

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 circular emblem. It features a central shield with a white background, depicting a figure in a blue and red robe, possibly a saint or scholar, standing on a green base. The shield is set against a light blue background with a yellow sun and a blue sky. The entire emblem is enclosed in a circular border with text in Spanish and Latin.

**EVALUACIÓN DE 10 MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE
LA ESPECIE *Psychotria elata Sw.*, EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS
VEGETALES DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN
CARLOS DE GUATEMALA**

JOSUÉ JOEL FUENTES CONTRERAS

GUATEMALA, JULIO DE 2021

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

**EVALUACIÓN DE 10 MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE
LA ESPECIE *Psychotria elata Sw.*, EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS
VEGETALES DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN
CARLOS DE GUATEMALA**

TESIS

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

POR

JOSUÉ JOEL FUENTES CONTRERAS

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO
INGENIERO AGRÓNOMO EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
EN EL GRADO ACADÉMICO DE LICENCIATURA

GUATEMALA, JULIO DE 2021

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA



RECTOR EN FUNCIONES

Licenciado M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

Decano:	Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes
Vocal I:	Dr. Marvin Roberto Salguero Barahona
Vocal II:	Dra. Gricelda Lily Gutiérrez Álvarez
Vocal III:	Ing. Agr. M.A. Jorge Mario Cabrera Madrid
Vocal IV:	Perito Agr. Marlon Estuardo González Álvarez
Vocal V:	Perito Agr. Sergio Wladimir González Paz
Secretario Académico:	Ing. Agr. Walter Arnoldo Reyes Sanabria

GUATEMALA, JULIO 2021

Guatemala, julio de 2021

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

Honorables miembros:

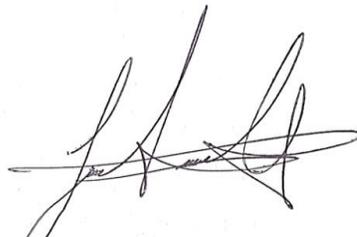
De conformidad con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a su consideración, el documento de graduación titulado:

“EVALUACIÓN DE 10 MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE LA ESPECIE *Psychotria elata Sw.*, EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA”

Requisito previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de licenciatura.

Esperando que el presente documento cumpla los requisitos necesarios para su aprobación, agradeciendo la atención presentada al presente.

Atentamente



Josué Joel Fuentes Contreras

“Id y enseñad a todos”

ACTO QUE DEDICO

A:

- DIOS: Josué 1:9, Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo en dondequiera que vayas.
- MI PADRE: Joel Fuentes, que Dios lo tiene en su gloria, pero su cariño prevalece siempre en mi corazón, que en su momento me brindo su enseñanza, cariño y apoyo incondicional. Orgulloso desde el cielo, al verme culminar una meta más.
- MI MADRE: Marleni Contreras, una mujer incondicional, guerrera, leal y de admirar, que con su amor, esfuerzo y cariño ha hecho posible culminar una meta más en mi vida. Mi apoyo constante en todo momento.
- MI HERMANA: Catherine Fuentes, por ser mi ejemplo a seguir, por tu apoyo en todo momento y tu motivación para lograr finalizar esta etapa de mi carrera profesional.
- MIS TÍOS (AS): Por los ánimos, apoyo y oraciones que me brindaron a pesar de la distancia.
- MIS PRIMOS Por sus ánimos y palabras de aliento.
- MIS AMIGOS (AS): Luis Morales, Marivy Córdón, Rocio Guerra, Kevin De León, Pedro Eskenasy, Vera Fion, Jurgen Soto, Fredy Alvarado y Raúl Casasola, por el apoyo y su amistad antes, durante y después de mi ciclo universitario.

TESIS QUE DEDICO

A:

GUATEMALA: Mi país que me dio la oportunidad de superarme profesionalmente

USAC: Por el honor de pertenecer a esta alma mater que me ha guiado para prepararme profesionalmente. Orgullo san carlista.

FAUSAC: Por darme la oportunidad de formarme académicamente en sus aulas y pertenecer a la gloriosa Facultad de Agronomía.

AGRADECIMIENTOS

A:

MI ASESOR: Inge. Agr. Edgar Franco, por su apoyo incondicional, compromiso y conocimientos aportados durante el desarrollo de esta investigación

MI SUPERVISOR: Dra. Ligia Monterroso, por su compromiso y apoyo durante mi Ejercicio Profesional Supervisado.

Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales: Por permitirme realizar la presente investigación en sus instalaciones

EVALUACIÓN DE 10 MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE LA ESPECIE *Psychotria elata Sw.*, EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RESUMEN

Guatemala es conocido por su diversidad en la flora, en ella se encuentran plantas ornamentales y medicinales, utilizadas para su comercialización de forma local o de exportación. Algunas plantas no han sido investigadas en el país como el caso de *Psychotria elata Sw.* Sin embargo, en países de Latinoamérica como, Colombia, México, Costa Rica y Brasil presentan estudios farmacológicos y de propagación de diferentes especies de *Psychotria sp*, por el potencial ornamental y medicinal, debido a la alta cantidad de metabolitos secundarios que estas especies presentan y sus exóticas bracteas en forma de besos. Con el fin de buscar alternativas para la propagación de *P. elata Sw.*, se evaluaron medios de inducción de organogénesis en hojas y propagación por segmentos nodales en medio basal MS.

Se evaluaron diferentes tipos de explantes de hoja para inducir organogénesis, como hojas enteras, explantes de un centímetro cuadrado y explantes intervenales. De los cuales se obtuvo una mejor desinfección en explantes intervenales. Para ello se evaluaron las combinaciones de reguladores de crecimiento ANA y BAP en concentraciones de 0.25 mg/l a 1 mg/l y 0.5 mg/l a 5 mg/l, respectivamente, IBA y BAP en concentraciones de 0.5 mg/l a 5 mg/l y 0.25 mg/l a 2 mg/l, respectivamente, en medio basal MS con 2 g/l de Benomyl, no se observó organogénesis en los medios de inducción evaluados, las hojas permanecieron verdes y con indicios de división celular pero sin presencia de brotes adventicios.

La evaluación de segmentos nodales de *P. elata Sw.*, se utilizó únicamente medio basal MS. se observó la emergencia de yemas axilares con crecimiento lento, durante cuatro meses de observación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
1.INTRODUCCIÓN.....	1
2.MARCO TEÓRICO	3
2.1. Marco conceptual.....	3
2.1.1.Taxonomía de la especie <i>P. elata</i>	3
2.1.2.Morfología de <i>Psychotria elata</i>	4
2.1.4.Importancia y uso de <i>P. elata</i>	7
2.1.5.Distribución geográfica de <i>Psychotria elata</i>	8
2.1.6.Cultivo de tejidos vegetales	9
A. Medio de cultivo	10
B. Agua	10
C. Agar.....	10
D. Azúcar	11
E. Macro y micronutrientes	11
F. EDTA.....	12
G. pH.....	12
H.Reguladores de crecimiento.....	13
I. Vitaminas	14
J. Micropropagación.....	14
K.Propagación por organogénesis.....	15
L. Propagación por segmentos nodales en medio solido	16
M. Desinfección del material vegetal.....	16
N.Contaminación microbiana en cultivo in vitro de tejidos vegetales	16
O. Métodos de desinfección en cultivo de tejidos vegetales.....	17
Ñ. Problemas de oxidación y oscurecimiento en explantes cultivados in vitro.....	18
2.1.6. Diseños experimentales.....	19
A. Aspectos para considerar en los diseños experimentales.....	19
B. Diseño completamente al azar (DCA).....	20
C. Diseños factoriales	20
2.2. Marco referencial	20
2.2.1. Lugar de realización del experimento.....	20
2.2.3. Evidencia científica de propiedades medicinales del género <i>Psychotria</i>	21
2.2.4. Investigaciones sobre propagación <i>in vitro</i> de especies del género <i>Psychotria</i>	22

	Página
2.2.5. Estudio de <i>P. elata</i> que muestra su peligro de extinción	25
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivo general.....	26
3.2. Objetivos específicos	26
4.HIPÓTESIS.....	26
5. METODOLOGÍA.....	27
5.1. Búsqueda, colecta y preparación de plantas de <i>P. elata</i> Sw.	27
5.2. Inducción de organogénesis en hojas de <i>P. elata</i> Sw.	31
5.1.1. Características generales de los experimentos	32
A. Tratamientos	32
B. Unidad experimental.....	32
C. Diseño experimental.....	32
D. Modelo estadístico matemático	32
E. Variable	33
F. Análisis de datos	33
5.1.2. Evaluación de explantes de hojas en proceso de crecimiento.....	33
A. Tratamientos	33
5.1.5. Evaluación de explantes de segmentos intervenales de hoja para inducción de organogénesis	34
A. Tratamientos	34
5.1.6. Primera evaluación de explantes de segmentos intervenales de hoja en medio de inducción con Benomyl para inducción de organogénesis	34
A. Tratamientos	34
5.1.7. Segunda evaluación de explantes de segmentos intervenales de hoja en medio de inducción con Benomyl para inducción de organogénesis	35
A. Tratamientos	35
5.2. Respuesta de segmentos nodales para la propagación de <i>P. elata</i> Sw.	36
5.3. Identificación de patógenos causantes de contaminación.....	36
5.4. Manejo del experimento.....	37
5.4.1. Condiciones de incubación	37
5.4.3. Preparación de cultivo.....	37
5.4.4. Preparación de medios de cultivo	39
A. Preparación de medio para respuesta organogénica	39

	Página
B. Preparación de medio de cultivo para segmentos nodales	41
5.4.5. Desinfección y siembra de explantes	41
5.4.6. Desinfección y siembra de segmentos nodales.....	43
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
6.1. Inducción de organogénesis en hojas de <i>P. elata Sw.</i>	45
6.1.1. Respuesta de segmentos intervenales a la inducción de organogénesis	45
6.3. Propagación por segmentos nodales de <i>P. elata Sw.</i>	53
6.3.1. Crecimiento de brotes axilares de <i>P. elata Sw.</i>	53
6.3.2. Crecimiento de brotes derivados de segmento nodal de <i>P. elata Sw.</i>	53
6.4. Repetición de evaluación del efecto de medios de inducción de organogénesis en explantes intervenales de hojas de <i>P. elata Sw.</i> , con tratamientos que mayor respuesta presentaron	54
6.5. Patógenos contaminantes.....	57
6.5.1. Tamaño de explante y contaminación.....	57
7. CONCLUSIONES	60
8. RECOMENDACIONES	61
9. BIBLIOGRAFÍA.....	62
10. ANEXOS.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Especie <i>P. elata</i> fotografiada en su medio natural mostrando sus brácteas rojizas	4
Figura 2. Hojas fotografiadas en el Área de Conservación Guanacaste de la especie <i>P. elata</i> , posición de hojas a simple vista (A), posición de hojas en acercamiento (B), color de haz de la hoja (C) y color de envés de la hoja (D)	5
Figura 3. Fotografías que detallan la parte floral de la especie <i>P. elata</i> . Color de cáliz (A), coloración de las anteras (B), Brácteas coloración rojo anaranjado (C) y forma y color de las flores (D).....	6
Figura 4. Fotografía de los frutos de <i>P. elata</i> (<i>Rubiaceae</i>),.....	6
Figura 5. Semillas de <i>P. elata</i> Sw, colectadas en los bosques nubosos de la finca “El Progreso” ubicada en el Municipio de Ixcán, Quiché.....	27
Figura 6. Plantas jóvenes de <i>P. elata</i> Sw. (A) y muestras de plantas introducidas en hielera para su traslado (B).....	28
Figura 7. Plantas jóvenes de <i>P. elata</i> Sw. en macetas para ser transportadas para la ciudad Guatemala, extraída de la finca “El Progreso” en el Municipio de Ixcán, Quiché	28
Figura 8. Plantas de <i>P. elata</i> Sw., en crecimiento en la Ciudad de Guatemala.....	29
Figura 9. Semillas <i>P. Elata</i> Sw., con coloración negro (A) y semilla sin membranas con consistencia dura (B).	29
Figura 10. Semillas de <i>P. elata</i> Sw. sumergidas en solución de Benomyl 1g/l por media hora en laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.....	30
Figura 11. Semillas de <i>P. elata</i> Sw. Sumergidas en solución de hipoclorito de sodio al 0.5% (A) y triple lavado con agua esterilizada (B), realizado en cámara de flujo laminar.....	31
Figura 12. Brotes en plantas de <i>P. elata</i> Sw., aclimatadas en la Ciudad de Guatemala, de los cuales se obtuvieron los segmentos nodales.....	36
Figura 13. Medio basal MS con benomyl (A) y distribución de medio basal MS con Benomyl para preparación de tratamientos (B).....	39
Figura 14. Preparación de tratamientos para evaluar la respuesta organogénica en hojas de <i>P. elata</i> Sw., en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.	39
Figura 15. Distribución de agar en cada Erlenmeyer para cada tratamiento evaluado en la respuesta organogénica de <i>P. elata</i> Sw., en el laboratorio de cultivo de tejidos.....	40
Figura 16. Tratamiento con fungicida Benomyl en hojas jóvenes de <i>P. elata</i> Sw., en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.....	41

	Página
Figura 17. Corte de explantes de un centímetro cuadrado (A) y corte de explantes intervenales en hojas de <i>P. elata</i> Sw. (B), en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.....	43
Figura 18. Figura 18. Segmentos nodales de <i>P. elata</i> Sw., en solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % de cloro comercial en cámara de flujo laminar del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.....	44
Figura 19. Figura 19. Corte realizado en segmentos nodales (A) y segmentos nodales de <i>P. elata</i> Sw. en medio de cultivo MS(B).	44
Figura 20. Figura 20. Imágenes de las estructuras de los principales hongos causantes de la contaminación in vitro en la propagación de <i>P. elata</i> Sw. (A) <i>Fusarium</i> sp. y (B) <i>Cladosporium</i> sp.	57
Figura 21. Figura 21. Explantes de hoja entera y de 1 cm ² de hoja de <i>P. elata</i> Sw., para respuesta de organogénesis.	58 58
Figura 22. Figura 22. Explante con grupos de células y con indicios de necrosamiento (A), Explante con presencia de callo en la base y grupos de células con indicios de organización (B) y explante con formación de callo alrededor de la base del tejido (C).	45 45
Figura 23. Figura 23. Secuencia del comportamiento del explante identificado con la literal A en la figura 22, necrosado a los 82 días de haber sido sembrado en medio basal MS en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.	46 46
Figura 24. Figura 24. Secuencia del comportamiento del explante identificado con la literal C de la figura 22, necrosado a los 112 días de su siembra, fue colocado en medio de inducción con reguladores de crecimiento, después de siete días se trasladó a medio basal MS en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.	46 46
Figura 25. Figura 25. Secuencia del comportamiento del explante identificado con la literal B de la figura 22, con callo en la base y estados iniciales de organización celular en la parte central a los 112 días después de la siembra en medio basal MS con combinación de 3 mg/l BAP + 0.5 mg/l ANA.	47 47
Figura 26. Figura 26. Porcentaje de explantes de tratamientos que mostraron división celular a los 57, 64, 72, 80 y 89 días después de la siembra, en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, de la Facultad de Agronomía, 2019.	48 48
Figura 27. Figura 27. Explantes turgentes con presencia de células organizadas a los 89 días en medio de cultivo MS con combinaciones de 0.5 mg/l IBA más 1 mg/l de BAP, en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Facultad de Agronomía, 2019.....	49 49
Figura 28. Figura 28. Explantes con presencia de grupos de células con indicios de organización celular en medio de cultivo MS con combinaciones de 2 mg/l IBA más 1 mg/l de BAP, en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Facultad de Agronomía, 2019.	49 49

	Página
Figura 29 Porcentaje de explantes con presencia de división celular de cada tratamiento en función al tiempo en la evaluación para la respuesta organogénica de segmentos intervenales de hojas de <i>P. elata Sw.</i> , como explante en medios de cultivo MS con 2 g/l de Benomyl en combinaciones de BAP + IBA y BAP +ANA, en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Facultad de Agronomía, 2019.	50 50
Figura 30. Explante con presencia de división y organización celular en menor proporción. Medio con 1 g/l BAP (A) y con 0.5 mg/l BAP más 0.25 mg/l ANA (B), en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Facultad de Agronomía, 2019.	51 51
Figura 31. Se puede observar la división y organización celular en medio de cultivo con 0.25 mg/l ANA más 1 mg/l de BAP, en evaluación de medios de inducción para respuesta organogénica de <i>P. elata Sw.</i> , en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Facultad de Agronomía, 2019.	51 51
Figura 32. Escala visual del desarrollo de brotes en segmento nodal de <i>P. elata Sw.</i> , en medio de cultivo basal MS en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Facultad de Agronomía, 2019.....	53 53
Figura 33. Comportamiento de dos brotes derivados de segmentos nodales de <i>P. elata Sw.</i> En medio basal MS en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Facultad de Agronomía, 2019.....	54 54
Figura 34. Porcentaje de explantes con presencia de división celular de cada tratamiento que presentó una mayor respuesta de división celular en segmentos intervenales de hojas de <i>P. elata Sw.</i> , como explante en medios de cultivo MS con 2 g/l de Benomyl en combinaciones de BAP + IBA y BAP + ANA, en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Facultad de Agronomía, 2020.	55 55
Figura 35. Explantes con mínima presencia de división celular. Al utilizar 1 mg/l BAP con 0.5 mg/l ANA, en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Facultad de Agronomía, 2020.	56 56
Figura 36. Explantes con mayor presencia de división celular al utilizar 0.5 mg/l IBA con 1 mg/l BAP (A) y 2 mg/l de IBA con 1 mg/l de BAP (B), en laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Facultad de Agronomía, 2020.	56 56

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Descripción Taxonómica de la especie <i>P. elata</i>	3
Cuadro 2. Macro y micronutrientes presentes en un medio de cultivo utilizado en cultivo de tejidos vegetales.	12
Cuadro 3. Combinaciones de Reguladores de Crecimiento que dieron respuesta positiva a la propagación organogénica de <i>Psychotria ipecacuanha</i>	23
Cuadro 4. Tratamientos para evaluar la respuesta organogénica de hojas de <i>P. elata</i> Sw.....	34
Cuadro 5. Tratamientos para evaluar la respuesta organogénica en hojas de <i>P. elata</i> Sw., en la Segunda evaluación.	35
Cuadro 6. Soluciones concentradas del medio basal MS y cantidad utilizada por litro de solución. ...	37
Cuadro 7. Tratamientos utilizados para validación de datos en experimento de organogénesis en segmentos intervenales de hojas de <i>P. elata</i> Sw.	55
Cuadro 8A. Composición del medio cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962).....	67
Cuadro 9A. Cantidad de solución concentrada de regulador de crecimiento utilizados en los medios evaluados para la inducción de organogénesis en hojas de <i>P. elata</i> Sw., a una concentración de 1000X, con medio basal MS.	68

1. INTRODUCCIÓN

La especie *Psychotria elata* (*P. elata*) es conocida comúnmente como labios de mujer. Su centro de origen es Colombia y se ha dispersado por Centroamérica y Sur América. La planta posee brácteas rojizas en forma de labios que rodean las flores.

