



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORA: CARRERA NAVARRETE, EVELYN CONSUELO

**TEMA: “ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES
CELULARES A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE
Valeriana pyramidalis Kunth Y ESTUDIO DEL EFECTO DE LA
HORMONA GA₃ EN GERMINACIÓN *in vitro* DE SUS
SEMILLAS”**

DIRECTORA: M.Sc. JADÁN GUERRERO, MÓNICA BEATRIZ

CODIRECTOR: Ing. PEÑA PONTÓN, CRISTIAN JAVIER

SANGOLQUÍ, SEPTIEMBRE DE 2014

CERTIFICACIÓN

M.Sc. Mónica Beatriz Jadán Guerrero

Ing. Cristian Javier Peña Pontón

Certifican:

Que el trabajo titulado **“Establecimiento de suspensiones celulares a partir de segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunth y estudio del efecto de la hormona GA₃ en germinación *in vitro* de sus semillas”** realizado en su totalidad por la Srta. EVELYN CONSUELO CARRERA NAVARRETE, como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple con las normas establecidas por la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.


Debido a la relevancia científica, expuesta en el presente trabajo de tesis, se recomienda su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a EVELYN CONSUELO CARRERA NAVARRETE que lo entregue a la Dra. María Augusta Chávez, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, Septiembre del 2014



M.Sc. Mónica Jadán
DIRECTOR



Ing. Cristian Peña
CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Carrera Navarrete Evelyn Consuelo

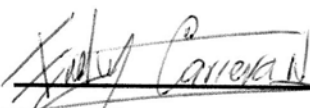
Declaro que:

El proyecto de grado denominado **“Establecimiento de suspensiones celulares a partir de segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunth y del efecto de la hormona GA₃ en germinación *in vitro* de sus semillas”**, ha sido desarrollado en base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía.

Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, Septiembre del 2014



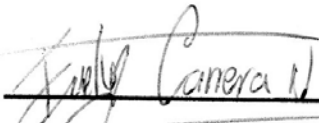
Evelyn Consuelo Carrera Navarrete

AUTORIZACIÓN

Yo, EVELYN CONSUELO CARRERA NAVARRETE

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “**Establecimiento de suspensiones celulares a partir de segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunth y del efecto de la hormona GA₃ en germinación *in vitro* de sus semillas**” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Septiembre del 2014


Evelyn Consuelo Carrera Navarrete

DEDICATORIA

Todo mi esfuerzo y perseverancia se lo dedico a Dios y a mi madre Dolorosa que han llenado mi camino de bendiciones, regalándome una nueva oportunidad cada día.

A mis padres Lauro y Consuelito quienes con su amor, su apoyo incondicional y sacrificio, me han dado el mejor ejemplo de vida, pues me han enseñado que se debe luchar por alcanzar nuestros sueños, que nada es imposible y a pesar de las adversidades siempre saldrá el sol.

A mi hermano Juan Gabriel por cuidarme, ver lo mejor para mí y aconsejarme siempre.

A mis abuelitos Olguita Bastidas y Lauro Enrique Carrera, guerreros que se aferran a la vida, les dedico este trabajo por criarme desde pequeña, con amor dulzura y rectitud.

“Comienza haciendo lo necesario, después lo posible y de repente estarás haciendo lo imposible”

-San Francisco de Asís -

Evelyn Carrera Navarrete

AGRADECIMIENTO

A mi directora de tesis M.Sc. Mónica Jadán, a quien he llegado a querer mucho, ya que gracias a su sabiduría, conocimiento, paciencia y orientación he logrado culminar esta investigación con éxito. A demás quiero agradecerle por abrirme las puertas de su laboratorio, su sincera amistad y sus valiosos consejos.

A mi codirector de tesis Ing. Cristian Peña, por haberme orientado, corregido y apoyado en mi labor científica.

A Santiago Molina, gracias por apoyarme incondicionalmente durante todo este proceso, por dibujar siempre una sonrisa en mi rostro y ser parte de mi vida.

A mis amigos Kary, Gaby, Liz, Vale, Che, Sebas, Pancho, Anita y Paty gracias por brindarme su amistad, su confianza y cariño, sé que puedo contar con ustedes en las buenas y en las malas.

A todos mis compañeros de laboratorio, en especial a los que ya no están, gracias por esos enriquecedores momentos de vida y sabios consejos que de una u otra manera contribuyeron con el éxito de esta investigación.

Evelyn Carrera Navarrete

ÍNDICE DE CONTENIDO

LISTADO DE FIGURAS	x
LISTADO DE TABLAS	xv
LISTADO DE CUADROS	xvii
RESUMEN.....	xx
ABSTRACT	xxi
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	22
1.1.Formulación del problema	22
1.2.Justificación del problema	23
1.3.Objetivos de la Investigación	26
1.3.1.Objetivo General.....	26
1.3.2.Objetivos Específicos	26
1.4.Marco teórico.....	27
1.4.1.Características generales de la especie	27
1.4.1.1.Taxonomía.....	27
1.4.1.2.Descripción botánica	28
1.4.1.3.Distribución geográfica	30
1.4.1.4.Perfil fitoquímico de la familia Valerianaceae	31
1.4.1.5. Usos y Propiedades.....	35
1.4.2.Cultivo <i>in vitro</i>	36
1.4.2.1.Generalidades	36
1.4.2.2.Aplicaciones del cultivo <i>in vitro</i>	36
1.4.2.3.Germinación <i>in vitro</i> de semillas.....	37
1.4.2.4.Componentes del medio de cultivo.....	38

1.4.3.Efecto del ácido giberélico (GA ₃) en la germinación de semillas.....	47
1.4.4.Obtención de explante asépticos.....	48
1.4.5.Inducción a callo.....	49
1.4.6.Suspensiones celulares.....	50
1.4.6.1.Iniciación de las suspensiones celulares.....	50
1.4.6.2.Mantenimiento de las suspensiones celulares.....	52
1.4.6.3. Cinética de crecimiento celular.....	52
1.4.6.4.Métodos para medir el crecimiento celular.....	54
1.4.6.5. Producción <i>in vitro</i> de metabolitos secundarios.....	56
1.5.Sistema de hipótesis.....	58
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
2.1. Fase de campo.....	59
2.1.1. Selección, recolección y traslado del material vegetal.....	59
2.1.2 Identificación de la especie.....	59
2.1.3. Aclimatación y tratamiento fitosanitario.....	59
2.2. Fase de Laboratorio.....	60
Experimento N° 1. Establecimiento de suspensiones celulares.....	62
2.2.1. Etapa I: Selección del material vegetal.....	62
2.2.2. Etapa II: Desinfección y establecimiento de folíolos.....	63
2.2.3. Etapa III: Inducción a callo.....	67
2.2.4. Etapa IV: Suspensiones celulares.....	70
2.2.4.1. Iniciación de las suspensiones celulares.....	70
2.2.3.1. Recambio de medio.....	71
2.2.3.2. Recuento Celular.....	72
2.2.3.3. Cinética Celular.....	73
Experimento N°2. Evaluación del Efecto de la Hormona GA ₃ en germinación <i>in vitro</i> ...	75

2.2.4. Etapa I: Selección del material vegetal.....	75
2.2.5. Etapa II: Desinfección y establecimiento de semillas	75
2.2.6. Etapa III: Evaluación del efecto de la hormona GA ₃ en la germinación de semillas.....	79
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	82
Experimento N° 1. Establecimiento de suspensiones celulares	82
3.1. Etapa I: Desinfección y establecimiento de folíolos	82
3.1.1. Contaminación.....	82
3.1.1.1 Análisis exploratorio de datos.....	82
3.1.1.2. Análisis inferencial	84
3.1.2. Necrosis.....	87
3.1.2.1. Análisis exploratorio de datos.....	87
3.1.2.2. Análisis inferencial.....	89
3.2. Etapa II: Inducción a Callogénesis	91
3.2.1. Formación de callo por explante.....	92
3.2.1.1. Análisis exploratorio de datos.....	92
3.2.1. 2. Análisis inferencial.....	93
3.3.1. Peso fresco del callo.....	95
3.3.1.1. Análisis exploratorio de datos.....	95
3.3.1.2. Análisis inferencial.....	96
3.4. Etapa III: Suspensiones celulares	98
3.4.1. Cinética celular	99
3.4.1.1. Análisis exploratorio de datos.....	99
3.4.1.2. Análisis inferencial.....	102
Experimento N° 2. Evaluación del efecto de la hormona GA ₃ en germinación.....	103
3.5. Etapa I: Desinfección y establecimiento de semillas	103

3.5.1. Contaminación.....	104
3.5.1.1. Análisis exploratorio de datos.....	104
3.5.1.2. Análisis inferencial.....	104
3.6. Etapa II: Evaluación del efecto de la hormona GA ₃ en germinación <i>in vitro</i>	107
3.6.1. Efecto de la hormona GA ₃ en germinación <i>in vitro</i>	107
3.6.1.1. Análisis exploratorio de datos.....	107
3.6.1.2. Análisis inferencial.....	109
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....	112
Experimento N° 1: Establecimiento de suspensiones celulares	112
4.1. Etapa I: Desinfección y establecimiento de folíolos	112
4.2. Etapa II: Inducción a Calogénesis	115
4.3. Etapa III: Suspensiones celulares	117
Experimento N° 2. Evaluación del efecto de la hormona GA ₃ en germinación.....	119
4.4. Etapa I: Desinfección y establecimiento de semillas	119
4.5. Etapa II: Efecto de la hormona GA ₃ en germinación <i>in vitro</i>	120
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	123
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....	125
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....	126

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.	29
Estructura morfológica de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth, a) Hojas, b) Inflorescencia, c) Flor y d) Semilla.....	29
Figura 2.	30
Imagen de distribución geográfica de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth en el Ecuador vista satelital a 100 Km 2014 © Google.....	30
Figura 3.	32
Estructura de algunos compuestos presentes en los aceites volátiles de valeriana (Silva, 2009).	32
Figura 4.	33
Estructura química de los valeportriatos (Russowski, 2007).	33
Figura 5.	34
Estructura química de los productos de la degradación de los valeportriatos a) Baldrinal; b) Homobaldrinal.	34
Figura 6.	35
Estructura química de los aminoácidos identificados en el género Valerianaceae.....	35
Figura 7.	45
Auxinas de origen natural.	45
Figura 8.	45
Auxinas sintéticas.....	45
Figura 9.	46
Ácido Giberélico GA ₃	46
Figura 10.	48
Acción del ácido giberélico (GA ₃) en semillas de cebada. (Universidad Politécnica de Valencia, 2014).....	48

Figura 11.	54
Fases de crecimiento de una suspensión celular	54
Figura 12.	60
a) Plantas de valeriana en hábitat natural, b) Plantas de valeriana en condiciones de invernadero sometidas a tratamiento fitosanitario.	60
Figura 13.	61
Esquema explicativo de la fase de laboratorio donde se detallan los dos experimentos que se realizaron.....	61
Figura 14.	62
Selección de explantes, a) Foliolos extraídos de la planta madre, b) Esquema que muestra la distribución de los foliolos en una hoja de valeriana, se utilizaron los foliolos terminales y primarios remarcados con rojo.....	62
Figura 15.	63
Desinfección de foliolos, a) Inmersión en detergente, b) lavado con agua destilada estéril, c) inmersión en hipoclorito de sodio, d) lavado con agua destilada estéril, e) secado de las hojas con servilletas estériles, f) segmentos foliares cortados.	63
Figura 16.	65
Evaluación de la contaminación, a) Contaminación bacteriana, b) Contaminación fúngica, c) sin contaminación.	65
Figura 17.	66
Evaluación de la necrosis, a) Explante necrosado, b) explante no necrosado.....	66
Figura 18.	69
Evaluación de la formación de callo, a) Ausencia de callo, b) presencia de callo.	69
Figura 19.	69
Evaluación del peso de callo formado. a) Callo a los 30 días, b) Callo a los 60 días. ...	69
Figura 20.	70

Medición de peso fresco del callo, a) Material autoclavado y balanza analítica esterilizados bajo luz UV, b) Remoción del exceso de agar, c) Encerado de la balanza y determinación de peso fresco del callo.	70
Figura 21.	71
Establecimiento de la suspensión celular de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth. a) Callo friable, b) disgregación, c) pesaje del callo, d) transferencia a medio líquido, e) suspensión celular resultante, f) incubación de la suspensión en agitación.....	71
Figura 22.	72
Recambio de medio a) Eliminación de medio antiguo (30% de la suspensión), b) adición de medio nuevo (30% de la suspensión)	72
Figura 23.	72
Obtención de una suspensión celular homogénea a) tamizado de la suspensión celular, b) suspensión homogénea resultante del tamizado.	72
Figura 24.	73
a) Cuadros considerados para el conteo celular b) Conteo de un cuadro grande de la cámara de Neubauer.	73
Figura 25.	75
Selección de explantes, a) En el círculo amarillo se muestra las semillas seleccionadas de plantas mantenidas en invernadero, b) Semilla seleccionada vista al microscopio.....	75
Figura 26.	76
Desinfección de semillas. a) Inmersión en detergente, b) lavado con agua destilada estéril, c) inmersión en hipoclorito de sodio, d) inmersión en alcohol e) y f) siembra de semillas en tubos de vidrio.	76
Figura 27.	78
Evaluación de la contaminación, a) Contaminación fúngica, b) contaminación bacteriana, c) sin contaminación.	78
Figura 28.	83

Porcentaje de explantes no contaminados respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio empleado en los tratamientos de desinfección para segmentos foliares de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth.	83
Figura 29.	84
Porcentaje de explantes no contaminados respecto a los tiempos de inmersión empleados en los tratamientos de desinfección para segmentos foliares de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth.	84
Figura 30.	87
Árbol de decisiones para los tratamientos de desinfección empleados en segmentos foliares de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth respecto a la variable contaminación.....	87
Figura 31.	88
Porcentaje de explantes no necrosados respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio empleados en los tratamientos de desinfección.	88
Figura 32.	89
Porcentaje de explantes no necrosados respecto los tiempos de inmersión empleados en los tratamientos de desinfección.	89
Figura 33.	91
Árbol de decisiones para los tratamientos de desinfección empleados en segmentos foliares de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth respecto a la variable necrosis.	91
Figura 34.	93
Porcentaje de formación de callo por explante con respecto a la concentración de 2,4-D.....	93
Figura 35.	95
Árbol de decisiones para los tratamientos empleados en la formación de callo.....	95
Figura 36.	96
Peso promedio del callo formado con respecto a la concentración de 2,4-D evaluado a los 60 días de incubación.	96
Figura 37.	100

Curva de cinética celular para la suspensión TS1.....	100
Figura 38.	100
Curva de cinética celular para la suspensión TS2.....	100
Figura 39.	101
Curva de cinética celular para la suspensión TS3.....	101
Figura 40.	102
Comparación de curvas de cinética celular para los tratamientos TS1, TS2 y TS3 empleados en el establecimiento de suspensiones celulares de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth.	102
Figura 41.	104
Porcentaje de explantes no contaminados respecto los tiempos de inmersión empleados en los tratamientos de desinfección de semillas de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth.	104
Figura 42.	106
Árbol de decisiones para los tratamientos de desinfección empleados en semillas de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth respecto a la variable contaminación.	106
Figura 43.	108
Porcentaje germinación de semillas de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth, con respecto a la concentración de GA ₃	108
Figura 44.	108
Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth, a) aparecimiento de la radícula, b) plántula a los 30 días de incubación y c) plántula a los 60 días de incubación	108
Figura 45.	111
Esquema resumen de resultados.	111

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1	28
Clasificación taxonómica de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth.....	28
Tabla 2	39
Macronutrientes (Jaramillo, 2008).	39
Tabla 3	40
Micronutrientes (Jaramillo , 2008; Torres , 1989).	40
Tabla 4	43
Vitaminas (PhytoTechnology Laboratories, 2003).	43
Tabla 5	50
Características de las células vegetales en suspensión, tabla traducida de (Petersen & Wilhelm, 2008, pág. 585).	50
Tabla 6	65
Tratamientos en la fase de desinfección para folíolos.	65
Tabla 7	68
Tratamientos con diferentes concentraciones de 2,4-D para la etapa de inducción a callo a partir de segmentos foliares de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth.....	68
Tabla 8	77
Tratamientos en la fase de desinfección para semillas	77
Tabla 9	80
Tratamientos de medios de cultivo con diferentes concentraciones de GA ₃ para la evaluación del efecto de la hormona en germinación.....	80
Tabla 10.....	83
Análisis de contingencia para los explantes no contaminados con respecto a los tratamientos de desinfección para segmentos foliares de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth	83
Tabla 11.....	88

Análisis de contingencia para explantes no necrosados con respecto a los tratamientos de desinfección.....	88
Tabla 12.....	92
Porcentaje de presencia y ausencia de callo para los tratamientos de inducción a callogénesis a partir de segmentos foliares de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth.	92
Tabla 13.....	95
Peso promedio del callo formado a los 60 días de incubación.....	95
Tabla 14.....	98
Tratamientos considerados para el establecimiento de suspensiones celulares de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth.	98
Tabla 15.....	109
Velocidad de germinación (VG) y tiempo medio en alcanzar la germinación máxima (TM), para cada tratamiento de germinación.....	109

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.....	85
Prueba de Kruskal-Wallis de los tratamientos de desinfección de segmentos foliares de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth.....	85
Cuadro 2.....	85
Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para la variable contaminación de los tratamientos de desinfección de segmentos foliares de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth...	85
Cuadro 3.....	86
Regresión logística para los datos categóricos de contaminación de los tratamientos de desinfección de segmentos foliares de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth.	86
Cuadro 4.....	89
Prueba de Kruskal-Wallis de los tratamientos de desinfección de segmentos foliares de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth para la variable necrosis.	89
Cuadro 5.....	90
Prueba de Shapiro- Wilks (modificado) para la variable contaminación de los tratamientos de desinfección de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth.....	90
Cuadro 6.....	90
Regresión logística para los datos categóricos para la variable necrosis de los tratamientos de desinfección empleados.	90
Cuadro 7.....	94
Prueba de Kruskal-Wallis para la variable formación de callo con respecto a las diferentes concentraciones de 2,4-D	94
Cuadro 8.....	94
Prueba de Shapiro- Wilks (modificado) para la variable formación de callo con respecto a las diferentes concentraciones de 2,4-D.....	94
Cuadro 9.....	96

Análisis de varianza (ANOVA) para la variable peso promedio de callo, evaluada a 60 días de incubación.....	96
Cuadro 10.....	97
Prueba de Duncan para la comparación de medias en la variable peso fresco de callo con respecto a las diferentes concentraciones de 2,4-D.....	97
Cuadro 11.....	97
Prueba de Shapiro- Wilks (modificado) para la variable peso de callo promedio evaluada a los 60 días de incubación.....	97
Cuadro 12.....	102
Análisis de varianza (ANOVA) para los tratamientos TS1, TS2 y TS3 considerados en el establecimiento de suspensiones celulares de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth.	102
Cuadro 13.....	103
Prueba de Shapiro- Wilks (modificado) para la comparación de medias entre los tratamientos TS1, TS2 y TS3	103
Cuadro 14.....	105
Prueba de Kruskal-Wallis para la variable germinación con relación a las diferentes concentraciones de GA ₃	105
Cuadro 15.....	105
Prueba de Shapiro- Wilks (modificado) para la variable contaminación de los tratamientos de desinfección de semillas de <i>Valeriana Pyramidalis</i> Kunth.	105
Cuadro 16.....	106
Regresión logística para los datos categóricos de contaminación de los tratamientos de desinfección de semillas de <i>Valeriana pyramidalis</i> Kunth.	106
Cuadro 17.....	109
Prueba de Kruskal-Wallis para la variable germinación con relación a las diferentes concentraciones de GA ₃	109
Cuadro 18.....	110

Prueba de Shapiro- Wilks (modificado) para la variable contaminación de los tratamientos de germinación de <i>Valeriana Pyramidalis</i> Kunth.....	110
Cuadro 19.....	110
Regresión logística para los datos categóricos para la variable dicotómica germinación <i>in vitro</i> de semillas.....	110

RESUMEN

Valeriana pyramidalis Kunth especie nativa declarada como planta patrimonial para el Distrito Metropolitano de Quito, es popularmente utilizada por su actividad calmante en el tratamiento de problemas nerviosos, cardiacos, migraña e insomnio. Al igual que otras valerianas ha sido descrita taxonómicamente. Sin embargo, no existe ninguna publicación científica sobre sus metabolitos secundarios. Además, su multiplicación en campo se da por semillas, estas tienen viabilidad baja y pierden su poder germinativo con facilidad. En la presente investigación se planteó el establecimiento de suspensiones celulares de *Valeriana pyramidalis* Kunth, como un estudio base para una futura cuantificación y obtención de sus metabolitos secundarios. A la vez, se estandarizó un protocolo de germinación *in vitro* como estrategia de conservación de la especie. Se desarrollaron dos experimentos, el primero consistió en el establecimiento de suspensiones celulares para lo cual foliolos fueron desinfectados empleando hipoclorito de sodio al 0.5% (v/v) por 10 minutos. Para la inducción a callogénesis se empleó medio MS suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D (2.5; 2.0 y 1.5 mg/L). Se establecieron suspensiones celulares transfiriendo 1 g de callo en 20 ml de medio líquido en agitación constante (110 r.p.m.). Se obtuvo con éxito las curvas de cinética celular para cada una de las suspensiones, tras comparar estas curvas se determinó que no existe diferencia significativa entre los tratamientos. En el segundo experimento se estandarizó un protocolo de germinación *in vitro*, para lo cual, semillas seleccionadas, fueron desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 1% (v/v) por 5 minutos y etanol al 70% por 1 minuto, las semillas asépticas se colocaron en medio MS suplementado con 3.0 mg/L de GA₃ que generó un 80% germinación, adicionalmente se evidencio que la temperatura óptima de germinación para esta especie se encuentra entre 16 y 20 grados centígrados.

PALABRAS CLAVES: VALERIANA PYRAMIDALIS KUNTH, 2,4-D, CALLO, SUSPENSIONES CELULARES, GERMINACIÓN, IN VITRO, GA₃.

ABSTRACT

Valeriana pyramidalis Kunth native species declared as patrimonial plant for the Metropolitan District of Quito is popularly used for its sedative activity in the treatment of nerve, heart, migraine and insomnia problems. Like other valerian it has been described taxonomically, however, there is no scientific publication about its secondary metabolites. Also, field multiplication is given by seeds; these have low viability and lose their germinating power easily. In this research it was proposed the establishment of cells suspensions cultures of *Valerian pyramidalis* Kunth, as a basis of future study for quantification of their secondary metabolites. At the same time, was standardized a protocol for *in vitro* germination of seeds as a conservation strategy of the specie. Two experiments were developed, the first was the establishment of cells suspensions cultures, for which, leaflets were disinfected using sodium hypochlorite 0, 5 % (v / v) with an immersion time of 10 minutes. Callus formation was significant in MS media supplemented with different concentration of 2,4-D (2.5; 2.0 and 1.5 mg / L). The cell suspension culture was established by transferring 1 g of calli to 20 ml liquid media an agitating condition (110 rpm). The growth kinetic curve was successfully obtained for each one of the suspension, after comparing these curves, it was determined no significant difference exists between the treatments. In the second experiment, a protocol of germination *in vitro* was standardized, for which, selected seeds were disinfected in a solution of sodium hypochlorite 1% (v / v) for 5 min and 70% ethanol for 1 minute, aseptic seeds were placed on MS medium supplemented with 3.0 mg / L GA₃, which produces 80% of germination. It was also observed that the optimum germination temperature for this species is 16 of 20 Celsius degrees.

KEYWORDS: VALERIAN PYRAMIDALIS KUNTH, 2,4-D, CALLI, CELLS SUSPENSIONS CULTURES, GERMINATION, IN VITRO, GA₃

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

En los últimos 50 años, se han intensificado los estudios sobre metabolitos secundarios de origen vegetal. Se ha demostrado que estas moléculas intervienen en las funciones de adaptación y defensa de la planta, representando así, una importante fuente de principios activos para la elaboración de fármacos (Bourgaud, Gravot, Milesi, & Gontier, 2001).

