocimiento de la respuesta de esta especie al cultivo in vitro, se realizaron evaluaciones de procesos de desinfección y de la respuesta de explantes de valeriana a medios de inducción de organogénesis y medios de inducción de callo.

En este documento se presentan los resultados de la evaluación de procedimientos para la desinfección de hojas para ser utilizadas como explantes, la evaluación de medios de inducción de organogénesis y medios de inducción de callo. Los medios de inducción de organogénesis fueron suplementados con Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Naftalenacético (ANA) en varias concentraciones. Se evaluó 2,4-D y Kinetina para inducir callo, así también se evaluó 2,4-D en combinación con Ácido Indol Butírico (IBA).

Se evaluaron procedimientos de desinfección de hojas de valeriana, el mejor tratamiento fue el que consistió en el lavado de las hojas con jabón antibacterial, luego inmersión en una solución de benomyl por 30 min, realizando tres lavados con agua estéril para eliminar restos de benomyl, luego inmersión en hipoclorito de sodio comercial al 10 %, (el cual contiene 5.25 % de hipoclorito de sodio) por 10 min, retirando nuevamente los residuos de hipoclorito por medio de tres lavados con agua estéril.

El rizoma de valeriana no se pudo utilizar como explante debido a que este contiene exudados viscosos, los cuales producen alta oxidación además de dificultar la desinfección.

En los medios de inducción de organogénesis evaluados no se obtuvo respuesta organogénica. Así también no se produjo callo en los medios de inducción de callo evaluados. Por la no respuesta de explantes de hoja de valeriana a la inducción de organogénesis y de callo, esta planta puede considerarse como recalcitrante, de acuerdo a lo expuesto por Klimaszewska, Bonga, & Von Aderkas (2009), Beltrán Pedroza (2011), Trujillo Moya (2009), Ochatt, Atif, Patatochatt, Jacas & Conreux (2010).

2. MARCO TEÓRICO

2.1.MARCO CONCEPTUAL

2.1.1. Descripción botánica, morfológica y clasificación de valeriana

Valeriana prionophylla Standl., es una planta perenne perteneciente a la familia Valerianaceae que tiene un olor característico que para algunas personas es desagradable, con tallos de 10 cm a 80 cm de alto, las hojas son basales, numerosas y aparecen un poco cespitosas, de forma oblongo-linear o espatuladas, su tamaño es de 3 cm a 30 cm de longitud y 0.5 cm a 3 cm de ancho, pilosas, obtusas, atenuadas hacia la base, sus márgenes serrados, serrado- dentados, crenada o rara vez completa. La mayoría de las hojas tienen un tamaño de 2 cm a 22 cm de largo envueltas en la base. Esta planta tiene un tallo floral que es producido cada dos o tres años, éste tiene forma redonda, pilosa o glabrosa, sus flores son abundantes, con forma tubular, brácteas lineales, el cáliz contiene 9 a 11 segmentos, su corola mide aproximadamente de 1.5 mm a 3 mm de largo, la coloración de las flores es blanca y rosa. Los frutos tienen un tamaño de 2 mm a 3 mm de longitud. Los rizomas tienen forma ovoide o cilíndrica de 3 cm a 5 cm, con un color gris-amarillento con muchas raíces de tamaño pequeño (Nash, 1976). En la figura 1 se muestran hojas, rizomas y tallo floral de valeriana.



Figura 1. A. Hojas y rizoma de Valeriana. B. Flores de valeriana. C. Tallo floral.

2.1.2. Distribución geográfica de valeriana

En Guatemala la especie valeriana (*Valeriana Prionophylla* Standl) se encuentra distribuida en los departamentos de Chimaltenango, Guatemala, Huehuetenango, Quetzaltenango, Sacatepéquez, San Marcos, Sololá, Totonicapán; en México en el estado de Chiapas y en Costa Rica (Nash, 1976). En la figura 2 se muestra la distribución de valeriana en Guatemala.

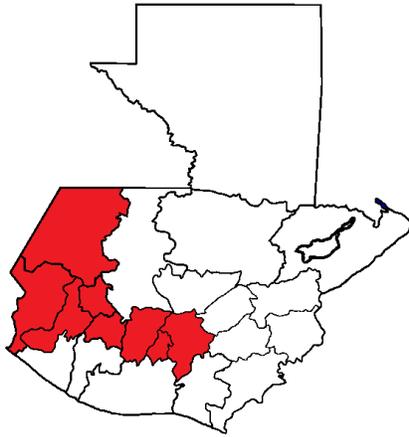


Figura 2. Mapa de distribución de *Valeriana prionophylla* Standl en Guatemala.

2.1.3. Hábitat de la especie *Valeriana Prionophylla* Standl.

Valeriana prionophylla Standl., es una planta que crece en bosque húmedo montano bajo, estos bosques presentan una biotemperatura de 12.5 °C a 18.6 °C y tienen una precipitación promedio de 2,730 mm/año, esta planta se ha ubicado a diferentes alturas que van desde 1,600 m s.n.m. a 3,500 m s.n.m. (Cáceres, 2011; Cáseres Estrada , 2009; Garrido, 2007).

2.1.4. Usos medicinales de valeriana

Los extractos obtenidos de las especies de valeriana son utilizados como sedantes, para el estrés, sueño y ansiedad. La decocción de la hoja de valeriana se utiliza en curación de heridas y afecciones de la piel, esta se puede encontrar en capsulas, raíz seca para té y forma líquida combinada con otras especies de plantas medicinales (Gaitán Fernández, 2005).

2.1.5. Composición química de valeriana

Según Barrios Valenzuela (2007), la valeriana contiene componentes que varían considerablemente dependiendo de la variedad, edad y sus condiciones de crecimiento. El rizoma de valeriana contiene cantidades bajas de: acevaltrato, didrovaltrato hidroxisovalérico y homovaltrato. El aceite volátil (rango de 0.2 % -2.8 %) contiene acetato de bornilo e isovalerianato de bornilo, estos son sus componentes principales.

Otros constituyentes significativos de valeriana incluyen al β -cariofileno, valeranona, valeranal, ácido valérico, α - y β -pineno, β -inona, isovalerato de eugenilo, isovalerato de isoeugenilo, alcohol patchouli, valerianol, borneol, camfeno, β -bisaboleno, ledol, ácido isovalérico, terpinoleno y algunos otros sesquiterpenos y monoterpenos. Hay un segundo grupo importante de constituyentes (rango de 0.05 % - 0.67 %) es la serie de valepotriatos, de los cuales son abundantes el valtrato e isovaltrato (Barrios Valenzuela, 2007).

Los componentes que en valeriana se encuentran en cantidades menores son: el dihidrovaltrato, isovaleroxi-hidroxidihidrovaltrato y 1-acevaltrato. Contiene alcaloides como la actinidina, valerianita, valerina y catinina, entre otros. Posee colina, metil 2-pirrolil cetona, ácidos caféico y clorogénico, β -sitosterol, taninos y gomas. Actualmente no existen estudios para *V. prionophylla* que reporten cuál de sus componentes es al que se le atribuye la actividad sedante, sin embargo, se cree que los iridoides son los responsables de la misma (Barrios Valenzuela, 2007).

2.1.6. Propagación de valeriana

A. Propagación por semilla

Para la propagación de valeriana por semilla, se debe preparar el semillero entre marzo y abril. Las semillas se pueden obtener de las plantas adultas (más de 2 a 3 años), se cortan los frutos cuando estos se tornaron de color amarillo. En el semillero se colocan las semillas y se cubren con una capa delgada de tierra. En el caso de los rizomas, éstos son erectos, aproximadamente de 2 cm a 4 cm de longitud y de 1 cm a 2.5 cm de diámetro. Antes del trasplante al terreno definitivo, es conveniente la preparación del lugar de cultivo, dándole las condiciones adecuadas en la preparación del suelo, riego y la fertilización. Se trasplanta a los 15 a 20 días posteriores a la germinación, aproximadamente entre mayo a junio. En

terreno definitivo o en maceta se aplica riego cada dos o tres días a la semana (Cultivo de valeriana, s.f.).

B. Propagación por rizomas

La propagación por medio de rizomas se realiza haciendo cortes o dividiéndolo en secciones, porque generalmente éste está formado por varios internodos y debe tener yema vegetativa o un meristemo para producir brotes. El rizoma contiene altas cantidades de nutrientes que hacen que produzca raíces adventicias con mucha facilidad. Generalmente las secciones seleccionadas y cortadas del rizoma se trasplantan al lugar directamente (Quispe Calle , 2009).

2.1.7. Micropropagación

En documento publicado por la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (1999), se menciona que a la micropropagación también se le denomina propagación in vitro, la cual consiste en utilizar un conjunto de técnicas donde se extraen órganos o tejidos de distintas porciones o explantes con métodos asépticos, esto permite realizar una propagación masiva de plantas. Estas tecnologías se aplican en varias especies como hortalizas, plantas ornamentales y plantas forestales.

La micropropagación tiene ventajas sobre métodos convencionales, algunas de las más importantes son las siguientes: presenta un incremento acelerado del número de plantas, una reducción del tiempo de multiplicación, posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajo costo y con tiempos económicamente costeables, mayor control sobre la sanidad del material que se propaga, facilidad para transportar el material in vitro de un país a otro con menos restricciones aduaneras y posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual solo existían pocos individuos.

A. Etapas de la micropropagación

Duarcelis, Maryoret, Sánchez, y Torres (2013), proponen que un programa de micropropagación puede contener las siguientes etapas: desinfección de los explantes, introducción del material seleccionado in vitro, multiplicación de brotes, enraizamiento y aclimatación.

B. Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales contiene variadas tecnologías de propagación vegetal incluyendo los protoplastos (células sin pared celular), células, órganos, tejidos y plantas completas. Con la ayuda de estas tecnologías se puede obtener plantas libres de microorganismos, los explantes utilizados se colocan en medios nutritivos estériles bajo condiciones controladas, esta tecnología puede realizarse en recipientes de plásticos o de vidrio (Segretín, 2008).

2.1.8. Tipos de cultivos de tejidos vegetales

A. Cultivo de meristemos

El cultivo de meristemos es una de las tecnologías más importantes para obtener plantas libres de microorganismos, utilizando partes pequeñas de la planta que aún no presenta patógenos. El cultivo de meristemos es una tecnología importante para realizar multiplicación vegetal, la cual ha demostrado alto potencial debido a que se puede obtener alta cantidad de plantas en comparación con los métodos tradicionales. Se puede acelerar el crecimiento de plantas de lento crecimiento y se acelera la producción de plantas bianuales (Segretín, 2008).

B. Cultivo de células

Los cultivos celulares pueden realizarse a partir de callos separados, éstos se utilizan para realizar la suspensión de células los que son colocados en medios líquidos en constante movimiento (Esquivel & Escalant, 1994). Con esta tecnología podemos obtener embriones somáticos para conseguir semillas sintéticas y obtener metabolitos secundarios, donde las células bajo condiciones adecuadas sintetizan compuestos químicos que son utilizados por las industrias farmacéutica y alimenticias (Segretín, 2008).

C. Cultivo de callos

El cultivo de callos se deriva de tejidos que son diferenciados, éstos son sometidos a una dediferenciación celular, con una apariencia desorganizada que tiene forma de masa amorfa constituidas por células. Cuando se desea realizar cultivo de callos se desinfecta el tejido y este es colocado en medios de cultivo suplementados con una o más de una de las

auxinas siguientes: Ácido Indol-3-Acético (AIA), Ácido Naftalén Acético (ANA) y el Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 -D), los rangos de concentraciones utilizadas para AIA son 0.4 mg/l a 2 mg/l, para ANA son 0.1 mg/l a 4 mg/l y para 2,4-D son de 0.22 mg/l a 10 mg/l (Thorpe, 1981).

El cultivo de callos presenta diferentes tipos morfológicos que dependen de la textura, composición celular y apariencia externa, la coloración depende del grado de pigmentación características de la especie utilizada y los factores nutricionales y ambientales, también dependen de la edad del tejido y su origen.

Las células del callo tienen una característica que es muy importante, esta es la totipotencia la cual puede ser inducida al proveerles condiciones hormonales, ambientales y nutricionales, con un adecuado manejo se puede obtener brotes, raíces o embriones para poder lograr formar plantas completas (Cardenas Avila, 2001).

D. Cultivos de protoplastos

Los protoplastos son células vegetales sin pared celular. El cultivo de protoplastos se utiliza para realizar trabajos de manipulación genética donde se modifica un organismo para tener nuevas características, también se utiliza para estudios fisiológicos, bioquímicos y biofísicos, se utiliza esa técnica cuando no se puede usar plantas o células intactas (Esquivel & Escalant, 1994).

E. Cultivo de anteras

En el cultivo de anteras se cultiva polen inmaduro, este se divide para formar embriones o callos. Después éstos son transferidos a un medio de regeneración para que de las células de los callos se formen brotes o embriones somáticos los cuales dan origen a nuevas plantas, las cuales serán haploides. Para la producción de plantas se pueden utilizar dos vías, por organogénesis indirecta que se produce por medio de inducción de brotes y por embriogénesis somática (Esquivel & Escalant, 1994).

F. Organogénesis

La organogénesis es la producción de raíces adventicias y/o brotes a partir de algún segmento de planta. El desarrollo del primordio en brotes vegetativos a partir de yemas, se produce por un proceso donde las células tienen la capacidad de diferenciarse para formar

nuevos órganos (raíz, hojas y tallos) a esta capacidad celular se le conoce como totipotencia. Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callo (organogénesis indirecta) (Llorente, 2000).

La inducción de organogénesis in vitro es determinada por la totipotencialidad celular; cada célula contiene información genética que puede inducir la formación de tejido vegetal, órganos y plantas completas. Para que ello ocurra se requieren condiciones, las que se proveen a los explantes en el cultivo in vitro.

Se podría esperar que todas las células vivas son capaces de expresar totipotencia, sin embargo, no todos los tipos de células tienen capacidad totipotente, la probabilidad que ésta se exprese decrece conforme ocurre la diferenciación de la célula. Kung & Wu (1993) y Vasil & Thorpe (1998), mencionados por Muñoz Ramirez (2014), indican que la no manifestación de la totipotencialidad de las células se debe a bloqueos que pueden actuar en tres niveles diferentes.

Un primer nivel es el bloqueo genético, éste se manifiesta cuando no existe la totipotencialidad celular real o se carece de algún factor genético indispensable para que exista manifestación totipotente aun teniendo las condiciones externas para expresarla. Un segundo nivel es el bloqueo epigenético en el cual puede existir capacidad totipotente, pero la misma es reversible debido a las condiciones ambientales a las que se expongan los explantes en la experimentación.

El tercer nivel de bloqueo de la totipotencia es el fisiológico el cual se debe a la falta de condiciones externas para la expresión organogénica, estas condiciones pueden ser de luz, temperatura, concentración y combinación de reguladores del crecimiento.

La relación de auxinas y citoquininas se debe tener en cuenta en la expresión totipotente, es específica para las variedades de cada especie vegetal, ya que estos reguladores son los que promueven que se produzca la regulación de organogénesis, ésta se regula por medio de concentraciones adecuadas según el órgano a inducir. Cuando la relación de auxina/citoquininas es alta se forman raíces, cuando es baja se producen vástagos y con relaciones cercanas a uno se producen callos (Llorente, 2000).

2.1.9. Tipos de medios de cultivo

A. Medio líquido

Los medios líquidos son constituidos por componentes orgánicos, componentes inorgánicos, vitaminas, reguladores de crecimiento. En este medio hay mejor homogeneidad de nutrientes que en los sólidos, pues no se establecen gradientes con el crecimiento de tejidos. Los que a su vez pueden ser agitados (mediante el empleo de agitadores de uso continuo) o estacionarios (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2004).