El potencial ornamental y medicinal que *Psychotria elata* la hace una especie que es extraída de su medio natural, por ello es considerada en peligro de extinción. Por la importancia de la especie, se hace necesario propagarla, por ello se evaluaron nueve medios de cultivo para la inducción de organogénesis en hojas y un medio para la propagación por segmentos nodales.

Cortes, Pérez y Sánchez (2017) indican que, los cultivos in vitro aportan gran cantidad de herramientas y técnicas en la investigación, que permiten el fortalecimiento de estudios referentes a la agricultura, salud, biología, genética, entre otras. La propagación de especies vegetales aporta conocimientos como la morfología y comportamiento químico de las plantas, los cuales pueden llegar a tener alto nivel farmacológico y médico, por la existencia de metabolitos secundarios.

La investigación en *P. elata* Sw. se desarrolló del mes de julio del 2018 al mes de mayo de 2019. Se realizaron experimentos con semillas, segmentos nodales y hojas. Se evaluaron 10 medios de inducción utilizando como medio basal el MS, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales ubicado en el tercer nivel del edificio T-8 Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Durante la investigación para conocer la respuesta a la propagación *in vitro* de la especie se observaron factores que dificultan propagarla, estos iniciaron desde la dificultad de localizar la especie en el país hasta el control de la contaminación producida por *Fusarium*.

Las plantas, de las cuales se obtuvo el material vegetal, fueron asperjadas con el fungicida Benomyl y a nivel de laboratorio se agregó el mismo fungicida al medio de cultivo, habiéndose controlado la contaminación. El tamaño y procedencia de los explantes influyó en la contaminación, al utilizarse menor área foliar sin presencia de haces vasculares se obtuvo control de la contaminación.

Para la inducción de organogénesis en hojas de *P. elata* Sw., los explantes intervenales presentaron indicios de diferenciación celular en medio basal Murashige y Skoog (MS) con las combinaciones de reguladores de crecimiento de 0.5 mg/l IBA con 1 mg/l BAP, 1 mg/l IBA con 2 mg/l BAP, 2 mg/l IBA con 1 mg/l BAP, 1 mg/l BAP con 0.5 mg/l ANA, 3 mg/l BAP con 0.5 mg/l ANA, 5 mg/l BAP con 0.5 mg/l ANA, 1 mg/l BAP con 1 mg/l ANA, 3 mg/l BAP con 1 mg/l ANA y 5 mg/l BAP con 1 mg/l ANA. La planta al ser propagada por segmentos nodales mostró lento crecimiento en condiciones in vitro.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Marco conceptual

2.1.1. Taxonomía de la especie *P. elata*

Matsuura, Porto, y Fett-Neto (2013), indican que las plantas de la familia *Rubiaceae* se reconocen a nivel de campo por la filotaxia tipo opuesta de las hojas y ovario superior del fruto. Sin embargo, para el género *Psychotria* los rasgos morfológicos son escasos para su determinación por lo que se utiliza datos de ADN y fitoquímicos. UNAL (2007), ha descrito la clasificación taxonómica de *P. elata*, la cual se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Descripción taxonómica de la especie *P. elata*.

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Rubiales
Familia	Rubiaceae
Género	<i>Psychotria</i>
Epíteto específico	<i>Elata</i>

Fuente: UNAL, 2007.

González (2015), considera que *Psychotria* es un género con una alta diversidad de especies con floración. Su nombre tiene como significado sostén o alimento para el alma. La denominación del epíteto específico *elata*, posiblemente hace referencia a la presencia de pedúnculo alargado en la inflorescencia.

La especie *P. elata* es originaria de Colombia, pero su distribución se ha expandido hasta las selvas de Centroamérica y América del Sur. Esta planta es conocida por sus brácteas de color rojo en forma de labios, por lo que se le denomina comúnmente como flor del beso o labios de mujer, esta peculiar característica es fundamental para su polinización ya que es atrayente de mariposas y colibríes. En la figura 1 se muestra las brácteas rojizas de la planta *P. elata* (Hernández J., 2017).



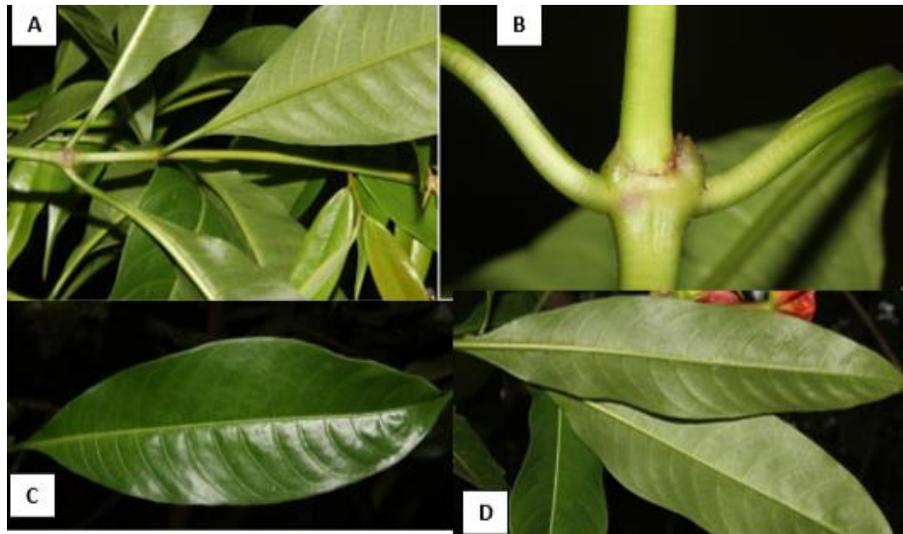
Fuente: Hernández J., 2017.

Figura 1. Especie *P. elata* fotografiada en su medio natural mostrando sus brácteas rojizas.

2.1.2. Morfología de *Psychotria elata*

Silvia y Segura (2015), describen la especie *P. elata* como de hábito arbustivo y su altura se encuentra entre 0.5 m a 5 m. La planta crece a una altura de 30 m a 1,700 m s.n.m de altitud desde Centroamérica hasta el país de origen, Colombia. Además *P. elata* produce flores y frutos todo el año con un pico de floración de enero a agosto.

Hernández (2017), describe las hojas de la especie *P. elata* como simples de filotaxia opuesta con un largo de 13 cm, la hoja posee un aspecto brillante de color verde en el haz y una coloración verde claro en el envés, el margen es entero. En la figura 2 se muestra de forma detallada las características de las hojas de *P. elata*.

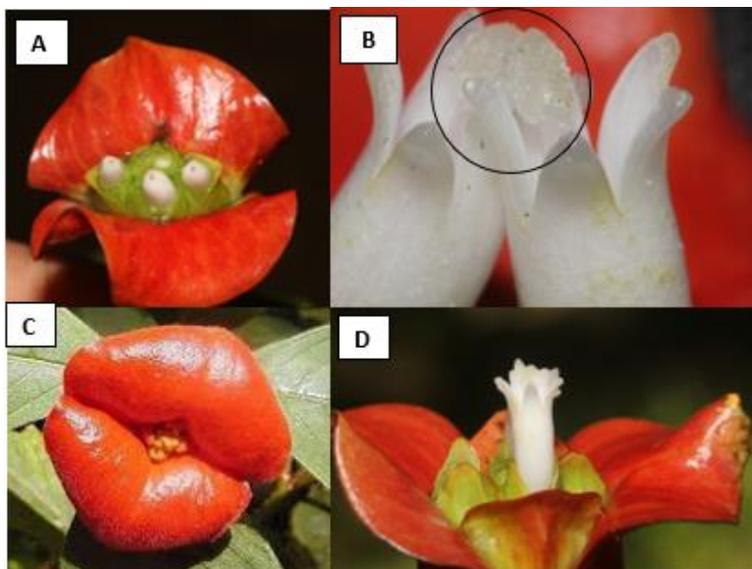


Fuente: Hernández J., 2017.

Figura 2. Hojas fotografiadas en el área de conservación Guanacaste de la especie *P. elata*, posición de hojas a simple vista (A), posición de hojas en acercamiento (B), color de haz de la hoja (C) y color de envés de la hoja (D).

Silva y Segura (2015) evaluaron la biología reproductiva y hercogamia de la especie *P. elata*, reportan que no presentan pubescencia. Soto y Vega (2010) consideran que en el género *Psychotria* existen varias características similares entre las especies, en el caso de *P. elata* es parecida a *Psychotria poeppigiana*, la característica distintiva entre ambas especies es la presencia de pubescencia que *Psychotria poeppigiana* muestra.

Hernández (2017) y Silvia y Segura (2015), reportan que la parte floral de *P. elata* se conforma de inflorescencias globosas semiesféricas. La inflorescencia está compuesta por flores tubulares de color blanco al igual que sus estambres y anteras, sus pétalos son lanceolados, posee un cáliz verdoso con la base alargada. La inflorescencia está rodeada de dos brácteas de color rojo anaranjado, que se ubican en la punta de las ramas. En la figura 3 se muestra varias secciones de la parte floral de *P. elata*.



Fuente: Hernández, 2017.

Figura 3. Fotografías que detallan la parte floral de la especie *P. elata*. Color de cáliz (A), coloración de las anteras (B), Brácteas coloración rojo anaranjado (C) y forma y color de las flores (D).

Borhidi (2012) y Rojas, Bermúdez y Jiménez (2006), reportan que la especie *P. elata* tiene fruto drupáceo con dos pírenos duros, cada uno con una semilla. Sus frutos son ovoides de color azul que al madurar su coloración se torna negra. Posee estipulas mayormente envainadoras, pardas o café oscuro, enteras, con un ápice redondo o con forma de capucha. En la figura 4 se observa la forma y coloración de frutos de *P. elata*.



Fuente: Borhidi, 2012.

Figura 4. Fotografía de los frutos de *P. elata* (*Rubiaceae*), ovoides y de coloración azul.

2.1.3. Reproducción asexual

Forma tradicional de reproducción de *P. elata* es por semilla. Sin embargo, la reproducción asexual se da por medio de estacas y esquejes (Soto Solís y Vega Araya, 2010). Para *P. elata* no se reporta información de propagación *in vitro*.

Sagers (1993) citada por Isabella (2011), indica que en los bosques tropicales existen especies que tienen una alta amenaza por depredadores, reduciéndose por ello la reproducción sexual, por lo que la reproducción asexual es una alternativa exitosa bajo condiciones estables.

2.1.4. Importancia y uso de *P. elata*

Matsuura, Porto, y Fett-Neto (2013), indican que existen especies de la familia *Rubiaceae* que se encuentran en Bosques del Atlántico y la Amazonia que poseen características químicas importantes para la elaboración de medicamentos, como alcaloides, que no han sido investigadas.

Matsuura, Porto, y Fett-Neto (2013), reportan que la familia *Rubiaceae* posee 1,343 especies registradas y distribuidas en 611 géneros, en los cuales se incluye el género *Psychotria* con importancia química. Las plantas pertenecientes a esta familia pueden estar ubicadas en lugares tropicales y húmedos.

Flor y Fauna Monforte (2017), reporta que la especie *P. elata* no necesita de luz directa por lo que se puede conservar en el interior como ornamental. Sin embargo, la planta desarrolla sustancias psicotrópicas, por lo que se debe de mantener alejada de los niños y mascotas para evitar intoxicación. Por otra parte, esta especie está desapareciendo por causa de la deforestación y excesiva comercialización, considerándose en peligro de extinción. Cardona

et al. (2014), afirma que *P. elata* por las características de su follaje colorido y flores rodeadas de brácteas en forma de labios se considera con un alto potencial ornamental.

Rojas Rodríguez, Bermúdez Cruz y Madrigal (2006), reportan que la especie *P. elata* es de importancia ecológica ya que sus frutos sirven como alimento para aves, éstas a su vez diseminan las semillas. Es una planta polinizada por mariposas por lo que ya se ha cultivado en jardines para mariposarios. Sánchez Luque (2017), afirma que el habitat natural de *P. elata* cada vez es amenazado por la deforestación incontrolada.

2.1.5. Distribución geográfica de *Psychotria elata*

Ávila, Cajas, Grajeda, Machuca, & Benitez (2005), indican que, la evaluación realizada sobre la dispersión de semillas por aves y murciélagos en el Parque Nacional de la Laguna Lachuá, Alta Verapaz y área de influencia, se determinaron las especies de las plantas dispersadas por aves y murciélagos. Entre el mayor número de familias vegetales encontradas está la familia *Rubiaceae*, la cual tiene como característica distintiva de producir frutos que son consumidos y dispersados por los animales evaluados. Entre las especies encontradas está *Psychotria elata* que se caracteriza por desarrollarse en lugares de sotobosques, con alta humedad y materia orgánica.

Rodas Duarte, Quezada, Hernández, & Marroquín (2018), Indican que, en el estudio realizado sobre la conservación y localización de encinos de Guatemala, se obtuvieron 112 especímenes asociados a los bosques de encino, correspondiendo a 38 familias botánicas, entre las más frecuentes está la familia *Rubiaceae* y entre los géneros se encuentra *Psychotria*.

El estudio se realizó en tres departamentos, Zacapa, Chiquimula e Izabal, estableciendo parcelas en cada área. Las parcelas con mayor cantidad de especies vegetales colectadas

fueron ubicadas en finca Las Granadillas y finca San José El Olvido en Zacapa; Negro Norte y finca municipal en Izabal, caracterizadas por sus ecosistemas de bosques nubosos y selvas. En el análisis realizado de especies relacionadas con encinos se determinó que, según el área de colecta las parcelas con mayor riqueza vegetativa fueron ubicadas en bosques nubosos. Entre las especies localizadas en este ecosistema se encuentra *Psychotria elata* (Sw.) Hammel.

Pérez, Rosito, Mass, & Gándara (2018), indican que, estudios realizados sobre la distribución y clasificación de los ecosistemas de Guatemala y zonas de vida. Sin embargo, la especie *P. elata* Sw. está clasificada en las especies frecuentes de los bosques muy húmedos premontano tropical en área norte de Huehuetenango, región central de Quiché, Alta Verapaz e Izabal, San Marcos, Quetzaltenango, Retalhuleu, Suchitepéquez, Sololá, Chimaltenango y Escuintla; y en pequeños segmentos de esta zona de vida existen en la Sierra de Las Minas, Baja Verapaz, Izabal, Zacapa y El Progreso; También en pequeñas regiones de Huehuetenango, Quiché, San Marcos, Quetzaltenango, Jalapa y Chiquimula.

2.1.6. Cultivo de tejidos vegetales

Pacheco Taco (2005), afirma que las células de las plantas tienen una característica que hace que se puedan diferenciar, esta es la totipotencia. La capacidad de diferenciación se observa en los tejidos de hojas, flores y tallos, ésta se induce con reguladores de crecimiento.

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta biotecnológica que se basa en procedimientos asépticos, asegurando la no contaminación microbiana, así mismo debe darse las condiciones físicas y químicas adecuadas para que el proceso de diferenciación se exprese en su máximo potencial (SAGARPA, 2017).

A. Medio de cultivo

Pedranzani y Giorno (2016), indican que los medios de cultivo son una composición química que se suplementa con sales inorgánicas, reguladores de crecimiento, vitaminas y compuestos carbonados. Este tipo de medio requiere de un proceso de esterilización tanto para los materiales a utilizar como los medios de cultivo. El grado de acidez o basicidad es indispensable en el medio, así como el fotoperiodo y tipo de luz, que se utiliza para estimular el crecimiento del material vegetal.