Un gran número de investigaciones muestran que las especies del género valeriana contienen en sus raíces y rizomas metabolitos secundarios, éstos incluyen aceites esenciales, derivados sesquiterpénicos (ácido valérico) e irridoides (valtrato, isoaltrato, acealtrato) (Salles, Silva, Fett-Neto, von Poser, & Rech, 2002). La especie europea *Valeriana officinalis*, es ampliamente cultivada y empleada como materia prima para la elaboración de fármacos (Silva, Rech & Von Poser, 2002). Se ha estudiado más especies de valeriana por su potencial valor económico, otras especies de interés son *V. wallichii* de los Himalayas, *V. edulis* de América Central, *V. glechomifolia* de Brasil y *V. amurensis* de China (NTP/NIH, 2009; Silva, AL, 2009).

En el 2002, Salles y colaboradores estandarizaron un protocolo para la propagación *in vitro* de *V. glechomifolia*, así como la influencia de las auxinas (AIA) e (IBA). En dicha investigación se cuantificó la cantidad de valtratos producidos *in vitro* y se comparó con las plantas cultivadas en condiciones *ex vitro*; más adelante Maurmann y colaboradores en el 2006 evaluaron la producción de valtratos en células no transformadas (callos), suspensiones celulares y raíces, comprobándose así, la aplicabilidad de la técnica de cultivo *in vitro* para la cuantificación y producción de metabolitos secundarios.

En el Ecuador se han registrado 35 especies de valeriana, 8 endémicas y 27 nativas (Bell, 2003). *Valeriana pyramidalis* Kunth, es una especie nativa, considerada de valor patrimonial para el Distrito Metropolitano de Quito, ya que forma parte de su

historia botánica, al ser colectada y herborizada por primer vez, por los botánicos Alexander Von Humboldt y Aimé Bonpland en el año 1802 (Rúales & Guevara, 2010).

Las especies de valeriana han sido descritas taxonómicamente, sin embargo, no existe ningún conocimiento científico sobre sus metabolitos secundarios, ni de su producción *in vitro*. Adicionalmente, factores como el aumento de la demanda, su recolección de tipo silvestre, así como su comercialización informal intervienen en la conservación de ésta y muchas otras plantas medicinales, algunas de las cuales desaparecen sin ser identificadas o estudiadas, en ese sentido se hace primordial aplicar estrategias como el cultivo *in vitro* para la conservación de las especies.

La presente investigación persigue dos propósitos fundamentales: el primero, establecer suspensiones celulares de *Valeriana pyramidalis* Kunth, como un estudio base para una futura obtención de metabolitos secundarios y; el segundo, aportar en iniciativas de conservación de esta especie al estandarizar un protocolo de desinfección de semillas, así como la concentración óptima de la hormona GA₃ para su germinación *in vitro*. Este estudio aportará con información valiosa, al ser probablemente una de las primeras investigaciones aplicando la técnica de cultivo *in vitro* en esta planta medicinal.

1.2. Justificación del problema

Desde los albores de la humanidad encontramos vestigios de la utilización de plantas medicinales (Cordeiro, Chung, & Do Sacramento, 2005). La revolución industrial y los avances científicos desarrollados en química orgánica, permitieron que la producción de medicamentos sintéticos llegue a su auge, sin embargo, los efectos secundarios de la medicina de síntesis y la necesidad de encontrar nuevas moléculas activas cuyos efectos secundarios sean menores, enfocaron de nuevo el interés científico en la medicina natural. Es así que se retomó el estudio de las plantas medicinales desde un criterio científico, como una fuente de principios activos que al ser aislados darán origen a nuevos medicamentos y también para su

utilización con fines terapéuticos, es decir, el uso de una planta completa o partes de ésta, que en diferentes presentaciones (trozos, polvo, extractos o tinturas) representarán una droga natural (Osorio, 2002).

La OMS define a las plantas medicinales como toda especie vegetal silvestre o cultivada, a partir de la cual se puede obtener fármacos o sus precursores con la finalidad de prevenir, aliviar, curar o modificar un proceso fisiológico normal o patológico. Entre los 252 fármacos considerados como esenciales por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1999), 11% son de origen exclusivamente vegetal y una parte significativa son medicamentos semi-sintéticos que se han obtenido a partir de precursores naturales (Cordeiro, Chung, & Do Sacramento, 2005).

En el Ecuador el uso de plantas medicinales se refleja en la vida cotidiana de sus habitantes. El 80% de la población depende del consumo de las plantas medicinales y de sus derivados para satisfacer su salud y bienestar (Manzano, 2011). La medicina popular es mayoritariamente manifestada en zonas rurales, pero también la practican ciudadanos de toda índole social (De la Torre, Alarcón, Lars, Salazar, & Aarhus, 2008). La valeriana es popularmente utilizada por su actividad calmante, antiespasmódica, carminativa, estimulante e hipnótica, útil para todo tipo de problemas nerviosos, migraña e insomnio. Dentro de la medicina empírica y ancestral es considerada como una planta mágica al ser empleada por curanderos (limpiadores) en el tratamiento de dolencias de origen folclórico, o sobrenatural como son el espanto y mal de viento (Cavender & Albán, 2009).

Valeriana pyramidalis Kunth, especie patrimonial de Quito, se expende de forma libre en ferias y mercados, la infusión de sus rizomas se emplea en el tratamiento de problemas cardíacos, hígado, sistema nervioso y riñones (De la Torre, Alarcón, Lars, Salazar, & Aarhus, 2008). Al ser una planta silvestre, su recolección y comercialización son informales, siendo una actividad económicamente rentable para los pobladores, quienes por desconocimiento podrían poner en riesgo la existencia de esta especie nativa. Al igual que otras valerianas, su multiplicación en

campo es por semillas, sin embargo, las semillas tienen una viabilidad baja y pierden su poder germinativo con facilidad, además su recolección es un tanto complicada, pues debe cortarse las umbelas en una etapa específica, es decir, antes de su maduración (Muñoz, 2002), por tal motivo, es necesario estandarizar una metodología de desinfección que ayude a la germinación *in vitro* de semillas de *Valeriana pyramidalis* Kunth, como estrategia de conservación de la especie. Cabe mencionar que a nivel científico es muy poco lo que se conoce sobre la especie, ya que se tiene una descripción taxonómica, más no existe información acerca de sus principios activos. En este sentido, se enuncia el establecimiento de suspensiones celulares como una alternativa para la obtención de metabolitos secundarios, la cual permitirá un flujo de producción continua de los mismos, al controlar factores bióticos (interacción planta- patógenos) y abióticos (luz, temperatura, humedad, salinidad) que influyen en sus rutas biosintéticas, como resultado de esto la inestabilidad química de los compuestos se reduce facilitando el estudio de su síntesis. La presente investigación plantea el establecimiento de suspensiones celulares de *V. pyramidalis* Kunth como un estudio pionero, aplicando la técnica de cultivo *in vitro* en esta especie y representando la base para una futura cuantificación y obtención de sus metabolitos secundarios. A la vez, se pretende estandarizar un protocolo de germinación *in vitro* de semillas, como estrategia de conservación que aportará para la futura creación de un banco germoplasma de valeriana. De esta manera y con el desarrollo de este estudio inicial, se forjarán las bases para la preservación de este recurso medicinal de la sierra ecuatoriana.

1.3. Objetivos de la Investigación

1.3.1. Objetivo General

Establecer tanto suspensiones celulares a partir de segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunth, como el efecto de la hormona GA₃ en germinación *in vitro* de sus semillas.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar el mejor método de desinfección para folíolos de *Valeriana pyramidalis* Kunth.
- Evaluar el efecto de la auxina 2,4-D en la formación de callo a partir de folíolos de *Valeriana pyramidalis* Kunth.
- Establecer un protocolo para obtener células en suspensión a partir de callo.
- Determinar el mejor método de desinfección para semillas de *Valeriana pyramidalis* Kunth.
- Evaluar el efecto de la hormona GA₃ en la germinación de semillas de *Valeriana pyramidalis* Kunth.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Características generales de la especie

1.4.1.1. Taxonomía

La familia Valerianaceae comprende de 9 a 13 géneros, totalizando 300 a 400 especies (Russowski, 2007; Boss, Woerdengbag, Van Putten, Hendriks, & Scheffer, 1998), esta variación numérica se debe a la taxonomía cambiante dada a las especies sudamericanas (Russowski, 2007; Backlud & Moritz, 1996). El género más diversificado y de mayor distribución dentro de esta familia, es el género *Valeriana* L. (Kutschker, 2011).

En el año 2009, se publicó la versión actualizada del sistema de clasificación de angiospermas basado en criterios filogenéticos (APG III, 2009), la cual adjunta a los géneros de la familia Valerianaceae dentro de la familia Caprifoliaceae, pertenecientes al Orden Dipsacales. La familia Caprifoliaceae está bien caracterizada, sin embargo, es posible que la mitad de los clados que la incluyen, únicamente sean identificados morfológicamente (APG III, 2009; Kutschker, 2011). En la presente tesis se mantiene la posición taxonómica de la familia Valerianaceae (Tabla 1), en concordancia con los autores (Backlud & Pyck, 1998; Kutschker, 2011) y, sobre la base de los estudios filogenéticos de Bell (2004), Hidalgo, Garnatje, Susanna, & Mathez, (2004), Bell y Donoghue (2005).

Tabla 1

Clasificación taxonómica de *Valeriana pyramidalis* Kunth.

Categoría	Taxón
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta/ Fanerógamas
Clase	Magnoliopsida/Dicotiledoneas
Subclase	Asteridae
Orden	Dipsacales
Familia	Valerianaceae
Género	<i>Valeriana</i> L.
Especie	<i>pyramidalis</i> Kunth

1.4.1.2. Descripción botánica

Valeriana pyramidalis Kunth (Figura 1), es una herbácea anual, erecta o rastrera, de 1 a 5 metros de altura, raíz central ramificada en raicillas delgadas. Tallo tetragonal de 2 a 11 mm de diámetro, que puede estar cubierto o no de vellosidades. Hojas caulinares, divididas, pecioladas, láminas foliares imparipinnadas¹ de 6 a 39 cm de longitud, llevando 0 a 5 pares de folíolos laterales, los cuales son ovados, carnosos, glabros a pilosos con vellosidades que se encuentran únicamente en venas y margen de las hojas, agudas en el ápice, márgenes enteros o ligeramente ondulados. El foliolo terminal tiene un tamaño de 3 a 10 x 0.6 a 5 cm, los folíolos laterales son más pequeños, notándose una disminución gradual de tamaño a medida que se acercan al peciolo.

¹ Hoja compuesta con número de folíolos impares, distribuidos a ambos lados del raquis o eje central.

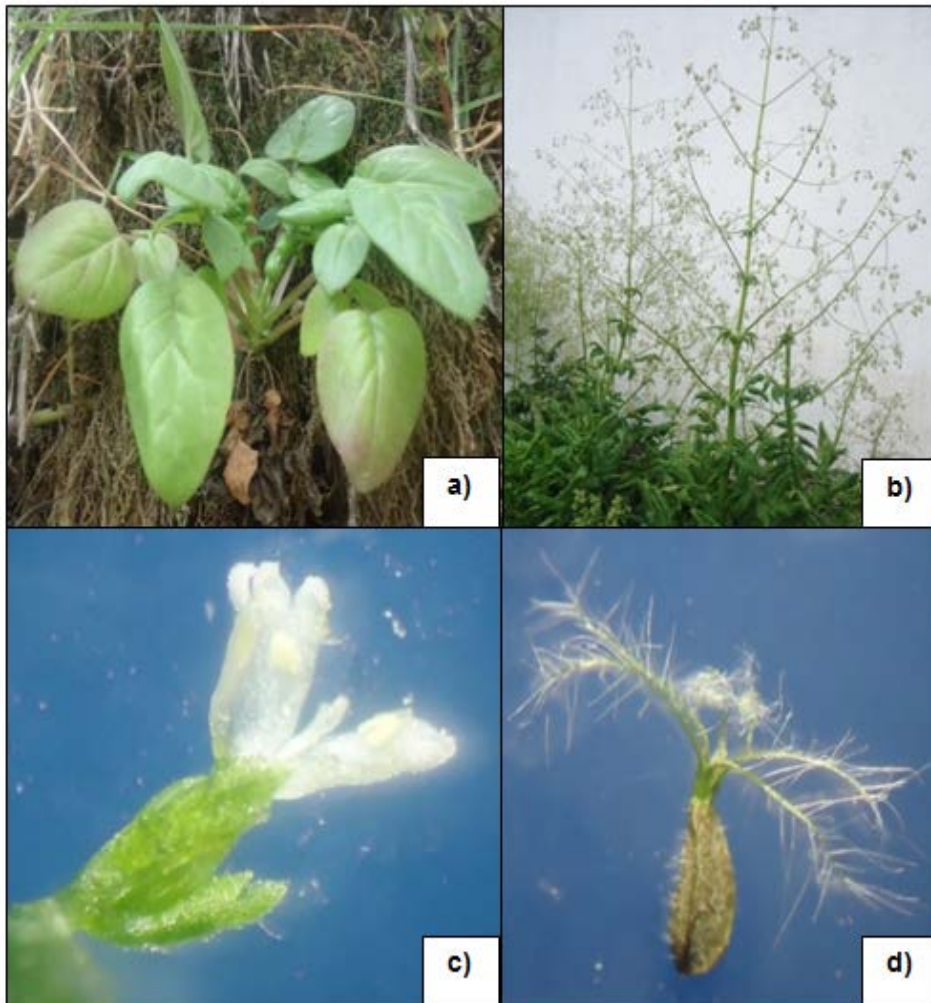


Figura 1. Estructura morfológica de *Valeriana pyramidalis* Kunth, a) Hojas, b) Inflorescencia, c) Flor y d) Semilla.

Peciolos dilatados y generalmente ciliados en la base. Inflorescencia en panícula dispersa, de dimensiones 30-150 x 15-76 cm, eje piloso, brácteas inferiores de aspecto similar a hojas foliares pero de menor tamaño. Brácteas y bractéolas superiores oblanceoladas², 1.5-9 x 0.3-2 mm glabras³ o pilosas en la base. Flores perfectas, corola infundibuliforme de 1-2 mm de longitud, tonalidad blanca, lobulada⁴, estambres y estilo incluidos. Fruto en aquenio ovalado, glarbo a piloso, 1.5- 2.5 mm de longitud, de forma creciente en corte transversal, el vilano de 2.5- 6 mm de longitud, usualmente con 6-12 radios (Eriksen, Harling, & Anderson, 1989).

² Hoja con forma oblonga (final más largo que ancho) y lanceolada al mismo tiempo

³ Que no presentan tricomas en su superficie externa

⁴ Que presenta entrantes y salientes redondeados

1.4.1.3. Distribución geográfica

El género *Valeriana* L. contempla alrededor de 250 especies distribuidas por todo el mundo, exceptuando Australia y Nueva Zelanda. La mayoría de las especies pertenecientes a este género, crecen en regiones templadas del Hemisferio Norte y los Andes Sudamericanos, siendo este último un centro secundario de diversificación. (Kutschker, 2011). La especie *Valeriana pyramidalis* Kunth se distribuye en Ecuador y Perú entre altitudes de 2000 a 4000 metros (Jaramillo, 2013).

En el Ecuador (Figura 2), esta especie se encuentra distribuida en las provincias de Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Morona Santiago, Napo, Pichincha y Tungurahua, (Tropicos, 2014)⁵. Es común encontrarla en bosques montañosos o formando parte de la vegetación de borde de carretera, así como, en áreas secas alrededor de Quito, peñas quebradas y laderas (Eriksen, Harling, & Anderson, 1989).



Figura 2. Imagen de distribución geográfica de *Valeriana pyramidalis* Kunth en el Ecuador vista satelital a 100 Km 2014 © Google.

⁵ Tropicos – Missouri Botanical Garden: Todos los datos de nomenclatura, bibliografía y muestras han sido acumulados en bases de datos electrónicos, durante los últimos 25 años, se encuentran disponibles para todo público. Tropicos. org.

En el año 2012, el Jardín Botánico de Quito inauguró el “Hyacu” Jardín temático, que comprende una selección de especies nativas y emblemáticas para la ciudad de Quito, las especies se han ubicado en base a un criterio botánico-histórico dividiendo el recorrido de la exhibición en dos partes. *Valeriana pyramidalis* Kunth se incluye en este jardín temático, encontrándose en la segunda parte del recorrido (principios del siglo XIX desde el año 1802) que pertenece a las colecciones de Alexander Von Humboldt y Aime Bonpland, (alemán y francés, respectivamente) (Jaramillo, 2013). Además la especie está descrita en la GUÍA DE CAMPO sobre Plantas Nativas, denominada “Plantas Nativas de la Hoya de Quito”.

1.4.1.4. Perfil fitoquímico de la familia Valerianaceae

La familia Valerianaceae se caracteriza por la presencia de 4 grupos principales de constituyentes químicos: sesquiterpenos de los aceites volátiles, irridoides (valeportriatos), alcaloides y flavonoides (Houghton, 1988).

Aceites volátiles.- Constituyen una mezcla de diversos monoterpenos (ésteres de bornilo, canfeno, pineno) y sesquiterpenos (valerianol, valeranol y valeranona,) (Figura 3c, 3d y 3g). En los aceites volátiles, se han identificado más de 150 compuestos, encontrándose en mayor cantidad el acetato de bornilo y el isovalerato (Figura 3a) (Garrido, 2007).

Los sesquiterpenos presentes en este grupo poseen tres tipos de estructuras basadas en el esqueleto químico del kesano, valeranano y valereno. La presencia simultánea de los sesquiterpenos ciclopentanoicos ácido valerénico (Figura 3f), ácido acetoxivalerénico y valerenal (Figura 3e), se observa únicamente en *Valeriana officinalis*, esta característica marcadora, permite su diferenciación de otras especies del género (Garrido, 2007; Carlini, 2003; Houghton, 1988). Es importante mencionar que las cantidades y composiciones químicas de los aceites volátiles varían considerablemente, tanto entre especies, como en individuos de una misma especie (Garrido, 2007; Houghton, 1988).

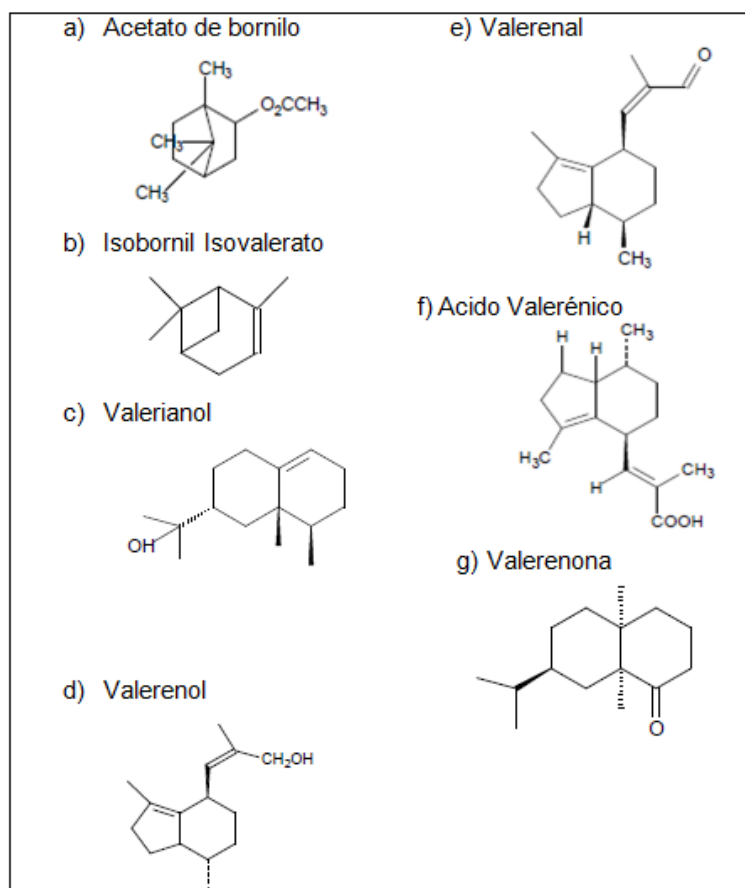


Figura 3. Estructura de algunos compuestos presentes en los aceites volátiles de valeriana (Silva, 2009).

Irridoides (valeportriatos).- Son monoterpenos irridoides, que poseen un esqueleto básico de 10 carbonos y anillos bi-cíclicos ciclopentano-c-pirano, no glicosilados, producidos en la ruta de los isoprenoides (Garrido, 2007; Mikell, Ganzera, & Khan, 2001).

El nombre de valeportriato, es una abreviatura de valeriana-epoxi- triester, denominación dada por los investigadores Thies & Funker, quienes en 1966 caracterizaron químicamente a estos compuestos. Los valeportriatos constituyen los principios activos de la familia Valerianaceae, encontrándose en mayor cantidad en raíces y rizomas de la planta en concentraciones de 0.5-1.6%. De acuerdo a su estructura química pueden clasificarse en monoénico, diénico, valtrato-hidrinas y desoxi-monoénico (Figura 4). Los valtratos que representan el 90% de los

valeportriatos, fueron aislados por primera vez en 1966 y se les atribuye el efecto tranquilizante. (Garrido, 2007; Russowski, 2007; Boss, et al; 1998).

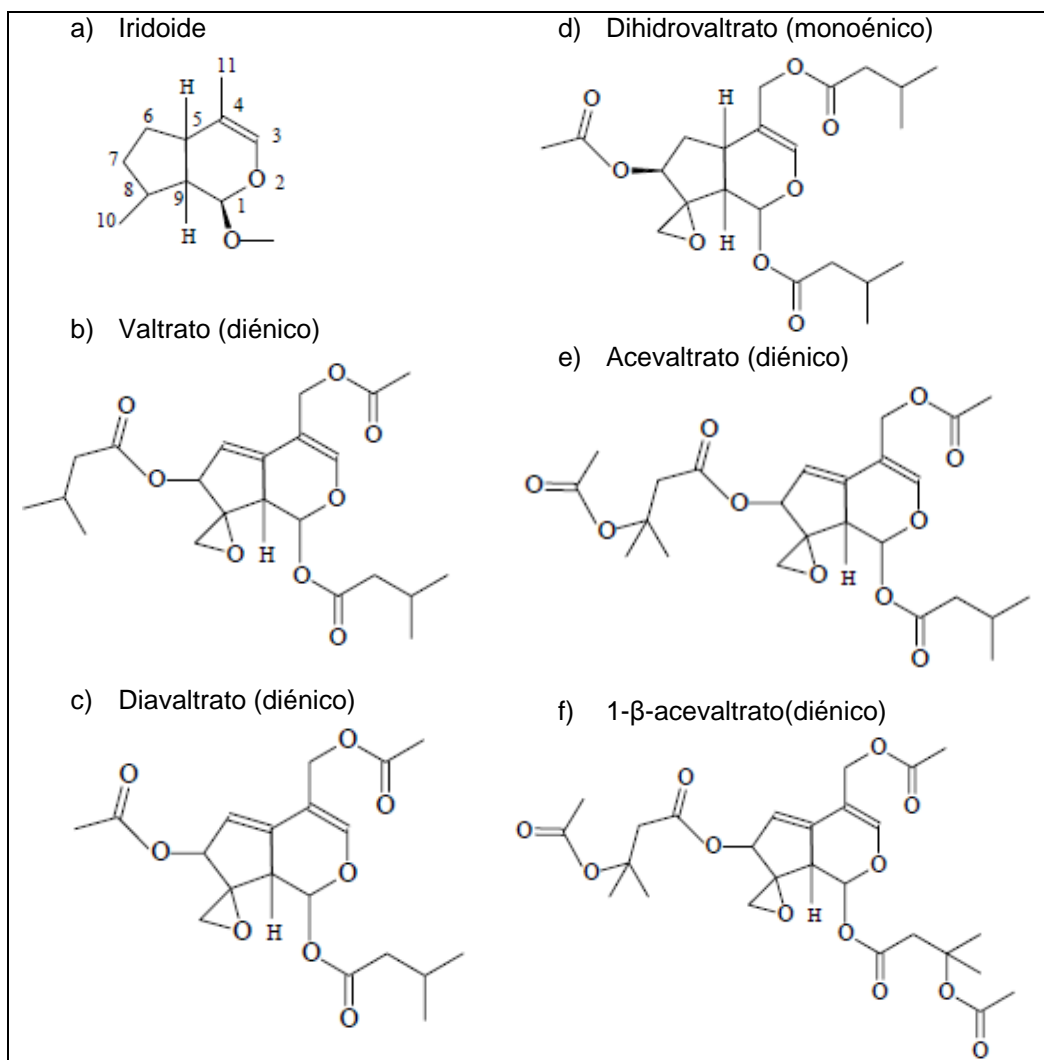


Figura 4. Estructura química de los valeportriatos (Russowski, 2007).