B. Medio sólido

Los medios sólidos se preparan a partir de los medios líquidos, agregándoles un agente gelificante como es el agar. Otros gelificantes utilizados son Phytogel utilizado al 0.25 % - 0.40 %, Agargel utilizado al 0.40 % - 0.60 %, Gelrite utilizado al 0.10 % - 0.20 % y agarosa utilizada al 0.80 % - 0.90 % (Cabrera Navarrete , 2014).

2.1.10. Medio de cultivo

El medio más utilizado en cultivo de tejidos vegetales es el de Murashige y Skoog (MS) (1962) que es un medio artificial desarrollado para cultivar los tejidos y órganos vegetales, proporcionándoles nutrientes necesarios para el desarrollo de los explantes, este medio contiene sales inorgánicas, vitaminas, myo-inositol, carbohidratos (sucrosa) y agente gelificante que es el agar.

La concentración final de los distintos nutrientes minerales del medio MS se muestra en el anexo 1. Este medio de cultivo es muy usado, particularmente si el objetivo es regenerar plantas (Galindo Guzmán, 2015).

2.1.11. Componentes del medio de cultivo

A. Nutrientes inorgánicos

En los medios de cultivo se utilizan compuestos inorgánicos que se agrupan en macro y micronutrientes (Puche & Rodríguez, 2012).

a. Macronutrientes

Estos nutrientes son conocidos como los primarios, elementos mayores o macroelementos. Se requieren en cantidades milimolares (mM) y son los elementos requeridos en mayor cantidad, estos son: Calcio (Ca^{2+}), Potasio (K^+), Magnesio (Mg^{2+}), Nitrógeno (NO_3^-), Fósforo (PO_4^{3-}) y Azufre (SO_4^{2-}) (Contreras Loera, 2016).

b. Micronutrientes

Según Puche & Rodríguez (2012), los micronutrientes o elementos menores se requieren en cantidades micromolares. Los elementos menores son: Hierro (Fe), Zinc (Zn), Manganeso (Mn), Cobre (Cu), Cobalto (Co), Boro (B) y Molibdeno (Mo) estos son los que forman parte de la estructura de algunas proteínas vegetales, o vitaminas de interés bioquímico-fisiológico.

B. Complementos orgánicos

Los complementos orgánicos están agrupados en vitaminas, aminoácidos y algunos reguladores del crecimiento de origen orgánico. Estos se incorporan al medio para que ayude al crecimiento y la morfogénesis (Puche & Rodríguez, 2012).

C. Vitaminas

Las vitaminas son esenciales para las plantas, éstas se requieren para el crecimiento y diferenciación cumpliendo un rol catalítico en el metabolismo celular. Las que se utilizan con mayor frecuencia en medios de cultivo son: Tiamina-HCl, Acido Nicotínico, Piridoxina-HCl, Biotina, Ácido Fólico, Ácido Pantoténico, Riboflavina (Abedini, Sharry, & Adema, 2015).

D. Aminoácidos

Según Puche & Rodríguez (2012), para la célula los aminoácidos son importantes porque son una fuente de nitrógeno que se puede incorporar al metabolismo de ellas de forma inmediata, las fuentes de nitrógeno deben ser puras porque es más rápida su incorporación que el nitrógeno inorgánico. El nitrógeno orgánico es una fuente esencial para la embriogénesis y muy importante para la organogénesis. Los aminoácidos se basan en la relación de NH_4/NO_3 que se agrega como NO_3^- , NH_4^+ , NO_3 y NH_4Cl , estos compuestos

orgánicos son estimulantes en la proliferación celular y son necesarios para iniciar la formación de callo.

E. Reguladores del crecimiento

Los reguladores de crecimiento son importantes para cubrir las necesidades de la planta, éstas son sustancias químicas que ayudan a regular el crecimiento de las células, la división y la diferenciación celular, así como la organogénesis. Pueden ser naturales o sintéticos y se dividen en auxinas, citoquininas, giberelinas y retardadores e inhibidores del crecimiento (Puche & Rodríguez, 2012).

F. Auxinas naturales

Las auxinas naturales regulan el crecimiento, el Ácido Indolacético (AIA) actúa a nivel de los ápices, en los que hay tejido meristemático, el cual es indiferenciado. Es la única auxina natural que actúa en zonas de crecimiento. El AIA es recomendado para ser utilizado en cultivos en suspensión porque es desnaturalizada por la luz, además es metabolizado por las enzimas oxidasas, las que hidrolizan esta hormona. Por ello es de poca duración y su efecto es leve (Puche & Rodríguez, 2012). Cabrera Navarrete (2014) indica que las auxinas generalmente se aplican en cultivos de tejidos vegetales en concentraciones de 0.1 mg/l a 10 mg/l.

G. Auxinas sintéticas

Según Puche y Rodríguez (2012), las auxinas sintéticas son: el Ácido Naftalenacético (ANA), Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético y Ácido Indolbutírico (AIB). Los reguladores que son utilizados para enraizar son el ANA y el AIB. En muchas especies de plantas se utiliza el AIA o el ANA que sirven para la formación de órganos, estos son mejores que el 2,4-D, ya que este se utiliza para la formación de callos. Además Thorpe (1981) indica que los rangos de concentración para observar respuestas en organogénesis directa son para ANA de 0.5 mg/l a 4 mg/l, para 2,4-D es de 0.04 mg/l y para AIB es de 1 mg/l a 2 mg/l y para inducción de callo las concentraciones son: ANA 0.1 mg/l a 5 mg/l, 2,4-D 0.22 mg/l a 10 mg/l y AIB 1 mg/l.

H. Citoquininas

a. Citoquininas naturales

Las citoquininas son utilizadas para la inducción de organogénesis, pero éstas en presencia de auxinas inducen la división celular. Existen citoquininas que son naturales como la Zetina que es extraída del endospermo del maíz, Thorpe (1981) menciona que la concentración de esta citoquinina para organogenesis directa e indirecta es de 0.2 mg/l. Otra citoquinina natural es la Iopentil Adenina (2iP), la cual se aísla de *Clostridium tumefaciens* (Puche & Rodríguez, 2012).

b. Citoquininas sintéticas

Según Puche y Rodríguez (2012), las citoquininas sintéticas principales son: Benciladenina (6 BA) o también conocida como Bencilaminopurina (6 BAP). También se emplea la Zeatina o Isopentil Adenina como sustancias de naturaleza citoquinética. Thorpe (1981), indica que la concentración utilizada de BAP es de 0.06 mg/l a 1.5 mg/l.

La Kinetina es el regulador que ayuda a la estimulación de la división celular, crecimiento y desarrollo. Esta hormona es utilizada en concentraciones de 1.0 mg/l a 10 mg/l, induce la formación de brotes adventicios, formación de raíces y retrasa el envejecimiento (Castañeda Castro, y otros, 2008). Thorpe (1981), menciona que las concentraciones para inducción de organogénesis varían de 0.02 mg/l a 6 mg/l y para inducción de callo varían de 0.04 mg/l a 5 mg/l.

I. Ácido Giberélico

En varias especies vegetales el Ácido Giberélico provoca un aumento en la elongación de brotes, las actividades biológicas son muy variadas como lo es el crecimiento, ya que este puede producir elongación o provocar enanismos genéticos (García Canté de Chaycoj, 2004). Thorpe (1981), menciona que la concentración para inducción de organogénesis es de 0.10 mg/l y para la inducción de callo varía de 0.3 mg/l a 0.6 mg/l.

J. Sustancias naturales

Puche Acosta y Damaso Alvarado (2013) mencionan que las sustancias naturales son extractos que son adicionados a los medios de cultivo. En las sustancias naturales existen

diferentes tipos de extractos que se han utilizado estos son: levadura, malta, carne, extractos de papa, de maíz, de raíces y de rizomas. Jugos de frutas u hortalizas (sustancias naturales que son adicionadas a los medios de cultivo), algunos extractos utilizados son de naranja, banano, piña, tomate, patata, leche de coco, agua de coco, entre otros. Su uso no se aconseja por no poder darse una composición precisa del extracto añadido, pueden resultar útiles sólo en casos concretos.

K. Materiales inertes

a. Agar

El agar es un extracto de algas marinas, este es un gel que por poseer características físicas adecuadas se utiliza para solidificar los medios básicos. Se considera un agar de buena calidad cuando cumple con las siguientes características: hierve a 100 °C y que solidifica a 45 °C, aproximadamente. Esta característica le confiere estabilidad a cualquier temperatura de incubación, no es digerido por enzimas vegetales y no reacciona con los constituyentes del medio de cultivo. Estas características son utilizadas cuando se trabaja con cultivo sólido o semi-sólido (Puche & Rodríguez, 2012).

b. Carbón activado

En algunas especies se tiene problemas con liberación de fenoles los que producen oxidación o muerte de tejidos, para evitar esto se utiliza el carbón activado porque este adsorbe sustancias químicas que pueden intervenir con el explante cultivado. El carbón activado al ser utilizado en medios que contienen auxinas y citoquininas, retiene los reguladores y los libera en el medio, esto favorece la embriogénesis somática. Las concentraciones comúnmente utilizadas van de 0.1 g/l a 1 g/l (Esquivel & Escalant, 1994).

c. Intercambio gaseoso

Esquivel & Escalant (1994) indican que el intercambio gaseoso es uno de los factores físicos que interviene en el cultivo de tejidos vegetales, entre los gases más corrientes en los cultivos in vitro están: O₂ (Oxígeno), CO₂ (Dióxido de Carbono) y C₂H₄ (Etileno).

L. Condiciones de los cultivos in vitro.

a. Humedad

Las condiciones de humedad para los cultivos in vitro es del 100 % de humedad relativa, lo que hace que las plantas cultivadas no desarrollen un sistema de regulación hídrica, es decir que no desarrollen cera, estomas y cutícula (Esquivel & Escalant, 1994).

b. La luz

La luz es importante para el cultivo in vitro, las condiciones son bajas en intensidad y calidad (10 W/m^2), en cambio en las condiciones naturales la luz puede representar hasta 900 W/m^2 . En el cuarto de incubación se recomienda utilizar diferentes tipos de luz por las longitudes de onda. Los vegetales utilizan un espectro que va de 400 nm a 700 nm. La luz tiene efecto en dos fenómenos, que dependen de ella, que son la fotosíntesis y la fotomorfogénesis (Esquivel & Escalant, 1994).

c. El pH

Según Roca y Mroginski (1991), los pH iniciales de la mayoría de los medios son generalmente de 4.0 a 5.5, cuando no son suplementados con reguladores de crecimiento. Pero en la mayoría de los casos se requerirá ajustar el pH, aumentándolo con una solución 0.01 N de hidróxido de potasio o de sodio, el ajuste del pH se hace a 5.5, 5.8 ó 6.3.

d. Fotomorfogénesis

La fotomorfogénesis se manifiesta en respuestas en crecimiento y desarrollo de las plantas que están controladas por la luz, es decir produce una expansión en las láminas foliares, síntesis de antocianinas, desarrollo de plástidos, estos pueden ser afectados por la radiación o la densidad de ciertas longitudes de onda, los cuales pueden verse influidas por la calidad y la intensidad. Además, Esquivel & Escalant (1994) indican que la luz es un factor importante que funciona por medio de pigmentos, porque responden a la absorción de luz azul y roja ya que estos son susceptibles a estas radiaciones. El pigmento que es susceptible y tiene las funciones más conocidas al color rojo es el fitocromo (rojo 660 nm y rojo lejano 730 nm).

e. Fotoperíodo

Según Irvin Valerio (2012), el fotoperíodo es un conjunto de procesos donde puede presentarse condiciones de luz y oscuridad para regular las funciones biológicas de los organismos y vegetales. Algunos fenómenos propios del desarrollo de las plantas (germinación, floración, tuberización, etc.) pueden ser activados por el número de horas diarias de luz que recibe la planta.

De forma análoga, el número de horas de luz que recibe el explante cultivado in vitro puede afectar su desarrollo. En general, el mejor fotoperíodo in vivo será también el mejor fotoperíodo in vitro. En general se utiliza luz blanca y un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad (Valerio, 2012).

M. Diseño completamente al azar

El diseño completamente al azar (CDA) es uno de los diseños más simples, donde los tratamientos son colocados de una forma aleatoria. La magnitud del error tiende a disminuir utilizando unidades experimentales homogéneas, este error lo provoca la variación intrínseca de las unidades experimentales. Este diseño es utilizado para trabajar experimentos en laboratorios o invernaderos, (Gutiérrez & de la Vara, 2008; López & González, 2014).

a. Ventajas del diseño completamente al azar

Algunas de las ventajas que presenta el Diseño Completamente al Azar, según López & González (2014), son las siguientes: El análisis estadístico es de una forma simple, tiene una máxima flexibilidad con el número de tratamientos y el número de repeticiones, lo que hace que este diseño se realice de la manera más fácil, ya que otros diseños no tienen dificultad y se obtienen mayor número de grados de libertad en el residuo.

b. Inconvenientes de diseño completamente al azar

Algunos de los inconvenientes que presenta el diseño completamente al azar son: cuando el número de unidades experimentales es muy grande es difícil encontrar lugares grandes que presenten la homogeneidad requerida y las fuentes de variación no asociadas a los

tratamientos o a los niveles del factor en estudio están incluidas en el residuo (López Bautista & González Ramírez, 2014).

c. Supuestos para validar análisis de varianza

Según López & González (2014) y Castejón Sandoval (2011), la varianza tiene supuestos que la hacen válida y estos son los siguientes:

- a) Los errores son independientes de un tratamiento a otro, éste utiliza un cálculo con la siguiente fórmula $ERROR_RESIDUAL = Y_i - \bar{Y}_i$. Utilizando como verificación del supuesto la prueba de aleatoriedad, la cual contiene un ámbito no paramétrico.
- b) Los errores están normalmente distribuidos con media cero y varianza constante, para cada tratamiento sus respuestas deben tener una distribución normal, para este supuesto se utiliza la prueba de Shapiro-Wilk que es para muestras pequeñas y Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Francia que son para muestras más grandes.
- c) Existe homogeneidad de varianzas entre los tratamientos. Es decir que cada tratamiento es igual a otro tratamiento porque poseen una variación parecida. Este supuesto se puede verificar por la prueba de Bartlett o Levene que van directo a un rechazo de hipótesis nula y así existirá homogeneidad en las varianzas.
- d) El modelo es lineal y de efectos aditivos. Hace referencia a que las sumas de medias generales tienen respuestas en cada grupo de los tratamientos y están asociados a un efecto aleatorio, este supuesto se puede validar por medio de la prueba de Tukey, esta prueba no rechaza la hipótesis nula ya que conduce a que el supuesto se cumpla.

N. Prueba de Kruskal-Wallis

La prueba de Kruskal – Wallis se utiliza para realizar comparaciones de dos o más muestras con la intención de conocer si proceden de la misma población, o bien, comparar si existen diferencias entre las medidas de tendencia central de más de dos poblaciones y no se justifica la suposición de normalidad y de igualdad de varianzas (Carmona Medero, Rubios Torres, & Lemus Flores, 2002).

Ésta prueba es una alternativa no paramétrica al análisis de varianza usual, en el planteamiento de hipótesis nula para la prueba de Kruskal-Wallis no existe diferencia entre los tratamientos ($\neq_1 = \neq_2 = \dots \neq_a$) y la hipótesis alternativa indica que existe diferencia entre

al menos un par de tratamientos ($\neq_i^1 \neq_j$) (Carmona Medero, Rubios Torres, & Lemus Flores, 2002).

O. Software para el análisis estadístico

a. Infostat

InfoStat es un software estadístico que permite el manejo de datos utilizando plantillas electrónicas, éste permite importar y exportar bases de datos en formato Excel y texto. Infostat tiene diferentes herramientas de las cuales se puede utilizar para el manejo de datos para realizar formulas, aplicar transformaciones, ordenar datos, categorizar variables, generar variables aleatorias por simulación, concatenar tablas, registros activos, entre otros, también permite trasladar a otras aplicaciones de Windows de una forma fácil las tablas, resultados y gráficos para poder interpretarlos de una forma profesional (Balzarini, Gonzalez, & Roblero, 2008; Universidad Nacional de Córdoba, 2010; Zambrano Gavilanes, 2012).