En el cultivo de tejidos vegetales se utilizan diversos medios. Un medio básico es aquel que no contiene reguladores de crecimiento. Según PROBIOTEK (2017), el más utilizado es el medio Murashige & Skoog (MS), el cual fue desarrollado por los científicos Toshio Murashige y Folke K. Skoog en 1962. La composición del medio de cultivo MS se muestra en el cuadro 10A.

B. Agua

Pedranzani y Giorno (2016), indican que el agua es un componente que está presente en el medio de cultivo en el 95 %. El agua que se utiliza para la elaboración de medios de cultivo es destilada, se recomienda que se almacene en recipientes de polietileno ya que el vidrio puede contener trazas de plomo, sodio o arsénico.

C. Agar

Pedranzani y Giorno (2016), indican que el agar es un componente utilizado en la elaboración de medios de cultivo, este se encarga de retener los compuestos y el agua del medio por su capacidad de gelificarse. Se utiliza en un rango de 0.6 % a 0.8 %. En concentraciones menores a 0.6 % se obtiene un medio semisólido y concentraciones mayores a 0.8 % sin superar el 1 % se obtiene un medio rígido que hace difícil la inoculación.

D. Azúcar

Según Pedranzani y Giorno (2016), el azúcar es un componente importante en cualquier medio nutritivo, esencial por su participación en el crecimiento y desarrollo del tejido. Los tejidos *in vitro* no son suficientemente autótrofos, la concentración de dióxido de carbono puede ser un factor limitante para la fotosíntesis y en la práctica es difícil y no económico administrarlo, los tubos de ensayo suelen ser pequeños y los procesos de respiración aumentan, haciendo un ambiente tóxico para la planta; por lo tanto la fuente de carbono debe incorporarse al medio de cultivo mediante alguna azúcar, en general se utiliza sacarosa, disacárido que se sintetiza y transporta en forma natural por las plantas.

Se agrega en concentraciones de 1 % al 5 %. En el caso de los embriones jóvenes se utilizan concentraciones altas. Al incrementar la concentración de azúcar el crecimiento y desarrollo alcanzarán un punto óptimo que puede disminuir si las concentraciones siguen aumentando.

E. Macro y micronutrientes

Los macronutrientes y micronutrientes son la base de la nutrición mineral de las plantas y aseguran el metabolismo, procesos fisiológicos como la fotosíntesis, crecimiento y reproducción celular. En el cuadro 2 se puede observar cada uno de los elementos nutricionales de un medio de cultivo.

Cuadro 2. Macro y micronutrientes presentes en un medio de cultivo utilizado en cultivo de tejidos vegetales.

Macronutrientes		Micronutrientes	
Nitrógeno	N	Hierro	Fe
Fosforo	P	Boro	B
Potasio	K	Manganeso	Mn
Sulfato	S	Zinc	Zn
Calcio	Ca	Cobre	Cu
Magnesio	Mg	Molibdeno	Mo
Azufre	S	Cobalto	Co

Fuente: elaboración propia con base a los componentes del medio MS, 2018.

F. EDTA

Pedranzani y Giorno (2016), indican que el EDTA es un quelato, Etilen-diamin-tetracético, este componente se encarga de captar el hierro (Fe) y lo deja disponible, ya que es un elemento pesado que suele precipitar.

G. pH

Pedranzani y Giorno (2016), indican que la concentración de protones adecuada es importante para que los medios de cultivo se solidifiquen y para el crecimiento, el pH adecuado se encuentra entre 5 y 6.5. En el laboratorio se mide el pH del agua destilada antes de elaborar las soluciones. Al adicionar las hormonas que son ácidas se debe volver a regular el pH a 5.8 antes de agregar el agar si el pH es mayor de 6.5 y menor a 5 puede causar que las auxinas y el ácido giberélico se vuelvan inestables, el agar pierda rigidez, las sales como fosfatos pueden precipitar, se retrasa la absorción de sales de amonio y nitrógeno. Para modificar el pH, se utiliza hidróxido de sodio (NaOH) para aumentar un pH bajo y ácido clorhídrico (HCl) para disminuir un pH alto, los dos compuestos se utilizan de 0.1 a 1 N.

H. Reguladores de crecimiento

Las hormonas se consideran compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores. Estas influyen en el crecimiento y desarrollo, actúan en un lugar diferente al de la síntesis y son activas en pequeñas proporciones. Los reguladores de crecimiento son compuestos sintéticos que actúan como las hormonas naturales. En el cultivo *in vitro*, las auxinas y citoquininas juegan un papel importante. Sin embargo, en este tipo de cultivos se conoce que no todos los explantes responden de igual forma, es decir unos necesitan ciertas concentraciones de reguladores externos, así también influye el tipo de regulador para que las células puedan expresar la totipotencia (Pedranzani y Giorno, 2016).

a. Auxinas

Las auxinas utilizadas en cultivo *in vitro* son: ácido 3- indol acético (IAA) considerado debil, ácido 3- indol butírico (IBA), ácido- naftalen acético (NAA) y ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D). Todas las auxinas se utilizan en concentraciones de 0.001 mg/l a 10 mg/l (Pedranzani y Giorno, 2016).

Las auxinas inducen la elongación celular, expansión de los tejidos, división celular, formación de callos y raíces adventicias, inhiben la generación de vástagos axilares y adventicios. También influye en la embriogénesis en los cultivos en suspensión (Pedranzani y Giorno, 2016).

b. Citoquininas

Las citoquininas utilizadas en medio de cultivo *in vitro* son: cinetina (Kinetina), 6-bencil amino purina (BAP) y N6-2-isopentinil adenina (2iP). Todas las citoquininas se utilizan a concentraciones de 1 mg/l a 10 mg/l (Pedranzani y Giorno, 2016).

Las citoquininas estimulan el crecimiento, el desarrollo y división celular, la formación de vástagos axilares, disminución de la dominancia apical y retardan el envejecimiento.

c. Giberelinas

Pedranzani y Giorno (2016), indican que el ácido giberélico (AG₃) es el regulador más utilizado en medios de cultivo *in vitro*. Sus acciones fisiológicas son la elongación de entrenudos, crecimiento de meristemas y yemas *in vitro*, inducen también la ruptura de la dormancia de embriones y yemas, así como inhiben la formación de yemas adventicias.

I. Vitaminas

Pedranzani y Giorno (2016), indican que las vitaminas producen varias reacciones catalíticas en el metabolismo de las plantas, éstas son requeridas en baja concentración. La vitamina más utilizada en cultivo *in vitro* es la tiamina por su contribución en el crecimiento de las células vegetales. En el medio de cultivo MS se utiliza el componente myo- inositol, el cual no es una vitamina como tal sino un azúcar- alcohol, éste es importante para la proliferación de tejidos y la inducción de organogénesis.

J. Micropropagación

La técnica de micropropagación se conoce como un sistema para lograr el desarrollo de nuevas plantas en un medio artificial, en condiciones asépticas y a partir de porciones vegetales muy pequeñas. Los métodos de propagación *in vitro* que se utilizan son los explantes nodales, los cuales son nudos provistos de una yema axilar, también se utilizan ápices caulinares o segmentos de tallo con más de una yema axilar. Los individuos que se obtienen de la micropropagación son idénticos a los progenitores (Pacheco Taco, 2005).

Según Pacheco Taco (2005), la micropropagación se realiza dentro de una cámara de flujo laminar, la plántula se corta en segmentos de un nudo (yema) y un corto pedazo de tallo, las proporciones de tallo hacia arriba y hacia abajo del nudo deben ser de un milímetro y de cuatro a cinco milímetros respectivamente. Cuando se utiliza la yema terminal de la planta, el tallo debe ser entre 5 mm a 6 mm, se debe dejar la hoja expandida más pequeña. La micropropagación se puede realizar en medio sólido o líquido.

K. Propagación por organogénesis

Gamara Reinoso (2014), indica que la propagación por organogénesis se basa en la capacidad de diferenciación de las células vegetales para el desarrollo de nuevas plantas. La organogénesis puede ser directa o indirecta, si existe un proceso prolongado donde se visualiza una masa celular antes de la producción de brotes es de forma indirecta, a diferencia de forma directa, la producción de brotes se da sin formación de callo. Las masas celulares se forman cuando los explantes son incubados en un medio de cultivo donde existe una combinación de auxinas y citoquininas.

Martín, Chong Pérez y Pérez Alonzo (2015), indican que para inducir organogénesis se necesita de reguladores de crecimiento, generalmente se utiliza ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB), 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) como auxinas y bencilaminopurina (6-BAP), zeatina, kinetina y tidiazurón (TDZ) como citoquininas. La selección de explante es indispensable para una propagación exitosa, ya que existen tejidos en los cuales las células tienen mayor capacidad de diferenciarse. El principal órgano vegetal utilizado en organogénesis son los segmentos foliares en diversas especies.

L. Propagación por segmentos nodales en medio sólido

Pacheco Taco (2005), indica que, para la propagación por segmentos nodales, el segmento de la plántula se coloca en un medio de cultivo apropiado que induce el desarrollo de la yema axilar del nudo, obteniéndose como respuesta una nueva planta *in vitro*. Este tipo de propagación se basa en el desarrollo de la estructura morfológica (yema) ya existente. La condición nutricional-hormonal del medio provoca la ruptura del reposo de la yema axilar promoviendo su rápido desarrollo.

M. Desinfección del material vegetal

Las plantas se encuentran contaminadas con una alta cantidad de microorganismos, éstos al momento de hacer contacto con el medio de cultivo, que contiene fuentes de carbono, proliferan. Los microorganismos pueden ser hongos o bacterias, que compiten con el explante por nutrientes, afectando su crecimiento, hasta provocarle la muerte (Pacheco Taco, 2005).

Según Pacheco Taco (2005), para obtener cultivos asépticos se trabaja en ambientes adecuados, esterilizando los medios de cultivo y por último desinfectando los explantes. Generalmente se utiliza etanol y el hipoclorito de sodio como desinfectantes superficiales para los explantes. Después de utilizar soluciones desinfectantes se deben lavar los explantes con agua estéril para retirar los restos del desinfectante, esto se realiza en la cámara de flujo laminar y generalmente se hacen tres lavados con agua estéril.

N. Contaminación microbiana en cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

La técnica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es considerada una actividad donde se trabaja bajo parámetros altos de asepsia evitando la contaminación del cultivo o del medio en el que se lleva a cabo los procesos del laboratorio.

Hernández & Gonzales (2010), indican que la mayor pérdida de material vegetal o plantas en crecimiento in vitro a nivel de investigación o comercial se debe a la contaminación por microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante, conocidos como endófitos o microorganismos que se pueden llegar a introducir por una incorrecta manipulación en el laboratorio al momento de realizar una transferencia o siembra. Sin embargo, estos microorganismos se pueden diseminar por ácaros, trips y hormigas.

Los microorganismos más comunes son los hongos, bacterias y levaduras, conocidos como vitropatógenos y los menos frecuentes son los virus, viroides, ácaros y trips. El término “vitropatógenos” es utilizado para los organismos que no causan necesariamente un daño en las plantas en campo, pero son letales para células, tejidos u órganos en cultivos in vitro.

Entre los contaminantes in vitro de plantas, se han identificado varios géneros de bacterias como: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Methylobacterium*, etc, y en el caso de hongos los más comunes son los géneros *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia* y *Fusarium* (Hernández & Gonzales, 2010).

O. Métodos de desinfección en cultivo de tejidos vegetales

Para obtener éxito en la propagación de plantas en cultivo in vitro se debe tener un adecuado control y prevención de contaminantes. Existen varios métodos o protocolos de desinfección que van desde el tratamiento de la planta madre, desinfección superficial del explante, control por medio de productos químicos y cultivo de meristemos (*Hernández & Gonzales, 2010).

Los métodos utilizados para desinfección no siempre eliminan las poblaciones de los microorganismos, algunos tienen la capacidad de permanecer en el interior de las células o los haces vasculares de las plantas, de esta manera se introducen al cultivo de tejidos donde

se llega a manifestar sobre los medios ya establecidos o puede permanecer durante un largo tiempo (Hernández & Gonzales, 2010).

Hernández & Gonzales (2010), Indican que, cuando la planta madre o donante de los explantes crece en un medio silvestre o sin ningún control está expuesta a plagas y enfermedades, por lo que las probabilidades de contaminación en laboratorio son altas. Para disminuir los riesgos de contaminación al momento de realizar la siembra o transferencia de explantes, se debe de realizar una aplicación de fungicidas, ya sea combinados o separados durante el crecimiento de la planta. Sin embargo, se debe considerar que, este tipo de tratamiento puede causar daño en los tejidos o dejar residuos tóxicos en ellos.

Estudios indican que, más del 50 % de hongos filamentosos son eliminados con fungicidas comerciales, uno de ellos es un fungicida curativo de acción sistémica, Benomyl, el cual se ha utilizado a una concentración de 2 g/l, habiéndose demostrado que con este fungicida es posible inhibir el crecimiento de micelios de contaminantes de cultivo in vitro de géneros como: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Spicaria*, *Fusarium*, *Pestalotia* y *Colletotrichum*.

Hernández y Gonzalez (2010), Indican que, el tamaño de explante que se utiliza es un factor que influye en la contaminación ya que, a mayor área de tejido vegetal mayor es el riesgo que exista contaminación, por la dificultad de desinfección del tejido. Al igual que las irregularidades de la superficie del explante dificultan la desinfección superficial, por el riesgo que existan todavía esporas y los productos utilizados no logren una desinfección adecuada. Varios Investigadores emplean la desinfección para explantes con soluciones de hipoclorito de sodio a concentraciones de 0.5 %– 5 %, realizando tres lavados con agua destilada y esterilizada. Esto ayuda a limpiar el explante de residuos de algún químico que pueda causar toxicidad o un problema en la incubación.

Ñ. Problemas de oxidación y oscurecimiento en explantes cultivados in vitro

Según Azofeifa (2009), en el establecimiento de cultivo de tejidos vegetales se dan diferentes problemas, en los cuales está involucrado el tejido vegetal. El explante utilizado puede presentar diferentes complicaciones, una de ellas es necrosarse, lo que se conoce

como oxidación. La oxidación es un proceso en el cual un átomo o un grupo de átomos, pierde uno o más electrones y lo cede al otro. Esta oxidación se presenta como un oscurecimiento en el tejido vegetal y se da por radicales libres de diferentes componentes celulares, que puede ser como la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa para la producción de quinonas, la cual es considerada químicamente muy reactiva y propensa a reaccionar, generando daño o hasta la muerte del tejido.

2.1.6. Diseños experimentales

Gutiérrez Pulido y De la Vara (2008), indican que los diseños experimentales sirven para la evaluación de los resultados de experimentos con muestras pequeñas, realizando pruebas estadísticas que permitan entender de una mejor manera las situaciones complejas de relación causa-efecto.

En los experimentos existen factores de todo tipo que se presentan al momento de realizar un experimento. Los factores pueden ser controlables y no controlables.

Los factores controlables son aquellos que por medio de un mecanismo se puede cambiar, a diferencia de los no controlables que es imposible controlar en el experimento, entre estos se encuentran las condiciones ambientales como luz, humedad, temperatura, entre otros. Sin embargo, un factor no controlable se puede convertir en controlable media vez se tenga la tecnología o lugar adecuado donde se pueda manipular su nivel.

A. Aspectos para considerar en los diseños experimentales

Gutiérrez y De la Vara (2008), indican que para definir el diseño experimental que se utiliza en una investigación se debe de tomar en cuenta el número de factores a estudiar, el número de niveles de cada factor y los efectos de relación factores-respuestas.

B. Diseño completamente al azar (DCA)

Gutiérrez y De la Vara (2008), indican que el diseño completamente al azar es utilizado para comparar dos o más tratamientos donde no existe relación alguna entre ellos. Este diseño es considerado el más simple de todos y su aleatorización es de forma completa.

C. Diseños factoriales

Gutiérrez y De la Vara (2008), indican que los diseños factoriales se utilizan para estudiar varios factores con diferentes niveles cada uno, que se verán reflejados en una o varias repuestas dependiendo del experimento. El objetivo principal es obtener la mejor respuesta por medio de combinaciones de los diferentes niveles de los factores. Para obtener todas las posibles combinaciones entre los niveles de los factores se multiplica la cantidad de niveles por los factores, por ejemplo, se tiene un experimento con factor "A" y factor "B", con tres y dos niveles respectivamente, se obtiene el total de seis tratamientos.

2.2. Marco referencial

2.2.1. Lugar de realización del experimento

El experimento se realizó en las instalaciones del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales ubicado en el tercer nivel del edificio T-8 de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

En el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales existe un área de incubación con control de temperatura, fotoperiodo de 16 horas, luz blanca a una intensidad de radiación de 3,000 lux, un área de preparación de medios de cultivo, un área de transferencias con dos cámaras de flujo laminar, un área de almacenamiento de reactivos y materiales. También existe equipo, instrumentos y cristalería como una autoclave, un horno microondas, potenciómetro,

estereoscopios, refrigerador, balanzas analíticas, probetas, matraces de erlenmeyer, agitadores magnéticos, cajas de Petri, tubos de ensayo, mecheros, pinzas y bisturí.

2.2.3. Evidencia científica de propiedades medicinales del género *Psychotria*

Matsuura, Porto, y Fett-Neto (2013), en el Centro de Biotecnología de Brasil realizaron estudios sobre la biosíntesis de alcaloides para las plantas del género *Psychotria* de la familia *Rubiaceae*, las que son importantes farmacológicamente por el tipo de alcaloides que presentan. En el proceso de la investigación se establecieron plantas derivadas de semillas *in vitro* para cultivar *Psychotria leiocarpa* donde se evaluaron distintas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo en ausencia o presencia de luz blanca.