Los valeportriatos son compuestos altamente inestables y termolábiles, se descomponen rápidamente en medio acuoso, hidroalcohólico, ácido o básico, en contraste, son bastante estables en condiciones anhidras o disueltos en metanol y conservados a bajas temperaturas (- 20°C). Al descomponerse, forman compuestos sólidos de color amarillo denominados baldriales (Figura 5), son bastante activos químicamente y a menudo generan polímeros (Garrido, 2007; Russowski, D, 2007; Boss, Woerdengbag, Van Putten, Hendriks, & Scheffer, 1998).

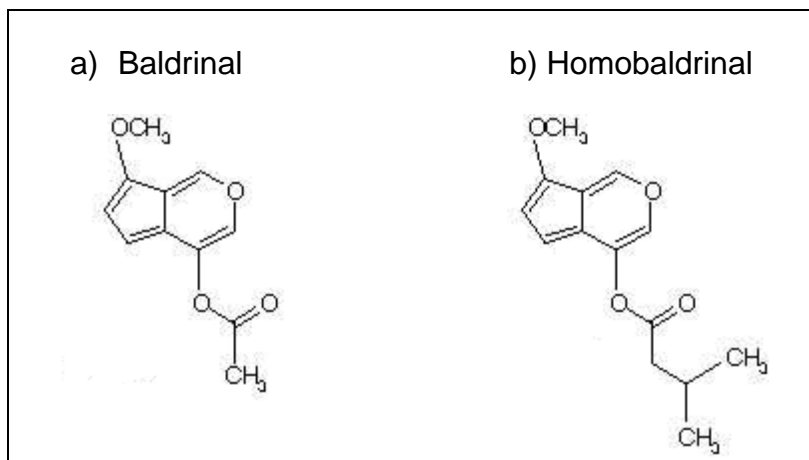


Figura 5. Estructura química de los productos de la degradación de los valeportriatos. a) Baldrinal; b) Homobaldrinal.

Alcaloides.- Se encuentran en trazas o pequeñas cantidades, esto hace que su contribución con la actividad sedante propia de la valeriana sea poco probable, como ejemplo tenemos a los alcaloides actinidina y valeranina, presentes en cantidades de 0.015 y 0.001% y aislados por primera vez en 1967 de *V. officinalis* (Garrido, 2007).

Flavonoides.- Flavonoides como la linarina y su cetona (acacentina) tienen actividad sedante e inductora del sueño. En 1968, la linarina fue identificada en *V. wallichii*, recientemente se la ha identificado también en *V. officinalis*, sin embargo, su mecanismo de acción aún no está esclarecido (Garrido, 2007). Se han encontrado otros compuestos como los aminoácidos: Ácido gama amino butírico (GABA), tirosina, arginina y glutamina (Figura 6).

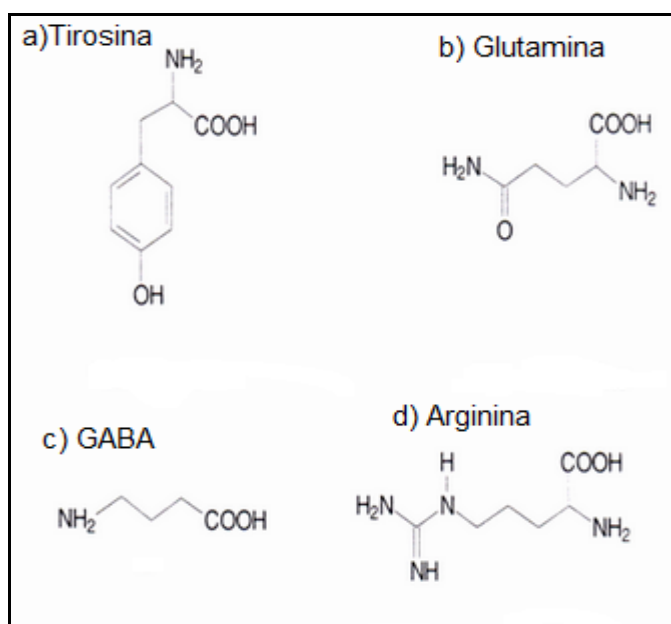


Figura 6. Estructura química de los aminoácidos identificados en el género Valerianaceae.

1.4.1.5. Usos y Propiedades

La planta de valeriana ha sido utilizada con fines medicinales por más de 200 años, desde el tiempo de la antigua Grecia y Roma hasta la actualidad. Las primeras descripciones de sus usos terapéuticos fueron realizadas por Hipócrates (460-377 AC) y Dioscórides (1 DC), más adelante en el siglo II, el médico griego Galeno ya prescribía esta planta para problemas de insomnio (NTP/NIH, 2009). En la medicina tradicional está descrito el empleo de valeriana para aliviar una diversidad de afecciones como dolor de cabeza, náuseas, disturbios hepáticos, infecciones urinarias, tos, gripe, aerofagia, febrífugo, además tiene efectos sedantes, antiespasmódicos, y de relajación en el organismo (Oliveira, Tamariz, & Gutiérrez, 2010).

Valeriana officinalis, es ampliamente cultivada y empleada como materia prima para la elaboración de fármacos, generalmente estos medicamentos contienen extractos obtenidos a partir de las raíces y rizomas de la planta. La mayoría de investigaciones sugieren que los valeportriatos (presentes en las raíces) son los

responsables del efecto sedante antiespasmódico, ansiolítico y ligeramente sedante de la valeriana (Silva, Rech, & Von Poser, 2002).

Según (Garrido, 2007), El ácido valerénico a concentraciones menores de 1 μM , exhibe un efecto alostérico modulador positivo, incrementando la expresión del receptor GABA_A. Al parecer el efecto es dosis-dependiente (la estimulación de la enzima depende de la dosis), su estimulación máxima ocurre a 100 μM . Los receptores GABA_A median la mayor parte de la neurotransmisión inhibitoria del sistema nervioso central (SNC), estos receptores contienen subunidades (α_2 , β_3 , γ_2). La acción del ácido valerénico se ejerce preferentemente en los receptores que contienen las sub-unidades β_2 β_3 .

1.4.2. Cultivo *in vitro*

1.4.2.1. Generalidades

Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales involucra un conjunto de técnicas que permiten cultivar, en condiciones asépticas, cualquier parte de la planta (semillas, embriones, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos), en medio nutritivo esterilizado. Tras colocar el explante en el medio, se mantienen a condiciones de luz, temperatura y humedad relativa, controladas (Roca & Mroginski, 1993).

1.4.2.2. Aplicaciones del cultivo *in vitro*

La amplia gama de aplicaciones de cultivo *in vitro* va desde estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica vegetal, hasta la obtención de plantas libres de patógenos, propagación masiva, conservación de germoplasma, bancos de semillas, mejoramiento genético y la producción de metabolitos secundarios (Villalobos & Thorpe, 1991; Ramachandra & Ravishankar, 2002).

1.4.2.3. Germinación *in vitro* de semillas

Las semillas son la unidad de reproducción sexual de las plantas, su función es multiplicar y perpetuar la especie a la que pertenecen siendo un elemento eficaz de dispersión en tiempo y espacio. Para que cumplan con su objetivo, es necesario que el embrión se transforme en una plántula con alta capacidad de supervivencia (Torres, 2011). El proceso de germinación comienza cuando las semillas se hidratan y la radícula empieza a crecer y finaliza cuando la radícula atraviesa la cubierta seminal. Se distingue 3 fases sucesivas: **hidratación**.- intensa absorción de agua y aumento proporcional en la actividad respiratoria, **germinación**.- verdadero proceso de germinación donde se producen las transformaciones metabólicas necesarias para el correcto desarrollo de la planta y la fase de **crecimiento**.- se asocia con la aparición de la radícula y se caracteriza por un nuevo aumento en la absorción de agua y actividad respiratoria. No obstante, en muchas ocasiones, las semillas no son capaces de germinar, debido a condiciones ambientales desfavorables o dormancia de la semilla, empezando a deteriorarse, lo que se manifiesta en una pérdida progresiva de su capacidad de germinar (viabilidad). El tiempo que tardan las semillas en perder su viabilidad es variable en cada especie y depende de factores externos (temperatura ambiental) como internos (contenido de humedad, genotipo etc.) (García, Roselló, & Santamarina, 2006).

La germinación de semillas *in vitro* permite obtener plántulas asépticas, libres de patógenos que pueden ser empleadas como fuentes de explantes en procesos como micropropagación masiva de plantas, mejoramiento genético, inducción a callo, suspensiones celulares y producción de raíces (Bueno, Alzugaraya, Giubileoa, Severina, & Carnevalea, 2009).

Entre las principales ventajas de la germinación *in vitro* tenemos: a) proceso de desinfección de semillas, que es relativamente fácil con relación a otros tejidos, b) porcentaje de germinación elevado ya que se mantienen condiciones controladas de luz, humedad y temperatura, sin competencia con la germinación de otras semillas o el crecimiento de patógenos y, c) germinación favorable de semilla, cuya viabilidad

en campo es muy baja. Además, esta técnica constituye un paso fundamental en planes de mejoramiento genético, es decir en la obtención y regeneración de plantas genéticamente modificadas.

1.4.2.4. Componentes del medio de cultivo

Un medio de cultivo es una combinación de nutrientes y agua, esenciales para el desarrollo *in vitro* del explante, su composición varía de acuerdo a los requerimientos nutricionales de la especie y del tipo de cultivo a desarrollar (meristemos, callos, células en suspensión etc.), los medios pueden ser sólidos, semisólidos o líquidos dependiendo del protocolo del sistema de cultivo. Los componentes básicos de cualquier medio de cultivo son agua, sales minerales de macronutrientes y micronutrientes, vitaminas, hormonas, fuente de carbono y agentes gelificantes (Roca Mroginski, 1993).

Agua

Componente mayoritario que representa el 95% del medio de cultivo. Según Jaramillo, (2008) es recomendable usar agua destilada en la preparación de los medios de cultivo, ya que el agua corriente además de contener contaminantes orgánicos y microorganismos, puede poseer trazas de iones como Ca^{2+} o Mg^{2+} que facultan la formación de sales insolubles con otros componentes del medio.

Nutrientes inorgánicos

Los nutrientes inorgánicos son esenciales para el desarrollo *in vitro* de la planta, se describen como sales minerales en forma de **macronutrientes** y **micronutrientes**.

Los macronutrientes (Tabla 2), se requieren en grandes cantidades a concentraciones mayores de 0.5 mM, comprenden seis elementos principales nitrógeno (N), azufre (S), fósforo (P), calcio (Ca), magnesio (Mg), potasio (K) (Criollo,

2013; Razdan, 2003). El nitrógeno puede estar disponible como amonio (cationes) o nitratos (aniones). El fósforo se adiciona al medio en forma de fosfato monobásico, el potasio en nitrato, el azufre en sulfato o de aminoácidos, el calcio en nitrato y el magnesio en forma de sulfato de magnesio (Jaramillo, 2008).

Tabla 2

Macronutrientes (Jaramillo, 2008).

Elemento	Concentración	Función
Nitrógeno (NO ₃ ⁻)(NH ₄ ⁺).	20-40 Mm	Estimula el crecimiento rápido. Forma parte de las moléculas de ácidos nucleicos, proteínas, clorofila, aa, alcaloides y algunas hormonas.
Potasio (K)	20- 30 Mm	Necesario para la división celular, promueve el crecimiento de meristemos, síntesis de carbohidratos y proteínas.
Azufre (SO ₄ ⁻)	1-3 Mm	Esencial para la formación de aminoácidos y vitaminas; aporta el color verde a las hojas.
Fosforo (PO ₄ ⁻)	1-3 mM	Forma parte de ADN y ATP, se requiere para la fotosíntesis y respiración.
Calcio (Ca)	1-3 Mm	Mayor catión presente en las plantas, constituyente de las paredes celulares, regula el pH y el entorno osmótico de la célula.
Magnesio (Mg)	1-3 Mm	Elemento central de la clorofila.

Los micronutrientes (Tabla 3), se requieren en pequeñas cantidades con concentraciones menores a 0.05 mM. La naturaleza y concentración de los micronutrientes surge de resultados empíricos al evaluar la capacidad de cada

elemento en afectar el crecimiento. El hierro es adicionado al medio en forma de quelato Fe-EDTA, el cobalto como cloruro de cobalto, iodo como yoduro de potasio, manganeso como sulfato de manganeso, molibdeno como molibdato de sodio, zinc como sulfato de zinc y boro es utilizado como ácido bórico (Jaramillo, 2008).

Tabla 3

Micronutrientes (Jaramillo , 2008; Torres , 1989).

Elemento	Concentración	Función
Hierro	1 μM	Interviene en las reacciones de óxido reducción y síntesis de clorofila
Cobalto	0,1 μM	Componente de la vitamina B12
Cobre	0,1 μM	Colabora en la síntesis de clorofila y en la respiración.
Iodo	5 μM	Aparte de su posible función antioxidante, aún no se esclarece su función metabólica en plantas
Manganeso	20- 90 μM	Síntesis de clorofila y formación de O_2 en fotosíntesis
Molibdeno	0.1 μM	Interviene en los procesos de fijación de nitrógeno y síntesis de proteínas.
Zinc	5-30 μM	Formación de auxina y almidón.
Boro	25-100 μM	Involucrado en la síntesis de bases nitrogenadas, interviene en la floración, formación de frutos y división celular.

Fuentes de Carbono

Generalmente, la mayoría de los cultivos de células vegetales no son autótrofos y, por lo tanto dependen completamente de una fuente externa de carbono, los azúcares representan esta fuente de energía. Uno de la más utilizado es la sacarosa, se adiciona al medio en concentraciones de 2 a 5%, también se puede utilizar otros azúcares como glucosa, maltosa y galactosa, siendo la fructosa y galactosa los mejores sustitutos de la sacarosa (Jaramillo, 2008; Roca & Mroginski, 1993).

Agente gelificante

Los agentes gelificantes brindan un soporte físico al explante, el más utilizado es el agar, un polisacárido que proviene de la purificación de las algas marinas, al solidificarse forma un gel (sistema coloidal), el cual puede contener hasta 99.5% de agua, presenta notables ventajas con relación a otros gelificantes, es soluble en agua, se derrite fácilmente en un rango de temperaturas de 60 a 100 °C y se solidifica a 45 °C, además no reacciona con ningún constituyente del medio, ni es digerido por las enzimas de la planta (Sathyanarayana & Varghese, 2007).

La solidez del medio varía de acuerdo a la cantidad de agar agregada, generalmente para un medio sólido se utiliza concentraciones de 0.6 - 1% (p/v), para que se solidifique el agar el pH del medio debe estar ajustado entre 5.7 y 5.8. Otros agentes gelificantes son Phytigel que se utiliza en concentraciones de 0.25-0.40%(p/v), Agargel 0.40-0.60%(p/v), Gelrite 0.10-0.20%(p/v) y Agarosa 0.80-0.90% (p/v) (Roca & Mroginski, 1993).

Vitaminas y Aminoácidos

Las vitaminas (Tabla 4), son compuestos orgánicos importantes para el crecimiento y desarrollo *in vitro* de la planta, participan como catalizadores en diversas rutas metabólicas, la ausencia de alguna de ellas puede limitar la organogénesis. Las vitaminas que se añaden rutinariamente en la mayoría de los medios de cultivo son: tiamina (Vit. B₁), ácido nicotínico (Vit. B₃) y piridoxina (Vit B₆) mioinositol y el aminoácido glicina (Sathyanarayana & Varghese, 2007).

El mioinositol se incluye en las stocks de vitaminas, pero es un carbohidrato, no una vitamina, interviene en las rutas biosintéticas que conducen a la formación de la pectina y hemicelulosas necesaria en las paredes celulares (George, Hall, & De Klerk, 2008).

A pesar de que las células vegetales en condiciones *in vitro* son normalmente capaces de sintetizar todos los aminoácidos necesarios, la adición de ciertos aminoácidos al medio puede estimular aún más el crecimiento celular, ya que son una fuente inmediata de nitrógeno que generalmente puede ser absorbido por las células más rápidamente que el nitrógeno inorgánico. Los aminoácidos más utilizados son caseína hidrolizada, L-glutamina, L-asparaguina, L-tirosina y adenina (PhytoTechnology Laboratories, 2003).

Tabla 4

Vitaminas (PhytoTechnology Laboratories, 2003).

Compuesto	Concentración	Función
Tiamina (Vit. B ₁)	0.1 a 10 mg/L	Componente esencial de las coenzimas que catalizan la oxidación del ácido pirúvico en el ciclo respiratorio.
Piridoxina (Vit. B ₆)	0.1 -10 mg/L	Interviene como cofactor en algunas rutas biosintéticas para la formación de hormonas (auxina y etileno).
Acido Nicotínico (Vit. B ₃)	0.1 a 5 mg/L	Componente de las coenzimas I y II, que son grupos portadores de hidrógeno en la fase respiratoria de deshidrogenación.
Mioinositol	50-5000 mg/L	Involucrado en la síntesis de fosfolípidos y por lo tanto de sistemas de membranas, induce crecimiento de callo y morfogénesis.

Otros compuestos

Algunos medios pueden ser suplementados con sustancias o extractos de naturaleza indefinida que favorecen la respuesta celular *in vitro*, estos pueden ser proteínas hidrolizadas, agua de coco, levadura, extracto de malta, extracto de plátano, jugo de naranja y jugo de tomate, estos últimos son utilizados en medios especiales para ciertas especies de orquídeas (PhytoTechnology Laboratories, 2003).

La caseína (proteína hidrolizada) se añade al medio en concentraciones de 0.05-0.1%, mientras que el agua de coco se añade en concentraciones de 5-20% (p/v). Otros compuestos como la levadura se adiciona en concentraciones de 0.25 – 2.0 g/L, el extracto de malta de 0.5-1 g/L (Pierik, 1997).

El carbón activado se obtiene por carbonización y activación de materiales orgánicos como la madera, presenta un área superficial elevada y gran cantidad de microporos (poros inferiores a 2 mm de diámetro) que le proporciona un alto poder de absorción. Se adiciona al medio como antioxidante, en concentraciones de 0.2- 3 % (p/v). Absorbe compuestos fenólicos tóxicos que se han producido durante la oxidación, también absorbe reguladores de crecimiento, vitaminas y quelatos, adicionalmente oscurece al medio, creando las condiciones óptimas para generación de raíces (Pierik, 1997).

Reguladores de crecimiento

Las fitohormonas son compuestos orgánicos sintetizados por las plantas, que intervienen en diversos procesos fisiológicos y están presentes en concentraciones bajas, su sitio de síntesis no siempre está restringido a un solo órgano, además ejercen su efecto en un sitio diferente de donde fueron producidas. Los cinco principales grupos de hormonas vegetales son: auxinas, giberilinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico. Actualmente se conoce otros compuestos que se sintetizan en forma natural en la planta y tienen una acción reguladora, clasificándose como fitohormonas. Dentro de este nuevo grupo tenemos a las poliaminas, brasinoesteroides, jasmonatos y el ácido salicílico (Jaramillo, 2008).

Auxinas

Las auxinas son compuestos que tienen una estructura derivada del fenol que se sintetiza a partir del aminoácido L-triptófano. El ácido indol acético (AIA) es la auxina más estudiada y la de mayor presencia natural en las plantas, se sintetiza en los tejidos jóvenes como ápices de los tallos, meristemos apicales, hojas jóvenes y semillas inmaduras, generalmente producen elongación celular, expansión de los tejidos, división celular, formación de raíces adventicias y embriogénesis en cultivos

en suspensión. Si se utiliza bajas concentraciones de auxina se estimulará al enraizamiento, mientras que concentraciones medias y altas favorecerán a la formación de callo (Pierik, 1997). Las auxinas pueden clasificarse en naturales y sintéticas. El ácido indol acético (AIA) (Figura 7), es conocida como una hormona natural, se añade al medio en concentraciones de 0.01 mg/L a 10 mg/L (Roca & Mroginski, 1993).

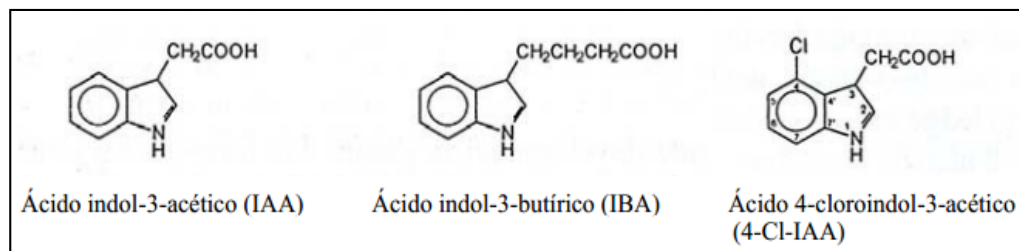


Figura 7. Auxinas de origen natural.

Las auxinas sintéticas son: ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), naftalenacético (ANA) y 2,4-metilfenoxiacético (MCPA) (Figura 8). La mayoría de estos compuestos son más estables que el AIA, son metabolizados lentamente y por ende su acción a bajas concentraciones puede ser más eficiente (Srivastava, 2002).

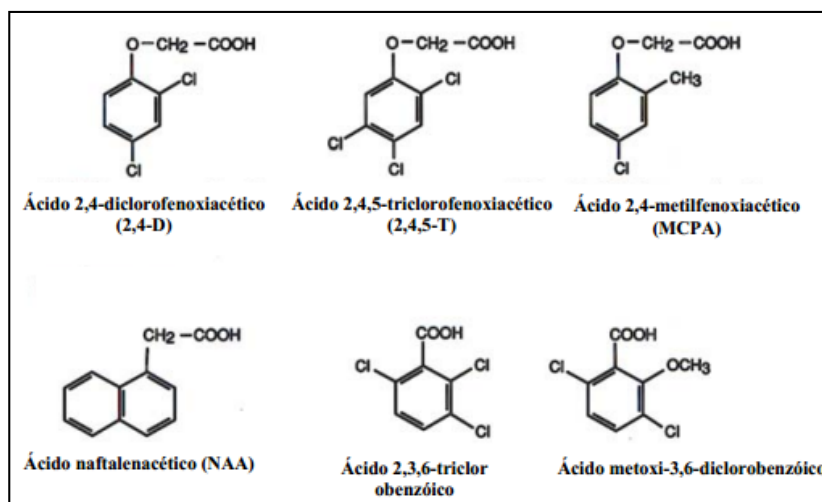


Figura 8. Auxinas sintéticas.

El 2,4-D (Figura 8) es una auxina sintética ampliamente utilizada en cultivo *in vitro* para la inducción a callogénesis y establecimiento de suspensiones celulares. Se adiciona a los medios de cultivo en concentraciones de 0.1 a 10 mg/L, su

concentración óptima varía de 1 a 5 mg/L para la formación de callo y el establecimiento de suspensiones, también se lo usa como herbicida en altas concentraciones (Roca & Mroginski, 1993).

Giberilinas

Las giberilinas son ácidos diterpenos tetracíclicos naturales, cuya estructura básica deriva del anillo ent - giberelano (Talón, 2000). La denominación giberelina se asocia con *Giberella fujikuroi*, hongo del cual se han aislado estas fitohormonas y que fue descubierto en 1926 por el científico japonés Eiichi Kurosawa (Serrani, 2006).

Hasta el momento se conocen al menos 136 giberelinas diferentes presentes en plantas, hongos y bacterias (University of Bristol, 2014). Se las representa como GAs, distinguiéndose una de la otra por la asignación de un subíndice ($GA_{1, 2, 3...n}$), esta numeración va de acuerdo al orden cronológico de su descubrimiento (MacMillan & Takahashi, 1968).

De todas las giberelinas descritas, solo algunas poseen actividad biológica. Las giberelinas consideradas como activas son GA_1 , GA_3 , GA_4 y GA_7 . (Kobayashi, *et al.*, 2000). Las formas activas suelen poseer 19 carbonos y un grupo β -hidroxilo en el C-3, dicha hidroxilación parece ser la clave para la actividad, mientras que una β -hidroxilación en el C-2 provoca la pérdida de la actividad biológica (Ross, *et al.*, 1995).