P. Plantas recalcitrantes al cultivo de tejidos

Klimaszewska, Bonga y Von Aderkas (2009), definen como planta recalcitrante al cultivo de tejidos vegetales a las especies cuyos procesos para la inducción de embriogénesis somática u organogénesis resultan fallidos, después de haber realizado una extensiva evaluación de su respuesta por métodos tradicionales de cultivo de tejidos o por aplicación de reguladores de crecimiento de descubrimiento reciente, que no producen respuesta alguna. La recalcitrancia en algunas especies vegetales continúa siendo un obstáculo, principalmente cuando se reproducen en su fase adulta.

Beltrán Pedroza (2011), quien trabajó en cultivo in vitro de la especie comino (*Cuminum cyminum*) menciona que la falta de respuesta o recalcitrancia al cultivo in vitro se debe a la inhabilidad de las células, tejidos y órganos de responder a la manipulación para su cultivo in vitro. Los factores que pueden influir en la recalcitrancia pueden ser ecológicos, fisiológicos y/o ambientales.

Trujillo Moya (2009), trabajó en la especie de tomate (*Solanum lycopersicum*) en la cual encontró genotipos recalcitrantes al cultivo in vitro. Expone que además del componente genético existen otros factores como las condiciones fisiológicas del material, los

componentes del medio de cultivo y las condiciones de incubación, que contribuyen a la recalcitrancia al cultivo in vitro de ciertos genotipos. Por otra parte, expone que la recalcitrancia al cultivo de tejidos es influenciada principalmente por cuatro factores, los cuales son: el genotipo, el estado fisiológico de la planta dadora, la fisiología asociada al estrés de la planta en cultivo y las manipulaciones realizadas para su cultivo in vitro.

Steinitz et al. (2003), mencionado por Gómez Aguilar (2016) quienes trabajaron en Chile habanero (*Capsicum chinense*) indican que en el género *Capsicum* es una especie determinada como recalcitrante a la inducción morfogénica, lo anterior se afirma debido a la baja eficiencia de los sistemas de regeneración, la baja reproductividad de los protocolos de regeneración, el alto índice de embriones deformados y la baja tasa de embriones somáticos inducidos.

Medina Collado (2016), quien trabajó en análisis de diploidía en *Brassica napus* concluye que para que exista regeneración en plantas de la especie trabajada los juegos cromosómicos deben ser diploides, tetraploides y hasta octoploides, y las plantas con más complementos cromosómicos no tienen la capacidad de formar brotes organogénicos. Capote Rodríguez, Fundora Mayor y Pérez Díaz (2000) trabajaron en regeneración de plantas de cebollas a partir de callos indican que la variación genética que se produce en los tejidos somáticos produce inestabilidad genética lo cual disminuye la capacidad de regeneración de plantas.

Roubelakis-Angelakis (1993), indica que el término recalcitrante se utiliza comúnmente para referirse a las plantas que no muestran proliferación celular o no muestran respuesta a la morfogénesis.

Ochatt, Atif, Patatochatt, Jacas y Conreux (2010), analizaron, en mutantes de *Arabidopsis thaliana*, varios parámetros citológicos para identificar algunos que pudieran servir como indicadores para conocer la competencia celular para producir embriogénesis u organogénesis. Resaltan que las respuestas a la regeneración de diferentes genotipos, dentro de la misma especie, son comunes en la bibliografía y las diferencias entre especies son mayores. La regeneración es un proceso complejo que involucra a varias fases;

desdiferenciación, reactivación celular, división celular y aspectos metabólicos así como fases del desarrollo que requieren reprogramación.

2.2. Marco referencial

2.2.1. Ubicación geográfica

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, ubicado en el laboratorio C-16 en el tercer nivel del edificio T8 de la Facultad de Agronomía, en el campus central de la Universidad de San Carlos de Guatemala, ubicado en la zona 12 de la ciudad de Guatemala.

2.2.2. Facilidades del laboratorio

El laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales está dividido en diferentes áreas, las cuales son:

- a) Área de preparación de medios. Es el área donde se preparan los medios de cultivo, tiene espacios para el almacenamiento de cristalería, reactivos químicos y en ella se tiene balanza analítica, potenciómetro y platos con agitación orbital.
- b) Área de lavado y esterilización de los materiales: en esta área se tienen facilidades para lavar cualquier tipo de cristalería, también existe un horno para secado y esterilización de cristalería. En esta área existe una autoclave para la esterilización.
- c) Área de transferencia: en esta área se tienen dos cámaras de flujo laminar, las que son utilizadas para hacer las transferencias en condiciones de esterilidad.
- d) Área de incubación: este es un espacio en donde los cultivos se incuban, en el mismo se tienen control de temperatura y de fotoperíodo. Existen estanterías en las cuales se colocan los cultivos. Para proveer luz se utilizan lámparas led de luz blanca.

2.2.3. Condiciones del laboratorio

Las condiciones del laboratorio son las siguientes: intensidad lumínica de 1,000 lux a 3,000 lux, fotoperíodo de 16 h luz por 8 h de oscuridad, temperatura: $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa del 70 % a 80 %.

2.2.4. Obtención de plantas de *Valeriana prionophylla* Standl.

Las plantas de *Valeriana prionophylla* Standl fueron recolectadas en el caserío Ciénaga Grande, municipio Santa Lucía Utatlán en el departamento de Sololá, las plantas completas fueron colocadas en papel periódico húmedo y en una bolsa plástica. Se transportaron en una hielera, posteriormente se plantaron en macetas.

2.2.5. Medio de cultivo MS (Murashige y Skoog)

El medio Murashige y Skoog (MS) (1962), es un medio que contiene macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, hierro, mio-inositol y 3 % de sacarosa. Este medio sirve para proveer un ambiente artificial a los explantes, aportándoles nutrientes, hormonas, humedad, para que estos desarrollen dependiendo el proceso al cual son sometidos. La composición del medio MS se muestra en el anexo 1.

2.2.6. Uso de reguladores del crecimiento en la inducción de organogénesis

Abdi & Khosh-Khui (2007), trabajaron en *Valeriana officinalis* L., utilizaron como explantes hojas, al medio de cultivo le agregaron BAP en concentraciones de 0.25 mg/l y 0.5 mg/l así como combinaron 1 mg/l y 1.5 mg/l de BAP con Kinetina. En los medios que contenían bajas concentraciones de BAP lograron producir un solo brote y cuando combinaron BAP con Kinetina produjeron dos o más brotes.

Tansaz, Zamani, & Otrshy (2014), indujeron organogénesis en *Valeriana officinalis* L., con el propósito de desarrollar un protocolo para la regeneración de ésta especie. Utilizaron como explantes hojas, las que colocaron en medios de inducción organogénica que contenían BAP en concentraciones de 0.25 mg/l, 0.5mg/l y 1 mg/l. Obtuvieron respuesta con las concentraciones de 0.25 mg/l y 0.5 mg/l de BAP, sin embargo, el más alto número de brotes de mayor tamaño los obtuvieron en las concentraciones de 0.5 mg/l y 1 mg/l de BAP.

Saini y otros (2018), evaluaron concentraciones de 2 mg/l de BAP y 2 mg/l de ANA en medio basal MS e indujeron rizogénesis en explantes de hoja de *Valeriana jatamansi* Jones. Obtuvieron respuesta después de 90 días en cultivo, obtuvieron hasta 70 raíces por explante con una longitud máxima de cinco centímetros.

Camen, Beinsan y Sumalan (2012), con el propósito de conocer la respuesta a la regeneración a la propagación in vitro de *Valeriana officinalis* L., evaluaron como explantes segmentos de hoja y segmento de tallo, los que pusieron en medios de cultivo que contenían medio basal MS suplementado con 10 mg/l ANA y 0.1 mg/l de BAP, 1 mg/l de ANA y 1 mg/l de BAP y 0.1 mg/l de ANA y 1 mg/l de BAP. Observaron la formación de callo o la formación de raíces en los explantes, no así la presencia de brotes apicales.

2.2.7. Uso de reguladores del crecimiento en la inducción de callo

Cabrera Navarrete (2014), trabajó en la inducción de callo en explantes de hoja de *Valeriana pyramidalis* Kunth, con el propósito de establecer suspensiones celulares, utilizó el medio MS como medio basal, el cual fue suplementado con 2,4-D en concentraciones de 1.5 mg/l, 2 mg/l y 2.5 mg/l, observó la formación de callo en las diferentes concentraciones de 2,4-D utilizadas y utilizó ese callo para establecer las suspensiones celulares.

Castillo, Márquez, Rubluo, Hernández, & Lara (2000), evaluaron la inducción de callo, organogénesis indirecta e inducción de embriones somáticos en *Valeriana edulis* sp. Utilizaron como medio basal el medio MS al cual adicionaron 1 mg/l o 2 mg/l de 2,4-D combinados con 0.1 mg/l o 0.2 mg/l de Kinetina, el explante utilizado fue hoja, después de 16 semanas de cultivo observaron la formación de callo, el cual subcultivaron en medios semi- sólidos y medios líquidos, habiendo obtenido brotes y embriones somáticos, los primeros fueron enraizados y los segundos puestos a germinar.

Zamini, Mokhtar, Tansaz, & Zarei (2016), trabajaron en *Valeriana officinalis*, utilizaron como explantes el pecíolo y la parte basal de la hoja, así como la parte media de la hoja. Utilizaron como medio basal el medio MS al cual adicionaron 1.5 mg/ de 2,4-D y 1 mg/l de Kinetina, así como 2 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l o 1 mg/l de Kinetina, las primeras concentraciones las utilizaron con la parte basal de las hojas y las segunda con la parte media de la hoja. La mayor producción de callo (95.83 %) la observaron con la concentración de 1.5 mg/l de 2,4-D y 1 mg/l de Kinetina y no observaron diferencias estadísticas significativas en los explantes.

2.2.8. Benomyl en desinfección de explantes

Urrea, Gomez y Naranjo (2012) realizaron desinfección de hojas con benomyl con 400 mg/l esto con el fin de eliminar la contaminación de los explantes de hoja, sumergieron las hojas en benomyl por 30 min y posteriormente las colocaron en hipoclorito de sodio al 1.5 %, seguidamente fueron lavadas con agua estéril.

Ferreira de Santana, Paiva, Ibrahim Aloufa y Pinto de Lemos (2003), mencionan que el benomyl es un fungicida efectivo para eliminar hongos en los explantes de hojas y la concentración que se utiliza es de 1 g/l. La ampicilina estos autores la utilizaron para controlar la contaminación producida por bacterias, habiéndola utilizado en concentraciones de hasta 4 mg/l.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Evaluar procedimientos de desinfección de explante de hoja y medios de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana (*Valeriana prionophylla* Standl) para contribuir a la propagación vegetativa de esta especie.

3.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar siete procedimientos de desinfección de hojas de valeriana para disminuir la contaminación de los explantes de hoja.
2. Evaluar dos concentraciones de BAP y ANA para la inducción de organogénesis en rizoma de valeriana.
3. Evaluar siete concentraciones de BAP y tres concentraciones ANA en medio basal MS para la inducción de organogénesis en hojas de valeriana.
4. Evaluar el efecto de siete concentraciones de 2,4-D combinadas con Kinetina para la inducción de callo en hojas de valeriana.
5. Evaluar el efecto de dos concentraciones de 2,4-D e IBA para la inducción de callo en hojas de valeriana.

4. HIPÓTESIS

1. El procedimiento más efectivo para la desinfección de hojas de valeriana es el que combina el lavado con jabón antibacterial y agua potable, luego la inmersión en benomyl con posterior lavado con agua estéril, después la inmersión en hipoclorito de sodio comercial al 0.5 % y el lavado posterior en agua estéril.
2. El medio de inducción de organogénesis en el cual se agreguen 1 mg/l de BAP y 0.5 mg/l ANA inducirá una mayor cantidad de yemas adventicias en explantes de rizoma de valeriana.
3. Los explantes de hoja de valeriana al ser colocados en medios de inducción de organogénesis que contenga BAP solo o en combinación con ANA inducirá la formación de yemas adventicias.
4. Los explantes de hoja de valeriana al ser colocados en medios de inducción de callo que contengan 2,4-D inducirán la formación de callo, a mayor concentración de 2,4-D se inducirán mayor formación de callo.
5. Los explantes de hoja de valeriana en medios de inducción de callo que contengan 2,4-D combinado con IBA, a mayor concentración se inducirá mayor formación de callo.

5. METODOLOGÍA

5.1. Metodología Experimental

5.1.1. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas de valeriana

A. Descripción de los tratamientos

En la evaluación de procedimientos de desinfección de hojas se utilizaron siete tratamientos los cuales se describen a continuación en grupos de acuerdo a los elementos comunes de cada uno. Al primer tratamiento se le asignó el código T1 (B) y al segundo tratamiento el código T2 (B-m), estos tratamientos tienen en común que al inicio se lavaron las hojas con jabón antibacterial y agua potable, luego se trasladaron a la cámara de flujo laminar para colocarlas en una solución de benomyl (se utilizó como fuente de benomyl el producto comercial Pronto® WP) a una concentración de 0.5 g/l en agitación constante por 30 min, posteriormente fueron lavadas tres veces con agua estéril. En el primer tratamiento (código T1 (B)) las hojas fueron sumergidas en una solución que contenía 0.5 % de hipoclorito de sodio por 10 min en agitación constante, y en el segundo tratamiento (T2 (B-m)) las hojas fueron sumergidas en la misma solución por un periodo de cinco minutos. Posteriormente en ambos tratamientos las hojas fueron lavadas tres veces con agua estéril y colocadas en cajas de Petri estériles.

El tercero, cuarto y quinto tratamientos se les asignaron los códigos T3 (C), T4 (C-m) y T5 (C-m2) respectivamente, en estos tratamientos se lavaron las hojas con jabón antibacterial y agua potable, luego se trasladaron a la cámara de flujo laminar en donde fueron sumergidas en una solución de benomyl a una concentración de 0.5 g/l por 30 min en agitación constante, luego fueron lavadas con agua estéril tres veces y colocadas en una solución de tetraciclina a una concentración de 0.5 g/l por 15 min, posteriormente fueron lavadas tres veces con agua estéril y después en el tercer tratamiento (T3 (C)) las hojas fueron colocadas en una solución que contenía 0.5 % de hipoclorito de sodio por 10 min en agitación constante. En el cuarto tratamiento (T4 (C-m)) las hojas fueron colocadas en una solución de hipoclorito de sodio a la misma concentración del tratamiento anterior por cinco minutos y las hojas en el quinto tratamiento (T5 (C-m2)) no fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio. Para los tres tratamientos después de haber sido colocadas en soluciones

desinfectantes las hojas fueron lavadas tres veces con agua estéril y colocadas en cajas de Petri estériles.

Los tratamientos seis y siete fueron identificados con los códigos T6 (D) y T7 (D-m), respectivamente, en ambos tratamientos al inicio las hojas fueron lavadas con jabón antibacterial y agua potable, posteriormente en la cámara de flujo laminar fueron colocadas en una solución que contenía benomyl a una concentración de 0.5 g/l y mancozeb (se utilizó como fuente de mancozeb el producto comercial mancozeb 80 % WP) a una concentración de 0.8 g/l por 10 min en movimiento constante, posteriormente fueron lavadas tres veces con agua estéril, luego se trasladaron a una solución que contenía 0.5 % de hipoclorito de sodio, en el tratamiento seis (T6 (D)) las hojas fueron sumergidas en esta solución por 10 min en agitación constante, y en el tratamiento siete (T7 (D-m)) las hojas fueron sumergidas en la solución que contenía 0.5 % de hipoclorito de sodio por cinco minutos. Posteriormente en ambos tratamientos las hojas fueron lavadas tres veces con agua estéril y colocadas en cajas de Petri estériles. En la figura 3 se muestran los procesos realizados con los diferentes tratamientos de desinfección de hojas.