Los resultados obtenidos muestran que los alcaloides se concentran en las estructuras reproductivas y el área foliar, las plantas más jóvenes presentan mayor cantidad de alcaloides. Sin embargo, a pesar de los estudios ya realizados se necesita profundizar en la producción de metabolitos secundarios en condiciones *in vitro*.

Giovannini y Howes (2017), investigaron plantas utilizadas como tratamiento para mordeduras de serpientes en países de Centroamérica. En los resultados obtenidos reportan cinco especies del género *Psychotria* entre ellas esta *P. elata* de la cual se puede utilizar como tratamiento las hojas, flores, tallo, raíz y la planta entera.

Hiromi Ohashi y Braga (2020), indican que, un estudio realizado de fitoquímica y actividades biológicas de la familia *Rubiaceae* y el género de *Psychotria* demostró ser importante fuente de compuestos potencialmente antipalúdicos y posee una importancia medicinal. Además, la familia *Rubiaceae* tiene una gran diversidad de metabolitos secundarios, los cuales incluyen las antraquinonas, terpenoides, flavonoides, cumarinas, varios compuestos fenólicos y alcaloides, resalta que, el género *Psychotria* ha sido el más estudiado en las clases de dichos metabolitos. La cantidad grande de sustancias químicas y actividades farmacológicas informadas de varias especies de esta familia.

2.2.4. Investigaciones sobre propagación *in vitro* de especies del género *Psychotria*.

Reis Soares *et al.* (2004), evaluaron en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad de Federal de Larvas, la influencia del tamaño y la posición del explante de la especie *Psychotria ipecacuanha*, y el volumen de medio de cultivo MS para su propagación. El material vegetal utilizado fueron segmentos intermodales obtenidos de una planta cultivada *in vitro*. Los explantes fueron cultivados en medio MS semisólido suplementado con 1.5 mg/l de BAP. La variable de respuesta fue el número de brotes por tubo de ensayo para el tamaño y posición de explante, y número de brotes por frasco para la influencia de volumen de medio de cultivo.

En las dos lecturas de datos realizadas se obtuvo que, los tamaños 1 cm y 1.5 cm presentaron mayor número de brotes en comparación al tamaño 0.5 cm y la cantidad de brotes no fue influenciada por las posiciones del explante (basales, medianas y apicales). Sin embargo, la especie *Psychotria ipecacuanha* produce mayor cantidad de brotes en volumen de 30 ml y 40 ml de medio de cultivo en comparación de los volúmenes 10 ml y 20 ml.

Naranjo, Urrea, y Atehortua (2014), evaluaron la propagación *in vitro* por medio de embriogénesis de la especie *Psychotria ipecacuanha*. El material vegetal evaluado fueron hojas jóvenes de la parte apical, éstas se colectaron de plantas cultivadas en condiciones semicontroladas en casa malla. Se utilizó 2 g/l de Benomyl y estreptomicina como funguicidas donde se sumergieron las hojas por dos horas y luego en hipoclorito de sodio al 3 % por 30 min para su desinfección y por último se realizaron tres lavados con agua destilada.

Los explantes fueron cultivados en medio de cultivo MS a la mitad de su concentración los cuales fueron suplementados por diferentes combinaciones de IBA + BAP, de las cuales tres de ellas dieron respuesta positiva, éstas fueron: 3 mg/l IBA + 1.5 mg/l BAP, 2 mg/l IBA + 1 mg/l BAP y 1 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP.

Botero Giraldo, Urrea Trujillo, y Naranjo Gómez (2015), investigaron en la Universidad de Antioquia, Colombia el potencial de regeneración de la especie *Psychotria ipecacuanha* al

ser propagada *in vitro*, por la importancia medicinal que esta posee. Se evaluaron capas delgadas de células de hojas, tallos y segmentos nodales para la propagación por organogénesis, embriogénesis y segmentos nodales, así mismo se evaluó el efecto de la condición lumínica. El material vegetal se cultivó en el medio MS a la mitad de su concentración.

En la evaluación de organogénesis las hojas se sembraron de manera que el haz hiciera contacto con el medio nutritivo con un tamaño de explante de 0.5 cm², éstos fueron expuestos a distintas combinaciones de reguladores de crecimiento IBA y BAP, en las cuales cinco de los nueve tratamientos dieron respuesta positiva a la organogénesis, estos resultados se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Combinaciones de Reguladores de Crecimiento que dieron respuesta positiva a la propagación organogénica de *Psychotria ipecacuanha*.

No	Reguladores de crecimiento	Combinaciones (mg/l)
1	IBA + BAP	IBA 2 + BAP 1
2		IBA 1 + BAP 2
3		IBA 0.5 + BAP 1
4		IBA 10 + BAP 5
5		IBA 5 + BAP 1

Fuente: datos de Botero Giraldo, Urrea Trujillo, y Naranjo Gómez, 2015.

Los ensayos realizados mostraron mayor respuesta organogénica, evaluada por el número de brotes obtenidos, en la combinación de IBA 1 mg/l + BAP 2 mg/l, en presencia de luz blanca. Sin embargo, este resultado fue dependiente del tipo de explante, y la condición lumínica, es decir, el mayor número de brotes se obtuvo de los segmentos de hojas y el menor de los tallos. La evaluación organogénica se llevó a cabo con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

Botero Giraldo, Urrea Trujillo y Naranjo Gómez (2015), evaluaron segmento nodales con respecto a las distintas condiciones lumínicas, reportan que, a partir de los brotes desarrollados de los nudos de la planta, la especie *Psychotria ipecacuanha* mantiene la supervivencia de los nudos en su totalidad en el corto y largo plazos, bajo condiciones de luz blanca continua, concluyendo que la propagación de esta especie de forma *in vitro* se produce en condiciones de fotoperiodo bajo luz blanca continua de 420 nm -450 nm.

Lara, Valverde, Gómez, y Hidalgo (2003), propagaron *in vitro* la especie *Psychotria acuminata*, utilizando como explantes microestacas con hojas, con al menos cinco nudos, extraídas de cuatro localidades distintas de los bosques de Costa Rica. Se utilizó el medio basal MS con una combinación de 3 mg/l de 6 bencilaminopurina (BAP) y 0.01 mg/l de ácido naftalenacético (ANA), con un pH de 5.8. Las condiciones del cuarto de incubación fueron con un fotoperiodo de 12 horas con luz blanca y con una temperatura promedio de 26 °C. Los resultados muestran que se logró un alto número de brotes al utilizar explantes de hojas de 10 mm- 15 mm y segmentos nodales de un centímetro.

Las microestacas reportan que la brotación se inicia en un periodo de dos a 12 semanas, para los entrenudos se observa la aparición de brotes a la semana 16. En el caso de las hojas se observó la brotación a las 10 semanas, reportan que la brotación se observó con mayor intensidad en la vena media y secundaria y en menor cantidad en la lámina.

La desinfección de la especie *Psychotria acuminata* se realizó sumergiendo los explantes en un bactericida y fungicida, agitándolo por dos horas, luego se sumergió un minuto en etanol al 70 % y por 25 min en hipoclorito de sodio al 2.5 %, terminando con un triple lavado con agua estéril. Lara, Valverde, Gómez, y Hidalgo (2003), afirman que las altas concentraciones de hipoclorito de sodio o lapsos de tiempos prolongados redujeron la probabilidad de contaminación, pero a su vez dañaron los explantes haciendo que se observaran de color café o amarillo y murieran.

Urrea Trujillo, Botero Giraldo y Naranjo Gomez (2017), evaluaron la influencia de diferentes temperaturas y concentraciones del regulador de acción osmótica, manitol en la especie *Psychotria ipecacuanha* por medio de segmentos nodales, para su conservación *in vitro*. El material vegetal se recolectó de una planta *in vitro* que fue obtenida de ápices y nudos de poblaciones de *Psychotria ipecacuanha* colectados en Urabá- Antioquia, Colombia. Los

resultados mostraron que, de las tres temperaturas (18 °C, 23 °C y 25 °C) y las tres concentraciones de manitol (0 g/l, 15 g/l y 30 g/l), la mayor altura se alcanzó a los 25 °C con cero concentraciones de manitol a los 3 meses de ser evaluada.

En el caso de las hojas y el número de nudos, el mayor número de ambas variables se obtuvo a 23 °C con cero concentraciones de manitol. Sin embargo, la morfología de las plantas fue influenciada ya que la presencia de manitol provocó una coloración verde pálido con zonas cloróticas y las que fueron expuestas a 25 °C sin manitol presentaron un mejor desarrollo, crecimiento excesivo de hojas y raíces.

2.2.5. Estudio de *P. elata* que muestra su peligro de extinción

Chazdon, Redondo Brenes y Vilchez Alvarado (2005), estudiaron la tasa de mortalidad que presentan las especies que habitan los bosques de Costa Rica, por consecuencia de las deforestaciones, cambios climáticos y edáficos que se dan en su hábitat natural. Reportan que la más alta tasa de mortalidad la presentó *P. elata*, la cual fue de 25.8 %.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar medios de cultivo para contribuir a la propagación *in vitro* de la especie *P. elata*.

3.2. Objetivos específicos

1. Evaluar 10 medios de cultivo en la inducción de organogénesis en explantes de hoja de la especie *P. elata*.
2. Evaluar la respuesta de la especie *P. elata* a la propagación, por medio de segmentos nodales, en medio de cultivo MS.
3. Identificar los patógenos causantes de la contaminación en el cultivo de explantes de hojas y segmentos nodales de *P. elata* Sw.

4. HIPÓTESIS

1. Los explantes de hoja de *P. elata* al ser puestos en medios de inducción de organogénesis que contengan solo BAP o en combinación con IBA mostrarán formación de brotes adventicios. El medio de inducción de organogénesis, en hojas de *P. elata*, en el cual se agreguen 1 mg/l de IBA más 2 mg/l de BAP producirá mayor cantidad de brotes adventicios, en comparación con los otros tratamientos.
2. La especie *P. elata* presentará una tasa exponencial en la propagación por medio de segmentos nodales.

5. METODOLOGÍA

5.1. Búsqueda, colecta y preparación de plantas de *P. elata* Sw.

Se realizó la búsqueda de la especie *P. elata* Sw. en Guatemala, fue ubicada en la zona norte del Departamento de Quiché, en el municipio de Ixcán. La planta se encontró dentro de la finca “El Progreso”. En la primera colecta se obtuvieron semillas, las que se muestran en la figura 5.



Fuente: elaboración propia, 2019.

Figura 5. Semillas de *P. elata* Sw, colectadas en los bosques nubosos de la finca “El Progreso” ubicada en el municipio de Ixcán, Quiché.

Se obtuvieron muestras de diferentes tamaños; se extrajeron plantas jóvenes sin inflorescencia, se introdujeron plantas pequeñas para su traslado en una hielera, como se puede observar en la figura 6 literal B; y plantas de mayor tamaño en crecimiento vegetativo como se puede observar en la figura 7.



Fuente: elaboración propia, 2019.

Figura 6. Plantas jóvenes de *P. elata* Sw. (A) y muestras de plantas introducidas en hielera para su traslado (B).

Se utilizó macetas para poder conservar la planta durante el viaje y establecerlas en la ciudad Guatemala. Se realizó el llenado de macetas con suelo y materia orgánica en la que la planta se desarrolla, se plantaron una o dos plantas por maceta, como se muestra en la figura 7.



Fuente: elaboración propia, 2019.

Figura 7. Plantas jóvenes de *P. elata* Sw. en macetas para ser transportadas para la ciudad Guatemala, extraída de la finca “El Progreso” en el municipio de Ixcán, Quiché.

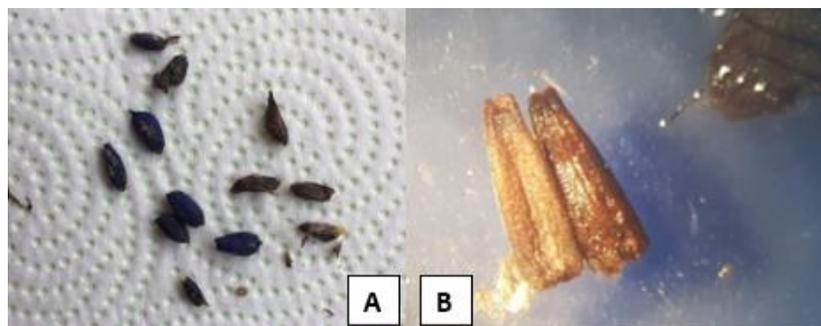
Las plantas acondicionadas en macetas fueron ubicadas en la terraza de una vivienda. Se aplicó riego diario durante 15 días y luego fueron regadas cada dos días. Las plantas fueron colocadas en sombra como se puede observar en la figura 8.



Fuente: elaboración propia, 2019.

Figura 8. Plantas de *P. elata* Sw., en crecimiento en la Ciudad de Guatemala.

Se procedió a reproducir la especie *P. elata* por medio de semillas en cultivo *in vitro*, estas fueron analizadas en el laboratorio de cultivo de tejidos utilizando estereoscopio, se observó que las semillas presentan una coloración negra con una consistencia dura, como se puede observar en la figura 9.



Fuente: elaboración propia, 2019.

Figura 9. Semillas *P. Elata* Sw., con coloración negro (A) y semilla sin membranas con consistencia dura (B).

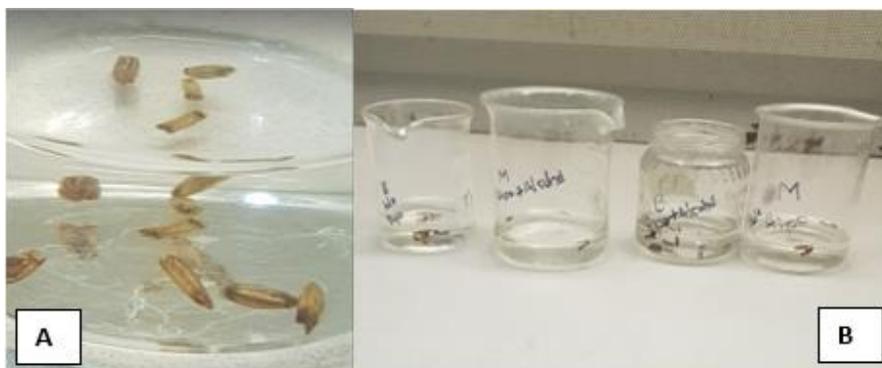
Las semillas se lavaron con jabón antibacterial y se sumergieron en una solución de Benomyl a una concentración de 1 g/l por media hora para eliminar cualquier contaminación por hongo, agitando levemente, como se puede observar en la figura 10.



Fuente: elaboración propia, 2019.

Figura 10. Semillas de *P. elata* Sw. sumergidas en solución de Benomyl 1 g/l por media hora en laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.

Luego se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 %, esto se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar por un periodo de diez minutos en constante agitación. Por último, se realizó un triple lavado con agua esterilizada, como se puede observar en la figura 11. Se colocó una semilla en tubos de ensayo y frascos de vidrio con 20 ml de medio MS basal, con un total de 16 semillas establecidas en el cuarto de incubación.



Fuente: elaboración propia, 2019.

Figura 11. Semillas de *P. elata* Sw. Sumergidas en solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % (A) y triple lavado con agua esterilizada (B), realizado en cámara de flujo laminar.

En la siembra de semillas de *P. elata* Sw. no hubo germinación debido a dormancia en las mismas. En un estudio realizado sobre la germinación y dormancia de arbustos y trepadoras del bosque en Cuba, Sánchez, Montejo, Gamboa, Puentes y Hernández (2015), reportaron que las semillas del género *Psychotria* muestran dormancia.

5.2. Inducción de organogénesis en hojas de *P. elata* Sw.

Se evaluaron diferentes medios de inducción para la respuesta organogénica en hojas de *P. elata* Sw., se utilizó como medio basal el MS, con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento BAP, ANA e IBA, en diferentes concentraciones. Como explantes se utilizaron hojas en proceso de crecimiento, segmentos de hoja de 1 cm², segmentos de hojas de los espacios intervenales, todos los medios utilizados fueron semisólidos, solidificados con 0.6 % de agar, se utilizó de 10 ml a 20 ml de cada medio de cultivo, los que fueron esterilizados en una autoclave a 120 °C y 15 psi por 15 min. Los explantes fueron desinfectados con procedimientos que se detallan en cada uno de los experimentos, que se describen abajo.

5.1.1. Características generales de los experimentos

A. Tratamientos

Los tratamientos estuvieron constituidos por medios de inducción de organogénesis en los cuales se utilizó como medio basal el medio MS y diferentes combinaciones de los reguladores de crecimiento; BAP, ANA e IBA. En cada experimento el número de tratamientos fue diferente de acuerdo con las combinaciones de reguladores de crecimiento y características del explante.

B. Unidad experimental

Cada unidad experimental estuvo constituida por un frasco de vidrio de 125 ml con 10 ml o 20 ml de medio de cultivo. En el cual se colocaron de uno a cuatro explantes de hoja de *P. elata* según experimento. Los frascos se sellaron con papel aluminio.