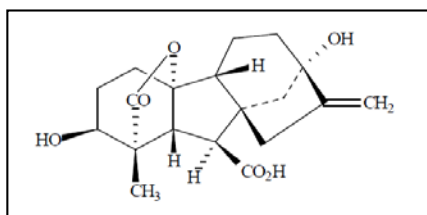


Figura 9. Ácido Giberélico GA_3 .

El ácido giberélico GA_3 (Figura 9), es una de las giberelinas más comercializadas al igual que otras GAs, se sintetiza en los primordios apicales de las hojas, en las raíces, semillas en desarrollo, endospermo y frutos inmaduros. A nivel intracelular los sitios de biosíntesis son los plastidios. Las giberelinas incrementan tanto la

división como la elongación celular, sus efectos fisiológicos son: germinación de semillas, elongación del tallo, alargamiento celular, partenocarpia⁶, expansión foliar, alargamiento de la raíz, inducen a la floración de plantas de ciclo largo e intervienen en la formación de frutos (Aguilar, Melgarejo, & Romero, 2010).

Sus efectos varían de acuerdo a la concentración y el material vegetal utilizado. El GA₃ es sensible al calor, tras el autoclavado pierde el 90% de su actividad biológica, por ese motivo se recomienda usar filtros durante el proceso de esterilización (Roca & Mroginski, 1993).

1.4.3.Efecto del ácido giberélico (GA₃) en la germinación de semillas

Las giberilinas ejercen su acción sobre el ARN activando genes, función que está bien caracterizada para dos genes que son: la α -amilasa y los genes involucrados en el alargamiento de los entrenudos del tallo. El endospermo está formado por dos tejidos, el endospermo amiláceo que ocupa una capa central y la capa de aleurona, donde existe un receptor de GA₃, esta hormona induce a la síntesis de α -amilasa, enzima responsable de la solubilización de las reservas del endospermo durante la germinación, por tal motivo, su uso como promotor o inductor de la germinación en diversos tipos de plantas es bien conocido.

En la Figura 10 se muestra el mecanismo de acción del ácido giberélico en una semilla de cebada, considerándose 5 etapas. Etapa (1), las giberelinas son sintetizadas por el coleoptilo y el escutelo del embrión y liberadas en el endospermo. Etapa (2); las giberelinas difunden hacia la capa de aleurona. Etapa (3), las células de la capa de aleurona son inducidas a sintetizar y segregar enzimas (α -amilasas y otras hidrolasas) en el endospermo amiláceo. Etapa (4), el almidón y otros polímeros son degradados a pequeñas moléculas y Etapa (5) los solutos liberados (monómeros) son transportados hacia el embrión donde son absorbidos y utilizados

⁶ Proceso por el cual se forman frutos sin fertilización.

para el desarrollo del embrión (Marujano, Jordan & Rojas –Aréchiga, 2007; Tigabu & Odén 2000; Universidad Politécnica de Valencia, 2014).

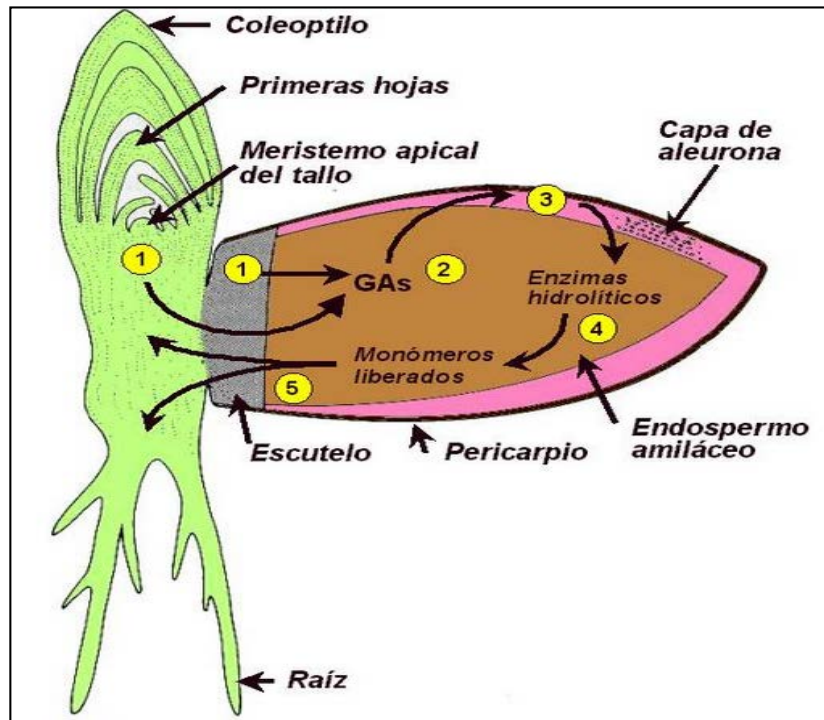


Figura 10. Acción del ácido giberélico (GA₃) en semillas de cebada. (Universidad Politécnica de Valencia, 2014).

1.4.4. Obtención de explante asépticos

Un explante es un fragmento de tejido u órgano de cualquier parte de la planta (hoja, raíz, yemas, capítulos foliares, anteras, embriones etc.) (García, Quintero, & Munguía, 2004). La elección del explante es el primer paso para el establecimiento de cualquier cultivo, este dependerá del objetivo de estudio. En la selección del explante se debe tomar en cuenta factores como edad de la planta, genotipo y su estado fisiológico (Esquivel & Escalant, 1994).

La desinfección superficial del explante debe garantizar la eliminación de todos los microorganismos (hongos y bacterias) y a la vez causar el menor daño posible a los explantes (Esquivel & Escalant, 1994). En este proceso se emplean varios agentes desinfectantes, como: hipoclorito de sodio o calcio, alcohol, peróxido de hidrógeno,

nitrate de plata, yodo, fungicidas y antibióticos. La concentración y el tiempo de esterilización del explante se determinan mediante ensayos experimentales (Sathyanarayana & Varghese, 2007).

La adición de tensoactivos como el Tween- 20 hacen que la desinfección sea más eficaz, estos compuestos reducen la tensión superficial permitiendo que el explante esté en mayor contacto con el agente esterilizante, obteniéndose así explantes asépticos libres de contaminación (Roca & Mroginski, 1993).

1.4.5.Inducción a callo

Los callos se definen como una masa irregular de células no diferenciadas que se multiplica de forma desorganizada (Evans, Coleman, & Kearns, 2003). De manera natural, el callo aparece como un mecanismo de cicatrización cuando la planta presenta heridas o tumores inducidos por organismos fitopatógenos (UNAD, 2014).

A nivel *in vitro*, se genera al colocar los explantes en un medio de cultivo específico en condiciones asépticas. Durante la callogénesis el tejido diferenciado de los explantes, se desdiferencia formando masas celulares amorfas. La formación de callo se observa en la superficie de corte del explante. (Evans, Coleman, & Kearns, 2003). Prácticamente todo órgano de la planta (hoja, tallo, raíz, embriones, polen, entre otros) a cualquier edad fisiológica, puede servir para la proliferación de callo (Hurtado & Merino, 1987). Sin embargo, es preferible usar tejido joven por ser menos diferenciado y presentar una mejor respuesta *in vitro*. Otros factores que influyen en la formación de callo son el genotipo del explante, luz, temperatura, formulación del medio de cultivo y posición del explante (UNAD, 2014; Chawla, 2002).

1.4.6. Suspensiones celulares

Las suspensiones celulares consisten en células libres y agregados celulares, dispersos en un medio líquido que está en agitación constante (Esquivel & Escalant, 1994). Algunas características de las suspensiones celulares se describen en la siguiente tabla:

Tabla 5

Características de las células vegetales en suspensión, tabla traducida de (Petersen & Wilhelm, 2008, pág. 585).

Característica	Célula vegetal
<i>Inoculo</i>	Alto (5-10% del volumen de la suspensión)
<i>Tamaño (μ)</i>	25-400
<i>Diámetro celular (μ)</i>	40-200
<i>Superficie (μm^2)</i>	4500
<i>Volumen (μm^3)</i>	900 000
<i>Crecimiento</i>	Lento
<i>Tiempo de duplicación (h)</i>	15-180
<i>Índice de crecimiento (1/h)</i>	0.010-0.046
<i>Desarrollo de crecimiento</i>	Células libres pero principalmente agregados celulares
<i>Sensibilidad a la agitación</i>	Relativamente alta
<i>Demanda de oxígeno</i>	Mayor que las bacterias
<i>Localización de los metabolitos secundarios</i>	Intracelular y en algunos casos extracelular

1.4.6.1. Iniciación de las suspensiones celulares

Una suspensión celular se establece al colocar segmentos de callo en medio líquido en agitación mecánica. El objetivo de esta agitación es romper los agregados celulares, mantener una distribución celular uniforme y proporcionar oxígeno a las células (Freire, 2013; Chawla, 2002).

El mejor inóculo para la iniciación de las suspensiones, es callo friable, que se define como una masa de células indiferenciadas con alto ritmo de división y baja cohesividad entre ellas. En caso de tener callo poco friable, es necesario romper los agregados celulares por métodos mecánicos (filtrado, frascos reflectores) o enzimáticos (adición de pectinasa⁷ y celulasa⁷ a los medios) (Roca & Mroginski, 1993).

A escala de laboratorio, el inóculo se siembra en erlenmeyers con medio líquido llenando la capacidad de un quinto del frasco. En general, se recomienda empezar con volúmenes pequeños de medio (10 a 50 mL) y una cantidad de inóculo de 1 a 20 gramos (peso fresco), con una velocidad de agitación variable entre 60 a 150 r.p.m. (Esquivel & Escalant, 1994; Chawla, 2002). La selección de la velocidad de agitación dependerá del cultivo celular, medio de cultivo, tipo de recipiente y volumen (Freire, 2013; Chawla, 2002).

Los elementos de una suspensión celular son células libres, células muertas, inóculo inicial y agregados celulares, estos últimos, son esféricos, de superficie lisa, cohesivos y con cierto grado de diferenciación celular o tisular (Baran & Ghosh, 2005)

En una suspensión existen varios tipos de células:

- **Células no embriogénicas:** células grandes y alargadas, con una vacuola enorme, núcleo pequeño y citoplasma reducido (Villalobos & Thorpe, 1991). Las células diferenciadas y meristemáticas forman parte de este grupo celular.
- **Células embriogénicas:** células pequeñas ovoides, citoplasma denso con pared y núcleo prominente (Villalobos & Garcia, 2012)

⁷ Enzimas que lisan las paredes celulares vegetales, se utilizan en concentraciones bajas para romper los agregados celulares y generar células libres

1.4.6.2. Mantenimiento de las suspensiones celulares

Las suspensiones celulares se mantienen mediante subcultivos, es decir, adicionando medio fresco a la suspensión. El objetivo del recambio de medio es mantener las células vivas, prevenir el necrosamiento y la pérdida de viabilidad.

Según Roca & Mroginski (1993), para el mantenimiento de una suspensión, se pueden emplear tres tipos de sistemas: cerrado, continuo cerrado y continuo abierto.

Sistema cerrado.- Las células se mantienen en el medio. Cuando la suspensión ha alcanzado la fase estacionaria, se toma una alícuota y se la subcultiva en medio fresco, reiniciando así el ciclo de crecimiento celular. El sistema cerrado es el más empleado en investigación.

Sistema continuo cerrado.- En este sistema hay un suministro continuo de medio fresco y simultáneamente se retira el medio gastado pero sin células, pues éstas son separadas de la solución por métodos mecánicos.

Sistema continuo abierto.- Se le adiciona a la suspensión medio fresco y se retira medio antiguo junto con algunas células. El volumen de ingreso de medio nuevo debe ser el mismo volumen de medio antiguo.

1.4.6.3 Cinética de crecimiento celular

La cinética celular describe el crecimiento de las células con relación al tiempo. El modelo clásico que describe esta cinética es la curva sigmoidea, este modelo establece que para las células libres, el crecimiento es potencialmente ilimitado e inicia con un modelo exponencial. Sin embargo, cuando las células se agrupan forman un organismo, la interacción entre individuos impone limitaciones al crecimiento, por lo que su curva, habiendo sido por un tiempo exponencial, al finalizar su ciclo de vida cambia de dirección tomando una forma sigmoidal (CATIE, 1986)

La curva sigmoideal que se muestra en la Figura 11, describe las siguientes fases:

Fase de retraso o latencia.- Periodo en el cual la densidad celular no aumenta, las células se encuentran adaptándose a su nuevo entorno, por lo tanto no se da la división celular (Roca & Mroginski, 1993).

Fase exponencial o logarítmica.- En esta fase el volumen celular aumenta, predominando la división celular. El número de células con capacidad de crecimiento va aumentando exponencialmente de acuerdo a una progresión geométrica (del tipo 1, 2, 4, 8, 16, etc.) (EXA-UNE, 2014).

Fase lineal.- Se caracteriza porque a períodos iguales de tiempo corresponde aumentos iguales de crecimiento (EXA-UNE, 2014).

Fase de desaceleración progresiva.- En esta fase disminuye la tasa de crecimiento debido al agotamiento de nutrientes en el medio.

Fase estacionaria.- Etapa final de la curva de crecimiento. El número celular se mantiene constante y la tasa de división celular decrece. Usualmente los metabolitos secundarios se generan durante la fase estacionaria ya que hay un descenso en la producción de metabolitos primarios (Pérez , 2008). El cultivo necesita ser transferido a un medio nuevo ya que si se mantiene por mucho tiempo en fase estacionaria, las células mueren.

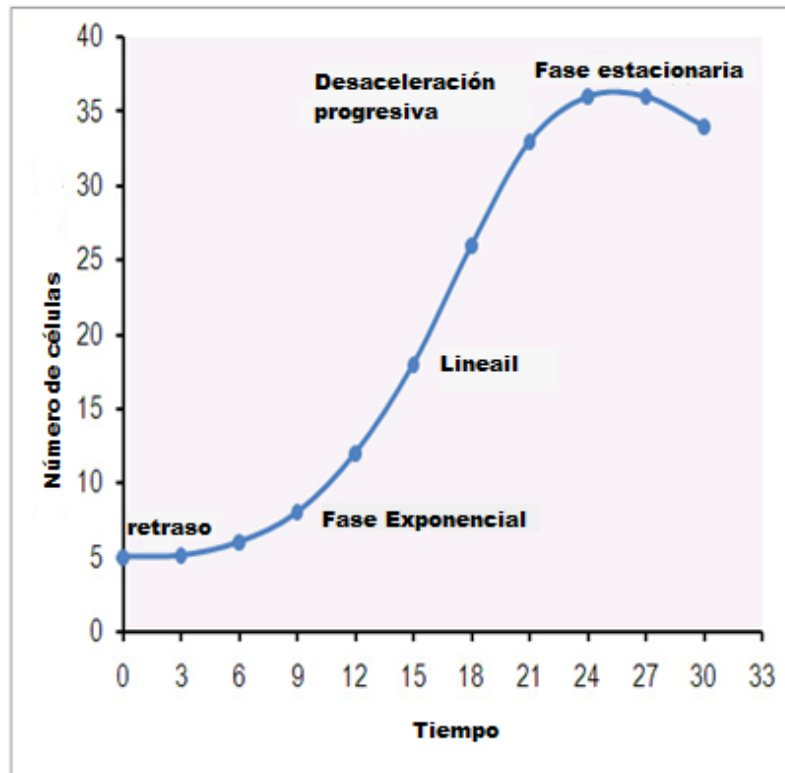


Figura 11. Fases de crecimiento de una suspensión celular

1.4.6.4 Métodos para medir el crecimiento celular

Existen varios métodos para la evaluar la cinética de crecimiento celular. Los más comunes son:

Conteo celular.- Se evalúa el número de células por volumen de suspensión, para esto se emplea un hemocitómetro (cámara de Neubauer), este dispositivo consiste en una placa de cristal, con una depresión central dividida en campos por una fina cuadrícula (Oxford, 2004). Se coloca un poco de muestra en la cámara y bajo el microscopio, se mide la cantidad de células por cuadrícula, esto permite calcular la densidad celular en la suspensión (Lugo, 2004). Para emplear esta metodología es preferible que no existan agregados celulares. Si existen, deben ser disgregados en células individuales, tratándoles previamente con soluciones

acuosas de trióxido de cromo al 8-12% a 70 ° C por 2 -15 minutos o con pectinasa al 0.1% a 25 °C por 16 horas (Freire, 2013; Pérez M. , 2008; Roca & Mroginski, 1993).

Volumen de células sedimentadas.- Un incremento en el número de células eleva el volumen (mL) que ocupa dichas células en la suspensión, para determinar este parámetro, se toma un volumen conocido de suspensión en un tubo cónico graduado y se centrifuga durante tres minutos a 200 r.p.m, provocando la sedimentación de las células (pellet). El volumen celular se expresa como mililitro de pellet por mililitro de cultivo (Freire, 2013; Mustafa, Winter, Van Iren, & Verpoorte, 2011).

Peso fresco.- Inicialmente se pesa un fragmento de papel filtro, luego se coloca un volumen conocido de suspensión, el papel es lavado, filtrado al vacío y finalmente se lo vuelve a pesar (Roca & Mroginski, 1993).

Peso seco.- El procedimiento de este método es similar al de peso fresco, la única variación es que antes de pesar las células se secan a 60 °C al vacío durante mínimo 12 horas. (Roca & Mroginski, 1993).

Viabilidad celular.- La viabilidad celular se determina mediante la tinción de las células con colorantes como el azul de Evans que penetra en las células muertas tiñéndolas de azul, las células vivas no presentan coloración (Roca & Mroginski, 1993).

Turbidez.- Cuando las células se multiplican en el medio, este se torna turbio o nebuloso. Para medir la turbidez se utiliza un espectrofotómetro con filtro, en longitudes de onda de 400 nm a 465 nm (Roca & Mroginski, 1993).

Índice mitótico.- Esta técnica evalúa el número de células en estado de mitosis (Roca & Mroginski, 1993), aplicando la siguiente fórmula adimensional:

$$IM = \frac{\text{células en mitosis}}{\text{total de células}} * 100$$

1.4.6.5. Producción *in vitro* de metabolitos secundarios

Las plantas producen una gran diversidad de compuestos bioactivos denominados metabolitos secundarios que a diferencia de los metabolitos primarios, no intervienen en procesos de fotosíntesis, respiración, transporte, crecimiento o reproducción, por lo tanto no son estrictamente necesarios para la supervivencia de la planta (Taiz & Lincoln, 2006).

Los metabolitos secundarios tienen una distribución restringida a determinadas familias o especies, se sintetizan en pequeñas cantidades por tipos celulares concretos durante un momento explícito del desarrollo de la planta. Sus funciones principales son: 1) brindar protección al evitar la ingesta de herbívoros, 2) defensa ante la infección de patógenos microbianos, 3) polinización, al servir como atrayentes polinizadores, dispersadores de semillas y como agentes en la competencia planta-planta (Taiz & Lincoln, 2006).

Muchos de éstos compuestos que provienen de plantas medicinales, representan una fuente principal para la elaboración de fármacos, agroquímicos, pesticidas, insecticidas, saborizantes, colorantes y aditivos alimentarios (Zhao, Davis, & Verpoorte, 2005; Balandrin & Klocke, 1988). Generalmente, estos compuestos se extraen de plantas silvestres o cultivadas, lo que tiene una serie de desventajas: su acumulación en las plantas es baja y lenta, al estar limitada por factores ambientales bióticos (interacción con patógenos) y abióticos (sequía, luz ultravioleta y temperaturas extremas), en la extracción por métodos convencionales se necesita una gran cantidad de material vegetal y costos de producción elevados (Pérez, 2008). En este contexto, el establecimiento de suspensiones celulares representa un excelente método para la obtención *in vitro* de metabolitos secundarios, ya que estos pueden obtenerse en condiciones controladas de luz temperatura y humedad, además es posible reducir los costos e incrementar la productividad mediante el control automatizado del proceso y la regulación de las rutas metabólicas; contar con sistemas de producción definidos, calidad uniforme y rendimientos constantes del producto, así como la posibilidad de establecer

sistemas estrictos de control de calidad. Adicionalmente el proceso de extracción puede ser más simple, rápido y eficiente (Paek, Chakrabarty, & Hahn, 2005; Vanisree & Tsay, 2007).

1.5. Sistema de hipótesis

- **Hipótesis 1:** Existe una concentración de auxina 2,4-D que aplicada en el medio Murashige & Skoog permite la formación de callos friables en forma significativa a partir de segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunth.
- **Hipótesis 2:** Existe una concentración de auxina 2,4-D que aplicada en el medio Murashige & Skoog permite obtener una mayor densidad de células en suspensión de *Valeriana pyramidalis* Kunth.
- **Hipótesis 3:** Existe una concentración de la hormona GA₃ que aplicada en el medio Murashige & Skoog permite obtener un porcentaje significativo de semillas germinadas de *Valeriana pyramidalis* Kunth.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Fase de campo

2.1.1. Selección, recolección y traslado del material vegetal

La recolección del material vegetal se realizó en la provincia de Pichincha, ciudad de Quito, parroquia Pintag. Se identificó las plantas en chacras, pastizales y bordes de camino cercanos a la hacienda “Santa Inés” (latitud E 17790940; longitud N 0963006; altitud 2725 msnm), seleccionándose plantas vigorosas, visiblemente sanas, libres de patógenos (Figura 12 a). Se extrajo la planta completa con raíz y se colocó en macetas que contenían tierra propia del lugar, las plantas recolectadas fueron trasladadas al laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, ubicado en la parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, (latitud S 01881; longitud E 782664; altitud 2516 msnm).

2.1.2 Identificación de la especie

Para verificar la identidad taxonómica del material vegetal colectado, se contó con la ayuda de la PhD. Carol Auer, experta en botánica e investigadora del Departamento de Ciencias Vegetales de la Universidad de Connecticut (EEUU) y Tatiana Jaramillo, directora técnica del Jardín Botánico de Quito.

2.1.3. Aclimatación y tratamiento fitosanitario

La fase de aclimatación se llevó a cabo en invernaderos ubicados en los pasillos exteriores del laboratorio. Se realizó la aclimatación el mismo día del muestreo, cuidadosamente se retiró la tierra original de las raíces, luego se preparó una solución de enraizador universal a una concentración de 1 mL/L este producto contiene AIB, AIA, arginina y bioestimulantes en general, se mantuvo a las raíces en

esta solución por 15 minutos, finalmente se sembró cada planta agregando a las macetas una mezcla preparada de turba, tierra negra y cascajo en proporciones de 2:1:1 (Zurita, 2013). El tratamiento fitosanitario se basó en fungicidas sistémicos y de contacto a una concentración de carbendazamin: 3 mL/L y Captan: 3 g/L (Captan 80 PM), se aplicó dicho tratamiento 2 veces por semana durante un mes, también se aplicó una solución de Brasinolida de 2 mg/L cada 7 días para estimular la brotación (Figura 12 b).



Figura 12. a) Plantas de valeriana en hábitat natural, b) Plantas de valeriana en condiciones de invernadero sometidas a tratamiento fitosanitario.

2.2. Fase de Laboratorio

Esta fase se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, que se encuentra ubicado en Sangolquí, Av. El Progreso, s/n, Cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, (latitud S 01881; longitud E 782664; altitud 2516 msnm).

En el siguiente esquema, se explica los dos experimentos realizados durante esta fase, cada experimento esta subdividido en etapas cuyo procedimiento y evaluación se detalla a lo largo del Capítulo 2 (Figura 13).