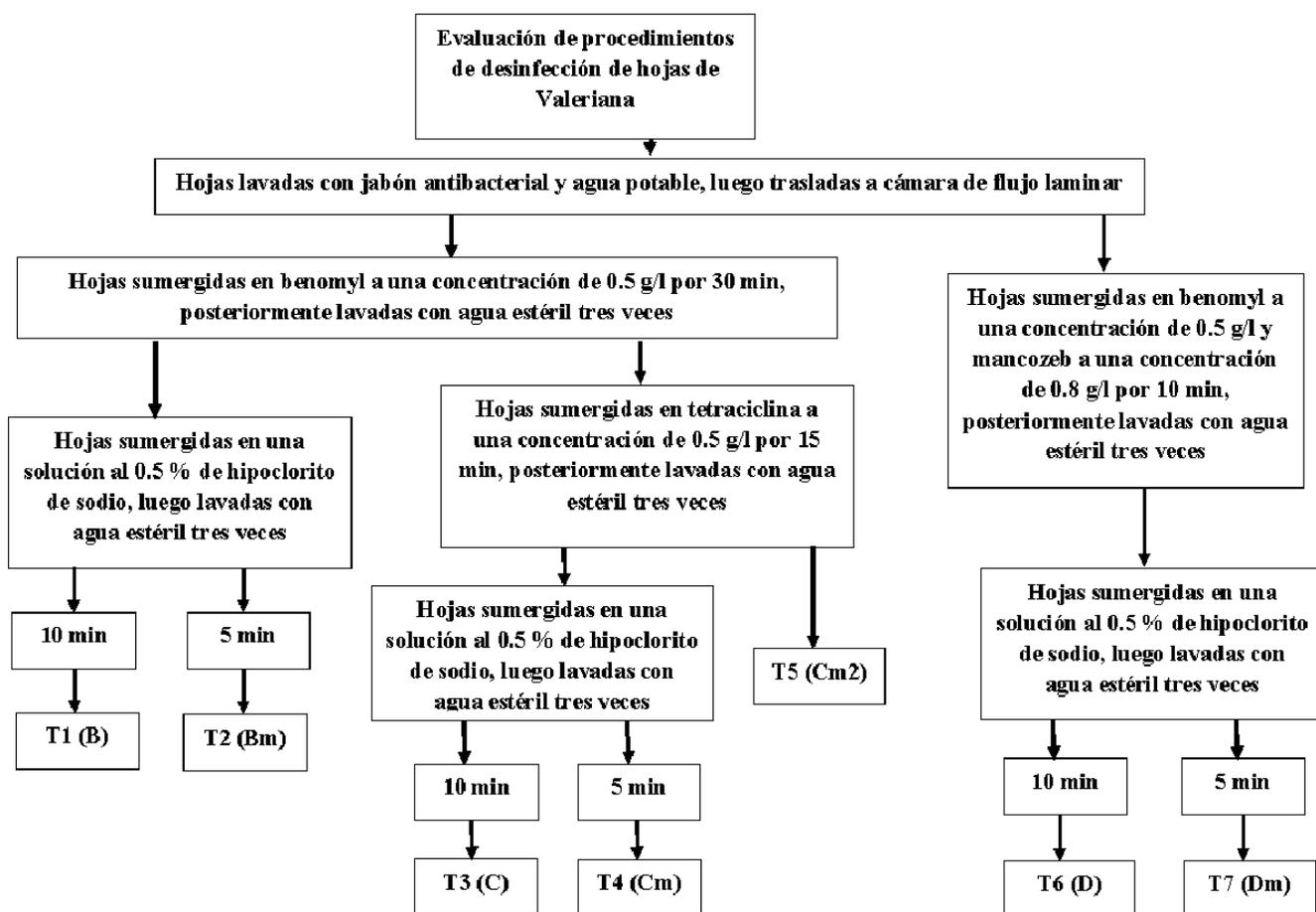


Figura 3. Metodología de la evaluación de procesos de desinfección de hojas de valeriana. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

B. Unidad experimental

La unidad experimental consistió de tres explantes de hoja de valeriana de dos centímetros cuadrados en una caja de Petri con 20 ml de medio MS.

C. Diseño experimental

Para la evaluación del efecto de los tratamientos para la desinfección de hojas de valeriana se utilizó el diseño experimental completamente al azar con siete tratamientos y cuatro repeticiones.

D. Variables de respuesta.

Las variables de respuesta fueron el número de explantes que presentaban contaminación y turgencia en cada unidad experimental. La contaminación se observó por la presencia de hongos o bacterias sobre los explantes y la turgencia se observó por la firmeza y expansión de las células de la epidermis de las hojas. Los datos obtenidos de estas variables de respuesta fueron registrados en una base de datos, se utilizó una hoja electrónica de Excel.

E. Análisis de datos

Los datos fueron analizados en el programa InfoStat, se utilizó para su análisis la prueba de Kruskal-Wallis (Carmona Medero, Rubios Torres, & Lemus Flores, 2002).

5.1.2. Inducción de organogénesis en rizoma de valeriana

A. Tratamientos

Para evaluar el efecto de BAP y ANA en la inducción de organogénesis en explantes de rizoma de valeriana, se utilizaron combinaciones de BAP y ANA y como medio basal fue utilizado el medio MS. El primer tratamiento al cual se le asignó el código TR1 estuvo constituido por la combinación de 1 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de ANA. El segundo tratamiento que fue identificado con el código TR2, estuvo constituido por la combinación de 1 mg/l de BAP y 1 mg/l de ANA, el tercer tratamiento se identificó con el código TR3 que estuvo constituido por 3 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de ANA, y en el cuarto tratamiento, que se identificó con el código TR4, se evaluaron 3 mg/l de BAP y 1 mg/l de ANA. En el cuadro 1 se muestran los tratamientos evaluados para la inducción de organogénesis en rizomas.

Cuadro 1. Tratamientos utilizados para la inducción de organogénesis en rizomas de valeriana. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

Código	Tratamientos
TR1	1 mg/l de BAP + 0.5 mg/l de ANA
TR2	1 mg/l de BAP + 1 mg/l de ANA
TR3	3 mg/l de BAP + 0.5 mg/l de ANA
TR4	3 mg/l de BAP + 1 mg/l de ANA

B. Unidad experimental para la evaluación de inducción de organogénesis en rizomas.

La unidad experimental para la evaluación de medios de cultivo con combinaciones de BAP y ANA estuvo constituida por cuatro explantes de rizoma de valeriana de dos centímetros cuadrado en una caja de Petri con 20 ml de medio de cultivo.

C. Diseño experimental

Para la evaluación de medios de inducción de organogénesis de rizoma de valeriana se utilizó el diseño experimental completamente al azar con cuatro tratamientos y seis repeticiones.

D. Variables de respuesta.

La variable de respuesta para la evaluación de la inducción de organogénesis en rizomas de valeriana fue la presencia de yemas adventicias sobre el explante de rizoma, por lo que no se pudo cuantificar.

5.1.3. Inducción de organogénesis en hojas

Para evaluar medios de cultivo en la inducción de organogénesis en hojas de valeriana se realizaron siete experimentos en los cuales se utilizaron combinaciones de BAP y ANA y como medio basal se utilizó el medio MS.

A) Tratamientos para inducir organogénesis en hojas de valeriana.

a) Tratamientos evaluados en el primer experimento

En el primer experimento para conocer el efecto de medios de cultivo para la inducción de organogénesis en hojas de valeriana se evaluaron seis tratamientos con seis repeticiones de cada uno. Al primero se le asignó el código THA1 y al segundo tratamiento el código THA2, en ambos tratamientos se utilizó 1 mg/l de BAP, al primero se le agregó 0.5 mg/l de ANA y al segundo 1 mg/l de ANA. El tercero se identificó con el código THA3 y cuarto con el código THA4 a ambos se les agregó 3 mg/l de BAP, al tercero se le agregó 0.5 mg/l de ANA y al cuarto fue agregado 1 mg/l de ANA. El quinto tratamiento se identificó con el código THA5 y el sexto tratamiento se identificó con el código THA6, a ambos se les agregó 5 mg/l de BAP, al quinto se le agregó 0.5 mg/l de ANA y al sexto le fue agregado 1 mg/l de ANA. En el cuadro 2 se muestra los códigos y tratamientos del primer experimento.

Cuadro 2. Tratamientos para evaluar la inducción de organogénesis en hojas de valeriana. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

Código	Tratamiento
THA1	1 mg/l de BAP + 0.5 mg/l ANA
THA2	1 mg/l de BAP + 1 mg/l ANA
THA3	3 mg/l de BAP + 0.5 mg/l ANA
THA4	3 mg/l de BAP + 1 mg/l ANA
THA5	5 mg/l de BAP + 0.5 mg/l ANA
THA6	5 mg/l de BAP + 1 mg/l ANA

b) Tratamientos evaluados en el segundo experimento

En el segundo experimento para conocer el efecto de medios de cultivo para la inducción de organogénesis en hojas de valeriana se evaluaron cuatro tratamientos con cuatro repeticiones de cada uno. Al primero se le asignó el código THB1 y al segundo tratamiento el código THB2, en ambos tratamientos se utilizó 3 mg/l de BAP, al primero se le agregó 0.5 mg/l de ANA y al segundo 1 mg/l de ANA, a ambos medios de cultivo se les agregó 1 % de carbón activado. El tercer tratamiento se identificó con el código THB3 y cuarto con el código THB4 a ambos se les agregó 3 mg/l de BAP, al tercero se le agregó 0.5 mg/l ANA y al cuarto le fue agregado 1 mg/l de ANA. En el cuadro 3 se muestra los códigos y tratamientos del segundo experimento.

Cuadro 3. Tratamientos para evaluar efecto de carbón activado en la inducción de organogénesis en hojas de valeriana. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

Código	Tratamiento
THBC1	3 mg/l de BAP + 0.5 mg/l ANA + 1 % carbón activado
THBC2	3 mg/l de BAP + 1 mg/l ANA + 1 % carbón activado
THBC3	3 mg/l de BAP + 0.5 mg/l ANA
THBC4	3 mg/l de BAP + 1 mg/l ANA

c) Tratamientos evaluados en el tercer experimento

En el tercer experimento para conocer el efecto de medios de cultivo para la inducción de organogénesis en hojas de valeriana se evaluaron tres tratamientos con seis repeticiones de cada uno. Al primero se le asignó el código THC1 y al segundo tratamiento el código THC2, en ambos tratamientos se utilizó 10 mg/l de BAP, al primero tratamiento se le agregó 2 mg/l de ANA y al segundo no se le agregó ANA. El tercer tratamiento se identificó con el código THC3 y estuvo constituido por 5 mg/l de BAP. Los explantes permanecieron por 15 días en los medios de inducción. En el cuadro 4 se muestra los códigos y tratamientos del tercer experimento.

Cuadro 4. Tratamientos para evaluar la inducción de organogénesis en hojas de valeriana. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

Código	Tratamiento
THC1	10 mg/l de BAP + 2 mg/l ANA
THC2	10 mg/l de BAP
THC3	5 mg/l de BAP

d) Tratamientos evaluados en el cuarto experimento

En el cuarto experimento para conocer el efecto de medios de cultivo para la inducción de organogénesis en hojas de valeriana se evaluaron cuatro tratamientos con 10 repeticiones cada uno. Al primer tratamiento se asignó el código THD1 y al segundo tratamiento el código THD2, en ambos tratamientos se utilizó 5 mg/l de BAP, al primero se le agregó 0.5 mg/l de ANA y al segundo 1 mg/l de ANA. El tercero se identificó con el código THD3 y cuarto con el código THD4 a ambos se les agregó 10 mg/l de BAP, al tercero no se le agregó ANA y al cuarto le fue agregado 2 mg/l de ANA. En todos los tratamientos se adicionó al medio de cultivo 0.2 mg/l de benomyl. Los explantes permanecieron por 15 días en los medios de inducción. En el cuadro 5 se muestra los códigos y tratamientos del cuarto experimento.

Cuadro 5. Tratamientos evaluados para inducir organogénesis en hojas de valeriana. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

Código	Tratamiento
THD1	5 mg/l de BAP + 0.5 mg/l ANA
THD2	5 mg/l de BAP + 1.0 mg/l ANA
THD3	10 mg/l de BAP
THD4	10 mg/l de BAP + 2 mg/l ANA

e) Tratamientos evaluados en el quinto experimento

En el quinto experimento para la evaluación de medios de cultivo para la inducción de organogénesis en hojas de valeriana se evaluaron dos tratamientos con cuatro repeticiones

de cada uno. Al primer tratamiento se asignó el código THE1 y al tratamiento dos el código THE2, el primero estuvo constituido por 2 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de ANA y el segundo por 5 mg/l de BAP y 1mg/l de ANA. En todos los tratamientos se adicionó al medio de cultivo 0.2 mg/l de benomyl. Los explantes permanecieron por ocho días en los medios de inducción En el cuadro 6 se muestran los códigos y los tratamientos que se evaluaron en el quinto experimento.

Cuadro 6. Tratamientos evaluados para inducir organogénesis en hojas de valeriana. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

Tratamiento	Descripción
THE1	2 mg/l de BAP + 0.5 mg/l ANA
THE2	5 mg/l de BAP + 1.0 mg/l ANA

f) Tratamientos del sexto experimento

En el sexto experimento para la evaluación de medios de cultivo para la inducción de organogénesis en hojas de valeriana se asignó al tratamiento uno el código THF1, el cual estuvo constituido por la combinación de 1 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de ANA. Al segundo, tercer y cuarto tratamientos se les asignaron los códigos THF2, THF3 y THF4, respectivamente; a todos estos tratamientos se les agregó 1 mg/l de ANA y al segundo, tercero y cuarto tratamiento les fueron agregado 2 mg/l, 3 mg/l y 5 mg/l de BAP, respectivamente. Los explantes permanecieron por ocho días en los medios de inducción. En el cuadro 7 se muestran los códigos y los tratamientos que se evaluaron en el sexto experimento.

Cuadro 7. Tratamientos utilizados de prueba para evaluar reguladores de crecimiento. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

Tratamiento	Descripción
THF1	1 mg/l de BAP + 0.5 mg/l ANA
THF2	2 mg/l de BAP + 1.0 mg/l ANA
THF3	3 mg/l de BAP + 1.0 mg/l ANA
THF4	5 mg/l de BAP + 1.0 mg/l ANA

g) Tratamientos del séptimo experimento

En el séptimo experimento para la evaluación de medios de cultivo para la inducción de organogénesis en hojas de valeriana se asignó al tratamiento uno el código THG1, el cual estuvo constituido por la combinación de 0.25 mg/l de BAP. Al segundo tratamiento se le asignó el código THG2 constituido por la combinación de 0.5 mg/l de BAP y el tercer tratamiento se le asignó el código THG3 constituido por la combinación de 1 mg/l de BAP. En el cuadro 8 se muestran los códigos y los tratamientos que se evaluaron en el séptimo experimento.

Cuadro 8. Tratamientos utilizados de prueba para evaluar reguladores de crecimiento. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

Tratamiento	Descripción
THG1	0.25 mg/l de BAP
THG2	0.5 mg/l de BAP
THG3	1 mg/l de BAP

B) Unidad experimental

En todos los experimentos la unidad experimental consistió de cuatro explantes de hoja de dos centímetros cuadrados en una caja de Petri con 20 ml de medio de cultivo.