C. Diseño experimental

Para la evaluación de la respuesta organogénica de las hojas de *P. elata*, se utilizó el diseño experimental completamente al azar en todos los experimentos realizados, debido a que las condiciones en las que se realizaron los experimentos fueron homogéneas en el laboratorio.

D. Modelo estadístico matemático

El diseño estadístico matemático que se utilizó para la respuesta organogénica fue el siguiente:

$$\gamma_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

γ_{ij} = Variable respuesta de la ij-esima unidad experimental.

μ = Efecto de la media general.

τ_i = Efecto del i-esimo tratamiento, número de brotes producidos.

ε_{ij} = Efecto del error experimental asociado a la i-esima unidad experimental.

(Gutiérrez y De la Vara, 2008).

E. Variable

En la evaluación de la respuesta organogénica la variable de respuesta fue el número de brotes adventicios. Sin embargo, dada las condiciones que se dieron en los experimentos se observaron las variables explantes turgentes, así como presencia de división celular en algunas células de la superficie del explante y nivel de organización de las células.

F. Análisis de datos

Se realizó análisis descriptivo, utilizando gráficos del Software Infostat®.

5.1.2. Evaluación de explantes de hojas en proceso de crecimiento

A. Tratamientos

Se evaluaron 10 medios de inducción en los cuales seis fueron con combinaciones de BAP + ANA, tres con combinaciones de BAP + IBA y un testigo con medio basal MS, como se puede observar en el cuadro 4. De cada tratamiento se tuvieron seis repeticiones.

Cuadro 4. Tratamientos para evaluar la respuesta organogénica de hojas de *P. elata* Sw.

Código	Tratamientos (mg/l)
IBP1	IBA 0.5 + BAP 1
IBP2	IBA 1 + BAP 2
IBP3	IBA 2 + BAP 1
BAN1	BAP 1 + ANA 0.5
BAN2	BAP 3 + ANA 0.5
BAN3	BAP 5 + ANA 0.5
BAN4	BAP 1 + ANA 1
BAN5	BAP 3 + ANA 1
BAN6	BAP 5 + ANA 1
TESTIGO	Sin reguladores de crecimiento

Fuente: elaboración propia, 2018.

5.1.5. Evaluación de explantes de segmentos intervenales de hoja para inducción de organogénesis

A. Tratamientos

Se utilizaron como explantes segmentos intervenales sin las venas primarias y secundarias, en 10 medios de inducción con combinaciones de reguladores de crecimiento que se describen en el cuadro 4. De cada tratamiento se tuvieron cuatro repeticiones.

5.1.6. Primera evaluación de explantes de segmentos intervenales de hoja en medio de inducción con Benomyl para inducción de organogénesis

A. Tratamientos

Se evaluaron los mismos 10 medios de inducción con combinaciones de reguladores de crecimiento que se muestran en el cuadro 4, agregando una concentración de 2 g/l de

Benomyl al medio de cultivo. Para la inducción organogénica en explantes sin presencia de venas primarias ni secundarias. De cada tratamiento se tuvieron cuatro repeticiones.

5.1.7. Segunda evaluación de explantes de segmentos intervenales de hoja en medio de inducción con Benomyl para inducción de organogénesis

A. Tratamientos

Se evaluó explantes de hoja sin venas primarias ni secundarias de *P. elata* en medios de inducción con combinaciones de reguladores de crecimiento, con concentraciones más bajas que las anteriores, como se observa en el cuadro 5. Se agregó una concentración de 2 g/l de Benomyl en el medio de cultivo.

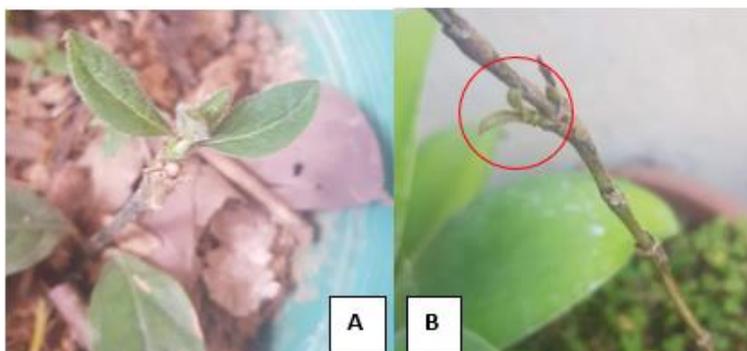
Cuadro 5. Tratamientos para evaluar la respuesta organogénica en hojas de *P. elata* Sw., en concentraciones más bajas.

Código	Tratamiento (mg/l)
T1	BAP 1 + 0.5 IBA
T2	BAP 0.5 + 0.25 IBA
T3	1 BAP
T4	0.5 BAP
T5	BAP 1 + 0.5 ANA
T6	BAP 1 + 0.25 ANA
T7	BAP 0.5 + 0.25 ANA
TESTIGO	Sin reguladores de crecimiento

Fuente: elaboración propia, 2019.

5.2. Respuesta de segmentos nodales para la propagación de *P. elata* Sw.

Se colocaron segmentos nodales en medio de cultivo basal MS, para conocer la brotación de yemas axilares y ser utilizadas en la propagación de la especie *P. elata*. Se utilizaron segmentos nodales obtenidos de plantas provenientes del campo y de plantas tratadas con fungicida Benomyl en la Ciudad de Guatemala, durante 45 días. En la figura 12 se muestran los brotes de los cuales se obtuvieron los segmentos nodales.



Fuente: elaboración propia, 2019.

Figura 12. Brotes en plantas de *P. elata* Sw., aclimatadas en la Ciudad de Guatemala, de los cuales se obtuvieron los segmentos nodales.

5.3. Identificación de patógenos causantes de contaminación

Debido a la contaminación de las unidades experimentales de los experimentos realizados con explantes de hojas enteras y segmentos de hojas de un centímetro cuadrado de tamaño, se procedió a identificar los microorganismos que contaminaron el medio. La identificación se realizó en el Centro de Diagnóstico Parasitológico de la Facultad de Agronomía ubicado en el Edificio de Vinculación. En los análisis realizados se determinó la presencia de dos hongos, los cuales fueron *Cladosporium* sp. y *Fusarium* sp., como se observa en la figura 22. Debido a ello se trató a la planta madre con dosis de 1g/l de Benomyl un fungicida sistémico y de contacto, su forma de aplicación fue por aspersion, con aplicaciones diarias durante el primer mes y luego con un intervalo de un día.

5.4. Manejo del experimento

5.4.1. Condiciones de incubación

Las condiciones de los cultivos en el cuarto de incubación fueron con temperatura de 23 °C a 25 °C, fotoperiodo de 16 horas, con luz blanca a una intensidad de radiación de 3,000 lux y humedad relativa de 60 % a 70 %.

5.4.3. Preparación de cultivo

Se utilizó como medio basal el medio MS, la composición de este medio se muestra en el cuadro 8A en anexos. El medio se preparó partiendo de soluciones concentradas. Se prepararon las soluciones concentradas a concentraciones de 10X hasta 1000X dependiendo de la concentración de los compuestos que se utilizaron. Las soluciones concentradas que se prepararon y la cantidad de compuestos que se utilizaron se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Soluciones concentradas del medio basal MS y cantidad utilizada por litro de solución.

Macronutrientes			Cantidad a agregar por litro (g)	Cantidad a utilizar para un litro de medio
Componentes	mg/l			
(NH ₄) NO ₃	1650	10x	16.5	100 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	10x	3.7	100 ml
KNO ₃	1900	10x	19	100 ml
KH ₂ PO ₄	170	10x	1.7	100 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	10x	4.4	100 ml
Micronutrientes				
Componentes	mg/l			
H ₃ BO ₃	6.2	1000x	6.2	1 ml
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	1000x	22.3	1 ml
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	1000x	8.6	1 ml
KI	0.83	1000x	0.83	1 ml
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	1000x	0.25	1 ml
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	1000x	0.025	1 ml
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	1000x	0.025	1 ml
Continuación cuadro 6				
Hierro y EDTA				
Componentes	mg/l			
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	50x	1.39	20 ml
Na ₂ EDTA	37.3	50x	1.86	20 ml
Vitaminas				
Componentes	mg/l			
myo- Inositol	100	100x	10	10 ml
Tiamina HCl	0.1	100x	0.01	10 ml
Reguladores de crecimiento				
Componentes	mg/l			
BAP	1	1000x	1	
IBA	1	1000x	1	
ANA	1	1000x	1	
Componentes			g/l	
Sacarosa			30	
Agar			6	

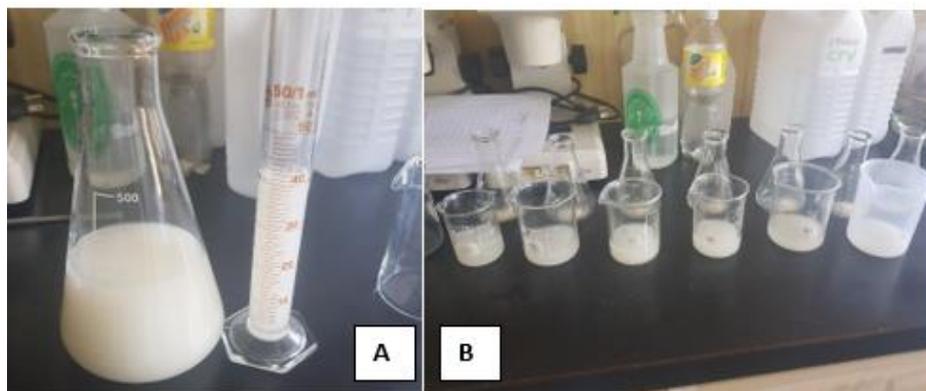
Fuente: elaboración propia, 2018.

5.4.4. Preparación de medios de cultivo

A. Preparación de medio para respuesta organogénica

Para la evaluación de la respuesta organogénica de hojas de *P. elata* se preparó diferentes volúmenes de medio basal MS. A cada volumen preparado se agregó las soluciones concentradas en el orden siguiente: macronutrientes, micronutrientes, solución de hierro, mynositol, vitaminas y sacarosa al 3 %.

Luego se aforó en una probeta graduada al volumen deseado. Para reducir la contaminación se agregó Benomyl al medio basal MS luego de aforar, con una concentración de 2 g/l, como se puede observar en la figura 13 literal A. El volumen total de cada experimento se distribuyó por el número de tratamientos de cada uno en diferentes beakers, como se observa en la figura 14.



Fuente: elaboración propia, 2020.

Figura 13. Medio basal MS con Benomyl (A) y distribución de medio basal MS con Benomyl para preparación de tratamientos (B).



Fuente: elaboración propia, 2020.

Figura 14. Preparación de tratamientos para evaluar la respuesta organogénica en hojas de *P. elata* Sw., en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.

Posteriormente se agregaron las diferentes cantidades de cada regulador de crecimiento a cada tratamiento, las cuales se muestran en el cuadro 7A. Después de agregar los reguladores de crecimiento se ajustó el pH a 5.5- 5.7 en cada tratamiento.

Luego se realizó el pesado del agar a 0.6 % con base al volumen de cada tratamiento, éste se colocó en matraces de Erlenmeyer, donde luego se agregó el volumen de cada tratamiento según correspondía, como se puede observar en la figura 15.

Luego se disolvió el agar en un horno microondas, por 2 min o 3 min con varias repeticiones, hasta homogenizar la solución. Después se procedió a colocar 20 ml de medio de cultivo en frascos de vidrio para el primer y segundo experimento y 10 ml para el resto de los experimentos, los cuales fueron cubiertos en la parte superior con papel aluminio y esterilizados en una autoclave a 120 °C y 15 psi por 15 min.



Fuente: elaboración propia, 2020.

Figura 15. Distribución de agar en cada erlenmeyer para cada tratamiento evaluado en la respuesta organogénica de *P. elata* Sw., en el laboratorio de cultivo de tejidos.

B. Preparación de medio de cultivo para segmentos nodales

Los segmentos nodales fueron cultivados en medio MS, para su preparación se utilizó un matraz de Erlenmeyer en el cual se agregó el 60 % de agua según cada volumen preparado. Se agregaron las soluciones concentradas en el orden siguiente: macronutrientes, micronutrientes, solución de hierro, mynositol, vitaminas y sacarosa al 3 %. Luego se aforó en una probeta graduada al volumen deseado.

Se procedió a medir y ajustar el pH a 5.5- 5.7, posteriormente se le agregó agar al 0.6 % en cada volumen preparado, se disolvió en el horno de microondas de 2 min - 3 min en varias ocasiones hasta homogenizar la solución. Luego se procedió al llenado de tubos de ensayo, se sellaron con papel aluminio y posteriormente fueron esterilizados en una autoclave a 120 °C y 15 psi por 15 min.

5.4.5. Desinfección y siembra de explantes

Al ingresar las hojas al laboratorio de cultivo de tejidos, se procedió a lavarlas con agua y jabón anti-bacterial, fueron eliminados restos que cualquier otro material observado en las

hojas. Posteriormente se preparó una solución con el fungicida Benomyl a 1 g/l de concentración. Se prepararon 500 ml de esta solución; las hojas fueron colocadas en la solución que contenía Benomyl por 30 min, como se puede observar en la figura 16.

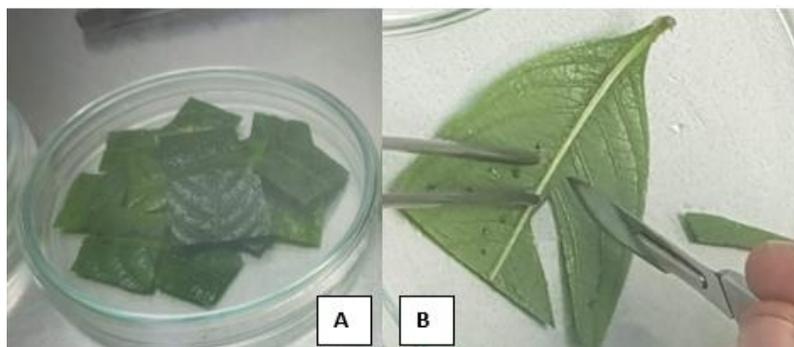
Posteriormente fueron trasladadas, en la cámara de flujo laminar, a una solución que contenía el 0.5 % de hipoclorito de sodio comercial, en esta solución estuvieron inmersas durante 10 min con agitación constante, por último, se les realizó un triple lavado con agua estéril eliminando restos de hipoclorito de sodio de las hojas.



Fuente: elaboracion propia, 2020.

Figura 16. Tratamiento con fungicida Benomyl en hojas jóvenes de *P. elata* Sw., en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.

Las hojas de *P. elata* fueron colocadas con el haz hacia arriba en cada frasco con 10 ml o 20 ml de medio de cultivo, según correspondiera. Las hojas en crecimiento fueron colocadas directamente. Para obtener los otros explantes de hoja, las mismas fueron cortadas con bisturí, según correspondía el tamaño del explante como se puede observar en la figura 17.



Fuente: elaboración propia, 2019.

Figura 17. Corte de explantes de un centímetro cuadrado (A) y corte de explantes intervenales en hojas de *P. elata* Sw. (B), en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.

Para los medios de cultivo en los cuales se evaluó respuesta organogénica, los explantes fueron incubados en un medio de inducción por una semana, posteriormente se realizó el traslado de la mitad de las unidades experimentales a un medio basal MS con 2 g/l de Benomyl.

Cuando en las unidades experimentales, en el primer experimento de la evaluación de explantes de segmentos intervenales, uno de los explantes mostraba signos iniciales de contaminación, éste fue descartado y los otros fueron desinfectados para ser cultivados nuevamente en medio basal MS. La desinfección se realizó con hipoclorito de sodio comercial al 0.5 % por 5 min, después se efectuó un triple lavado con agua estéril.

5.4.6. Desinfección y siembra de segmentos nodales

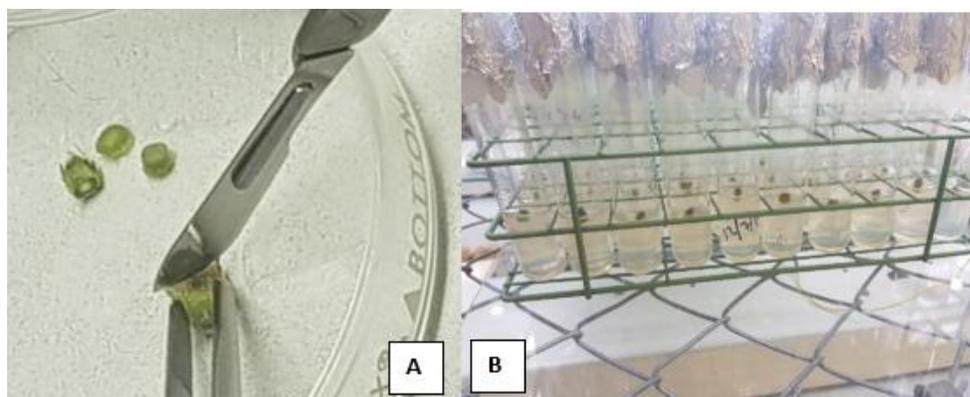
A nivel de laboratorio se realizó un lavado de segmentos nodales de 1 cm de longitud con jabón anti-bacterial, seguido de una inmersión en una solución de Benomyl a 1 g/l por media hora, luego se sumergieron en solución de hipoclorito de sodio al 0.5 %, de cloro comercial por 10 min, como se puede observar en la figura 18. Posteriormente se realizó un triple lavado con agua esterilizada para remover restos del cloro comercial utilizado.