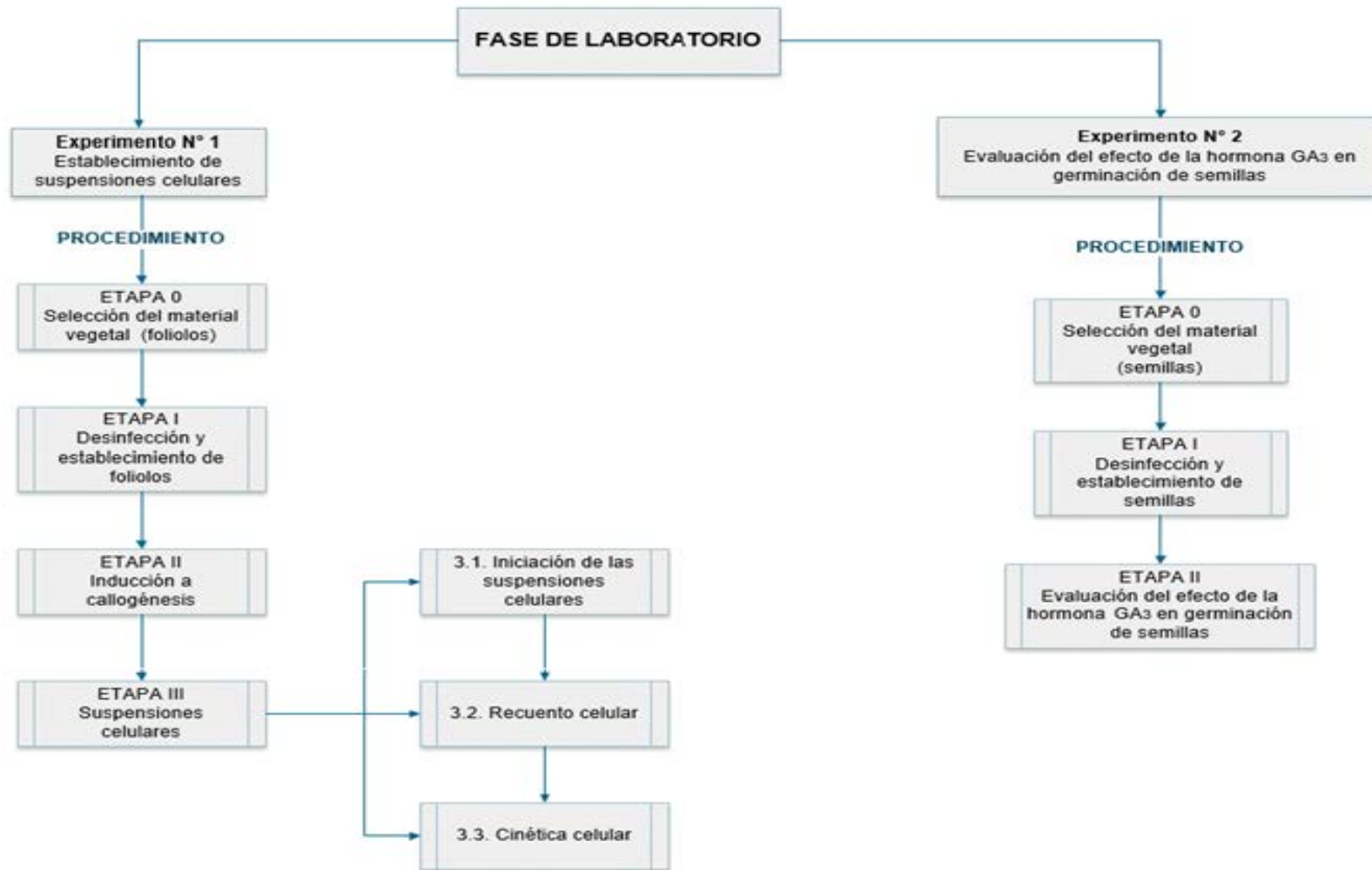


Figura 13. Esquema explicativo de la fase de laboratorio donde se detallan los dos experimentos que se realizaron.

Experimento N° 1. Establecimiento de suspensiones celulares

2.2.1. Etapa I: Selección del material vegetal

Se seleccionaron hojas jóvenes por presentar mayor actividad regenerativa. Como se ha mencionado en la descripción botánica, *Valeriana pyramidalis* Kunth tiene hojas compuestas imparipinnadas, es decir, hojas compuestas, cuyo número de folíolos es impar con un folíolo terminal al final del raquis. En la presente investigación se utilizó folíolos terminales y primarios. (Figura 14).

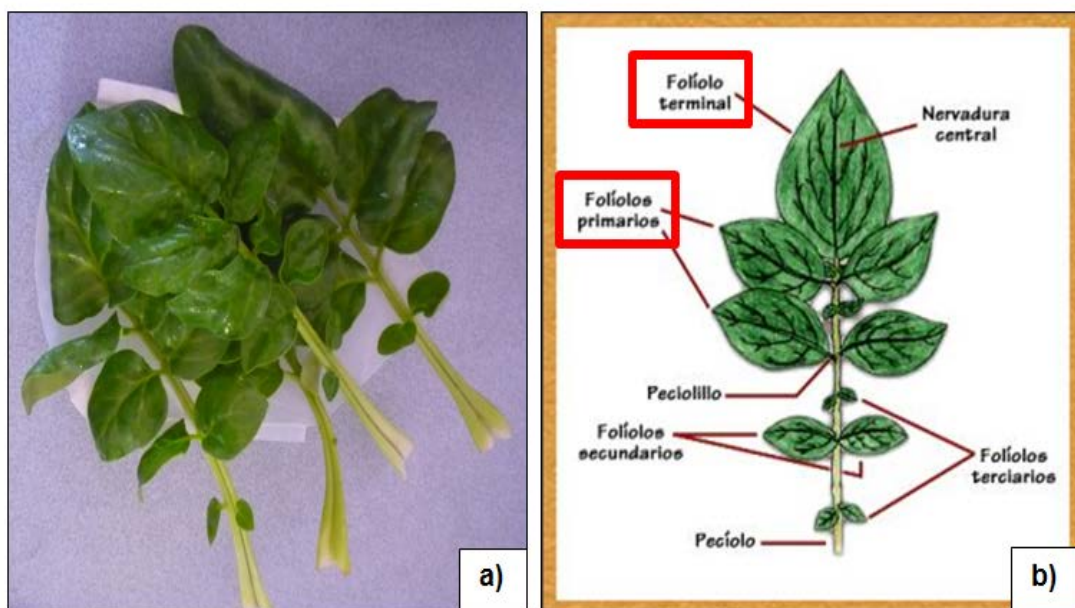


Figura 14. Selección de explantes, a) Folíolos extraídos de la planta madre, b) Esquema que muestra la distribución de los folíolos en una hoja de valeriana, se utilizaron los folíolos terminales y primarios remarcados con rojo.

2.2.2. Etapa II: Desinfección y establecimiento de folíolos

Las hojas jóvenes seleccionadas fueron lavadas en agua corriente por cinco minutos, a continuación se cortaron los folíolos terminales y primarios, dichos explantes se sumergieron en una solución de detergente a una concentración del 1% (p/v) por 10 minutos en agitación continua, luego se lavó tres veces con agua destilada estéril. En cámara de flujo laminar, los folíolos fueron sometidos a una solución de hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones (Tabla 6), durante tiempos de inmersión de 5 y 10 minutos, para potenciar su efecto, se adicionó dos gotas tween 20 por cada 100 mL de solución. A continuación se efectuaron 3 lavados con agua estéril para luego secar completamente el folíolo empleando servilletas autoclavadas. Finalmente se cortó segmentos foliares de aproximadamente 1 centímetro para su siembra (Figura 15).

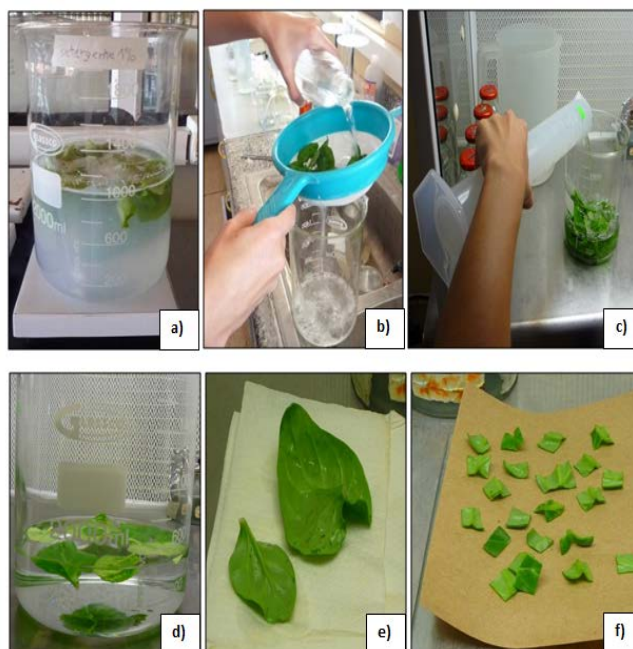


Figura 15. Desinfección de folíolos, a) Inmersión en detergente, b) lavado con agua destilada estéril, c) inmersión en hipoclorito de sodio, d) lavado con agua destilada estéril, e) secado de las hojas con servilletas estériles, f) segmentos foliares cortados.

Medio de cultivo. Los explantes se sembraron en frascos de vidrio con medio MS (Murashige & Skoog, 1962) que contiene sales minerales y vitaminas, suplementado con 30 g/L de azúcar y 6,5 g/L de bacto agar, el pH se ajustó entre 5.7- 5.8 con HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N.

Condiciones físicas del cultivo. Los explantes se incubaron a una temperatura de 23 ± 1 °C, 60 a 70% de humedad relativa, intensidad lumínica de 2000 - 2500 luxes con fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Diseño Experimental. En la etapa de desinfección y establecimiento de foliolos, se evaluó la combinación de tres niveles de porcentaje de hipoclorito de sodio (NaClO); 0.5%, 0.8 y 1% frente a dos tiempos de inmersión 5 y 10 minutos, generándose un diseño factorial de 3 x 2 (Tabla 6).

Factores controlables. Los factores controlables fueron hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión.

Factores no controlables. Se consideró como factores no controlables la luz, fluctuaciones de temperatura y humedad relativa ambiental.

Tratamientos. Se evaluaron seis tratamientos, resultado de la combinación de los niveles en porcentaje de hipoclorito de sodio vs tiempo de inmersión, a cada tratamiento se le asignó un código diferente (Tabla 6).

Tabla 6

Tratamientos en la fase de desinfección para folíolos.

Tratamiento	Código	[NaClO] (%)	Tiempo de inmersión (min)
1	TA1	0.5	5
2	TA2	0.5	10
3	TA3	0.8	5
4	TA4	0.8	10
5	TA5	1.0	5
6	TA6	1.0	10

Variables de respuesta evaluadas.

- **Contaminación.** Mediante observación se determinó si un explante (segmento foliar) presentaba contaminación, se asignó valores de “1” para explante no contaminado y “0” para explante contaminado por hongos o bacterias (Figura 16).

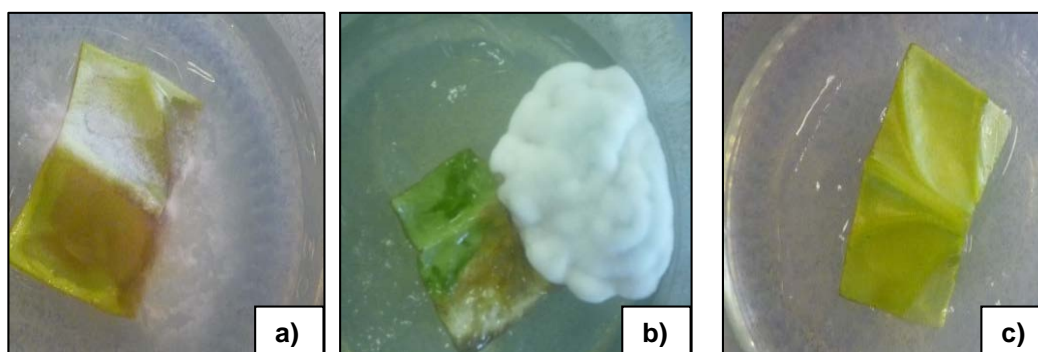


Figura 16. Evaluación de la contaminación, a) Contaminación bacteriana, b) Contaminación fúngica, c) sin contaminación.

- **Necrosis.** Mediante observación se determinó si un explante presentaba necrosis. Un explante necrosado se caracteriza por presentar oscurecimiento en su tejido, en tal caso se le asignará el valor de “0” y el valor “1” para los explantes no necrosados cuya tejido es viable y de coloración verde. (Figura 17).

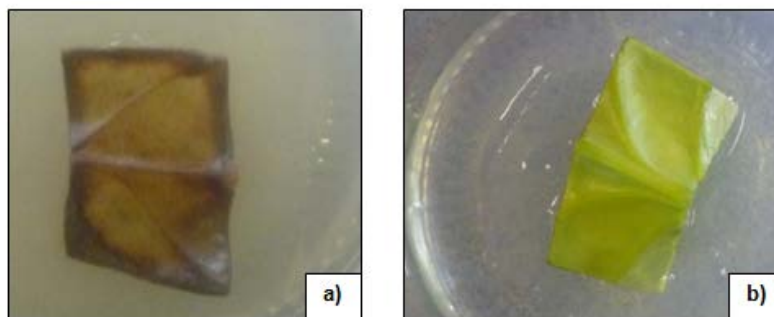


Figura 17. Evaluación de la necrosis, a) Explante necrosado, b) explante no necrosado.

Número de repeticiones. Para cada tratamiento se realizaron diez repeticiones.

Unidad experimental. La unidad experimental fue un frasco con un segmento de lámina foliar con nervadura central, el tamaño de cada explante fue de aproximadamente 1 centímetro.

Modelo estadístico de interés. El modelo estadístico fue un diseño factorial con dos factores 3x2, diseño que está dado por:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} :$$

$$i = 1, 2, \dots, a; j = 1, 2, \dots, b; k = 1, 2, \dots, n$$

Donde μ es la media general, α_i es el efecto debido al i -ésimo nivel del factor A , β_j es el efecto del j -ésimo nivel del factor B , $(\alpha\beta)_{ij}$ representa al efecto de interacción en la combinación ij y ε_{ijk} es el error aleatorio que se supone sigue una distribución normal con media cero y varianza constante $\sigma^2(N(0, \sigma^2))$ y son independientes entre sí.

2.2.3. Etapa III: Inducción a callo

Una vez establecido el mejor protocolo de desinfección para foliolos, continuamos con la etapa de inducción a callo. En esta etapa se realizó una nueva introducción de foliolos.

Medio de cultivo. Los explantes (segmentos foliares) se sembraron en medio (Murashige & Skoog, 1962), con sales y vitaminas suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D (0 a 2.5 mg/L), con 30 g/L de sacarosa y 6.5 g/L de agente gelificante (Bacto agar), el pH se ajustó entre 5.7- 5.8 con HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N.

Condiciones físicas del cultivo. Posterior a la siembra, los explantes se incubaron a una temperatura de 23 ± 1 ° C, 60 a 70% de humedad relativa, en condiciones de oscuridad completa.

Diseño experimental. Se evaluó el efecto de la hormona 2,4-D en la formación de callo, para esto se probó con 5 concentraciones de hormona (0.5; 1.0; 1.5; 2.0 y 2.5 mg/L 2,4-D) más un control (0 mg/L 2,4-D), realizándose en total 6 tratamientos (Tabla 7).

Factores controlables. Los factores controlables fueron la concentración de la hormona 2,4-D en el medio de cultivo.

Factores no controlables. Los factores no controlables son fluctuaciones de temperatura y humedad relativa ambiental.

Tratamientos. Se probaron seis tratamientos, a cada tratamiento se le asignó un código se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 7

Tratamientos con diferentes concentraciones de 2,4-D para la etapa de inducción a callo a partir de segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunth.

Tratamiento	Código	2,4-D (mg/L)
1	TC0	0
2	TC1	0.5
3	TC2	1
4	TC3	1.5
5	TC4	2
6	TC5	2.5

Número de repeticiones. Para cada tratamiento se realizaron diez repeticiones.

Unidad experimental. La unidad experimental fue un frasco con un segmento de lámina foliar (envés) con nervadura central, el tamaño de cada explante fue de aproximadamente 1 centímetro.

VARIABLES DE RESPUESTA EVALUADAS. Las variables evaluadas durante la fase de inducción a callo fueron presencia de callo y peso del callo formado.

- **Presencia de callo.-** Se observó el apareamiento de callo en el explante dando valores de "0" a la ausencia de callo y de "1" a la presencia de callo. La presencia de callo se evaluó a los 30 días de incubación de los explantes (Figura 18).

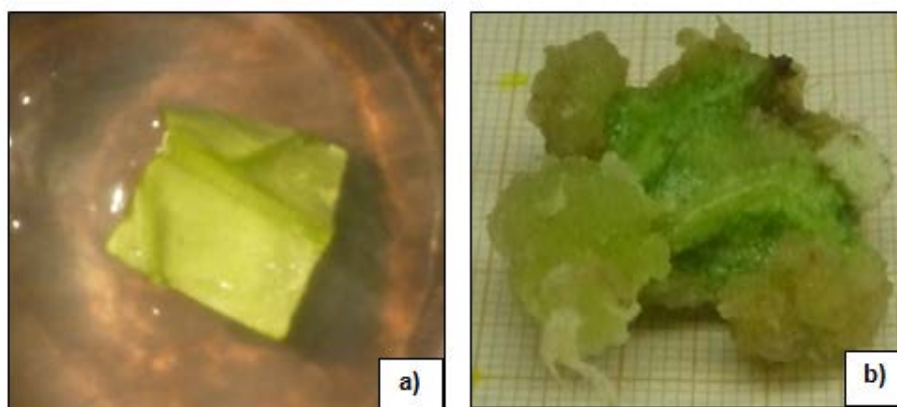


Figura 18. Evaluación de la formación de callo, a) Ausencia de callo, b) presencia de callo.

- **Peso del callo formado.**- Se determinó el peso fresco total del callo formado a 60 días de incubación de los explantes con ayuda de una balanza analítica (Figura 19).

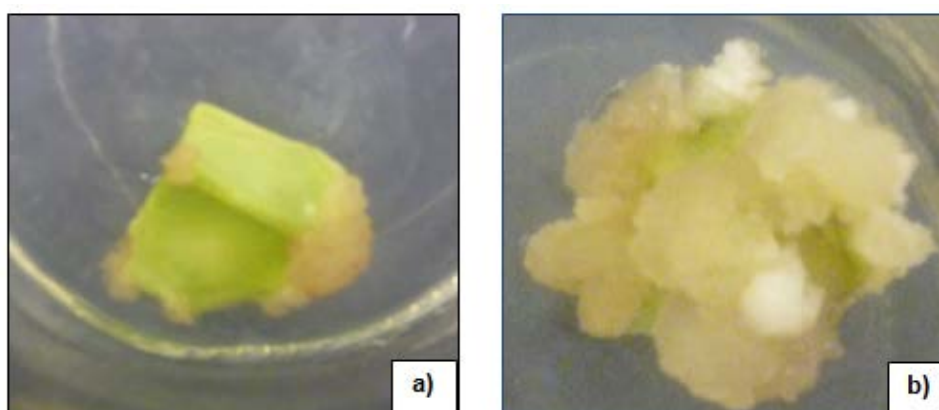


Figura 19. Evaluación del peso de callo formado. a) Callo a los 30 días, b) Callo a los 60 días.

El procedimiento de medición fue el siguiente, empleando pinzas autoclavadas se tomó el callo y se retiró el exceso de agar, a continuación, se colocó el callo sobre papel autoclavado previamente ubicado en el plato de una balanza analítica, finalmente se determinó su peso. El procedimiento se llevó a cabo en cámara de flujo laminar, todo el material utilizado incluyendo la balanza fue esterilizado bajo luz UV durante 40 minutos (Figura 20).

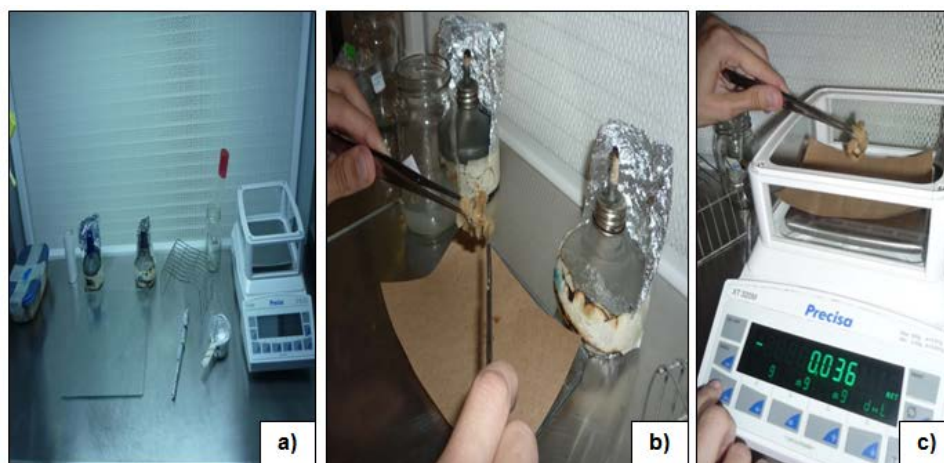


Figura 20. Medición de peso fresco del callo, a) Material autoclavado y balanza analítica esterilizados bajo luz UV, b) Remoción del exceso de agar, c) Encerado de la balanza y determinación de peso fresco del callo.

2.2.4. Etapa IV: Suspensiones celulares

2.2.4.1. Iniciación de las suspensiones celulares.

Una vez determinado los 3 mejores medios de respuesta para la formación de callo, es decir, aquellos que generaron una mayor cantidad de callo, se continuó con la siguiente etapa del experimento. Para la iniciación de las suspensiones celulares se prepararon los medios seleccionados sin la adicción de agente gelificante (bacto agar). Se inició las suspensiones (Figura 21), mediante la transferencia de 1 gramo de callo friable en matraces erlenmeyer de 100 mL de capacidad, con 20 mL de medio líquido MS (Murashige & Skoog, 1962), con sales completas y vitaminas, suplementado con sacarosa (30 g/L) y 2,4-D en varias concentraciones, el pH se ajustó entre 5.7- 5.8 con HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N. Los cultivos celulares se incubaron 23 ± 2 °C sobre un agitador orbital

rotatorio (Wisd SHO-2D) a una velocidad de 110 r.p.m. en condiciones de oscuridad (Freire, 2013).



Figura 21. Establecimiento de la suspensión celular de *Valeriana pyramidalis* Kunth. a) Callo friable, b) disgregación, c) pesaje del callo, d) transferencia a medio líquido, e) suspensión celular resultante, f) incubación de la suspensión en agitación.

2.2.3.1. Recambio de medio

El recambio de medio (Figura 22) se realizó cada 15 días durante tres meses (Freire, 2013), tiempo necesario para obtener una densidad celular adecuada (Villalobos & Garcia, 2012), transcurrido ese tiempo se tamizó las suspensiones empleando una malla de acero inoxidable N° 50, de esta manera se obtuvo una suspensión celular homogénea (Figura 23).

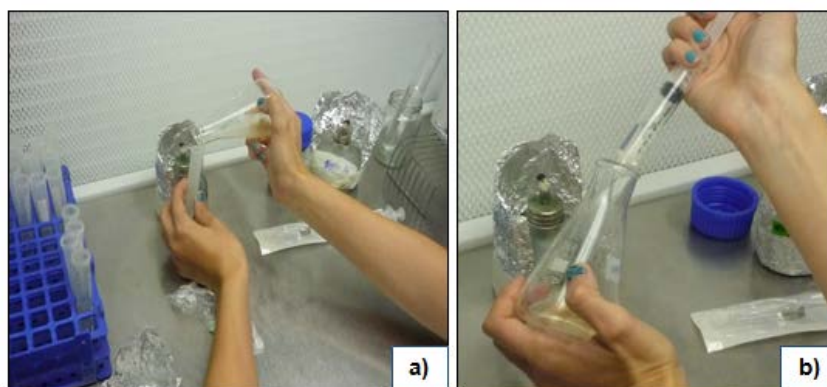


Figura 22. Recambio de medio a) Eliminación de medio antiguo (30% de la suspensión), b) adición de medio nuevo (30% de la suspensión)

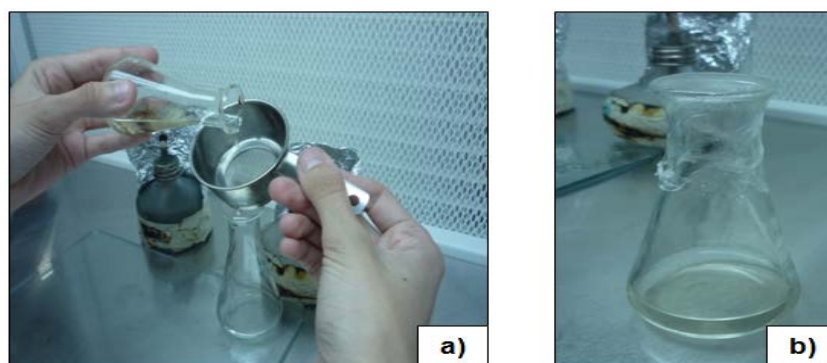


Figura 23. Obtención de una suspensión celular homogénea a) tamizado de la suspensión celular, b) suspensión homogénea resultante del tamizado.