C) Diseño experimental

En todos los experimentos, se utilizó el diseño experimental completamente al azar con el número de tratamientos que se describe para cada uno de ellos. El número de repeticiones de cada tratamiento en cada uno de los experimentos se menciona en la descripción que se hace de cada uno de ellos en este documento.

D) Variable de respuesta.

La variable de respuesta para la evaluación de la inducción de organogénesis en hojas de valeriana fue el número de yemas adventicias o brotes desarrollados sobre cada uno de los explantes. Por lo tanto no se pudo cuantificar.

5.1.4. Inducción de callo en hojas de valeriana.

A) Tratamientos evaluados en los experimentos de inducción de callo.

a) Tratamientos evaluados en el primer experimento

En el primer experimento para conocer el efecto de medios de cultivo para la inducción de callo en hojas de valeriana se evaluaron tres tratamientos con 10 repeticiones cada uno. Al primero se le asignó el código TCA1 y se le agregó 0.1 mg/l de 2,4-D, el segundo tratamiento se identificó con el código TCA2 y se le agregó 0.5 mg/l de 2,4-D. Al tercer tratamiento se le asignó el código TCA3 y se le agregó 1 mg/l de 2,4-D. En el cuadro 9 se muestra los códigos y tratamientos del primer experimento para la evaluación de la respuesta de las hojas de valeriana a la inducción de callo.

Cuadro 9. Tratamientos para evaluar la respuesta de hojas de valeriana a la inducción de callo, primer experimento. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

Código	Tratamientos
TCA1	0.1 mg/l de 2,4-D
TCA2	0.5 mg/l de 2,4-D
TCA3	1.0 mg/l de 2,4-D

b) Tratamientos evaluados en el segundo experimento

En el segundo experimento para conocer el efecto de medios de cultivo para la inducción de callo en hojas de valeriana se evaluaron seis tratamientos con seis repeticiones de cada uno. Al primero se le asignó el código TCB1 al cual se le agregó 2 mg/l de 2,4-D, el segundo tratamiento se identificó con el código TCB2 y se le agregó 5 mg/l de 2,4-D. Al tercer tratamiento se le asignó el código TCB3, el cual se le agregó 2 mg/l de IBA, el cuarto tratamiento se identificó con el código TCB4 y se le agregó 5 mg/l de IBA. Al quinto tratamiento se le asignó el código TCB5, que se le agregó 2 mg/l de 2,4-D combinado con 5 mg/l de IBA, Al sexto tratamiento se le asignó el código TCB6, se le agregó 5 mg/l de 2,4-D combinado con 2 mg/l de IBA. En el cuadro 10 se muestra los códigos y los tratamientos evaluados en el segundo experimento.

Cuadro 10. Tratamientos para evaluar la respuesta a la inducción de callo de hojas de valeriana, segundo experimento. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

Código	Tratamientos
TCB1	2 mg/l 2,4-D
TCB2	5 mg/l 2,4-D
TCB3	2 mg/l IBA
TCB4	5 mg/l IBA
TCB5	2 mg/l 2,4-D + 5 mg/l IBA
TCB6	5 mg/l 2,4-D + 2 mg/l IBA

c) Tratamientos evaluados en el tercer experimento

En el tercer experimento para conocer el efecto de medios de cultivo para la inducción de callo en hojas de valeriana se evaluaron tres tratamientos con seis repeticiones de cada uno. Al primero se le asignó el código TCC1, al segundo tratamiento el código TCC2, y al tercer tratamiento el código TCC3, en todos los tratamientos se utilizó 0.1 mg/l de Kinetina, la concentración de 2,4-D fue diferente en los tratamientos, al primero tratamiento se le agregó 2 mg/l, al segundo tratamiento se le agregó 5 mg/l y al tercer tratamiento se le

agregó 10 mg/l. En el cuadro 11 se muestra los códigos y tratamientos del tercer experimento en el cual se evaluó la inducción de callo en valeriana.

Cuadro 11. Tratamientos evaluados para inducir callo en hojas de valeriana, en tercer experimento. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

Código	Tratamientos
TCC1	0.1 mg/l Kinetina + 2 mg/l 2,4-D
TCC2	0.1 mg/l Kinetina + 5 mg/l 2,4-D
TCC3	0.1 mg/l Kinetina + 10 mg/l 2,4-D

d) Tratamientos evaluados en el cuarto experimento

En el cuarto experimento para conocer el efecto de medios de cultivo para la inducción de callo en hojas de valeriana se evaluaron tres tratamientos con cinco repeticiones de cada uno. Al primero se le asignó el código TCD1, al segundo tratamiento el código TCD2, y al tercer tratamiento el código TCD3, en todos los tratamientos se utilizó 0.1 mg/l de Kinetina, la concentración de 2,4-D fue diferente en los tratamientos, de la forma siguiente: al primero tratamiento se le agregó 5 mg/l de 2,4-D, al segundo tratamiento se le agrego 10 mg/l y al tercer tratamiento se le agrego 15 mg/l. En todos los tratamientos se adicionó al medio de cultivo 0.2 mg/l de benomyl. En el cuadro 12 se muestra los códigos y tratamientos del cuarto experimento que se realizó para evaluar la respuesta de las hojas de valeriana a la inducción de callo.

Cuadro 12. Tratamientos utilizados para evaluar la respuesta de hojas de valeriana a la inducción del callo, cuarto experimento. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

Código	Tratamientos
TCD1	0.1 mg/l Kinetina + 5 mg/l 2,4-D
TCD2	0.1 mg/l Kinetina + 10 mg/l 2,4-D
TCD3	0.1 mg/l Kinetina + 15 mg/l 2,4-D

B) Unidad experimental

En todos los experimentos en los que se evaluó la respuesta de hoja de valeriana a la inducción de callo, la unidad experimental consistió de cuatro explantes de hoja de dos centímetros cuadrados en una caja de Petri con 20 ml de medio de cultivo.

C) Diseño experimental

En todos los experimentos para la evaluación de la respuesta de hojas de valeriana a la inducción de callo se utilizó el diseño experimental completamente al azar con el número de tratamientos y de repeticiones que se describe en cada uno.

D) Variable de respuesta.

La variable de respuesta para la evaluación de la inducción de callo en hojas de valeriana considerada fue la presencia de callo en los explantes, el cual no se pudo cuantificar.

5.2. Manejo del experimento

5.2.1. Materiales y equipo

- Agua estéril
- Agitadores
- Alcohol
- Bisturís
- Autoclave
- Balanza analítica
- Beakers
- Matraces de Erlenmeyer
- Tubo de ensayo
- Agua desmineralizada
- Estufa con agitación magnética
- Cámara de flujo laminar
- Frascos de vidrio
- Papel aluminio
- Pinzas
- Jabón antibacterial
- Potenciómetros
- Reguladores de crecimiento
- Atomizadores
- Encendedores
- Hipoclorito de sodio
- Soluciones madres
- Marcadores
- Mecheros
- Papel cristal
- Hules
- Cajas de Petri estériles
- Agar
- $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$
- KNO_3
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- KH_2PO_4
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Na_2EDTA
- $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- H_3BO_3
- KI
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- Myo-inositol
- Ácido Nicotínico
- Piridoxina-HCl
- Tiamina-HCl
- Glicina
- Tetraciclina
- Benomyl
- Mancozeb

5.2.2. Área experimental

La evaluación de procedimientos de desinfección y de medios de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en hojas de valeriana (*Valeriana prionophylla* Standl.), se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, ubicado en el tercer nivel del edificio T-8.

5.2.3. Condiciones del cultivo

Las condiciones que presenta el cuarto de incubación donde fueron colocados los cultivos son: intensidad lumínica de 1,000 lux a 3,000 lux, fotoperíodo de 16 h luz por 8 h de oscuridad, temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa del 70 % a 80 %.

5.2.4. Determinación de la planta

Se obtuvo muestras de la planta (rizoma, tallo, hojas, flores y frutos), se consultó la Flora de Guatemala y con el uso de claves taxonómicas se determinó la especie.

5.2.5. Colecta, cultivo y acondicionamiento de plantas

Las plantas de valeriana se colectaron en el caserío Ciénaga Grande, municipio Santa Lucía Utatlán en el departamento de Sololá, posteriormente se trasladaron a macetas con diámetro de 22.5 cm y profundidad de 16 cm, se preparó una mezcla de suelo y arena en proporción 3:1, en esta mezcla fueron sembradas las plantas, las que se ubicaron en un lugar sombreado, se regaron cada tres días, fueron fertilizadas con fertilizante foliar. Así también se asperjaron con pesticidas e insecticidas de acuerdo a la presencia de plagas o enfermedades. Para reducir la contaminación por patógenos fueron asperjadas con benomyl a una concentración de 0.5 g/l. Se observó su desarrollo y cuando las mismas se establecieron y desarrollaron hojas sanas se obtuvo de ellas sus rizomas y hojas para ser utilizadas como explantes en la investigación.

5.2.6. Medios de cultivos

Se utilizó como medio basal el medio Murashige y Skoog (MS) (Dodds & Roberts, 1985), cuyos componentes se muestran en el anexo 1. A este medio basal se agregaron los reguladores del crecimiento en las concentraciones que se indican en cada uno de los tratamientos descritos en la metodología experimental.

5.2.7. Preparación de medios de cultivo

Para preparar los medios de cultivo se utilizó soluciones concentradas, las que se prepararon en función de los componentes del medio basal Murashige y Skoog. Las soluciones concentradas de los reguladores de crecimiento se prepararon en concentraciones 1000X teniendo como referente un miligramo por litro. El procedimiento para la preparación de las soluciones concentradas se muestra en el anexo 2.

Los medios de cultivo tuvieron como medio basal el MS, se prepararon utilizando las soluciones concentradas, cuyo procedimiento de preparación se muestra en el anexo 3. Se utilizó en todos los medios 3 % de sucrosa, 0.7 % de agar y el pH fue de 5.7.

Para los medios de inducción de organogénesis y de callo, se prepararon soluciones concentradas de reguladores de crecimiento (BAP, ANA, 2,4-D, Kinetina, IBA), y se adicionó a éstos concentraciones para las diferentes evaluaciones realizadas. Los medios de desarrollo se prepararon con medio MS sin adición de reguladores de crecimiento.

Todos los medios de cultivo fueron preparados y posteriormente esterilizados en Matraces de Erlenmeyer, en una autoclave a 15 psi por 15 min, a una temperatura de 121 °C, después se trasladaron a la cámara de flujo laminar en donde se procedió a verter 20 ml de medio de cultivo en cada una de las cajas de Petri, según correspondía el tratamiento.

Las cajas de Petri se almacenaron en cajas de cartón, una vez solidificado el medio se utilizaron para hacer las siembras o transferencias.

5.2.8. Preparación de la cámara de flujo laminar

La cámara de flujo laminar fue puesta a funcionar 15 min antes de iniciar el trabajo en ella, se desinfectó con una solución de etanol al 70 % la cual fue asperjada con atomizador manual en las paredes, techo y mesa. Posteriormente el exceso de la solución de etanol aplicada se secó con papel absorbente. Al mismo tiempo se preparó el mechero, la solución de etanol al 95 % para flamear y se desinfectó por medio de flameo los instrumentos que se utilizaron en el trabajo que se realizó.

5.2.9. Control de patógenos en las plantas de valeriana

Las plantas cultivadas en macetas fueron asperjadas con benomyl a una concentración de 0.5 g/l, el cual se aplicó al área foliar y al suelo, cada dos días por ocho días.

5.2.10. Aplicación de benomyl al medio de cultivo

Con base en información que se obtuvo de trabajos de investigación Ferreira de Santana, Paiva, Ibrahim Aloufa, & Pinto de Lemos (2003), en los cuales se utilizó benomyl en medios de cultivo, se adicionó benomyl a una concentración de 0.2 mg/l en algunos medios de cultivos evaluados para la inducción de organogénesis y callo, en la metodología experimental se mencionan los tratamientos en los cuales fue utilizado.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Procedimiento de desinfección de hojas

La menor contaminación de hojas se observó cuando éstas fueron lavadas con jabón antibacterial y agua potable, posteriormente fueron colocadas en benomyl a una concentración de 0.5 g/l por 30 min, después fueron colocadas en una solución que contenía 0.5 % hipoclorito de sodio por 10 min, finalmente fueron lavadas tres veces con agua estéril y colocadas en los medios de cultivo. Con este procedimiento se observó el 18.75 % de unidades experimentales con contaminación. El segundo mejor procedimiento observado fue una variante del mencionado anteriormente, esta variación consistió en el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio comercial, en este tratamiento el tiempo de inmersión fue cinco minutos y el porcentaje de contaminación fue del 43.75 % En los otros tratamientos evaluados la contaminación se observó en todas las unidades experimentales.

Existe diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en los tratamientos de desinfección evaluados, la prueba de Kruskal-Wallis muestra tres grupos, un primer grupo lo conforma el tratamiento de desinfección en el cual las hojas fueron lavadas con agua potable y jabón antibacterial, posteriormente colocadas en benomyl a una concentración de 0.5 g/l por 30 min, luego colocadas en una solución que contenía 0.5 % hipoclorito de sodio por 10 min y posteriormente sembradas en el medio de cultivo. El segundo grupo lo constituye el tratamiento que es una variante del procedimiento antes descrito, en este tratamiento la diferencia es el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio, el cual fue de cinco minutos. Un tercer grupo lo conforman el resto de tratamientos en donde la contaminación se observó en todas las unidades experimentales. En el cuadro 13 se muestra los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis de la evaluación de tratamientos de desinfección de hojas.

Cuadro 13. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis en la evaluación de procesos de desinfección de explante de hoja de valeriana. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medias	H	P
Escala	T1 (B)	7	1.71	0.49	2.00	8.76	0.0001
Escala	T2 (Bm)	7	1.14	0.38	1.00		
Escala	T3 (C)	7	1.00	0.00	1.00		
Escala	T4 (Cm)	7	1.00	0.00	1.00		
Escala	T5 (Cm2)	7	1.00	0.00	1.00		
Escala	T6 (D)	7	1.00	0.00	1.00		
Escala	T7 (Dm)	7	1.00	0.00	1.00		

Tratamiento	Medias	Rangos
T5 (Cm2)	1.00	A
T6 (D)	1.00	A
T7 (Dm)	1.00	A
T4 (Cm)	1.00	A
T3 (C)	1.00	A
T2 (Bm)	1.14	A B
T1 (B)	1.71	B

Al evaluar la turgencia de los explantes de hoja de valeriana como complemento de las pruebas de desinfección se observó que las hojas mantuvieron la turgencia por 15 días, después se observó necrosis en los bordes y partes del limbo hasta tornarse todas de color café oscuro, esto último se observó 30 días después de haber sido colocadas las hojas en el medio de cultivo. La prueba de Kruskal-Wallis no muestra diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) en la turgencia de las hojas para los diferentes tratamientos de desinfección, en el cuadro 14 se muestran los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para la turgencia de los explantes de hoja, en la figura 4 se muestra una comparación entre los dos procedimientos de desinfección en los que se observaron mejores resultados y en la figura 5 se muestran los explantes de hoja 15 días después de haber sido colocados en medios de cultivo.