Fuente: elaboración propia, 2019.

Figura 18. Segmentos nodales de *P. elata* Sw., en solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % de cloro comercial en cámara de flujo laminar del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.

Luego del triple lavado, se realizaron cortes con ayuda de un bisturí para reducir el tamaño y dejar únicamente el segmento nodal. Luego fueron introducidas las bases de los segmentos nodales en medio MS contenido en tubos de ensayo, llevados al cuarto de incubación para observar su respuesta. En la figura 19 literal A, se puede observar el corte realizado y el establecimiento de los segmentos en medio de cultivo.



Fuente: elaboración propia, 2020.

Figura 19. Corte realizado en segmentos nodales (A) y segmentos nodales de *P. elata* Sw. en medio de cultivo MS (B).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Inducción de organogénesis en hojas de *P. elata* Sw.

6.1.1. Respuesta de segmentos intervenales a la inducción de organogénesis

En un primer experimento en el cual se utilizaron segmentos intervenales de todos los explantes únicamente tres (7.75 %) de los explantes presentaron turgencia y mostraron división celular en la epidermis, no habiéndose observado organización celular que condujera a la emisión de brotes, como se observa en la figura 22.



Figura 20. Explante con grupos de células y con indicios de necrosamiento (A), Explante con presencia de callo en la base y grupos de células con indicios de organización (B) y explante con formación de callo alrededor de la base del tejido (C).

El explante que en la figura 22 se identifica con la literal A se necrosó con el tiempo, esto ocurrió a los 82 días después de haber sido colocado en el medio de cultivo, como se muestra en la figura 23. El explante identificado con la literal B a los 112 días presentó callo como se observa en la figura 22 y el explante identificado con la literal C mostró callo el cual se necrosó a los 112 días después de la siembra como se observa en la figura 24.

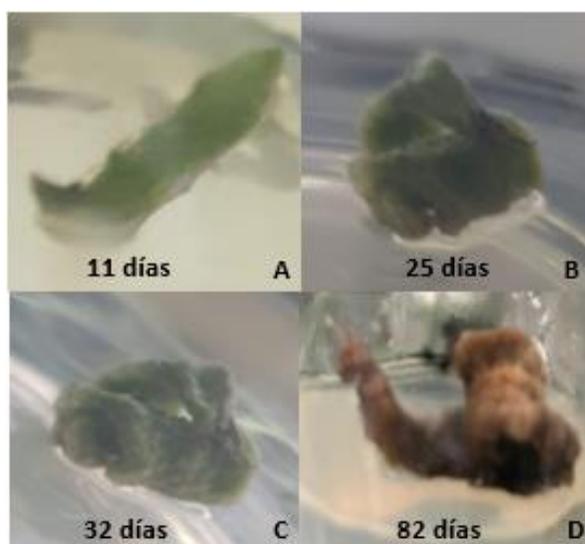


Figura 21. Secuencia del comportamiento del explante identificado con la literal A en la figura 22, necrosado a los 82 días de haber sido sembrado en medio basal MS en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.

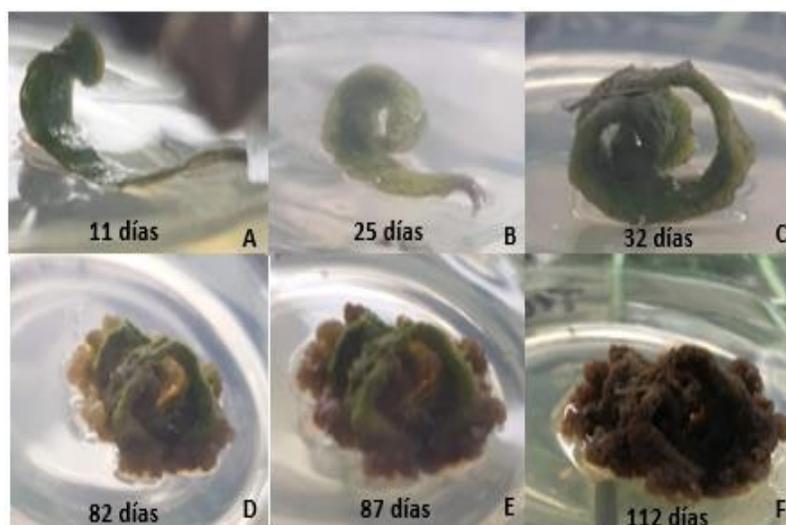


Figura 22. Secuencia del comportamiento del explante identificado con la literal C de la figura 22, necrosado a los 112 días de su siembra, fue colocado en medio de inducción con reguladores de crecimiento, después de siete días se trasladó a medio basal MS en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.

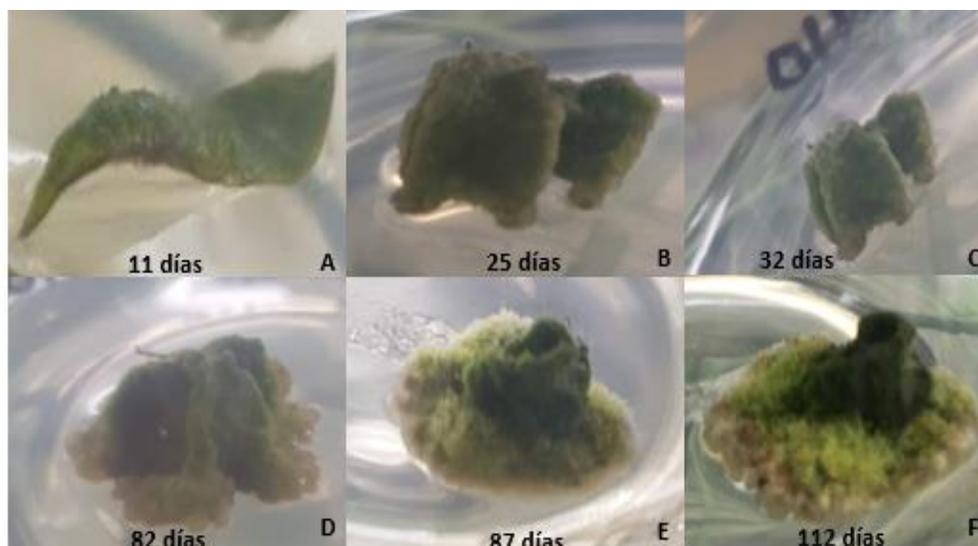


Figura 23. Secuencia del comportamiento del explante identificado con la literal B de la figura 22, con callo en la base y estados iniciales de organización celular en la parte central a los 112 días después de la siembra en medio basal MS con combinación de 3 mg/l BAP + 0.5 mg/l ANA.

Los tratamientos, que mayor turgencia y mayor número de grupos de células con indicios de organización se observaron en segmentos intervenales de hoja tratadas fueron, 2 mg/l de IBA + 1 mg/l de BAP, 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l ANA, 5 mg/l BAP + 0.5 mg/l ANA y 0.5 mg/l de IBA + 1 mg/l de BAP. En el tratamiento 2 mg/l de IBA + 1 mg/l de BAP a los 57 días se observó el 50 % de los explantes turgentes, a los 64 días se mantuvo el mismo porcentaje de explantes turgentes y se comenzó a observar la presencia de división celular en la epidermis de los explantes; a los 72 días el porcentaje de explantes que mostraron turgencia y división celular en la epidermis se mantuvo.

A los 80 y 89 días el 25 % de unidades experimentales siguieron mostrando división y organización celular. Similar comportamiento se observó en el tratamiento 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l ANA hasta los 80 días. Sin embargo, en este tratamiento se observó menos división celular en la epidermis y menos grupos de células.

En el tratamiento 0.5 mg/l de IBA + 1 mg/l de BAP a los 57 y 64 días permanecieron turgentes el 50 % de explantes y mostraron división celular en la epidermis, en menor

cantidad que los tratamientos mencionados anteriormente. A los 72 y 82 días solo el 25 % de explantes mostraron división celular en la epidermis. En el tratamiento con 5 mg/l BAP + 0.5 mg/l ANA el 25 % de explantes presentaron turgencia y división celular en las lecturas realizadas a los 57, 64 y 72 días, como se muestra en la figura 26. En estos explantes la división celular observada en la epidermis fue menor en comparación con los explantes de los tratamientos antes mencionados, como se muestra en la figura 27.

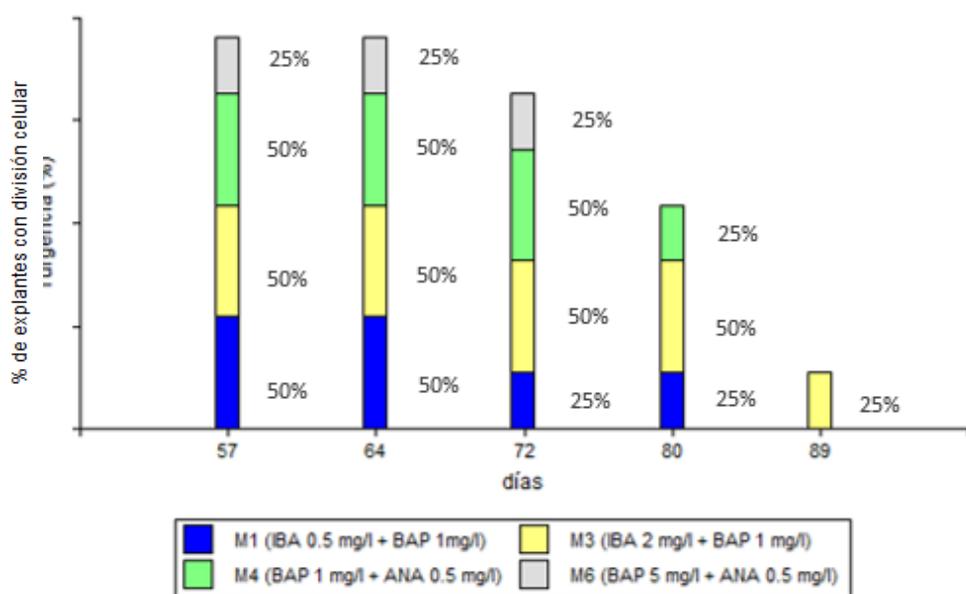


Figura 24. Porcentaje de explantes de tratamientos que mostraron división celular a los 57, 64, 72, 80 y 89 días después de la siembra, en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, de la Facultad de Agronomía, 2019.

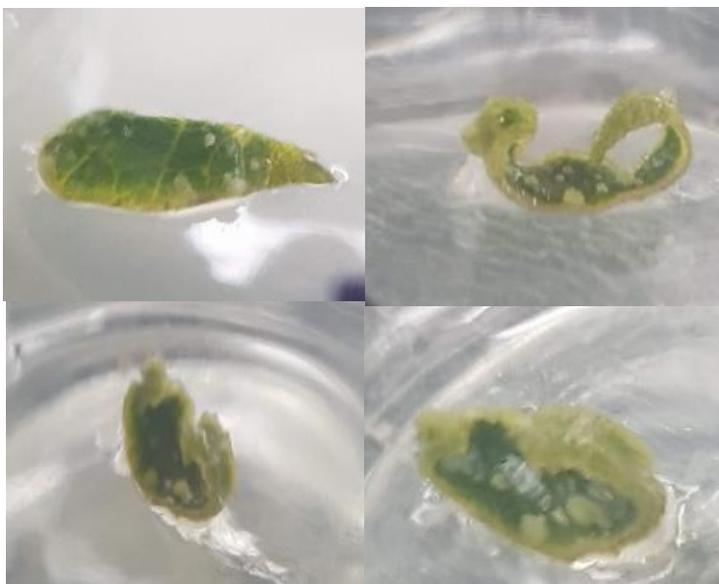


Figura 25. Explantes turgentes con presencia de células organizadas a los 89 días en medio de cultivo MS con combinaciones de 0.5 mg/l IBA más 1 mg/l de BAP, en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Facultad de Agronomía, 2019.



Figura 26. Explantes con presencia de grupos de células con indicios de organización celular en medio de cultivo MS con combinaciones de 2 mg/l IBA más 1 mg/l de BAP, en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Facultad de Agronomía, 2019.

Los tratamientos que mayor división celular mostraron fueron 0.25 mg/l de IBA + 0.5 mg/l de BAP, 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l ANA, 0.5 mg/l BAP + 0.25 mg/l ANA, 0.25 mg/l de ANA + 1 mg/l de BAP y 1 mg/l BAP. En el tratamiento 1 mg/l de BAP + 0.25 mg/l de ANA a los 50

días se observó el 50 % de los explantes con división celular, a los 57 días se mantuvo el mismo porcentaje de explantes con división celular en la epidermis; a los 65 y 72 días el porcentaje de explantes que mostraron turgencia y división celular en la epidermis se mantuvo. A los 80 días solo el 25 % de los explantes siguieron mostrando división y organización celular con apariencia inicial de organogénesis.

Para los tratamientos 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l ANA y 1 mg/l BAP a los 50, 57, 65 y 72 días se observó el 25 % de explantes con presencia de división celular en la epidermis, como se observa en la figura 30 literal A. Para el tratamiento 0.5 mg/l BAP + 0.25 mg/l ANA se observó a los 50, 57 y 65 días, 25 % de explantes turgente con presencia de división celular en la epidermis, como se observa en la figura 30 literal B.

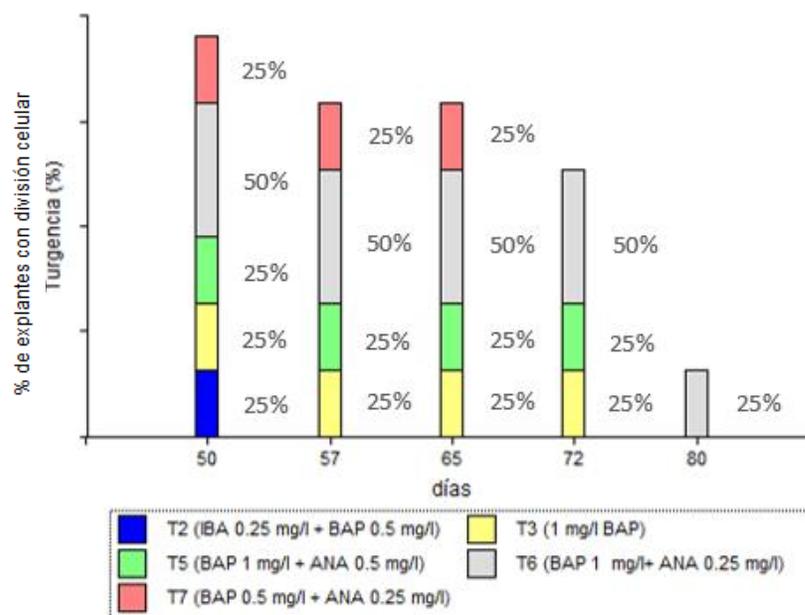


Figura 27. Porcentaje de explantes con presencia de división celular de cada tratamiento en función al tiempo en la evaluación para la respuesta organogénica de segmentos intervenales de hojas de *P. elata* Sw., como explante en medios de cultivo MS con 2 g/l de Benomyl en combinaciones de BAP + IBA y BAP + ANA, en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Facultad de Agronomía, 2019.

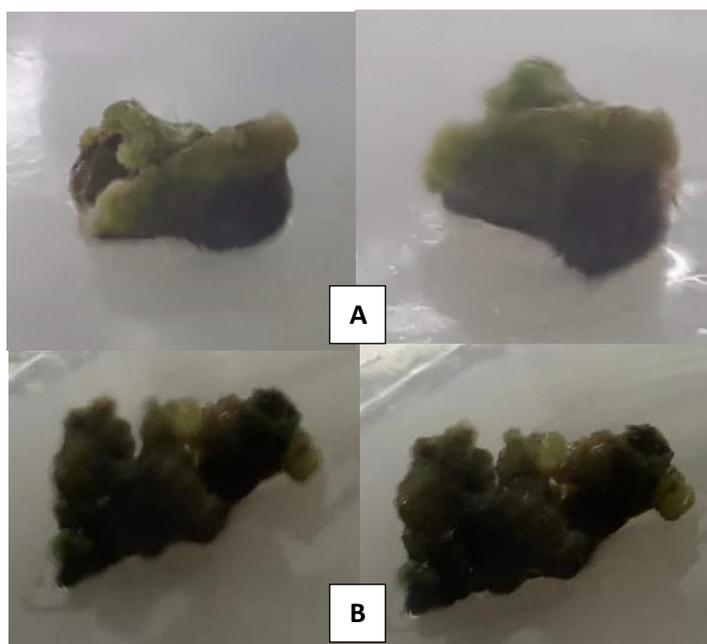


Figura 28. Explante con presencia de división y organización celular en menor proporción. Medio con 1 g/l BAP (A) y con 0.5 mg/l BAP más 0.25 mg/l ANA (B), en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Facultad de Agronomía, 2019.