2.2.3.2. Recuento Celular

Tras establecer una suspensión celular homogénea, se reemplazó el 50% del medio antiguo por medio fresco. Se evaluó el crecimiento celular a partir de este cambio el cual será asignado como día cero. Los conteos celulares se efectuaron mediante el uso de un hemocitómetro (cámara de Neubauer), en un microscopio óptico marca Olympus modelo BX- 48. Los conteos se realizaron de acuerdo a la siguiente metodología descrita por la casa comercial Celeromix, inicialmente se colocó un cubreobjetos sobre la cámara, luego se tomó alícuotas de suspensión de 10 μL , las cuales se

dispensaron en el extremo de la cámara procurando que el líquido entre correctamente y de manera uniforme. En el caso de que se formen burbujas se deberá repetir el procedimiento. Para las lecturas se consideraron 5 cuadros grandes de la cámara de Neubauer (Figura 24a). En cada cuadro se contó las células que estén dentro de la zona de medición así como las células (marcadas de negro) que toquen o estén encima del límite superior o izquierdo del cuadrado (Figura. 23.b). No se contabilizó las células que estaban en el límite inferior o derecho.

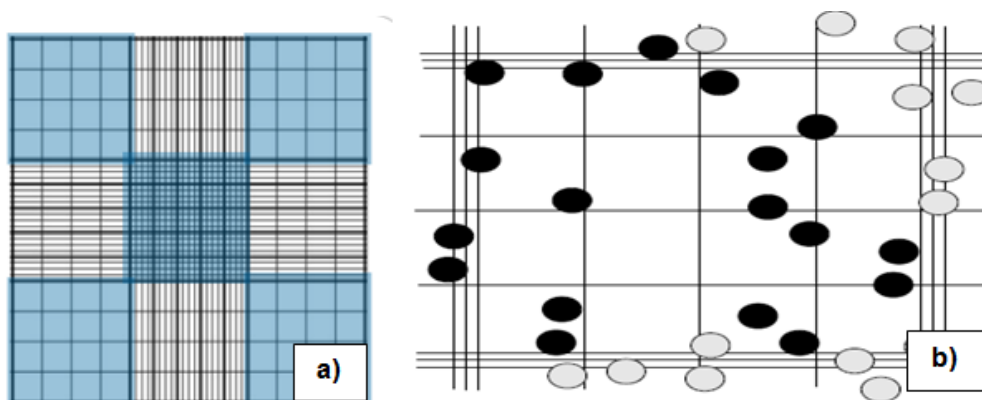


Figura 24. a) Cuadros considerados para el conteo celular b) Conteo de un cuadro grande de la cámara de Neubauer.

El número de células por volumen se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{cell}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{número de células} * 10000}{\text{número de cuadros}} [1]$$

2.2.3.3. Cinética Celular

El conteo celular se efectuó cuatro veces por suspensión, cada dos días por un periodo de 30 días, con estos datos se determinó la curva de crecimiento, donde el eje (x) es el tiempo en días y el eje (y) es el número de células por mililitro. Este procedimiento de conteo se aplicó a los tres tratamientos seleccionados en el proceso de iniciación de las suspensiones.

Diseño Experimental. Se realizó el conteo y cinética celular con la finalidad de establecer las curvas de crecimiento densidad celular (cell / mL) vs tiempo para lo cual se empleará el paquete estadístico InfoStat, estableciéndose así las curvas de las tres mejores concentraciones de 2,4-D para inducción de callo.

Factores controlables. Los factores controlables serán la concentración de la hormona 2,4-D para el establecimiento de suspensiones celulares, el medio de cultivo y la agitación (110 rpm).

Factores no controlables. Tenemos como factores no controlables las fluctuaciones de temperatura y humedad relativa ambiental.

Variable de respuesta. La variable a evaluar durante la fase de establecimiento de suspensiones celulares es la densidad celular.

- **Densidad celular.** Se contó el número de células por mililitro empleando una cámara de recuento celular (Neubauer), evaluándose cada dos días, en un periodo de 30 días.

Tratamientos. Se probaron 3 tratamientos, considerando las tres mejores concentraciones para la inducción a callo, resultantes de la etapa tres.

Número de repeticiones. Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento.

Unidad experimental. La unidad experimental durante el establecimiento de suspensiones celulares fue un erlenmeyer de 50 mL de capacidad con 1 gramo de callo friable y 20 mL de medio líquido. Se realizó 5 suspensiones por tratamiento, es decir, 5 erlenmeyers, tomando en cuenta que la unidad experimental de las suspensiones, es un

erlenmeyer, se hizo cuatro mediciones por cada tratamiento, en cada medición se contó los 5 cuadrantes de la cámara de Neubauer, obteniéndose 20 datos por tratamiento y un total de 60 datos por día.

Experimento N°2. Evaluación del Efecto de la Hormona GA₃ en germinación *in vitro*

2.2.4. Etapa I: Selección del material vegetal

Se realizó una inspección visual de las semillas, seleccionando aquellas que presentaban tonalidad café y vilano abierto (Figura 25).

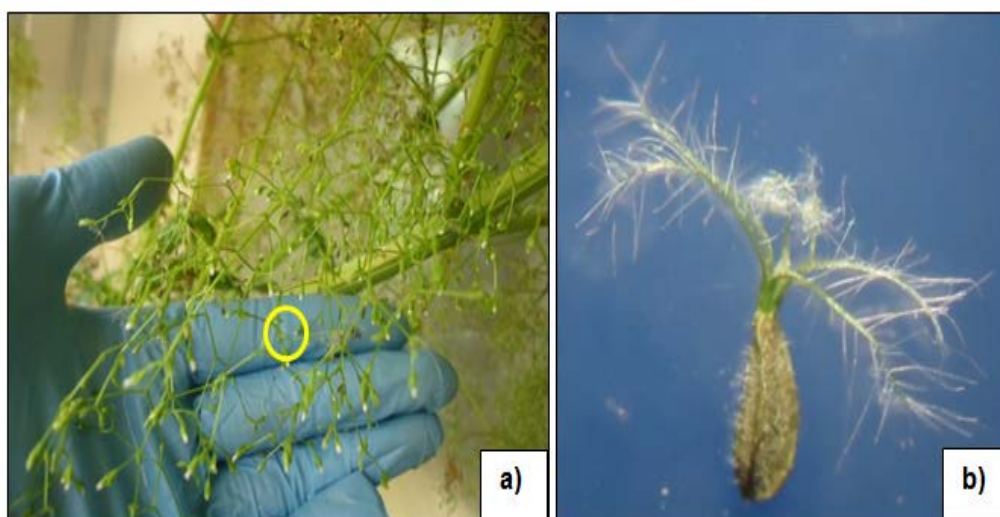


Figura 25. Selección de explantes, a) En el círculo amarillo se muestra las semillas seleccionadas de plantas mantenidas en invernadero, b) Semilla seleccionada vista al microscopio.

2.2.5. Etapa II: Desinfección y establecimiento de semillas

Se recolectó semillas de las plantas mantenidas en invernadero. En el laboratorio, se retiró el vilano de las semillas, se las lavó con agua corriente para eliminar la mayor cantidad de impurezas, a continuación se sumergieron en una solución de detergente a una concentración del 1%

p/v por 10 minutos en agitación continua, se realizó 3 lavados con agua estéril. En cámara de flujo laminar se introdujo las semillas en una solución de hipoclorito de sodio al 1% (v/v) probándose 3 tiempos de inmersión (5, 3 y 1 min), se lavó de nuevo con agua estéril para luego sumergirlas en una solución de alcohol al 70% (v/v) por 1 minuto, finalmente se realizó 3 lavados previos a la siembra definitiva. Debido al tamaño reducido de las semillas y para evitar su pérdida durante todos los lavados se utilizó mallas de tul autoclavadas (Figura 26).

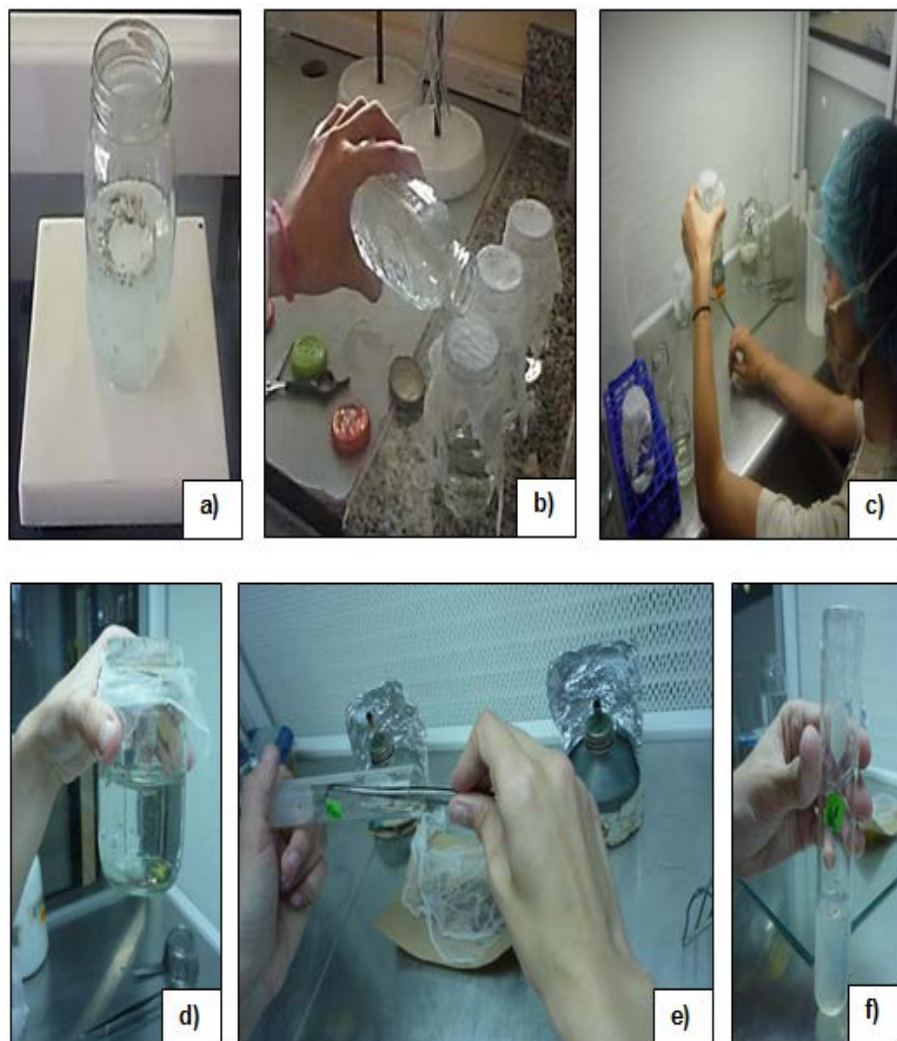


Figura 26. Desinfección de semillas. a) Inmersión en detergente, b) lavado con agua destilada estéril, c) inmersión en hipoclorito de sodio, d) inmersión en alcohol e) y f) siembra de semillas en tubos de vidrio.

Medio de cultivo Las semillas desinfectadas se sembraron en tubos de vidrio de 25x150 mm con 10 mL de medio MS (Murashige & Skoog, 1962) con sales y vitaminas, sin reguladores, el pH se ajustó entre 5.7-5.8 con HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N (Figura 26).

Diseño Experimental. En el proceso de desinfección y establecimiento de semillas se evaluó la combinación de dos niveles: porcentaje de hipoclorito de sodio (NaClO) y tiempo de inmersión en minutos frente a un factor de tipo cuantitativo (1%) de concentración de NaClO y tres factores de tipo cuantitativo de 5, 3 y 1 minuto de tiempo de inmersión. (Tabla 8).

Tabla 8

Tratamientos en la fase de desinfección para semillas

Tratamiento	Código	[NaClO] (%)	Tiempo de inmersión (min)
1	TB1	1.0	1
2	TB2	1.0	3
3	TB3	1.0	5

Condiciones físicas del cultivo. Los tubos se incubaron a una temperatura de 18 ± 2 °C, $16\% \pm 2$ de humedad relativa. En condiciones de oscuridad.

Factores controlables. Los factores controlables fueron hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión.

Factores no controlables. Se consideró como factores no controlables fluctuaciones de temperatura y humedad relativa ambiental.

Tratamientos. Se evaluaron 3 tratamientos resultado de la combinación de porcentaje de hipoclorito de sodio vs diferentes tiempos de inmersión. A cada tratamiento se le asignó un código (Tabla 8).

Variable de respuesta evaluada. La variable de respuesta considerada en esta etapa fue la contaminación.

- **Contaminación.** Mediante observación se determinó si un explante (semilla) presenta contaminación bacteriana o fúngica. Se dará valores de “1” para no contaminado y “0” para contaminado (Figura 27).

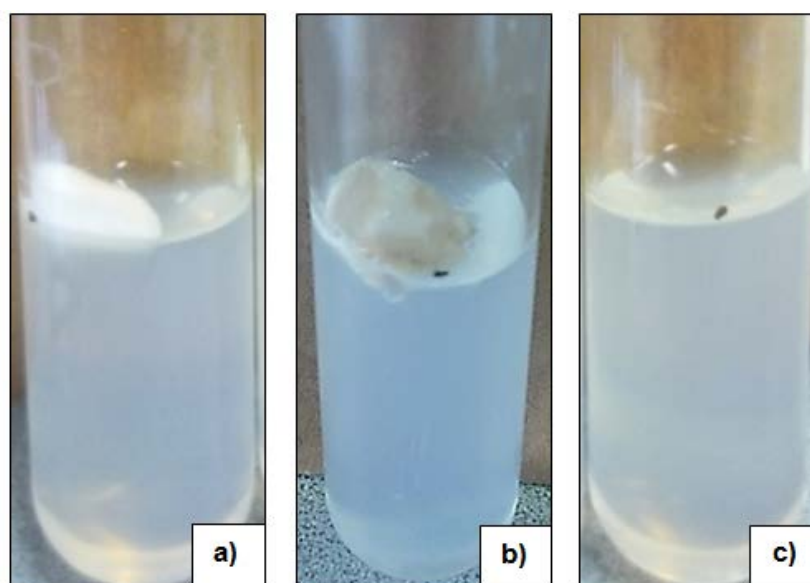


Figura 27. Evaluación de la contaminación, a) Contaminación fúngica, b) contaminación bacteriana, c) sin contaminación.

Número de repeticiones. En cada tratamiento se realizaron veinte repeticiones.

Unidad experimental. La unidad experimental fue un tubo de vidrio con una semilla.

Modelo estadístico de interés. Se empleó un diseño en bloques completos al azar (DBCA) donde en cada bloque se prueban todos los tratamientos, está dado por:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \gamma_j + \varepsilon_{ij}, \begin{cases} i = 1, 2, \dots, k \\ j = 1, 2, \dots, b \end{cases}$$

Y_{ij} es la medición que corresponde al tratamiento de i y al bloque de j , μ es la media general; τ_i es el efecto debido al tratamiento, γ_j es el efecto debido al bloque j y ε_{ij} es el error aleatorio atribuido en la medición Y_{ij} .

2.2.6. Etapa III: Evaluación del efecto de la hormona GA₃ en la germinación de semillas

Una vez estandarizadas las concentraciones de cloro y tiempo de inmersión, se hizo una nueva introducción de semillas en tubos de vidrio con medio de cultivo. En esta etapa, se evaluó el efecto de la hormona GA₃ en germinación mediante pruebas de vigor *in vitro*.

- **Pruebas de vigor *in vitro*.**- Se determinó el vigor de las semillas, a través de la velocidad de germinación (VG) propuesto por Kotowski (1926) [2] y el tiempo medio para alcanzar la germinación máxima (TM) propuesto por Edmond y Drapala (1958) [3]. Los índices VG y TM se calcularon aplicando las siguientes fórmulas:

$$VG = \frac{100 \sum C_i}{\sum C_i T_i} \quad [2]$$

$$TM = \frac{\sum C_i T_i}{\sum C_i} \quad [3]$$

C_i = número de semillas germinadas por día; T_i = tiempo

Se siguió la metodología de recuento establecida por (Bueno, Alzugaraya, Giubileo, Severina, & Carnevale, 2009) realizándose

recuentos diarios de semillas germinadas con radículas de mínimo 0,2 cm de longitud durante 60 días.

Medio de cultivo. Se utilizó MS (Murashige & Skoog, 1962), con sales y vitaminas, suplementado con diferentes concentraciones de GA₃ (1, 2 y 3 mg/L) (Tabla 9), con 30 g/L de sacarosa y 6.5 g/L de agente gelificante (Bacto agar), el pH se ajustó entre 5.7 - 5.8 con HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N.

Condiciones físicas del cultivo. Posterior a la siembra de las semillas, los tubos fueron incubados a una temperatura de 18 ± 2 °C, de humedad relativa en condiciones de oscuridad.

Factores controlables. Los factores controlables fueron las concentraciones de la hormona GA₃ en el medio de cultivo.

Factores no controlables. Se consideró como factores no controlables fluctuaciones de temperatura y humedad relativa ambiental.

Tratamientos. Se realizaron cuatro tratamientos que se describen en la siguiente tabla, a cada tratamiento se le asignó un código diferente:

Tabla 9

Tratamientos de medios de cultivo con diferentes concentraciones de GA₃ para la evaluación del efecto de la hormona en germinación.

Tratamiento	Código	Concentración GA ₃ (mg/L)
1	TG0	0
2	TG1	1
3	TG2	2
4	TG3	3

Número de repeticiones. Se realizaron veinte repeticiones por tratamiento.

Unidad experimental. La unidad experimental fue un tubo con una semilla.

Modelo estadístico de interés. Se aplicó un diseño en bloques completos al azar (DBCA) donde en cada bloque se prueban todos los tratamientos, está dado por:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \gamma_j + \varepsilon_{ij}; \begin{cases} i = 1, 2, \dots, k \\ j = 1, 2, \dots, b \end{cases}$$

Y_{ij} es la medición que corresponde al tratamiento de i y al bloque de j , μ es la media general; τ_i es el efecto debido al tratamiento, γ_j es el efecto debido al bloque j y ε_{ij} es el error aleatorio atribuido en la medición Y_{ij} .

El análisis estadístico consistió en el desarrollo de un análisis exploratorio e inferencial para cada variable evaluada en el capítulo 2. El análisis exploratorio se basó en la construcción de graficas de frecuencia y tablas de contingencia, mientras el análisis inferencial se efectuó según el caso. Para los casos donde se cumple el supuesto de normalidad, el análisis inferencial se basó en ANOVA y pruebas de Duncan, en contraste, a los casos que no cumplieron con el supuesto de normalidad se les aplicó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis y regresión logística. En todas las pruebas se empleó un nivel de significancia del 0.05%

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

Experimento N° 1. Establecimiento de suspensiones celulares

3.1. Etapa I: Desinfección y establecimiento de foliolos

3.1.1. Contaminación

En la etapa de desinfección y establecimiento de foliolos se evaluó la variable contaminación, probándose tres tiempos de inmersión (1, 3, 5 minutos) y dos concentraciones de hipoclorito de sodio (0.5% y 0.8% v/v).

3.1.1.1. Análisis exploratorio de datos

Se realizó un análisis de contingencia a los tratamientos de desinfección, el cual se muestra en la tabla 10 donde se puede evidenciar el porcentaje de explantes no contaminados con relación a las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio. Además se denota, el mismo porcentaje de explantes no contaminados en los tratamientos 5 (1% v/v NaClO vs 5 minutos de inmersión) y 6 (1% v/v NaClO vs 10 minutos de inmersión), encontrándose cierta similitud entre estos dos tratamientos. El porcentaje de explantes contaminados se detalla en la (Tabla A.1.1 de los Anexos.).

Tabla 10

Análisis de contingencia para los explantes no contaminados con respecto a los tratamientos de desinfección para segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunth.

		Concentración de hipoclorito de sodio		
		0.5 % V/V	0.8 % V/V	1 % V/V
Tiempo de inmersión (minutos)	5	10%	60%	90%
	10	80%	100%	90%

La Tabla 10 está representada gráficamente en la figura 28 que muestra el porcentaje de explantes no contaminados con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio, se evidencia que las concentraciones de 0.8% v/v y 1% v/v generaron porcentajes de 100% y 90% de explantes no contaminados.

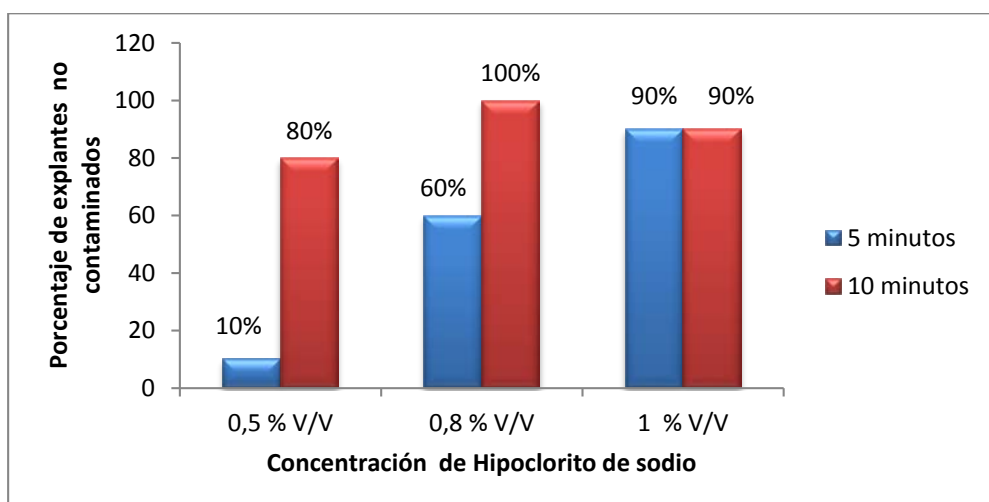


Figura 28. Porcentaje de explantes no contaminados respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio empleado en los tratamientos de desinfección para segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunth.

El porcentaje de explantes no contaminados con relación al tiempo de inmersión se muestran en la Figura 29, se destaca que un incremento en el tiempo de inmersión genera mayor porcentaje de explantes no

contaminados. El tratamiento 6 (0.8% de hipoclorito de sodio y 10 minutos de inmersión), es el más eficaz, mientras que el tratamiento 1 (0.5 % de hipoclorito de sodio y 5 minutos de inmersión), es el tratamiento menos eficaz en la desinfección de segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunth.

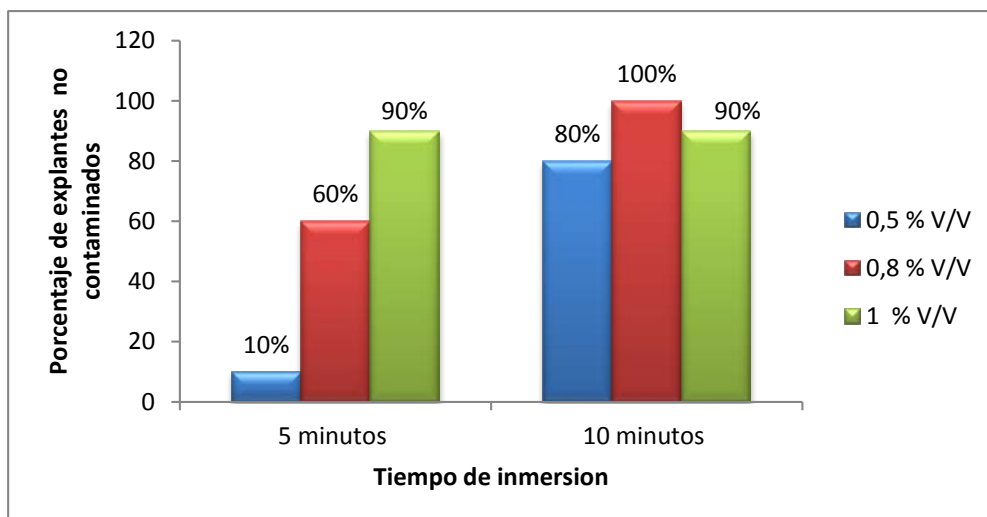


Figura 29. Porcentaje de explantes no contaminados respecto a los tiempos de inmersión empleados en los tratamientos de desinfección para segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunth.

3.1.1.2. Análisis inferencial

Debido a que la variable contaminación es dicotómica, se aplicó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis donde se comprobó que si existen diferencias significativas entre los tratamientos, pues su valor de ($p < 0,0001$) es menor al estadístico de prueba ($\alpha=0.05$), además se presentan dos subconjuntos diferentes (Cuadro 1).