Cuadro 14. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis en la evaluación de turgencia en explantes de hoja de valeriana según procedimiento de desinfección. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medias	H	P
Escala	T1 (B)	7	1.00	0.00	1.00	6.60	0.1492
Escala	T2 (Bm)	7	1.14	0.38	1.00		
Escala	T3 (C)	7	1.57	0.53	2.00		
Escala	T4 (Cm)	7	1.57	0.53	2.00		
Escala	T5 (Cm2)	7	1.57	0.53	2.00		
Escala	T6 (D)	7	1.29	0.49	1.00		
Escala	T7 (Dm)	7	1.43	0.53	1.00		

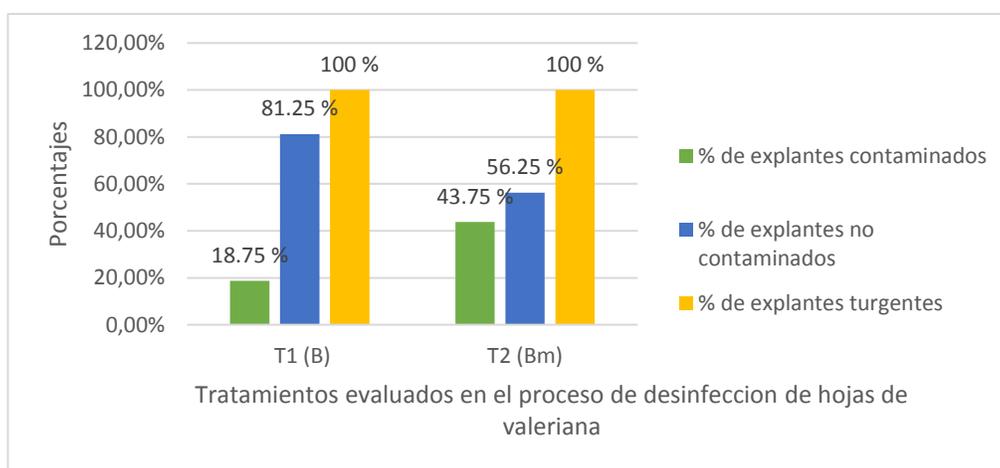


Figura 4. Comparación de los dos mejores tratamientos de desinfección en relación a la contaminación y la turgencia de los explantes. B, el mejor tratamiento de desinfección de hojas y Bm representa el segundo mejor tratamiento de desinfección de hojas. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.



Figura 5. Explantes de hoja de valeriana 15 días después de haber sido desinfectados con el mejor tratamiento. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

6.1.1. Inducción de organogénesis en rizoma de valeriana

Cuando se utilizó como explante el rizoma de valeriana no se observó respuesta organogénica debido a que en todas las unidades experimentales se presentó contaminación por hongos y bacterias. Esta contaminación se debió a la alta cantidad de exudados que son producidos por el rizoma de valeriana al ser cortado, así como por la estructura de la epidermis, la cual es plegada y por ello se hace difícil la desinfección. En la figura 6 se muestran cortes de rizoma en la cual se puede observar los pliegues de la epidermis. En la figura 7 se muestran los tratamientos que fueron evaluados en donde se puede observar la contaminación en los explantes en cada unidad experimental.



Figura 6. Corte de rizoma de valeriana en donde se muestran los pliegues de la epidermis. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.



Figura 7. Explantes de rizoma de valeriana en medios de cultivo para la inducción de yemas adventicias contaminados por bacterias y hongos. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

El rizoma no es una opción adecuada para ser utilizada como explante en la propagación in vitro de valeriana debido a los exudados que presenta y los pliegues de la epidermis, lo cual hace muy difícil la desinfección para su cultivo. Quispe Calle (2009) afirma que los rizomas son explantes con alta contaminación que provienen, ya sea de macetas o de campo abierto, al estar en contacto directo con el suelo se contaminan con una diversidad de patógenos por lo que su desinfección es imposible.

6.2. Inducción de organogénesis en hojas de valeriana.

6.2.1. Resultados del primer experimento

Cuando se evaluaron medios de cultivo con 1, 3 y 5 mg/l de BAP combinados 0.5 mg/l y 1 mg/l de ANA, a los ocho días de haber colocado los explantes en medio de cultivo se observó que los tratamientos que contenían 3 y 5 mg/l de BAP mostraron turgencia y coloración verde, a los 15 días se observó necrosis en los bordes, luego se extendió por todo el explante hasta observarse totalmente necrosados.

6.2.2. Resultados del segundo experimento

Cuando se evaluaron medios de inducción con 3 mg/l de BAP combinados 0.5 mg/l y 1 mg/l de ANA, a los ocho días de haber colocado los explantes en medio de cultivo se observó que en todos los tratamientos los explantes mostraron turgencia y coloración verde, a los 15 días se observó necrosis en los bordes de las hojas, después de 25 días los explantes se observaron necróticos.

6.2.3. Resultados del tercer experimento

Cuando se evaluaron medios de cultivo con 5 mg/l de BAP, 10 mg/l de BAP y 10 mg/l de BAP con 2 mg/l de ANA, los explantes de hoja se mantuvieron turgentes los 15 días que se mantuvieron en medio de inducción, en este medio se observó que los explantes del tratamiento que contenía 10 mg /l de BAP y 2 mg/l de ANA cambiaron de coloración verde a café claro y los explantes colocados en los medios con 10 mg/l y 5 mg/l de BAP mantuvieron la coloración verde. Al ser trasladados los explantes a los medios de desarrollo, los que provenían del medio que contenía 10 mg/l de BAP y 2 mg/l de ANA se tornaron café claro a los cinco días después de su traslado. Los explantes provenientes del medio que contenían 10 mg/l de BAP mostraron división celular (protuberancias) y

necrosis en los bordes, la cual se extendió en 10 días por todo el explante. Los explantes provenientes del medio de cultivo que contenía 5 mg/l de BAP mantuvieron por 15 días la coloración verde, después se observó necrosis en los bordes, la cual se extendió por todo el explante a los 25 días, en la figura 8 se muestran los explantes en el medio de inducción con las combinaciones de reguladores de crecimiento evaluadas y en la figura 9 se muestra la apariencia de los explantes ocho días después de haber sido trasladados al medio de desarrollo.



Figura 8. A. Explantes de hoja de valeriana colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 10 mg/l de BAP y 2 mg/l ANA. B. Explantes de hoja de valeriana colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 10 mg/l de BAP. C. Explantes de hoja de valeriana en medios de inducción de organogénesis conteniendo 5 mg/l de BAP, 15 días después de la siembra. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.



Figura 9. A. Explantes, provenientes del medio que contenía 10 mg/l de BAP y 2 mg/l de ANA, necrosados cinco días después de su traslado a medios de desarrollo. B. Explantes provenientes del medio que contenía 10 mg/l de BAP, necrosados 10 días después de ser colocados en medios de desarrollo. C. Explantes, proveniente del medio que contenía 5 mg/l de BAP necrosados 25 días después de ser trasladados a medios de desarrollo. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

6.2.4. Resultados del cuarto experimento

Cuando se utilizaron 5 mg/l de BAP y 10 mg/l de BAP combinados con 0.5 mg/l de ANA y 1 mg/l de ANA, así como 10 mg/l de BAP combinados por 2 mg/l de ANA y sin la adición de ANA, los explantes se mostraron turgentes y con signos de división celular a los 15 días en el medio de inducción. Cinco días después de haber sido transferidos al medio sin reguladores de crecimiento se observó necrosis en los bordes de los explantes y en diferentes partes del área del explante, las partes necróticas se extendieron hasta cubrir todo el explante, observándose áreas con signos de división celular (abultamientos también necrosadas).

En la figura 10 se muestran en A explantes turgentes en medios de inducción, en B explantes necrosados y en C explantes necrosados con aumento de 10X.

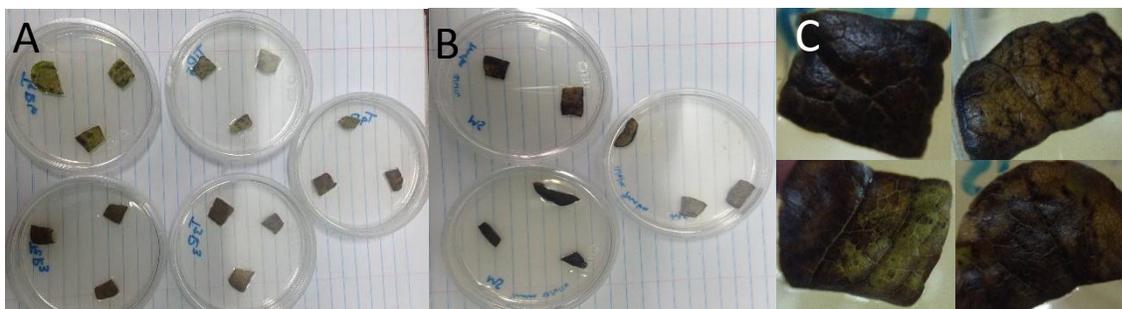


Figura 10. A. Explantes en medios de inducción a los 15 días antes de su transferencia a medios de desarrollo. B. Explantes cinco días después de ser transferidos a medios de desarrollo. C. Explantes deshidratados, cinco días después de transferidos a medios de desarrollo. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

6.2.5. Resultados del quinto experimento

Cuando se utilizaron 2 mg/l de BAP combinado con 0.5 mg/l de ANA y 5 mg/l de BAP combinado con 1 mg/l de ANA los explantes se mantuvieron turgentes en los ocho días que estuvieron en los medios de inducción, al ser transferidos a los medios de desarrollo la turgencia la mantuvieron por 15 días a partir de los cuales se observó necrosamiento en los bordes y en algunas partes del explante, éstas áreas necróticas se extendieron por todo el explante hasta observarse totalmente necrosado 20 días después de haber sido transferido

al medio de desarrollo. En la figura 11 se muestran los explantes de los tratamientos evaluados en los medios de inducción a los ocho días de ser colocados en los medios de inducción y en la figura 12 se muestran los explantes a los 15 días después de haber sido transferidos a los medios de desarrollo.

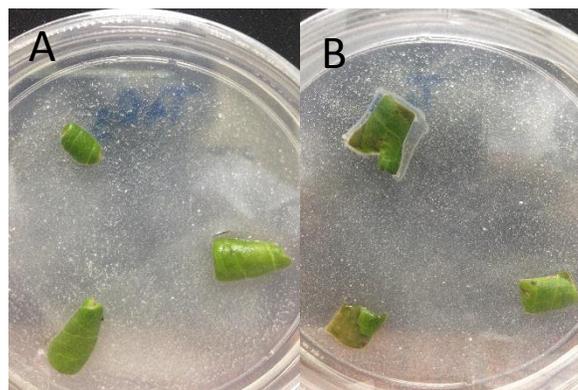


Figura 11. A. Explantes de hoja de valeriana colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 2 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de ANA. B. explantes de hoja de valeriana colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 5 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de ANA. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

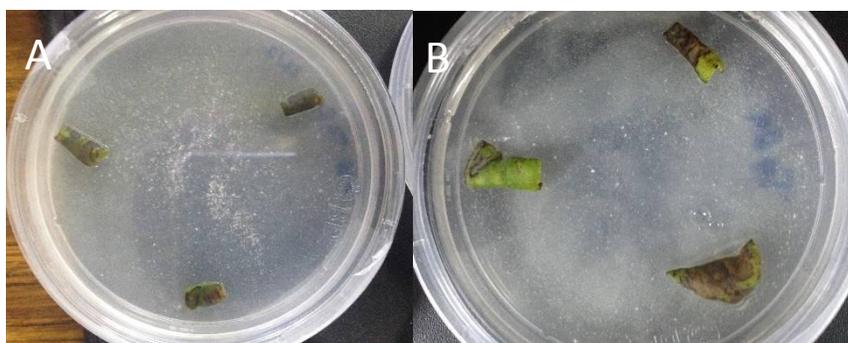


Figura 12. Aspecto de los explantes de hoja 15 días después de haber sido transferidos a medios de desarrollo. A. Explantes de hoja de valeriana colocados en medios de desarrollo proveniente de 2 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de ANA. B. Explantes de hojas de valeriana proveniente de 5 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de ANA. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

6.2.6. Resultados del sexto experimento

Cuando se evaluaron medios de cultivo con 1, 2, 3 y 5 mg/l de BAP, el primero combinado con 0.5 mg/l de ANA y los otros tres con 1 mg/l de ANA, los explantes mantuvieron turgentes a los ocho días en los medios de inducción, 15 días después de haber sido

trasladados a los medios desarrollo se observó necrosamiento en los bordes y algunas partes del explante, la necrosis se extendió por todo el explantes hasta observarse totalmente necrosados a los 25 días después de haber sido trasladados a los medio de desarrollo. En la figura 13 se muestran los explantes a los ocho días después de haber sido colocados en los medios de inducción, previo su traslado a los medios de desarrollo y en la figura 14 se muestran los explantes a los 15 días después de haber sido trasladados a los medios de desarrollo.

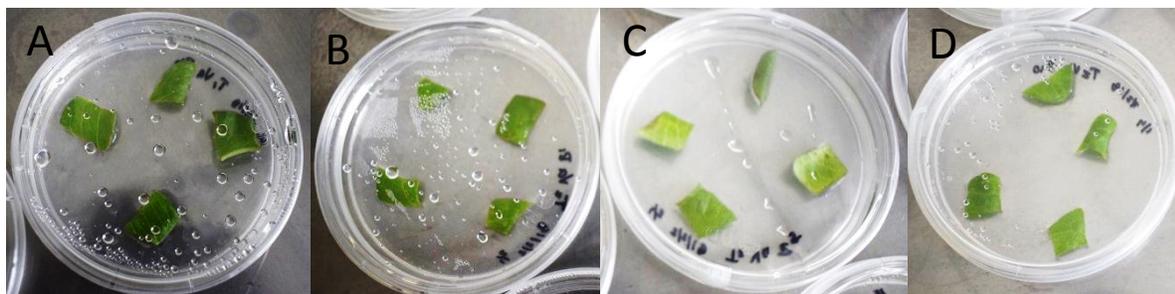


Figura 13. Apariencia de los explantes de hoja de valeriana ocho días después de haber sido colocados en medios de inducción. A. Explantes colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 1 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de ANA. B. Explantes colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 2 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de ANA. C. Explantes colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 3 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de ANA. D. Explantes colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 5 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de ANA. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

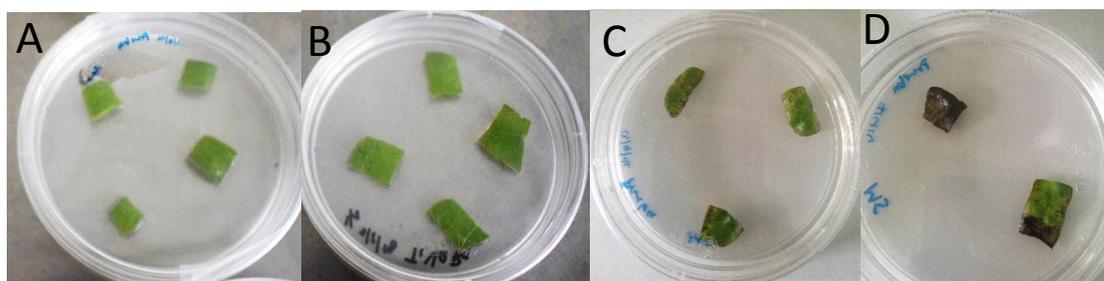


Figura 14. Apariencia de los explantes de hoja de valeriana 15 días después de su traslado a medios de desarrollo. A. Explantes provenientes de medio de inducción que contenía 1 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de ANA. B. Explantes proveniente de medio de inducción que contenía 2 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de ANA. C. Explantes proveniente de medio de inducción que contenía 3 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de ANA. D. Explantes proveniente de medio de inducción que contenía 5 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de ANA. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

6.2.7. Resultados del séptimo experimento

Cuando se evaluaron medios de cultivo con 0.25, 0.5 y 1 mg/l de BAP, los explantes mantuvieron turgentes a los cinco días en los medios de inducción, a los ocho días que se realizó el traslado a medios de desarrollo, algunos de estos ya se encontraban necrosados, fueron trasladados únicamente los que presentaban color verde, a los ocho días después de haber sido trasladados a los medios desarrollo, la necrosis se extendió por todo el explantes. En la figura 15 se muestran los explantes a los ocho días antes de su traslado a medios de desarrollo y en la figura 16 se muestran los explantes a los ocho días después de haber sido trasladados a los medios de desarrollo.