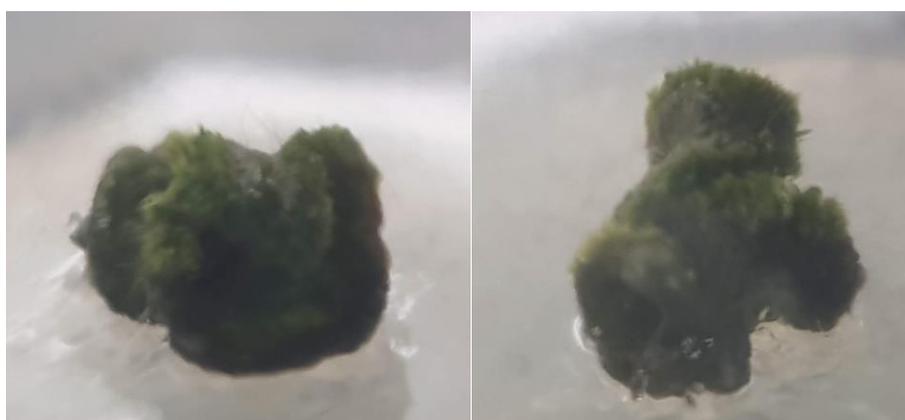


Figura 29. Se puede observar la división y organización celular en medio de cultivo con 0.25 mg/l ANA más 1 mg/l de BAP, en evaluación de medios de inducción para respuesta organogénica de *P. elata Sw.*, en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Facultad de Agronomía, 2019.

En el segundo experimento en el cual se utilizaron segmentos intervenales de hoja como explantes, se observó división celular en los mismos al combinar 3 mg/l BAP + 0.5 mg/l de ANA, como se puede observar en la figura 25. Además, los tejidos se necrosaron conforme avanzó el tiempo. El explante que mayor tiempo fue observado, 112 días, se muestra en la figura 25, con una coloración verde oscuro y con presencia de callo en la parte basal.

Según Azofeifa (2009), el oscurecimiento es un fenómeno muy común y especialmente en especies leñosas, dicho oscurecimiento del tejido en condiciones in vitro se debe a la oxidación por radicales libres de diferentes componentes celulares, oxidación de compuestos fenólicos que son catalizados por una enzima polifenol oxidasa para la producción de quinonas, las cuales son químicamente muy reactivas y propensas a reaccionar generando daño e incluso la muerte celular.

La familia *Rubiaceae* presenta una gran diversidad de metabolitos secundarios como antraquinonas, flavonoides y otros compuestos fenólicos y alcaloides. *P. elata* Sw., pertenece a esta familia y se reporta la presencia de estos compuestos, lo cual puede influir en la inducción de organogénesis en esta especie (Azofeifa, 2009).

La combinación de 1 mg/l de BAP con 0.25 mg/l de ANA presentó la mayor cantidad de explantes con división celular durante el experimento con un 50 % de las unidades experimentales, para las demás combinaciones hubo presencia de turgencia menor al 50 %, como se observa en la figura 31. Esto nos muestra que, al utilizar una mayor concentración de BAP combinado con concentraciones bajas de ANA las hojas de *P. elata* presentan una mejor respuesta observada con la presencia de división celular y grupos de células con indicios de organización. Además, al utilizar únicamente BAP las hojas presentan indicios de organización celular a una concentración de 1 mg/l de BAP.

Botero Giraldo, Urrea Trujillo, y Naranjo Gómez (2015), mostraron los mejores resultados de respuesta organogénica en *P. ipecacuanha* con combinaciones de 2 mg/l de IBA con 1 mg/l de BAP, con esta misma combinación de reguladores de crecimiento se observó en *P. elata* Sw. grupos de células en la epidermis.

6.3. Propagación por segmentos nodales de *P. elata* Sw.

6.3.1. Crecimiento de brotes axilares de *P. elata* Sw.

Se observó el crecimiento de dos brotes derivados de segmentos nodales, los cuales emergieron a los 20 y 37 días después de ser colocado el segmento nodal en medio de cultivo MS. En la figura 32 se muestra el desarrollo de ambos brotes hasta los 37 días, en ambos fue observado un lento crecimiento.



Figura 30. Escala visual del desarrollo de brotes en segmento nodal de *P. elata* Sw., en medio de cultivo basal MS en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Facultad de Agronomía, 2019.

6.3.2. Crecimiento de brotes derivados de segmento nodal de *P. elata* Sw.

A los 51 días se procedió a separar los brotes de los segmentos nodales, los mismos tenían una longitud de 10 mm y 4 mm. El crecimiento de ambos fue lento ya que, a los 118 días el brote de mayor tamaño presentó 15 mm de altura con una tasa de crecimiento semanal de 0.52 mm y el segundo 7 mm de altura con una tasa de crecimiento de 0.31 mm, después que ambos fueron separados del segmento nodal, con 6 y 2 hojas, respectivamente. En la figura 33 se muestra el crecimiento de ambos brotes, se puede observar su lento crecimiento, por ello la propagación por segmentos nodales podría no ser viable en esta especie.

Botero Giraldo, Urrea Trujillo y Naranjo Gómez (2015), indican que en un ensayo realizado con segmentos nodales de *P. ipecacuanha* en los cuales se evaluaron diferentes condiciones de luz, los brotes mejor desarrollados de segmentos se obtuvieron a los dos y cuatro meses, con una altura de 2.5 cm hasta 5.5 cm, con ocho hojas y tres nudos.

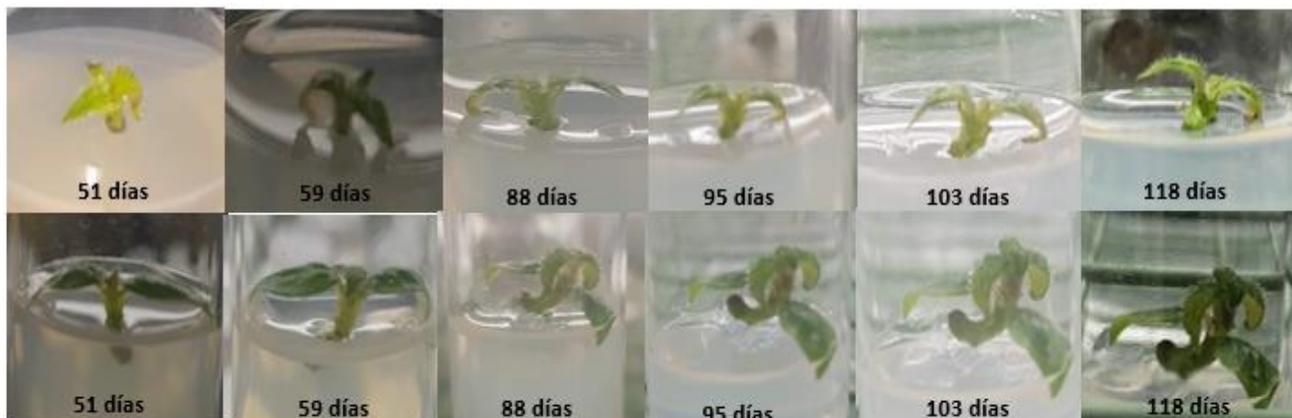


Figura 31. Comportamiento de dos brotes derivados de segmentos nodales de *P. elata* Sw. En medio basal MS en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Facultad de Agronomía, 2019.

6.4. Repetición de evaluación del efecto de medios de inducción de organogénesis en explantes intervenales de hojas de *P. elata* Sw., con tratamientos que mayor respuesta presentaron

Se realizó una evaluación de los tratamientos que presentaron mayor división y organización en hojas de *P. elata* Sw. Los tratamientos evaluados que presentaron indicios de división celular fueron 2 mg/l de IBA con 1 mg/l de BAP, 0.5 mg/l IBA con 1 mg/l BAP y 1 mg/l BAP con 0.5 mg/l ANA. Los tratamientos ya mencionados presentaron un 20 % de explantes con presencia de división celular a los 42 días, a los 56 días se mantuvo el mismo porcentaje como se puede observar en la figura 35.

Al utilizar 1 mg/l BAP con 0.5 mg/l ANA la presencia de división fue menor en comparación a los explantes colocados en 0.5 mg/l IBA con 1 mg/l BAP (figura 36 literal A) y 2 mg/l de IBA con 1 mg/l de BAP (figura 36 literal B), como se observa en figura 36. El comportamiento

siguió siendo el mismo a los 63 días. En el cuadro 7 se observa las diferentes combinaciones evaluadas.

Cuadro 7. Tratamientos utilizados para repetición de experimento de organogénesis en segmentos intervenales de hojas de *P. elata Sw.*, que mostraron mayor división celular.

Código	Tratamientos (mg/l)
M1	IBA 0.5 + BAP 1
M3	IBA 2 + BAP 1
M4	BAP 1 + ANA 0.5
M6	BAP 5 + ANA 0.5

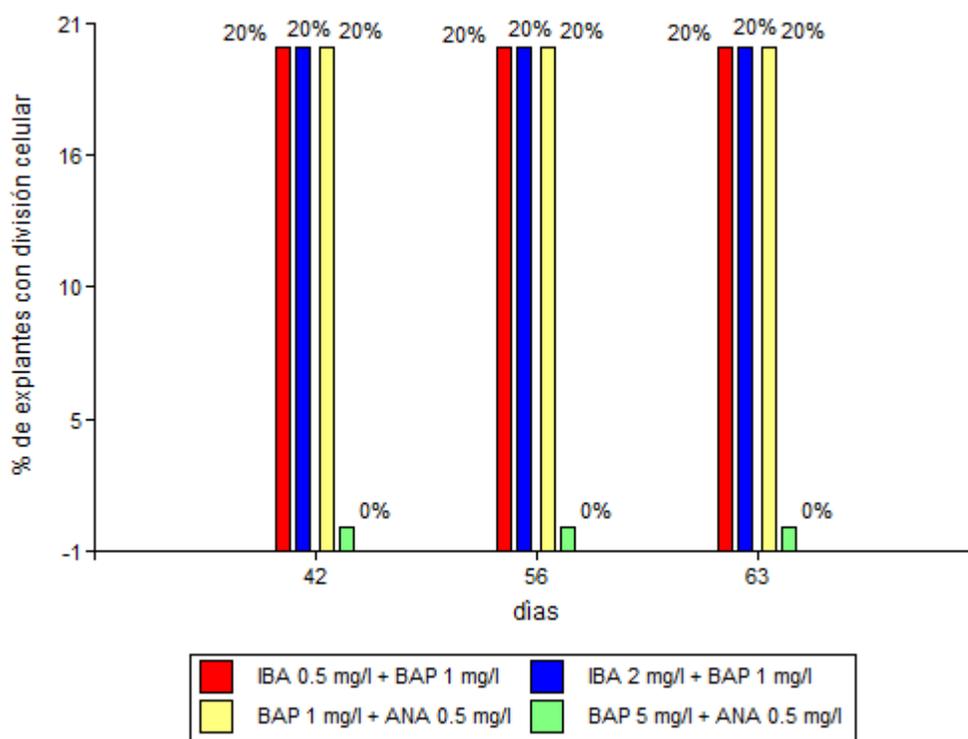


Figura 32. Porcentaje de explantes con presencia de división celular de cada tratamiento que presentó una mayor respuesta de división celular en segmentos intervenales de hojas de *P. elata Sw.*, como explante en medios de cultivo MS con 2 g/l de Benomyl en

combinaciones de BAP + IBA y BAP + ANA, en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Facultad de Agronomía, 2020.



Figura 33. Explantes con mínima presencia de división celular. Al utilizar 1 mg/l BAP con 0.5 mg/l ANA, en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Facultad de Agronomía, 2020.

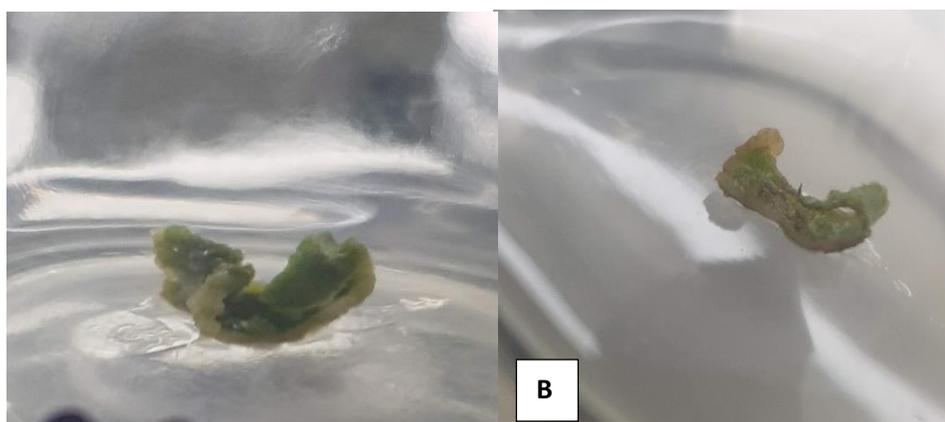


Figura 34. Explantes con mayor presencia de división celular, al utilizar 0.5 mg/l IBA con 1 mg/l BAP (A) y 2 mg/l de IBA con 1 mg/l de BAP (B), en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Facultad de Agronomía, 2020.

6.5. Patógenos contaminantes

La planta en su hábitat natural se encuentra en interacción con varios patógenos del ambiente. Los patógenos *Cladosporium sp.* y *Fusarium sp.* fueron los que provocaron la contaminación de los medios de cultivo. En la figura 20 se muestran las estructuras de estos patógenos.

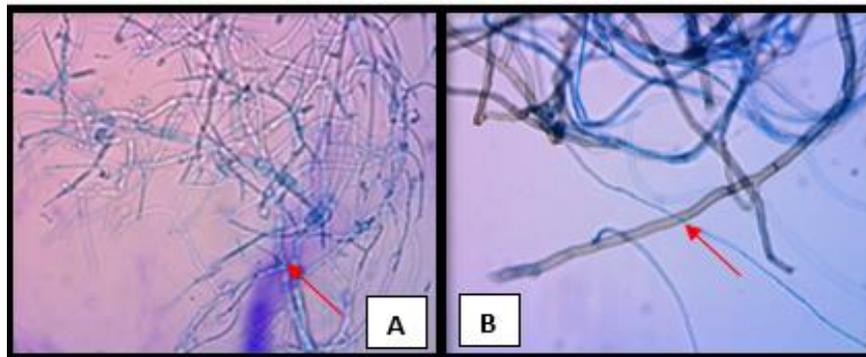


Figura 35. Fotografías de las estructuras de los principales hongos causantes de la contaminación in vitro en la propagación de *P. elata Sw.* (A) *Fusarium sp.* y (B) *Cladosporium sp.*

6.5.1. Tamaño de explante y contaminación

Se realizaron cuatro experimentos en los cuales se utilizaron diferentes tipos de explantes. Se inicio un experimento de hojas enteras en crecimiento y explantes de 1 cm² de hoja, para la respuesta organogénica en las hojas de *P. elata*. Se obtuvo alto porcentaje de contaminación como se observa en la figura 21.



Figura 36. Explantes de hoja entera y de 1 cm² de hoja de *P. elata Sw.*, para respuesta de organogénesis.

Debido a los resultados obtenidos con los explantes ya mencionados con anterioridad se utilizaron segmentos intervenales como explantes excluyendo los haces vasculares de las hojas. El control de la contaminación se logró al reducir el área foliar del explante y al agregar el fungicida Benomyl en el medio de cultivo.

Lara, Valverde, Gómez, y Hidalgo (2003), muestran que la propagación in vitro realizada en *P. acuminata* no fue del todo favorable ya que, el protocolo de desinfección fue ineficiente debido al material vegetal proveniente directamente de campo, aclarando que el género de *Psychotria* es una planta de sotobosque, por lo que sus condiciones ambientales son propicias para la proliferación de hongos y bacterias, que bajo condiciones ambientales no causan daño a la planta pero al ser colocadas en medio de cultivo como el cultivo in vitro, se manifiesta su proliferación. También, reportan que se agregó al medio el fungicida Imazalil a 0.5 mg/l y los resultados siguieron siendo negativos, donde el fungicida no inhibió el crecimiento de los tejidos. La organogénesis obtenida en *P. acuminata* se logró en plantas que se mantuvieron en cultivo in vitro por 4 años

Cuando se redujo el tamaño del explante de hojas de *P. etala Sw.* y se excluyeron los haces vasculares del tejido vegetal puesto en cultivo, la contaminación de las unidades experimentales fue menor, sin embargo, a los 7 días después los explantes comenzaron a contaminarse. Esta contaminación fue posteriormente reducida cuando se utilizó en el medio de cultivo 2 g/l de Benomyl. Hernández y Gonzales (2010), mencionan que los

microorganismos epífitos y endófitos de las plantas pueden ser introducidos al medio de cultivo principalmente por el explante inicial. La identificación de la fuente de contaminación es complicada ya que se pueden encontrar en la superficie, el interior del explante o en ambos sitios. Los que se ubican en los haces vasculares son los más complicados de eliminar.

La presencia de estos microorganismos es más probable que aparezca en cultivo in vitro cuando la planta donante crece directamente en campo expuesta a plagas y enfermedades sin ningún tipo de control. Por otra parte, el tamaño del explante es uno de los factores que influyen en la presencia de contaminantes in vitro; a mayor tamaño del explante, mayor probabilidad de contaminación.

Hernández y Gonzales (2015), indican que los métodos de desinfección utilizados no siempre eliminan los microorganismos, ya que, algunos tienen la capacidad de permanecer dentro de las células o los haces vasculares de las plantas, y de esta manera se introducen al cultivo, donde se llega a manifestar sobre los medios ya establecidos o puede permanecer durante un largo tiempo.