Cuadro 1

Prueba de Kruskal-Wallis de los tratamientos de desinfección de segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunth.

Variable	Hipoclorito	Tiempo	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Contaminación	0.50	5.00	10	0.10	0.32	0.00	16.18	0.0001
Contaminación	0.50	10.00	10	1.00	0.00	1.00		
Contaminación	0.80	5.00	10	0.80	0.42	1.00		
Contaminación	0.80	10.00	10	0.90	0.32	1.00		
Contaminación	1.00	5.00	10	0.60	0.52	1.00		
Contaminación	1.00	10.00	10	0.90	0.32	1.00		

Trat.	Ranks
0.50:5.00	12.00 A
1.00:5.00	27.00 A B
0.80:5.00	33.00 B
0.80:10.00	36.00 B
1.00:10.00	36.00 B
0.50:10.00	39.00 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

De acuerdo a la Figura A.1.3 (Anexo resultados), no se cumple el supuesto de normalidad para los datos, para verificar el supuesto de normalidad de los mismos, se empleó la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) donde se obtuvo un valor de ($p < 0,0001$), el cual es menor a ($\alpha = 0,05$) por lo tanto, la variable contaminación no tiene una distribución normal, es decir, los datos no son paramétricos (Cuadro 2).

Cuadro 2

Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para la variable contaminación de los tratamientos de desinfección de segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunth.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO No contaminados	60	0.00	0.34	0.85	<0.0001

La regresión logística para la variable dicotómica contaminación, presentó un valor p de 0.0009, valor que es cercano a 0, por tanto, la variable independiente tiempo de inmersión, sí influye en la variable dependiente contaminación. Adicionalmente, la regresión logística mostró

que existe mayor probabilidad de obtener explantes asépticos al emplear un tiempo de inmersión de 10 minutos y a concentraciones de 0.8% y 1% de hipoclorito de sodio. (Cuadro 3)

Cuadro 3

Regresión logística para los datos categóricos de contaminación de los tratamientos de desinfección de segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunth.

Parámetros	Est.	E.E.	O.R.	Wald LI(95%)	Wald LS(95%)	Wald Chi ²	p-valor
Constante	-1.16	0.68	0.31	0.08	1.19	2.92	0.0876
Hipoclorito_0.80	2.10	0.93	8.15	1.32	50.31	5.11	0.0238
Hipoclorito_1.00	1.32	0.86	3.75	0.70	20.10	2.39	0.1224
Tiempo 10.00	2.98	0.90	19.66	3.38	114.41	10.99	0.0009

En el árbol de decisiones es una herramienta estadística que nos permite visualizar con mayor claridad los resultados obtenidos. La figura 30 muestra el árbol de decisiones para la variable contaminación donde se evidencia que al incrementar el tiempo de inmersión a 10 minutos manteniendo concentraciones bajas de hipoclorito de sodio se obtiene mayor cantidad de explantes no contaminados. De acuerdo a estos resultados se confirma el tratamiento 2 (0.5% de Hipoclorito de sodio vs 10 minutos de tiempo de inmersión) como mejor tratamiento de desinfección pues tiene el mayor porcentaje de explantes no contaminados.

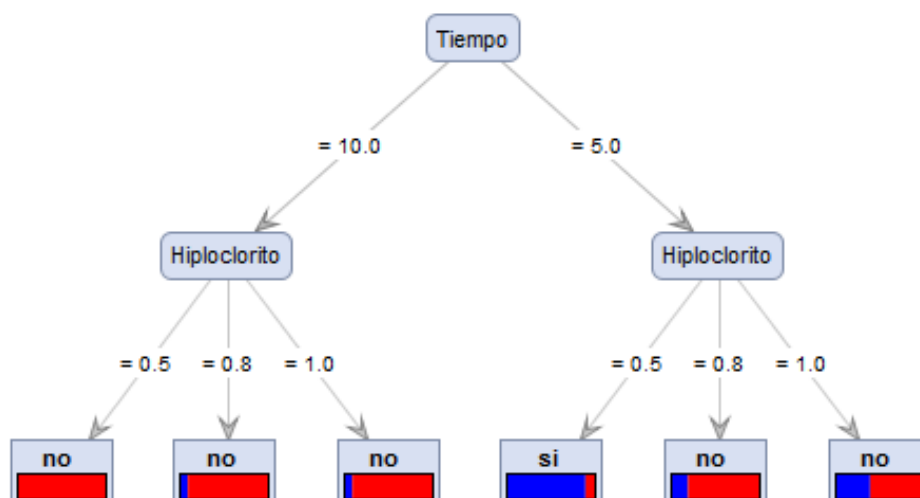


Figura 30. Árbol de decisiones para los tratamientos de desinfección empleados en segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunth respecto a la variable contaminación.

3.1.2. Necrosis

Es necesario analizar la variable necrosis con el objetivo de seleccionar el tratamiento que tenga menor influencia sobre los explantes, es decir, aquel que genere menor daño tisular durante el proceso de desinfección.

3.1.2.1. Análisis exploratorio de datos

En la tabla 11, se presenta el porcentaje de explantes no necrosados obtenidos mediante un análisis de contingencia de los tratamientos de desinfección. Se denota el mismo porcentaje de explantes no necrosados en los tratamientos 4 (1% v/v NaClO vs 5 minutos de inmersión) y 5 (1% v/v NaClO vs 5 minutos de inmersión), por ende, se evidencia cierta similitud entre estos dos tratamientos. El porcentaje de explantes necrosados se detalla en la Tabla A.2.1 de los Anexos.

Tabla 11

Análisis de contingencia para explantes no necrosados con respecto a los tratamientos de desinfección.

	Concentración hipoclorito de sodio			
		0.5 % v/v	0.8 % v/v	1 % v/v
Tiempo de inmersión (minutos)	5	90	50	70
	10	60	70	30

La Tabla 11 está representada gráficamente en la figura 31 que muestra el porcentaje de explantes no necrosados con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio, la concentración de 0.5% v/v genera el mayor porcentaje de explantes no necrosados. En la Figura 32, se presenta el porcentaje de explantes no necrosados con relación al tiempo de inmersión, se observa que una disminución en el tiempo de inmersión genera mayor porcentaje de explantes no necrosados, vemos que el tratamiento 1 presenta el mayor porcentaje de explantes no necrosados (90%), sin embargo, éste resultó ser el menos efectivo para la variable contaminación, ya que solo se obtuvo un (10%) de explantes no contaminados. El tratamiento menos efectivo para la variable necrosis es el tratamiento 6 con (30%) de porcentaje de explantes no necrosados.

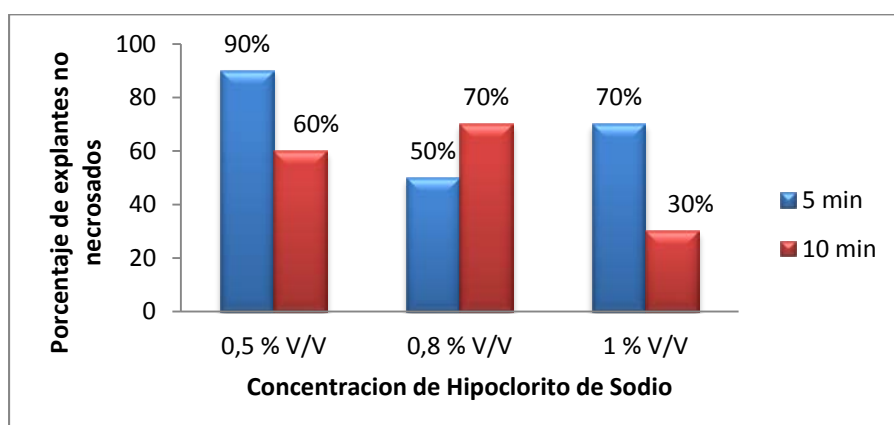


Figura 31. Porcentaje de explantes no necrosados respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio empleados en los tratamientos de desinfección.

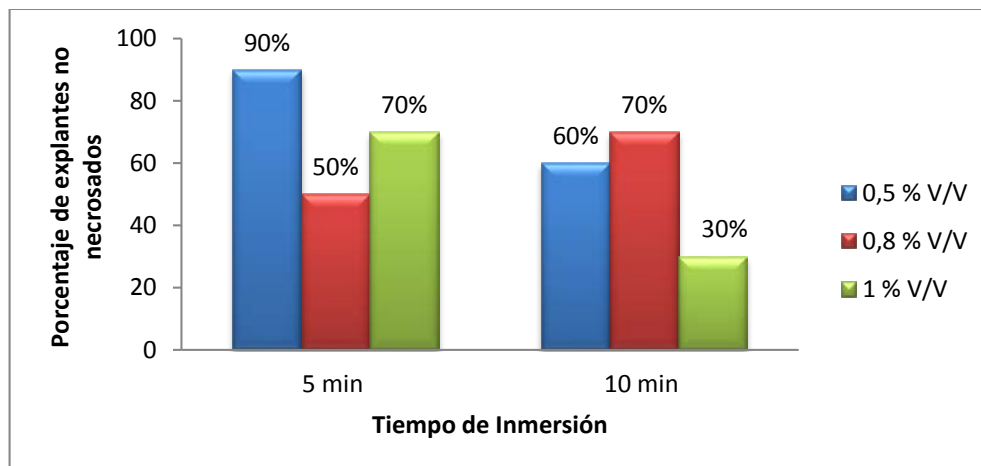


Figura 32. Porcentaje de explantes no necrosados respecto los tiempos de inmersión empleados en los tratamientos de desinfección.

3.1.2.2. Análisis inferencial

Se realizó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, se obtuvo un valor de ($p = 0,1231$) que es mayor al estadístico de prueba ($\alpha = 0,05$), lo cual determinó que no existe diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de desinfección de *Valeriana pyramidalis* Kunth, sin embargo, en base a la media obtenida (0.90), se determinó que el tratamiento 1 (0.5% v/v NaClO vs 5 minutos de inmersión), es el mejor tratamiento para la obtención de explantes no necrosados (Cuadro 4).

Cuadro 4

Prueba de Kruskal-Wallis de los tratamientos de desinfección de segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunth para la variable necrosis.

Variable	Tiempo	Hipoclorito	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Necrosis	5.00	0.50	10	0.90	0.32	1.00	6.15	0.1231
Necrosis	5.00	0.80	10	0.60	0.52	1.00		
Necrosis	5.00	1.00	10	0.50	0.53	0.50		
Necrosis	10.00	0.50	10	0.70	0.48	1.00		
Necrosis	10.00	0.80	10	0.70	0.48	1.00		
Necrosis	10.00	1.00	10	0.30	0.48	0.00		

De acuerdo a la Figura A 2.3, los datos están alejados de la línea de tendencia, por consiguiente, no se cumple el supuesto de normalidad necesario en un diseño experimental paramétrico, para verificar el supuesto de normalidad de los mismos, se empleó la prueba de Shapiro-Wilks (modificado), en el cual se obtuvo un valor de ($p < 0,0001$) que es menor al estadístico de prueba ($\alpha = 0,005$), afirmándose que la variable en estudio no tiene una distribución normal (Cuadro 5).

Cuadro 5

Prueba de Shapiro- Wilks (modificado) para la variable contaminación de los tratamientos de desinfección de *Valeriana pyramidalis* Kunth.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO No Necrosado	60	0.00	0.45	0.87	<0.0001

En el Cuadro 6, se presenta el análisis de regresión logística para la variable dicotómica necrosis, se obtuvo un valor p de 0.0126 que es cercano a 0, por tanto la variable independiente hipoclorito de sodio sí influye en la variable dependiente necrosis. Además, la regresión logística mostró que existe mayor posibilidad de obtener explantes no necrosados al utilizar un tiempo de inmersión de 10 minutos y concentraciones de 0.8% y 1% de hipoclorito de sodio.

Cuadro 6

Regresión logística para los datos categóricos para la variable necrosis de los tratamientos de desinfección empleados.

Parámetros	Est.	E.E.	O.R.	Wald	LI (95%)	Wald	LS (95%)	Wald	Chi²	p-valor
Constante	1.64	0.65	5.18	1.45		18.49		6.41	0.0114	
Hipoclorito_0.80	-0.78	0.73	0.46	0.11		1.94		1.12	0.2903	
Hipoclorito_1.00	-1.81	0.73	0.16	0.04		0.68		6.22	0.0126	
Tiempo 10.00	-0.48	0.57	0.62	0.20		1.89		0.71	0.3987	

En el árbol de decisiones es una herramienta estadística que nos permite visualizar con mayor claridad los resultados obtenidos. En la Figura 33, se presenta el árbol de decisiones para la variable necrosis, de manera general la necrosis es baja para todos los tratamientos, en especial en los que emplean tiempos de inmersión de 10 minutos y concentraciones bajas de hipoclorito de sodio (0.5% y 0.8%), por lo tanto para la obtención de mayor número de explantes no necrosados, es necesario aumentar el tiempo de inmersión manteniendo concentraciones bajas de hipoclorito de sodio.

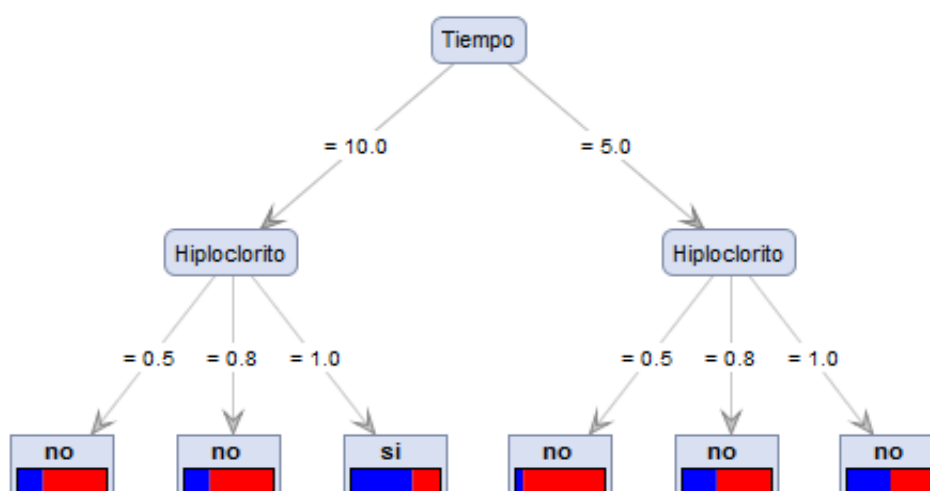


Figura 33. Árbol de decisiones para los tratamientos de desinfección empleados en segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunth respecto a la variable necrosis.

En base al análisis exploratorio e inferencial de las variables contaminación y necrosis, se determinó que el tratamiento (0.5% v/v NaClO vs 10 minutos de inmersión) es el mejor tratamiento para la obtención de explantes viables y libres de contaminación.

3.2. Etapa II: Inducción a Calogénesis

En esta etapa se evaluó el efecto de la hormona 2,4-D en la formación de callo a partir de segmentos foliares de *V. pyramidalis*, para lo cual, se examinaron 6 tratamientos, que incluyeron 5 concentraciones de 2,4-D y,

un tratamiento control sin la adición de la hormona (Tabla 7). Se analizó la formación de callo a los 30 días y el peso del callo formado a los 60 días. Los resultados para esta etapa se detallan a continuación.

3.2.1. Formación de callo por explante

3.2.1.1. Análisis exploratorio de datos

En la Tabla 12 se muestra el porcentaje de formación de callo por explante, evaluados a 30 días de incubación. Se puede apreciar el mismo porcentaje de presencia de callo en los tratamientos TC3 (1.5 mg/L 2,4-D), TC4 (2.0 mg/L 2,4-D) y TC5 (2.5 mg/L 2,4-D), por lo tanto se evidencia cierta similitud entre estos tres tratamientos.

Tabla 12

Porcentaje de presencia y ausencia de callo para los tratamientos de inducción a callogénesis a partir de segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunth.

Tratamiento	Concentración de 2,4-D mg/L	% Presencia de callo	% Ausencia de callo
TC0	0	0	100
TC1	0.5	40	60
TC2	1	70	30
TC3	1.5	90	10
TC4	2.0	90	10
TC5	2.5	90	10

La Tabla 12 está representada gráficamente en la Figura 34 que muestra el porcentaje de formación de callo con respecto a la concentración de 2,4-D. Se observa que a concentraciones mayores el porcentaje de presencia de callo aumenta, destacándose las concentraciones de 1.5 mg/L; 2.0 mg/L y 2.5 mg/L de 2,4-D con un porcentaje de callogénesis del 90%, mientras que en el tratamiento

control (0 mg/L) NO se observó formación de callo en ninguno de los explantes.

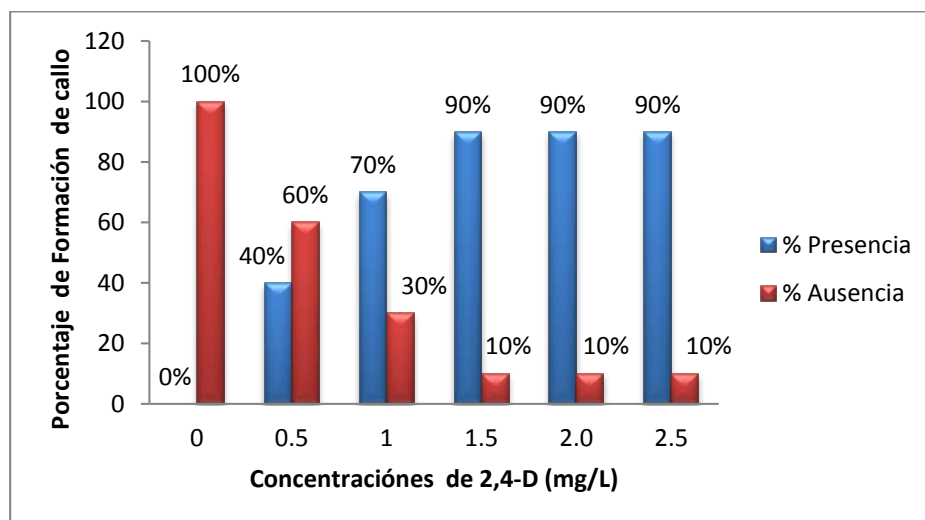


Figura 34. Porcentaje de formación de callo por explante con respecto a la concentración de 2,4-D.

3.2.1. 2. Análisis inferencial

Para analizar la relación de dependencia o independencia entre la concentración de la hormona 2,4-D y la formación de callo, se realizó un análisis de varianza de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos donde se obtuvo un valor ($p < 0,0001$) menor al estadístico de prueba ($\alpha=0.05$), por lo tanto, no existe diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de inducción a callogénesis, sin embargo, en base a la medias obtenidas (0.90) se determinó que los tratamientos 4, 5 y 6 (1.5 mg/L; 2.0 mg/L y 2.5 mg/L) son los mejores para la inducción a callogénesis a partir de segmentos foliares de *V. pyramidalis* (Cuadro 7).

Cuadro 7.**Prueba de Kruskal-Wallis para la variable formación de callo con respecto a las diferentes concentraciones de 2,4-D**

Variable	Concentracion de 2.4D	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Formacion de callo	0.00	10	0.00	0.00	0.00	19.87	<0.0001
Formacion de callo	0.50	10	0.40	0.52	0.00		
Formacion de callo	1.00	10	0.70	0.48	1.00		
Formacion de callo	1.50	10	0.90	0.32	1.00		
Formacion de callo	2.00	10	0.90	0.32	1.00		
Formacion de callo	2.50	10	0.90	0.32	1.00		

De acuerdo a la Figura B.1.2 (Anexo de resultados), los datos están alejados de la línea de tendencia, por lo tanto, no se cumple el supuesto de normalidad necesario en un diseño experimental paramétrico. Para verificar el supuesto de normalidad de los mismos, se empleó la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) donde se obtuvo un valor de ($p < 0,0001$) que es menor al estadístico de prueba ($\alpha = 0,05$) concluyéndose que la variable en estudio no tiene una distribución normal (Cuadro 8).

Cuadro 8.**Prueba de Shapiro- Wilks (modificado) para la variable formación de callo con respecto a las diferentes concentraciones de 2,4-D.**

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (Unilateral D)
RDUO Formacion de callo	60	0.00	0.35	0.82	<0.0001

El árbol de decisiones es una herramienta estadística que nos permite visualizar con mayor claridad los resultados obtenidos. En la figura 35, se presenta el árbol de desiciones para la variable formacion de callo empleando distintas concetraciones de 2,4-D, se observa que para los tratamientos que emplean concetraciones altas de 2,4-D (1.5 mg/L; 2.0 mg/L y 2.5 mg/L), se obtiene una mayor probabilidad de formacion de callo, consecuentemente, se puede emplear cualquiera de las tres concetraciones mencionadas para la obtencion de callo.

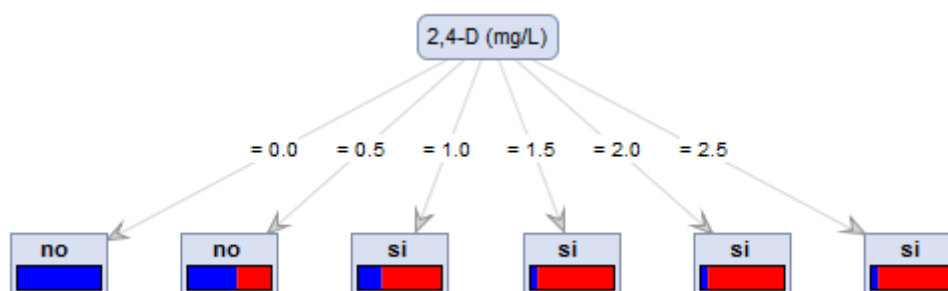


Figura 35. Árbol de decisiones para los tratamientos empleados en la formación de callo.

3.3.1 Peso fresco del callo

3.3.1.1. Análisis exploratorio de datos

Se evaluó el peso fresco de callo formado por explante a los 60 días de incubación. En la Tabla 13, se presenta el peso promedio en gramos para cada tratamiento, los resultados obtenidos fueron favorables. El tratamiento TC5 (2.5 mg/L 2,4-D) registró el mayor peso promedio 3.964 gr, seguido del tratamiento TC4 (2.0 mg/L 2,4-D y TC3 (1 mg/L 2,4-D) con 2.679 y 2.085 respectivamente, en el tratamiento control no hubo formación de callo (Figura 36).

Tabla 13.

Peso promedio del callo formado a los 60 días de incubación.

Tratamiento	Concentración de 2,4-D (mg/L)	Peso promedio del callo (g)
TC0	0	0
TC1	0.5	0.70
TC2	1	1.44
TC3	1.5	2.085
TC4	2.0	2.679
TC5	2.5	3.964

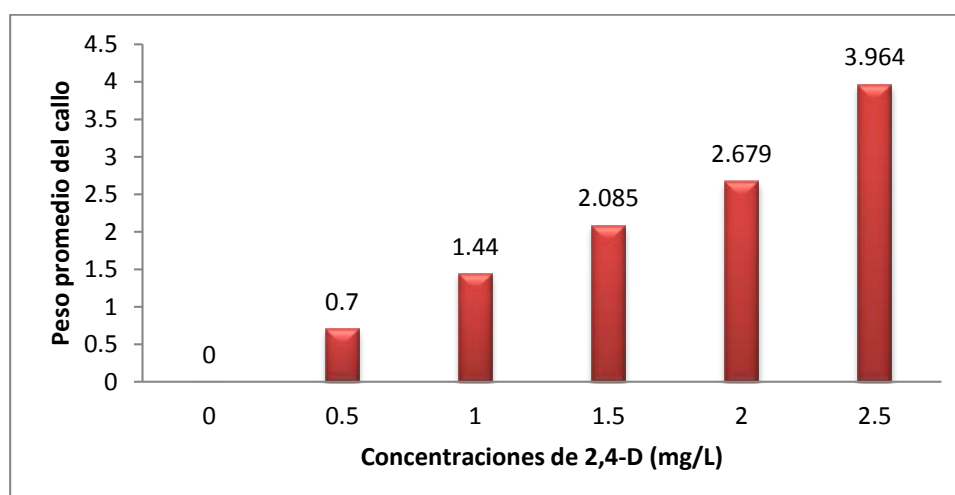


Figura 36. Peso promedio del callo formado con respecto a la concentración de 2,4-D evaluado a los 60 días de incubación.