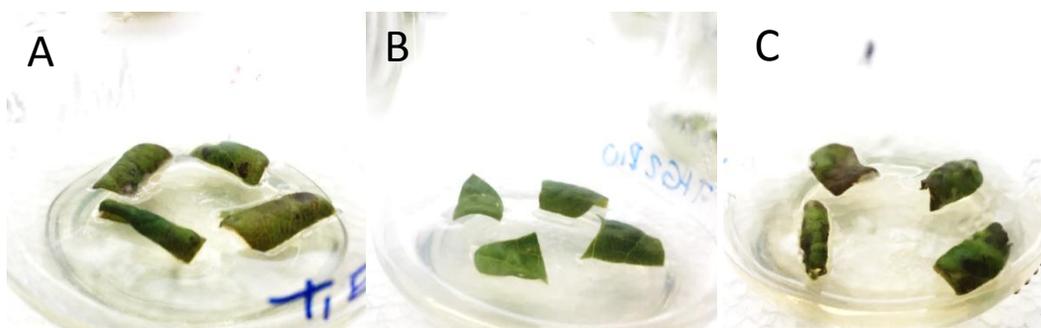


Figura 15. Apariencia de los explantes de hoja de valeriana ocho días después de haber sido colocados en medios de inducción. A. Explantes colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 0.25 mg/l de BAP. B. Explantes colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 0.5 mg/l de BAP. C. Explantes colocados en medios de inducción de organogénesis conteniendo 1 mg/l de BAP. D. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

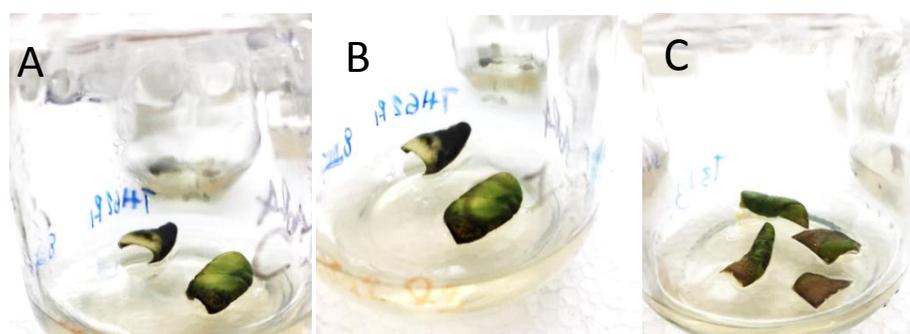


Figura 16. Apariencia de los explantes de hoja de valeriana ocho días después de su traslado a medios de desarrollo. A. Explantes provenientes de medio de inducción que contenía 0.25 mg/l de BAP. B. Explantes proveniente de medio de inducción que contenía 0.5 mg/l de BAP. C. Explantes proveniente de medio de inducción que contenía 1 mg/l de BAP. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

6.3. Inducción de callo en hojas de valeriana

6.3.1. Resultados del primer experimento de inducción de callo

Cuando se utilizaron 0.1, 0.5 y 1.0 mg/l de 2,4-D los explantes se mostraron turgentes y con signos de división celular a los ocho días después de la siembra en medios de inducción de callo. A los 15 días se observó pérdida de turgencia hasta mostrar necrosis de los bordes hacia el centro del explante. En la figura 17 se muestran los explantes en el medio de inducción de callo con las diferentes concentraciones de 2,4-D evaluadas, 15 días después de haberse colocado en dicho medio.



Figura 17. A. Explantes de valeriana en medio de inducción de callo una concentración de 0.1 mg/l de 2,4-D. B. Explantes de valeriana en medio de inducción a una concentración de 0.5 mg/l de 2,4-D. C. Explantes de valeriana en medio de inducción de callo a una concentración de 1.0 mg/l de 2,4-D. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

6.3.2. Resultados del segundo experimento de inducción de callo

Cuando se evaluaron concentraciones de 5 y 2 mg/l de 2,4-D, 2 y 5 mg/l de IBA, y las combinaciones de 2 mg/l de 2,4-D con 5 mg/l de IBA y 5 mg/l de 2,4-D con 2 mg/l de IBA, los explantes de hoja se mantuvieron turgentes los 15 días que estuvieron en medio de inducción de callo, posteriormente los explantes presentaron necrosis en los bordes. Los que fueron colocados en 2 mg/l de 2,4-D mostraron coloración verde y amarilla y los que fueron colocados en 5 mg/l de 2,4-D presentaron necrosis. Los explantes que fueron colocados en medio con 2 mg/l y 5 mg/l de IBA mostraron coloración verde y algunas partes necrosadas. Los explantes que fueron colocados en medio con combinaciones de 2,4-D e IBA se necrosaron. En la figura 18 se muestran los explantes en medio de inducción de callo en hojas de valeriana.

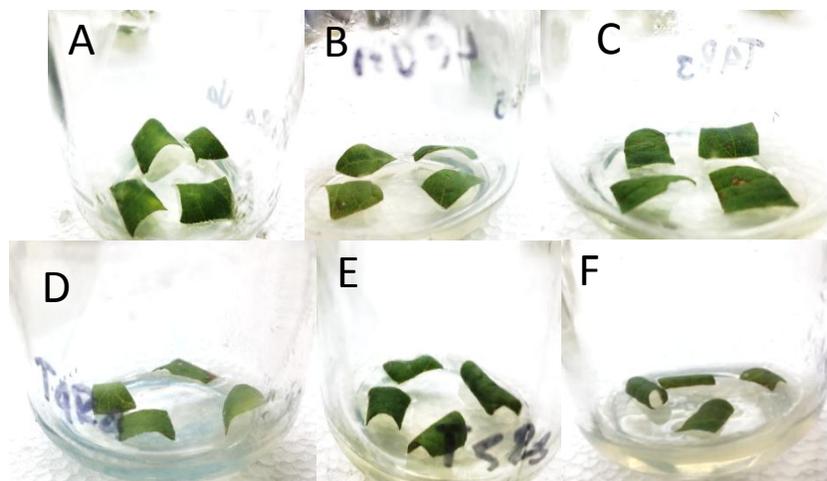


Figura 18. Aspecto de los explantes de valeriana 15 días después de haber sido colocados en medios de inducción de callo. A. Explantes en medio a una concentración de 2 mg/l de 2,4-D, B. Explantes en medio a una concentración de 5 mg/l de 2,4-D. C. Explantes en medio a una concentración de 2 mg/l de IBA. D. Explantes en medio a una concentración de 5 mg/l de IBA. E. Explantes en medio a una concentración de 2 mg/l de 2,4-D con 5 mg/l de IBA y F. Explantes en medio a una concentración de 5 mg/l de 2,4-D con 2 mg/l de IBA. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

6.3.3. Resultados del tercer experimento de inducción de callo

Cuando se utilizaron 2 mg/l, 5 mg/l y 10 mg/l de 2,4-D con 0.1 mg/l de Kinetina, los explantes perdieron su coloración verde y no se observó turgencia. En el medio con 10 mg/l de 2,4-D se pudo observar protuberancias de color amarillo con apariencia de callo, en forma esponjosa. Caetano Nunez, Escobar, Caetano, & Vaca Vaca (2014) reportan que en la especie pitahaya amarilla cuando utilizaron 2,4-D en combinación con BAP para formación de callo obtuvieron callos esponjosos. Cruz Pizarro (2012) menciona que los callos suelen ser masas celulares compactas y sólidas con espacios intercellares limitados, otros forman tejidos esponjosos. La coloración del tejido también varía, con la especie se pueden presentar callos que carecen de pigmentación, mientras que otros pueden ser de diferentes tonos de verde, amarillo, café o rojo. Esto está influenciado por factores como la nutrición y el ambiente, pueden observarse pigmentos como clorofila, carotenos, antocianinas, entre otros. En la figura 19 se muestran los explantes de hojas de valeriana en medios de inducción de callo 15 después de cultivados en medios con 2, 5 y 10 mg/l de 2,4-D combinados con 0.1 mg/l de Kinetina.



Figura 19. Apariencia de explantes 15 días después de haber sido colocados en medios de inducción de callo. A. Medio que contenía 2 mg/l de 2,4-D y 0.1 mg/l de Kinetina. B. Medio que contenía 5 mg/l de 2,4-D y 0.1 mg/l de Kinetina y C. Medio que contenía 10 mg/l de 2,4-D y 0.1 mg/l de Kinetina. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

6.3.4. Resultados del cuarto experimento de inducción de callo.

Cuando se evaluaron medios de inducción de callo en hojas de valeriana con 5 mg/l, 10 mg/l y 15 mg/l de 2,4-D con 0.1 mg/l de Kinetina, se observó que los explantes de hoja en las tres concentraciones evaluadas presentaron coloración café claro. Esta coloración se observó a los ocho días en cultivo, cuando se aplicaron 15 mg/l de 2,4-D se observó una coloración café oscuro. En la figura 20 se muestra la apariencia de los explantes de hoja 30 días después de haber sido colocados en medios de inducción de callo que contenían 5, 10 y 15 mg/l de 2,4-D y 0.1 mg/l de Kinetina.

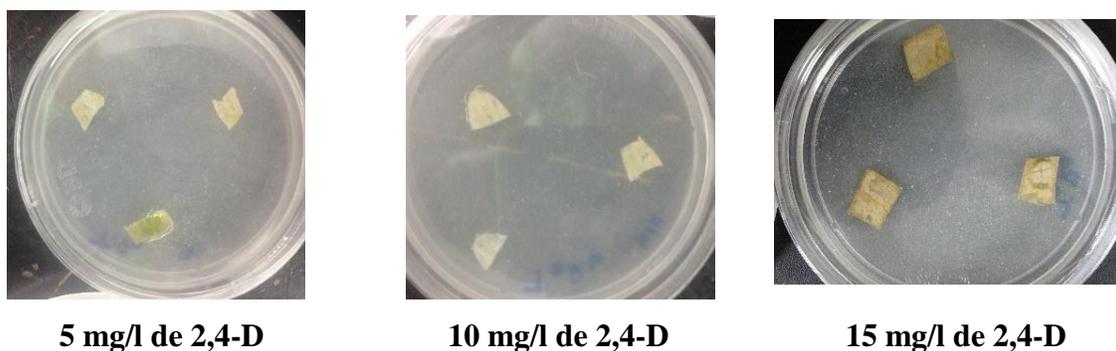


Figura 20. Apariencia de explantes después de 30 días en medios de inducción de callo con 5, 10 y 15 mg/l de 2,4-D. Evaluación de procedimientos de desinfección de hojas y medio de cultivo para la inducción de organogénesis y de callo en valeriana, Guatemala, 2018.

6.4. Comportamiento general de explantes de hoja en medios para inducir organogénesis y callo.

Los explantes que fueron evaluados en medios de inducción para organogénesis en hojas utilizando concentraciones de BAP (1 mg/l a 10 mg/l) y ANA (0.5 mg/l a 1 mg/l), presentaron turgencia mostrando una coloración verde al principio luego mostraron necrosis en las orillas y en el centro hasta cubrir completamente el explante. En la inducción de organogénesis cuando se utilizó únicamente BAP los explantes permanecieron más tiempo verdes y turgentes en los medios de desarrollo en comparación con los explantes que provenían de medios de inducción con combinaciones de BAP y ANA.

En los explantes de hojas evaluados en la inducción de callo utilizando concentraciones de 2,4-D (0.5 mg/l a 15 mg/l), IBA (2 mg/l a 5 mg/l) y Kinetina (0.1 mg/l) los explantes después de 30 días en medios de inducción de callo no presentaron respuesta alguna. Al incrementarse la concentración de 2,4-D se observó mayor pérdida de la coloración verde.

La falta de respuesta a la organogénesis y a la inducción de callo puede ser afectada por factores como la fisiología, que depende del estado de la planta, y la genética del explante utilizado. A las plantas que muestran esta problemática se les denomina recalcitrantes (Klimaszewska, Bonga, & Von Aderkas 2009; Beltrán Pedroza 2011; Trujillo Moya 2009; Gómez Aguilar 2016; Medina Collado 2016 y Ochatt, Atif, Patatochatt, Jacas, & Conreux 2010). Se ha propuesto que la no expresión de la organogénesis puede ser debida a bloqueo genético, epigenético y fisiológico (Vasil y Thorpe 1998; Kung y Wu 1993 y Muñoz Ramirez 2014).

7. CONCLUSIONES

1. El menor porcentaje de contaminación, cuando se utilizan explantes de hoja de *Valeriana prionophylla* Standl., se obtiene cuando éstas son lavadas con jabón antibacterial, posteriormente colocadas en una solución de benomyl a una concentración de 0.5 g/l por 30 min, después lavadas tres veces con agua estéril, posteriormente colocadas en una solución con 0.5 % de hipoclorito de sodio por 10 min y finalmente lavadas tres veces con agua estéril.
2. La especie *Valeriana prionophylla* Standl., no presenta respuesta organogénica a los medios de inducción que contienen como medio basal MS y BAP en concentraciones de 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 5 y 10 mg/l, solas o en combinas con ANA en concentraciones de 0.5, 1 y 2 mg/l.
3. La especie *Valeriana prionophylla* Standl., no presenta respuesta a la inducción de callo en medios de cultivo que contienen como medio basal MS y 2,4-D en concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 2 y 5 mg/l. Así también no presenta respuesta a la inducción de callo cuando se combinan concentraciones de 2,4-D de 2, 5, 10 y 15 mg/l con 0.1 mg/l de Kinetina o cuando se combinan 2 y 5 mg/l de 2,4-D con 2 y 5 mg/l de IBA.

8. RECOMENDACIONES

1. Debido a que *Valeriana prionophylla* Standl., no mostró respuesta a la propagación in vitro por medio de organogénesis e inducción de callo, se recomienda realizar investigación para incrementar su propagación por medio de semillas y de rizomas.
2. Se hace necesario concientizar a los agricultores del área en donde valeriana se distribuye naturalmente para hacer uso sostenible de la especie.