7. CONCLUSIONES

1. En los segmentos intervenales de hojas de *P. elata Sw.*, no se observó inducción de organogénesis en los diferentes medios de cultivo evaluados.
2. La mayor división y organización celular se observó cuando se utilizaron segmentos intervenales de hoja de *P. elata Sw.*, en medios de inducción que contenían como medio basal MS con la combinación de reguladores de crecimiento de 2 mg/l IBA más 1 mg/l BAP.
3. Los brotes, derivados de las yemas axilares de segmentos nodales de *P. elata Sw.*, al ser propagados en el medio basal MS muestran lento crecimiento, lo cual dificulta la propagación de la especie por este método.
4. Los patógenos causantes de la contaminación en los medios de cultivo fueron *Fusarium sp* y *Cladosporium sp*.

8. RECOMENDACIONES

1. Debido a la dificultad que presenta la especie *P. elata* Sw., a la propagación in vitro por organogénesis y segmentos nodales, se recomienda evaluar la propagación por semilla, estudiando la dormancia de ésta.
2. Se recomienda evaluar protocolos de desinfección para el material vegetal de *P. elata* Sw.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alcántara Cortes, J. S. (2017). *Importancia de los cultivos vegetales in vitro para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación*. Obtenido de BioCiencias, 1(1), : <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/Biociencias/article/view/2222>
- Ávila, R., Cajas, J., Grajeda, A. L., Machuca, O., & Benitez, L. (2005). *Aves y murciélagos como dispersores de semillas en tres etapas sucesionales de la ecorregión Lachuá, Alta Verapaz, Guatemala*. Obtenido de Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación / Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia: <https://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puirna/INF-2005-021.pdf>
- Azofeifa, Á. (2009). *Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro*. Obtenido de Agronomía Mesoamericana, 20(1), 153-175: http://www.mag.go.cr/rev_meso/v20n01_153.pdf
- Baskin, J. M. (2004). *A classification system for seed dormancy*. Obtenido de Seed Science Research, 14(1), 1-16: <https://www.cambridge.org/core/journals/seed-science-research/article/classification-system-for-seed-dormancy/024181C2EEE1FC55B9D7578660A5CB66>
- Borhidi, A. (2012). *Rubiaceas de México*. Recuperado el 16 de Abril de 2018, de Hungría: Akadémiai Kiadó: http://static.akademiai.hu/media/2/4/5/0/0/-rubiaceas_de_mexico_segunda_y_ampliada_edicion_borhidi_attila-24500.pdf / https://www.researchgate.net/profile/Attila_Borhidi2/publication/272563188_Rubiaceas_de_Mexico_2nd_edition/links/58a49910a6fdcc0e075b
- Botero Giraldo, C., Urrea Trujillo, A. I., & Naranjo Gómez, E. J. (2015). *Potencial de regeneración de Psychotria ipecacuanha (Rubiaceae) a partir de capas delgadas de células*. Recuperado el 10 de Mayo de 2018, de Acta Biológica Colombiana, 20(3): http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-548X2015000300015&script=sci_arttext&tlng=es
- Chazdon, R. L., Redondo Brenes, A., & Vilchez Alvarado, B. (2005). *Effects of climate and stand age on annual tree dynamics in tropical second-growth rain forests*. Recuperado el 1 de Mayo de 2018, de Ecology, 86(7), 1808–1815: http://www7.nau.edu/mpcer/direnet/publications/publications_c/files/chazdon.pdf
- Gamara Reinoso, L. (2014). *Regeneración in vitro vía organogénesis y aislamiento de protoplastos de Gmelina arborea a partir de las plantas in vitro*. Obtenido de (Tesis Lic. Biol., Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Programa de Biología: Colombia): <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/15436/GamarraReinosoLiesel2014.pdf?sequence=1>
- García Vettorazzi, M. J. (2006). *Caracterización de la dieta y el hábitat del tapir (Tapirus bairdii Gill, 1865) en ecosistemas ribereños del Parque Nacional Laguna Lachuá, Cobán, Alta Verapaz, Guatemala*. Obtenido de (Tesis Lic. Biol., Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia: Guatemala): <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/tesis/B155.pdf>

- Giovannini, P., & Howes, M. J. (2017). *Medicinal plants used to treat snakebite in Central America: Review and assessment of scientific evidence*. Recuperado el 12 de Abril de 2018, de Journal of Ethnopharmacology, 199, 240-256: <https://pdfs.semanticscholar.org/acf7/b60a8f945b1e8d06879bf367b152d1e46d54.pdf>
- González, J. (2015). *Explicación etimológica de las plantas de la selva*. Recuperado el 16 de Abril de 2018, de Flora Digital de la Selva: <https://sura.ots.ac.cr/local/florula4/docs/ETIMOLOGIA.pdf>
- Guatemala Digital. (2017). *50 pcs blazing red lips flower seeds Psychotria elata flower seed garden plant*. Recuperado el 16 de Mayo de 2018, de Guatemala Digital: <https://guatemaladigital.com/Sin-Categoria/50-Pcs-Blazing-Red-Lips-Flower-Seeds-Psychotria-Elata-Flower-Seed-Garden-Plant/Producto.aspx?CodigoP=B073S3Y863>
- Gutiérrez Pulido, H., & De la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. Recuperado el 22 de Mayo de 2018, de México, MacGraw-Hill: <https://www.freelibros.org/ingenieria/analisis-y-diseño-de-experimentos-2da-edición-humberto-gutiérrez-pulido.html>
- Guzmán Q., J. A., & Cordero S., R. A. (2016). *Neighborhood structure influences the convergence in light capture efficiency and carbon gain: an architectural approach for cloud forest shrubs*. Recuperado el 1 de Mayo de 2018, de Tree Physiology, 36(6), 712–724: <https://doi.org/10.1093/treephys/tpw012>
- Hernández, J. (2017). *Psychotria elata (Rubiaceae)*. Recuperado el 26 de Abril de 2018, de Costa Rica: Área de Conservación de Guanacaste (ACG): <https://www.acguanacaste.ac.cr/paginas-de-especies/plantas/632-rubiaceae/4030-i-psychotria-elata-i-rubiaceae>
- Hernández, Y., & Gonzales, M. (2010). *Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes*. Obtenido de Cultivos Tropicales, 31(4): http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015
- Isabella, C. R. (2011). *Plants with specialist relationships show higher rates. (pp. 31-38)*. Recuperado el 21 de Mayo de 2018, de Council on International Educational Exchange (CIEE). Tropical ecology & conservation. Monte Verde, Costa Rica: CIEE: <https://cieetropicalecologyandconservation.files.wordpress.com/2015/10/spring-2011-complete.pdf>
- Lara, A., Valverde, R., Gómez, L., & Hidalgo, N. (2003). *Micropropagación de la planta medicinal Psychotria acuminata*. Recuperado el 20 de Mayo de 2018, de Agronomía Costarricense, 27(2), 7-20: https://www.mag.go.cr/rev_agr/v27n02_007.pdf
- Longa, C. (2018). *Características de la flor del beso o Psychotria elata – todo lo relacionado con la flor del beso propiedades, cultivo, fotos y más*. Recuperado el 10 de Mayo de 2018, de Plantas del Mundo: <http://plantasdelmundo.com/flores/caracteristicas-de-la-flor-del-beso/>
- Martín, R., Chong-Pérez, B., & Pérez-Alonzo, N. (2015). *Organogénesis in vitro en el género Digitalis*. Obtenido de Biotecnología Vegetal, 15(4), 195-206: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/497>
- Matsuura, H. N., Porto, D. D., & Fett-Neto, A. G. (2013). *Bioactive alkaloids from south american Psychotria and related Rubiaceae. (pp. 119-147)*. Recuperado el 12 de Abril de 2018, de K.

- G. Ramawat y J-M. Mérillon. Natural products: Phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes. Berlin: Springer: https://www.researchgate.net/profile/Arthur_Fett-Neto/publication/256497516_Bioactive_Alkaloids_from_South_American_Psychotria_and_Related_Rubiaceae/links/0deec52321fe1ebb92000000/Bioactive-Alkaloids-from-South-American-Psychotria-and-Related-Rubiaceae.pdf
- Naranjo, E., Urrea, A., & Atehortua, L. (2014). *Avances en la propagación in vitro a través de la embriogénesis somática de Psychotria ipecacuanha (Brot.) Stokes, planta medicinal en peligro crítico*. Obtenido de Revista Colombiana de Biotecnología, 16(1): http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752014000100010&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Ohashi, L. H., & De Oliverira, A. B. (2020). *Palicourea hoffmannseggiana (Schult.) Borhidi (Rubiaceae); uma revisão de taxonomia botânica, fitoquímica, atividades biológicas e atividade antimalárica*. Obtenido de Revista Eletrônica Acervo Saúde, 43: <https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/3027>
- Pacheco Taco, V. E. (2005). *Determinación de una metodología de desinfección y un medio de cultivo para la introducción y micropropagación in vitro de once ecotipos de cucúrbitas y cuatro de passifloras*. Recuperado el 13 de Mayo de 2018, de (Tesis Inga. Agra., Universidad Técnica de Cotopaxi, Carrera de Ciencias Agropecuarias, Ambientales y Veterinarias: Ecuador): <http://repositorio.iniap.gob.ec/jspui/handle/41000/709>
- Pedranzani, H., & Giorno, D. (2016). *Guía de trabajos prácticos cultivo in vitro: Conservación y producción de plantas año 2016-2020*. Recuperado el 13 de Mayo de 2018, de Argentina: Universidad Nacional de San Luis, Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias: https://www.researchgate.net/profile/Hilda_Pedranzani/publication/317267689_Guia_de_Trabajos_Practicos_CULTIVO_IN_VITRO_CONSERVACION_Y_PRODUCCION_DE_PLANTAS_ANO_2016-2020/links/5994a8feaca272ec90880089/Guia-de-Trabajos-Practicos-CULTIVO-IN-VITRO-CONSERVACION
- Pérez, G., Rosito, J., Mass, R., & Gándara, G. (2018). *Ecosistemas de Guatemala, basado en el sistemas de clasificación de zonas de vida*. Obtenido de Guatemala: Universidad Rafael Landívar, Instituto de Investigación y Proyección sobre Ambiente Natural y Sociedad (IARNA): <http://www.infoiarna.org.gt/wp-content/uploads/2019/02/Ecosistemas-de-Guatemala-final.pdf>
- Probiotek, México. (2017). *Murashige & Skoog (MS) medium*. Recuperado el 13 de Mayo de 2018, de Productos y Equipos Biotecnológicos: <http://www.probiotek.com/productos/reactivos/murashige-and-skoog-ms-medium/>
- Reis, E. S., Pinto, J. E., Correa, R. M., Bertolucci, S. K., & Lameira, O. A. (2004). *Tamanhos e posições de explantes e volumes de meio de cultivo na multiplicação de ipeca (Psychotria ipecacuanha (Brot.) Stokes) in vitro*. Obtenido de Ciência e Agrotecnologia, 28(3): http://login.research4life.org/tacsgr0www_scielo_br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542004000300030&lng=pt&tlng=pt

- Rocha Mendoza, D. R., & Treminio Reyes, S. J. (2008). *Embriogénesis somática en reproducción in vitro del cultivo de piña (Ananas comosus L. Merr.) cultivar M2*. Recuperado el 13 de Mayo de 2018, de (Tesis Ing. Agr., Universidad Nacional Agraria, Facultad de Agronomía: Nicaragua): <http://cenida.una.edu.ni/Tesis/tnf62r672.pdf>
- Rodas Duarte, L., Quezada, M., Hernández, B., & Marroquín, A. (2018). *Encinos de Guatemala, estado de conservación y evaluación de servicios ecosistémicos. Fase III: Izabal, Zacapa y Chiquimula*. Obtenido de Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación: <https://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puicb/INF-2017-16.pdf>
- Rojas Rodríguez, F., Bermúdez Cruz, G., & Jiménez Madrigal, Q. (2006). *Plantas ornamentales del trópico*. Recuperado el 30 de Abril de 2018, de Cartago, Costa Rica: Editorial Tecnológica de Costa Rica: https://books.google.com.gt/books?id=a_CF1vL6poAC&q=psychotria+elata#v=snippet&q=psychotria%20elata&f=false
- Sánchez Luque, M. C. (2017). *Los jardines "pintados" de Émile Zola, lugares de encuentro entre literatura y arte*. Recuperado el 02 de Mayo de 2018, de (Tesis PhD., Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Filología: España): <http://eprints.ucm.es/39749/1/T37906.pdf>
- Sánchez, J. A., Montejo, L., Gamboa, A., Albert-Puentes, D., & Hernández, F. (2015). *Germinación y dormancia de arbustos y trepadoras del bosque siempreverde de la Sierra del Rosario, Cuba*. Obtenido de Pastos y Forrajes, 38(1): http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942015000100002
- Seretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México (SAGARPA). (2017). *Laboratorio de cultivo de tejidos (CTV): Implementación y puesta en marcha: reporte de proyecto*. Recuperado el 13 de Mayo de 2018, de México: SAGARPA: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/264918/Reporte_de_Proyecto_1_Laboratorio.pdf
- Silva, C. A., & Lobo Segura, J. A. (2015). *Reproductive biology and herkogamy of Psychotria elata (Rubiaceae), a distylous species of the tropical rain forests of Costa Rica*. Recuperado el 14 de Abril de 2018, de American Journal of Plant Sciences, 6, 433-444: https://file.scirp.org/pdf/AJPS_2015022515024264.pdf
- Soto Solís, A., & Vega Araya, G. (2010). *Plantas con flores que atraen mariposas*. Recuperado el 16 de Abril de 2018, de Heredia, Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio): https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=aXc-gYfo2fMC&oi=fnd&pg=PA3&dq=produccion+de+psychotria+elata&ots=PV_dL9G7Nk&sig=8x_dnWcmZEQTdrVFkfvlrpT0Njk#v=onepage&q&f=false
- Universidad Nacional de Colombia (UNAL). (2007). *COL000159410 - Psychotria elata (Sw.) Hammel - Rubiaceae*. Recuperado el 02 de Mayo de 2018, de Colombia: UNAL, Biovirtual: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/es/colecciones/detail/122699/>
- Urrea Trujillo, A. I., Botero Giraldo, C., & Naranjo Gomez, E. J. (2017). *Potencial de conservación ex situ de ipecacuana (Psychotria ipecacuanha (Brot.) Stokes), una planta medicinal en peligro*

crítico de extinción. Obtenido de Acta Agronómica, 66(4):
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122017000400598&lng=en&nrm=iso&tlng=en

 Rolando Barrios

10. ANEXOS

Cuadro 8A. Composición del medio cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962).

Macroelementos		mg/l
1	NH ₄ NO ₃	1650.00
2	KNO ₃	1900.00
3	CaCl ₂ .2H ₂ O	440.00
4	MgSO ₄ .7H ₂ O	370.00
5	KH ₂ PO ₄	170.00
Microelementos		mg/l
6	MnSO ₄ .H ₂ O	22.30
7	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60
8	H ₃ BO ₃	6.20
9	KI	0.83
10	Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0.25
11	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.02
12	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.02
Vitaminas		mg/l
13	Tiamina HCl	0.10
14	Myo-inositol	100.00
Azúcar		g/l
15	Sacarosa	30.00

Fuente: Rocha Mendoza & Treminio Reyes, 2008.

Cuadro 9A. Cantidad de solución concentrada de regulador de crecimiento utilizados en los medios evaluados para la inducción de organogénesis en hojas de *P. elata* Sw., a una concentración de 1000X, con medio basal MS.

Número experimento	Cantidad preparada/ tratamiento (ml)	Reguladores de crecimiento	Concentración (mg/l)	Cantidad de solución concentrada utilizada (ml)
1	120	ANA	0.5	0.06
			1	0.12
		IBA	0.5	0.06
			1	0.12
			2	0.24
		BAP	1	0.12
			2	0.24
			3	0.36
5	0.60			
2	80	ANA	0.5	0.04
			1	0.08
		IBA	0.5	0.04
			1	0.08
			2	0.16
		BAP	1	0.08
			2	0.16
			3	0.24
5	0.4			
3	160	ANA	0.5	0.08
		BAP	5	0.8

Continuación de cuadro 9A.

5	40	ANA	0.5	0.02
			1	0.04
		IBA	0.5	0.02
			1	0.04
			2	0.08
		BAP	1	0.04
			2	0.08
			3	0.12
5	0.2			
6	40	ANA	0.5	0.02
			1	0.04
		IBA	0.5	0.02
			1	0.04
			2	0.08
		BAP	1	0.04
			2	0.08
			3	0.12
5	0.2			
8	40	BAP	0.5	0.02
			1	0.04
		ANA	0.5	0.02
			0.25	0.01
		IBA	0.5	0.02
			0.25	0.01

Fuente: elaboración propia, 2018.



REF. Sem. 02/2021

LA TESIS TITULADA:

"EVALUACIÓN DE 10 MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE LA ESPECIE *Psychotria elata* Sw., EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, GUATEMALA, C.A."

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE:

JOSUÉ JOEL FUENTES CONTRERAS

CARNE:

201407965

HA SIDO EVALUADO POR LOS PROFESIONALES: Dr. Gregorio Amilcar Sánchez Pérez
Ing. Agr. Gustavo Adolfo Álvarez Valenzuela

El Asesor y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cumplido con las Normas Universitarias y Reglamentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Ing. Agr. Edgar Oswaldo Franco Rivera
ASESOR

Ing. Agr. Carlos Fernando López Búcaro
DIRECTOR DEL IIA

IMPRIMAS

Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes
DECANO



CFLB/nm
c.c. Archivo