9. BIBLIOGRAFÍAS

1. Abdi, G., & Khosh-Khui, M. (2007). *Shoot regeneration via Direct Organogenesis from leaf segments of valerian (Valeriana officinales L.)*. Iran: International Journal of Agricultural Research 2.
2. Abedini, W., Sharry, S., & Adema, M. (2015). *Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Argentina: Universidad Nacional de la Plata. Recuperado el 16 de Junio de 2018
3. Balzarini, M., Gonzalez, L. A., & Roblero, C. (2008). *Manual del usuario*. Argentina: Universidad Nacional de Córdoba.
4. Barrios Valenzuela, A. C. (2007). *Validación farmacológica de la acción sedante e hipnótica de rizoma de Valeriana prionophylla (valeriana) en combinación con hojas de Passiflora edulis (flor de la pasión), flor con bráctea de Tilia platyphyllos (tilo) en infusión*. Tesis. Guatemala: USAC.
5. Beltrán Pedroza, D. M. (2011). *Rompimiento de la reacitrancia en el cultivo in vitro del comino (Aniba perutilis Hemsley)*. Colombia : Universidad del Tolima .
6. Cabrera Navarrete, E. C. (2014). *Establecimiento de suspensiones celulares a partir de segmentos foliares de Valeriana pyramidalis Kunth y estudio del efecto de la hormona GA3 en germinación in vitro de sus semillas* . Ecuador : Departamento de ciencias de la vida y de la agricultura .
7. Cáceres Estrada, A. (2011). *Evaluación de la actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa por diez especies medicinales y aromáticas nativas como posible fuente para el tratamiento de afecciones de la memoria*. Guatemala: Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología- CONCYT .
8. Camen, D. D., Beinsan, C. G., & Sumalan, R. L. (2012). *Study Regarding the in Vitro Regeneration and Use Perspectives in Some Valeriana officinalis L. Genotypes*. Romania: University of Agricultural Science and Veterinary Medicine Timisoara.
9. Capote Rodríguez, A., Fundora Mayor, Z., & Pérez Díaz, O. (2000). *Estudio de la variabilidad inducida en células y plántulas de cebolla (Allium cepa, L.) cv. Caribe-71 regeneradas in vitro*. Cuba: Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical.
10. Cardenas Avila, M. L. (2001). *Cultivo de callo In vitro como una alternativa para evaluar resistencia a salinidad y sequia en "frijol" Phaseolus vulgaris L*. Monterey, Mexico: Universidad Autónoma de Nuevo León, Dirección General de Bibliotecas. Recuperado el 29 de julio de 2018

11. Carmona Medero, M., Rubios Torres, C., & Lemus Flores, C. (2002). *Curso-Taller: Estadística aplicada a la investigación*. Cuba: Universidad Autónoma de Nayarit.
12. Cáseres Estrada, A. (2009). *Variabilidad genética, desarrollo de tecnología agrícola y caracterización fitofarmacéutica de una especie de valeriana (Valeriana prionophylla) nativa de Guatemala con potencial como sedante natural*. Guatemala: Facultad de Ciencias químicas y farmacia, USAC.
13. Castañeda Castro, O., Gómez Merino, F. C., Trejo Téllez, L. I., Pastelín Solano, M. C., Martínez Ocampo, Y., González Arnau, M. T., & Guevara Valencia, M. (2008). *Estado nutrimental y crecimiento de vitroplantas de caña de azúcar en respuesta a reguladores de crecimiento*. México: Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas.
14. Castillo, P., Márquez, J., Rubluo, A., Hernández, G., & Lara, M. (2000). *Plant regeneration from callus and suspension cultures of Valeriana edulis ssp. procera via simultaneous organogenesis and somatic embryogenesis*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
15. Contreras Loera, F. (2016). *Desarrollo de métodos de propagación In vitro de Alcaparro (Capparis spp.)*. Aguascalientes: Universidad Autónoma de Aguascalientes. Recuperado el 24 de 08 de 2018
16. Cruz Pizarro, F. (2012). *Cultivo de Tejidos Vegetales (Manual de practicas)*. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado el 29 de Mayo de 2018
17. *Cultivo de valeriana*. (s.f.). Recuperado el 12 de Septiembre de 2015, de Botanical Online: <http://www.botanical-online.com/valeriana-cultivo.htm>
18. Dodds, J. H., & Roberts, L. W. (1985). *Experiences in plant tissue culture*. Estados Unidos: Cambridge University Press.
19. Duarcelis, L., Maryoret, Y., Sánchez, M., & Torres, G. (3 de Febrero de 2013). *Etapas de la micropropagación*. Recuperado el 11 de abril de 2015, de Slidshare: <http://www.slideshare.net/submarino76/micropropagacion-nuevo-16314736>
20. Esquivel, A. A., & Escalant, J. V. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. Costa Rica: CATIE.
21. Ferreira de Santana, J. R., Paiva, R., Ibrahim Aloufa, M. A., & Pinto de Lemos, E. E. (2003). Efficiency of ampicillin and benomyl at controlling contamination of Annonaceae leaf segments cultured in vitro. *Fruits*, 58, 357-361.

22. Gaitán Fernández, I. C. (2005). *Actividad de doce plantas nativas guatemaltecas contra Sporothrix schenckii*. Tesis Licda. Biol. Guatemala, USAC, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Recuperado el 20 de septiembre de 2015, de Biblioteca Central USAC: www.goncevator.pesquelacalma.prensalibre/ii.16975:59-60
23. Galindo Guzmán, D. A. (2015). *Evaluación de medios de cultivo para la propagación in vitro de bambú (Guadua angustifolia; Poaceae); La Democracia, Escuintla*. Tesis Inga. Agra. Guatemala, Universidad Rafael Landívar. Recuperado el 20 de septiembre de 2015, de Biblioteca Universidad Rafael Landívar: recursosbiblio.url.edu.gt/tesisjcem/2015/06/17/Galindo-Dilia.pdf
24. García Canté de Chaycoj, S. E. (Julio de 2004). *Efecto de la bencilaminopurina, el ácido giberélico y el ácido indolacético en la micropropagación de mora (Rubus hadrocarpus forma adenophorus)*. Tesis Inga. Agra. Recuperado el 1 de Junio de 2015, de Biblioteca Central USAC: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2053.pdf
25. Garrido Tanchez, J. C. (Octubre de 2007). *Análisis por cromatografía líquida de alta resolución de ácido valerénico o sus derivados en extracto de hojas y raíz de valeriana (Valeriana prionophylla Standl.)*. Tesis MSc. Guatemala, USAC, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Recuperado el 30 de Mayo de 2015, de Biblioteca Central USAC: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2611.pdf
26. Gernandt, D. (3 de Febrero de 2015). *Departamento de Botánica*. Obtenido de Instituto de Biología (IBUNAM), Valeriana prionophylla Standl., ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares. En Portal de Datos Abiertos UNAM: <https://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:756347>
27. Gómez Aguilar , L. M. (2016). *Establecimiento de un protocolo para la inducción de la androgénesis en Capsicum chinense Jacq.* México: Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
28. Gutiérrez Pulido , H., & de la Vara Salazar , R. (2008). *Análisis y diseño de Experimentos* . México : McGraw-Hill Interamericana.
29. Klimaszewska, K., Bonga, J. M., & Von Aderkas, P. (2009). Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 254.
30. Kung , S.-d., & Wu , R. (1993). *Trangenic Plant*. California, San Diego: Academic Press, Inc.
31. Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2004). *Bioteología y Mejoramiento Vegetal II*. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

32. Llorente, B. E. (2000). *Aislamiento, purificación, caracterización y producción in vitro de peptidasas de alcaucil coagulantes de la leche*. Tesis PhD. Argentina, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas. Recuperado el 20 de septiembre de 2015, de SEDICI, Repositorio Institucional de la UNLP: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2211>
33. López Bautista, E. A., & González Ramírez, B. H. (2014). *Diseño y análisis de experimentos* (2da. ed.). Guatemala: USAC, Facultad de Agronomía.
34. López Bilbao, M. (2018). *Cultivo de tejidos vegetales (CTV)*. Argentina: Instituto de Biotecnología, INTA.
35. Medina Collado, A. (2016). *Regeneración de plantas en cultivo in vitro de colza (Brassica napus L.)*. España: Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural (ETSIAMN).
36. Muñoz Ramirez, L. S. (2014). *Establecimiento de un Protocolo de Propagación clonal del género Capsicum*. Mexico: Universidad de Guajalajara. Recuperado el 27 de Mayo de 2018
37. Nash, D. L. (1976). *Flora of Guatemala* (Vols. 24, 11, 4). Chicago, US: Field Museum of Natural History, Fieldiana Botany.
38. Ochatt, S. J., Atif, R. M., Patatochatt, E. M., Jacas, L., & Conreux, C. (2010). *Competence versus Recalcitrance for in Vitro Regeneration*. Francia: Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca.
39. Patil, S. S., Mane, J. J., Umdale, S. D., & Chavan, J. J. (2017). *Estrategias de organogénesis de disparo directo e indirecto para la propagación y conservación de Abutilon ranadei Wooder & Stapf - Una planta en peligro crítico de extinción*. India: Departamento de Botánica, Instituto de Ciencia Yashavantrao Chavan, Satara, India.
40. Puche Acosta, F. J., & Damaso Alvarado, L. A. (15 de Febrero de 2013). *Medios de cultivo definidos e indefinidos*. Obtenido de instituto Tecnológico de Ciudad de Altamirano, Guerrero, México: <http://alvaradobiotech.blogspot.com/2013/02/tarea-medios-de-cultivo.html>
41. Puche, A. F., & Rodríguez, P. (19 de Febrero de 2012). *Componentes del medio de cultivo*. Recuperado el 11 de Abril de 2015, de Biotecnología ITCA: <http://biotecnologia-itca.blogspot.com/2012/02/2-1-4-componentes-del-medio-de-cultivo.html>
42. Quispe Calle, E. (28 de Julio de 2009). *Evaluación Agronómica de tres genotipos de vitroplantas de papa nativa (Solanum tuberosum spp. andigenum L.) Bajo tres diferentes sustratos hidropónicos para la producción d semilla pres-básica en invernadero*. La Paz, Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés. Recuperado el 27 de Julio de 2018, de Rizoma: <https://www.ecured.cu/Rizoma>

43. Roubelakis-Angelakis , K. A. (1993). *An assessment of possible factors contributing to recalcitrance of plant protoplasts* . Estados Unidos : Springer Science+Business Media New York.
44. Saini, S., Dubey, A., Kumar, A., Taj, G., Budhori, S., & Kumar, V. A. (2018). *In vitro Direct Rhizogenesis of an Endangered Medicinal Herb: Valeriana jatamansi Jones*. India: Pant University of Agriculture and Technology, Uttarakhand, India.
45. Segretín, M. E. (2008). *Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales)*. Recuperado el 14 de septiembre de 2015, de ArgenBio, Consejo Argentino para la Información de la Biotecnología : <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>
46. Tansaz, M., Zamani, A., & Otroshy, M. (2014). *Rapid in vitro shoot regeneration of Valeriana officinalis*. Iran: Plant Tissue Cult. & Biotech.
47. Thorpe, T. A. (1981). *Plant Tissue Culture*. Estados Unidos : Academic Press, Inc.
48. Trujillo Moya , C. (2009). *Estudio de la genética de la regeneración a partir de explantes en tomate e identificación demarcadores asociados*. España: Universidad Politécnica de Valencia .
49. UNAD. (1999). *Micropropagación*. Recuperado el 11 de abril de 2015, de UNAD, Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/201529/Exe_201529/Protocolo_y_modulo/leccin_23_micropropagacin.html
50. Universidad Estatal de Pensilvania. (2018). *PennState Eberly College od science*. Recuperado el 15 de Mayo de 2018, de <https://newonlinecourses.science.psu.edu/stat504/node/216/>
51. Universidad Nacional de Córdoba, España. (2010). *InfoStat software estadístico*. Obtenido de Universidad Nacional de Córdoba: <https://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=28>
52. Urrea, A. I., Gomez, S., & Naranjo, E. J. (2012). *Respuesta de Zamia incognita L. al cultivo in vitro, una alternativa para su conservación*. Colombia: Universidad de Antioquia.
53. Valerio, I. (30 de Octubre de 2012). *blogspot*. Recuperado el 25 de Febrero de 2016, de Bitacora (Fotoperíodo): http://vivititi90.blogspot.com/2012/10/blog-post_1138.html
54. Vasil, I. K., & Thorpe, T. A. (1998). *Plant Cell and Tissue Culture*. London : Kluwer Academic Publishers.

55. Zambrano Gavilanes , F. (2012). *Ejemplos de los principales métodos estadísticos usando en investigaciones de Piñón (Jatropha curcas L.)*. Portoviejo: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.
56. Zamini , A., Mokhtar, A., Tansaz, M., & Zarei, M. (2016). *Callus induction and plant regeneration of Valeriana officinalis are affected by different leaf explants and various concentrations of plant growth regulators*. Iran: Payam Noor University of Isfahan.

10. ANEXO

10.1. Anexo 1. Componentes del medio MS

Cuadro 15A. Componentes del medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

Componentes	Cantidad (mg/l)
(NH ₄)NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	33.6
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025
Mio-inositol	100
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina-HCl	0.5
Tiamina-HCl	0.1
Glicina	2

Fuente: Experiments in Plant Tissue Culture, 1985

10.2. Anexo 2. Preparación de Soluciones Concentradas

La preparación de soluciones concentradas se realizó en función de la naturaleza de los compuestos. La concentración dependió de la cantidad que se utilizó en el medio.

En el cuadro 16A se muestra la concentración a la que se prepararon las soluciones concentradas y la cantidad que se agregó de cada uno de los compuestos en el orden en que aparecen en el cuadro.

Cuadro 16A. Cantidad de componentes del medio MS agregada por volumen preparado de soluciones concentradas.

Componentes del medio MS	Cantidad (mg/l)	Soluciones concentradas preparadas		
		Concentración	Volumen preparado (ml)	Cantidad agregada por volumen preparado (mg)
Macronutrientes A				
(NH ₄)NO ₃	1650	10X	500	8250
KNO ₃	1900	10X	500	9500
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	10X	500	2200
Macronutrientes B				
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	10X	500	1850
KH ₂ PO ₄	170	10X	500	850
Solución de hierro				
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	50X	500	695
Na ₂ EDTA	33.6	50X	500	840
Micronutrientes A				
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3	100 X	200	446
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	100 X	200	172
H ₃ BO ₃	6.2	100 X	200	124
Micronutrientes B				
KI	0.83	1000 X	500	415
Micronutrientes C				
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	1000 X	100	25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	1000 X	100	2.5
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	1000 X	100	2.5
Mio-inositol	100	100X	200	2000
Vitamina				
Ácido nicotínico	0.5	1000X	100	50
Piridoxina-HCl	0.5	1000X	100	50
Tiamina-HCl	0.1	1000X	100	10
Glicina	2	1000X	100	200

Los reguladores del crecimiento se prepararon a una concentración 1000X con referencia a 1 mg/l. Se preparó de cada regulador 50 ml de solución concentrada. La Bencilaminopurina (BAP) se preparó de la forma siguiente: se disolvió 50 mg de BAP en diez gotas de HCl 1N, una vez disuelta se procedió a agregar agua hasta completar 50 ml. Para preparar ácido naftalenacético (ANA) se preparó de la forma siguiente: se disolvió 50 mg de ANA en diez gotas de NaOH 1N, una vez disuelta se procedió a agregar agua hasta completar 50 ml.

10.3. Anexo 3. Preparación de medios de cultivo

Para preparar el medio basal MS se utilizó las soluciones concentradas, las cuales se agregaron de acuerdo al orden que se muestran en el cuadro 17A.

Para la preparación de un litro de medio basal MS se agregaron a un matraz de Erlenmeyer 500 ml de agua desmineralizada, luego se procedió a agregar las soluciones concentradas. Después se procedió a agregar 30 g de sucrosa. Se aforó a 1000 ml. Posteriormente de acuerdo a los tratamientos, se procedió a colocar en matraz de Erlenmeyers el volumen de medio que correspondía, posteriormente se agregaron los reguladores del crecimiento, después se ajustó el pH 5.7 y se agregó el agar en la cantidad que correspondía en relación al volumen y finalmente se esterilizó el medio.

Cuadro 17A. Volumen de soluciones concentradas utilizadas en la preparación de un litro de medio basal MS.

Solución concentrada	Concentración	Volumen agregado para preparar un litro de solución
Macronutrientes A		
(NH ₄)NO ₃	10X	100
KNO ₃	10X	100
CaCl ₂ · 2H ₂ O	10X	100
Macronutrientes B		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10X	100
KH ₂ PO ₄		
Solución de hierro		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	50X	100
Na ₂ EDTA	50X	100
Micronutrientes A		
MnSO ₄ · 4H ₂ O	100 X	10
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	100 X	10
H ₃ BO ₃	100 X	10
Micronutrientes B		
KI	1000 X	1
Micronutrientes C		
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1000 X	1
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1000 X	1
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1000 X	1
Mio-inositol	100X	10
Vitamina		
Ácido nicotínico	1000X	1
Piridoxina-HCl	1000X	1
Tiamina-HCl	1000X	1
Glicina	1000X	1

10.4. Anexo 4. Cantidad de antibióticos y fungicidas utilizados en la desinfección de hojas.

Cuadro 18A. Cantidad en gramos de fungicidas y antibióticos utilizados para la desinfección de hojas.

Componentes	Volumen preparado ml	Cantidad (g/l)	Cantidad agregada para el volumen preparado (g)
Benomyl	200	0.5	0.1
Tetraciclina	250	0.529	0.13225
Mancozeb	200	0.8	0.16