3.3.1.2. Análisis inferencial

Para analizar la relación de dependencia o independencia entre la concentración de la hormona 2,4-D y el peso promedio del callo. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) en el que se obtuvo un valor de ($p < 0,0001$) menor al estadístico de prueba ($\alpha = 0,05$), por lo tanto, se afirma que el modelo si se ajusta a las concentraciones de 2,4-D para la variable peso promedio del callo durante la fase de inducción (Cuadro 9).

Se encontró un valor de ($p < 0,0001$) menor al estadístico de prueba ($\alpha = 0,05$), esto nos indica que si existe diferencia significativa entre los tratamientos de inducción a callogénesis (Cuadro 9).

Cuadro 9.

Análisis de varianza (ANOVA) para la variable peso promedio de callo, evaluada a 60 días de incubación.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	101.17	5	20.23	15.22	<0.0001
2,4-D (mg/L)	101.17	5	20.23	15.22	<0.0001
Error	71.81	54	1.33		
Total	172.98	59			

A continuación, se realizó la prueba de Duncan para conocer si existen diferencias entre medias de los tratamientos. Se denota cinco subconjuntos estadísticamente diferentes, de los cuales el mejor tratamiento fue el tratamiento 5 (2.5 mg/L 2,4-D) por presentar la mayor media (3.96) y ser el único que pertenece al subconjunto E (Cuadro 10).

Cuadro 10.

Prueba de Duncan para la comparación de medias en la variable peso fresco de callo con respecto a las diferentes concentraciones de 2,4-D.

2,4-D (mg/L)	Medias	n	E.E.	
0.0	0.00	10	0.36	A
0.5	0.70	10	0.36	A B
1.0	1.44	10	0.36	B C
1.5	2.09	10	0.36	C D
2.0	2.68	10	0.36	D
2.5	3.96	10	0.36	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

De acuerdo a la Figura B.2.1 (Anexo resultados), los datos están cercanos a la línea de tendencia, por lo tanto se cumple el supuesto de normalidad, necesario en un diseño experimental paramétrico. Para verificar el supuesto de normalidad de los mismos, se empleó la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) donde se obtuvo un valor de ($p < 0,3020$) que es mayor al estadístico de prueba ($\alpha=0.05$), por ende, la variable en estudio si tiene una distribución normal y los datos son paramétricos (Cuadro 11).

Cuadro 11

Prueba de Shapiro- Wilks (modificado) para la variable peso de callo promedio evaluada a los 60 días de incubación.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Peso fresco de a lo..	60	0.00	1.10	0.96	0.3020

En base al análisis exploratorio e inferencial de las variables formación de callo por explante y peso fresco del callo, se determinó que los tres mejores medios de respuesta para la inducción a callogénesis fueron TC3 (1.5 mg/L 2,4-D), TC4 (2.0 mg/L 2,4-D) y TC5 (2.5 mg/L 2,4-D).

3.4. Etapa III: Suspensiones celulares

Una vez determinados los tres mejores medios de respuesta para la inducción a callogénesis, se elaboraron estos mismos medios sin la adición de agar y se establecieron las suspensiones celulares, colocando 1 gramo de callo friable en 20 ml de medio líquido en agitación constante (110 rpm) durante un periodo de tres meses, tiempo necesario para que se establezca la suspensión, realizándose recambio de medio fresco cada 15 días, debido a que el tratamiento TC5, género el mayor porcentaje de inducción a callo y mayor peso promedio, se empleó el callo friable de este tratamiento para establecer las tres suspensiones celulares (Tabla 14). Se observaron células embriogénicas y no embriogénicas en las suspensiones (Figura C.1.2 de Anexos de resultados).

Tabla 14.

Tratamientos considerados para el establecimiento de suspensiones celulares de *Valeriana pyramidalis* Kunth.

Tratamiento	Concentración de 2,4-D (mg/L)
TS1	2.5
TS2	2.0
TS3	1.5

3.4.1. Cinética celular

3.4.1.1. Análisis exploratorio de datos

La determinación de la cinética celular es fundamental para el establecimiento de la suspensión celular, ya que permite determinar el momento en que se han agotado uno o más componentes del medio de cultivo, necesiándose la adicción de medio nuevo para evitar la muerte celular por agotamiento de nutrientes.

Se determinó la cinética celular de cada tratamiento, para lo cual, se realizó conteos cada tres días, dos veces por alícuota, para cada una de las alícuotas se tomó 10 μ L de suspensión y se colocó en la cámara de Neubauer y luego se contó las células bajo un microscopio óptico. Para el análisis de los datos obtenidos se empleó el paquete estadístico InfoStat.

La figura 37 muestra la curva de la cinética celular para el tratamiento TS1. Se observó que existe un retraso en su etapa inicial hasta el día 6. Desde el día 9 hasta el 15, se percibe un crecimiento considerable de células alcanzando su máximo de crecimiento entre los días 18 y 23. A partir del día 24 el crecimiento celular empieza de disminuir.

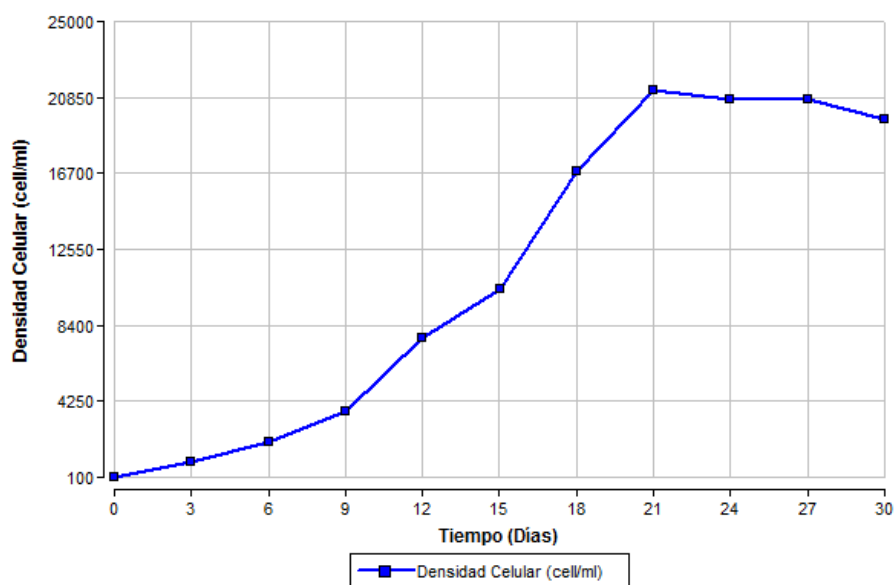


Figura 37. Curva de cinética celular para la suspensión TS1.

En el caso de la suspensión TS2, se evidenció un crecimiento celular bajo desde el día 0 hasta el día 6. A partir del día 9 el crecimiento celular aumenta alcanzando un máximo crecimiento entre los días 18 y 21. Desde el día 24 se observa un descenso en el número de células, manteniéndose así hasta el día 30(Figura 38).

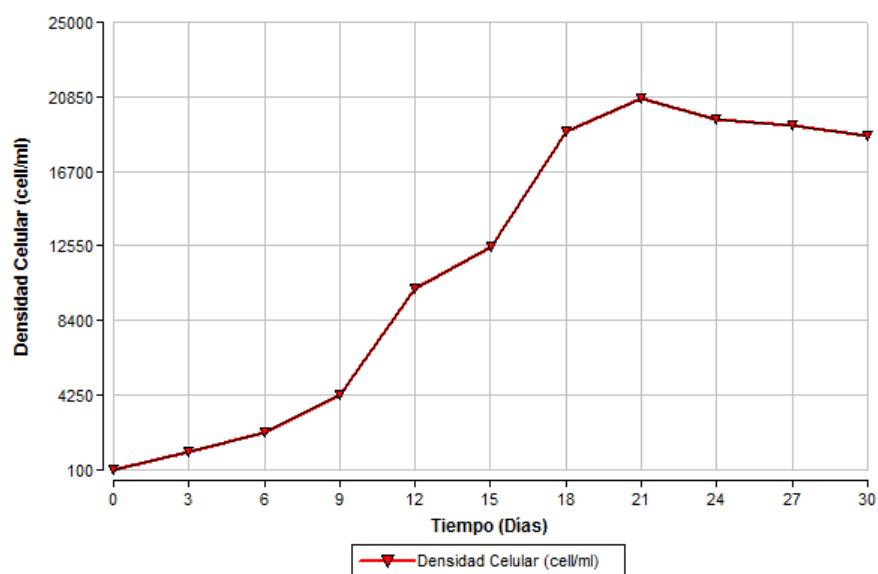


Figura 38. Curva de cinética celular para la suspensión TS2.

La suspensión celular TS3, mostro una cinética celular similar a la descrita en las otras dos suspensiones, es así que se denota un crecimiento lento hasta el día 6. Desde el día nueve 9 hasta el 18 se observa un incremento considerable de la densidad celular. El máximo crecimiento se da entre el día 19 hasta 24 y a partir del día 27 se evidencia una desaleración progresiva del crecimiento (Figura 39).

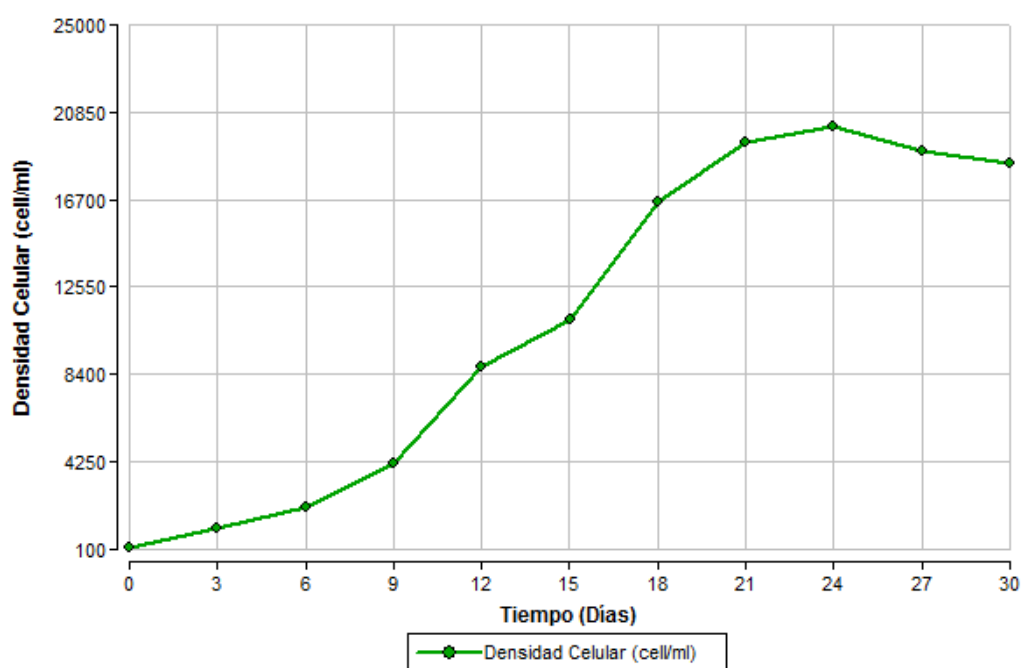


Figura 39. Curva de cinética celular para la suspensión TS3.

La comparación de la cinética celular entre los tratamientos de suspensiones celulares se muestra en la Figura 40. Se evidencia un crecimiento celular similar en los tratamientos hasta el día 9. A partir del día 12 el crecimiento celular varía para cada suspensión. Entre los días 18 y 21 se observan valores de densidad celular mayores en TS2 y TS1 mientras que para la suspensión TS3 los valores de densidad celular en esos días son menores.

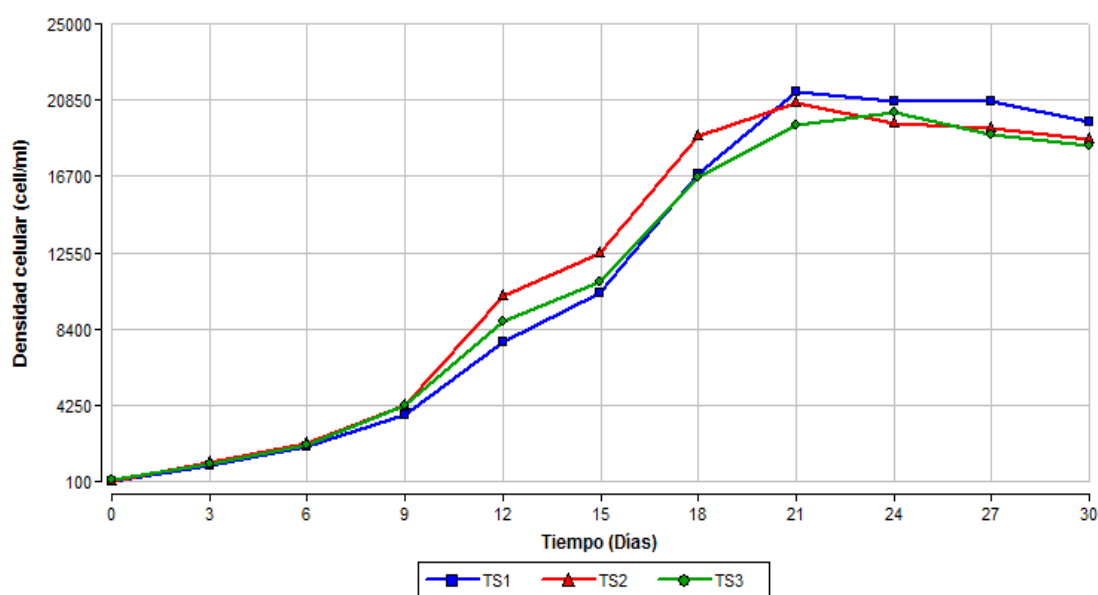


Figura 40. Comparación de curvas de cinética celular para los tratamientos TS1, TS2 y TS3 empleados en el establecimiento de suspensiones celulares de *Valeriana pyramidalis* Kunth.

3.4.1.2. Análisis inferencial

Para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó un análisis inferencial de los valores de densidad celular promedio obtenido para cada suspensión. Tras realizar una análisis de varianza ANOVA, se obtuvo un valor de ($p=0,985$), mayor que el estadístico de prueba ($\alpha=0,05$), por lo tanto, se asevera que no existe diferencia significativa entre los tratamientos TS1, TS2 y TS3 (Cuadro 12).

Cuadro 12

Análisis de varianza (ANOVA) para los tratamientos TS1, TS2 y TS3 considerados en el establecimiento de suspensiones celulares de *Valeriana pyramidalis* Kunth.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4013745.45	2	2006872.73	0.01	0.9857
Concentración de 2,4-D	4013745.45	2	2006872.73	0.01	0.9857
Error	4180600945.45	30	139353364.85		
Total	4184614690.91	32			

De acuerdo a la Figura C.1.1 (Anexo resultados), los datos están cercanos a la línea de tendencia, por lo tanto no se cumple el supuesto de normalidad, necesario en un diseño experimental paramétrico. Para verificar el supuesto de normalidad de los mismos, se empleó la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) donde se obtuvo un valor de ($p < 0,0001$) que es menor a 0.05, determinándose que la variable densidad celular no tiene una distribución normal.

Cuadro 13

Prueba de Shapiro- Wilks (modificado) para la comparación de medias entre los tratamientos TS1, TS2 y TS3 empleados en el establecimiento de suspensiones celulares de *Valeriana pyramidalis* Kunth.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Promedio de densidad celul..	33	11290.30	8135.75	0.80	<0.0001

Experimento N° 2. Evaluación del efecto de la hormona GA₃ en germinación

3.5. Etapa I: Desinfección y establecimiento de semillas

En la etapa de desinfección y establecimiento de semillas se evaluó la variable contaminación, probándose 3 tiempos de inmersión (1, 3, 5 minutos) y una concentración de hipoclorito de sodio (1% v/v) (Tabla ,8), los resultados se detallan a continuación.

3.5.1. Contaminación

3.5.1.1. Análisis exploratorio de datos

En la Figura 41, se muestra el porcentaje de semillas no contaminadas con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio evaluado a los 30 días de incubación, el tiempo de 5 minutos generó el mayor porcentaje de explantes no contaminados (80%).

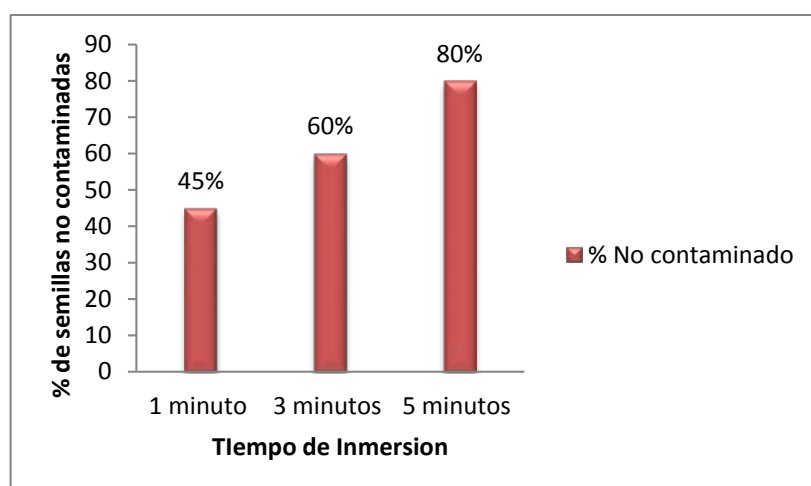


Figura 41. Porcentaje de explantes no contaminados respecto los tiempos de inmersión empleados en los tratamientos de desinfección de semillas de *Valeriana pyramidalis* Kunth.

3.5.1.2. Análisis inferencial

Se realizó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, donde se obtuvo un valor de ($p=0,0769$) mayor a ($\alpha=0,005$), determinándose que no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos desinfección de semillas, sin embargo, se destaca el tratamiento 3 por poseer la mayor media (0.80), siendo éste el mejor tratamiento de desinfección para semillas de *V. pyramidalis* (Cuadro 14).

Cuadro 14**Prueba de Kruskal-Wallis para la variable germinación con relación a las diferentes concentraciones de GA₃**

Variable	Tiempo	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
No contaminados	1.00	20	0.45	0.51	0.00	3.64	0.0769
No contaminados	3.00	20	0.60	0.50	1.00		
No contaminados	5.00	20	0.80	0.41	1.00		

De acuerdo a la Figura D.1.3 (Anexo resultados), los datos están alejados de la línea de tendencia, por consiguiente no se cumple el supuesto de normalidad necesario en un diseño experimental paramétrico, para verificar el supuesto de normalidad de los mismos, se empleó la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) que se muestra en el Cuadro 15, donde se obtuvo un valor de ($p < 0,0001$) menor a ($0,005$), afirmándose que la variable en estudio no tiene una distribución normal.

Cuadro 15**Prueba de Shapiro- Wilks (modificado) para la variable contaminación de los tratamientos de desinfección de semillas de *Valeriana Pyramidalis* Kunth.**

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
No contaminados	60	0.62	0.49	0.59	<0.0001

En la Figura 42 se presenta el árbol de decisiones para la variable contaminación, empleando tres tiempos de inmersión, vemos que a mayor tiempo de inmersión existe mayor probabilidad de obtener semillas asépticas, el mejor tiempo de inmersión fue el de 5 minutos.

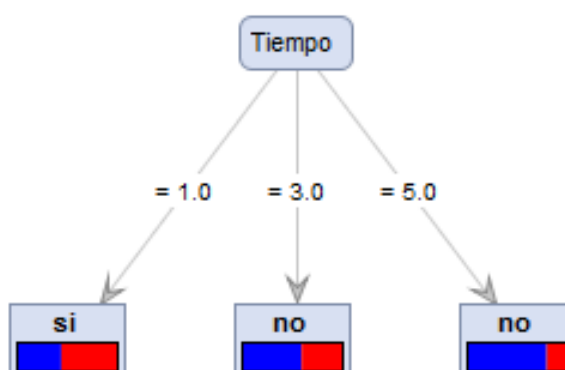


Figura 42. Árbol de decisiones para los tratamientos de desinfección empleados en semillas de *Valeriana pyramidalis* Kunth respecto a la variable contaminación.

En el cuadro 16, se presenta el análisis de regresión logística para la variable dicotómica contaminación, se determinó un valor p de 0.0269 que es más cercano a 0, por tanto, la variable independiente tiempo, si influye en la variable dependiente contaminación. La regresión logística nos permite predecir que a tiempos de inmersión de 3 y 5 minutos habrá una mayor posibilidad de obtener semillas asépticas.

Cuadro 16

Regresión logística para los datos categóricos de contaminación de los tratamientos de desinfección de semillas de *Valeriana pyramidalis* Kunth.

Parámetros	Est.	E.E.	O.R.	Wald	LI (95%)	Wald	LS (95%)	Wald	Chi ²	p-valor
Constante	-0.20	0.45	0.82		0.34		1.97	0.20	0.6553	
Tiempo_3.00	0.61	0.64	1.83		0.52		6.43	0.90	0.3440	
Tiempo_5.00	1.59	0.72	4.89		1.20		19.94	4.89	0.0269	

3.6. Etapa II: Evaluación del efecto de la hormona GA₃ en germinación *in vitro*

3.6.1. Efecto de la hormona GA₃ en germinación *in vitro*

3.6.1.1. Análisis exploratorio de datos

Se realizó los tratamientos descritos en la Tabla 8, en los cuales se evaluó el efecto de la hormona GA₃ en germinación *in vitro*, se cuantificó el porcentaje de semillas germinadas a 60 días de incubación, la velocidad de germinación (VG) y el tiempo medio en alcanzar la germinación máxima (TM). En la Figura 43 se presenta el porcentaje de germinación con respecto a las diferentes concentraciones de GA₃ empleadas, vemos que el tratamiento 4 (3 mg/L GA₃) presenta el mejor porcentaje de germinación (80%), mientras que para el tratamiento control se tiene un porcentaje de germinación de (15%).

En el tratamiento 4, se observó la aparición de la primera semilla germinada a los 15 días de incubación (Figura 44), mientras que para el tratamiento 3 y 2 la primera semilla germinada se dio a los 30 y 40 días respectivamente. En cuanto al tratamiento control la aparición de la primera semilla germinada fue a los 45 días de incubación, se siguieron evaluando los tratamientos hasta 60 días de germinación.

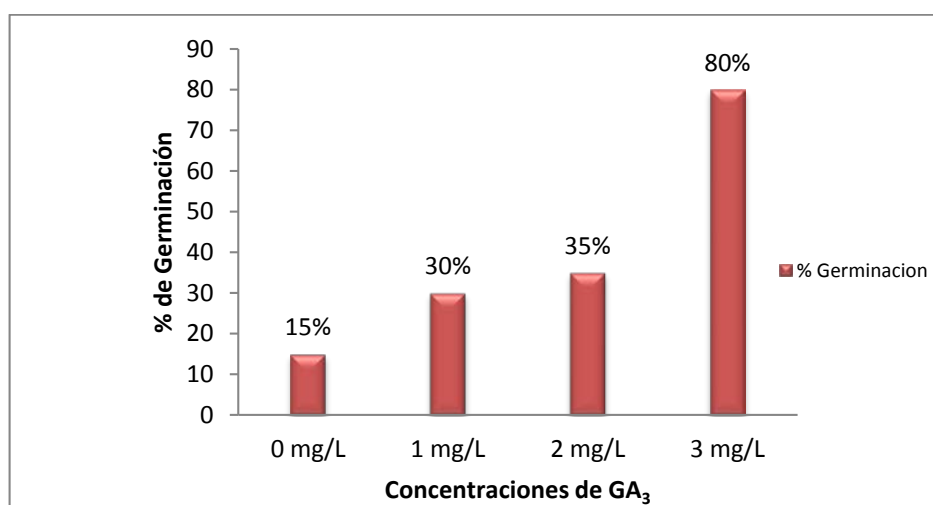


Figura 43. Porcentaje germinación de semillas de *Valeriana pyramidalis* Kunth, con respecto a la concentración de GA₃.

En la Tabla 15 se muestra los valores de la velocidad de germinación (VG) obtenidos para cada tratamiento, el tratamiento 4 presenta el valor más alto de (VG), por ende se determinó que la concentración de 3 mg/L de GA₃ genera mayores tasas de germinación. El tiempo medio en alcanzar la germinación máxima (TM) fue de 60 días en todos los tratamientos.

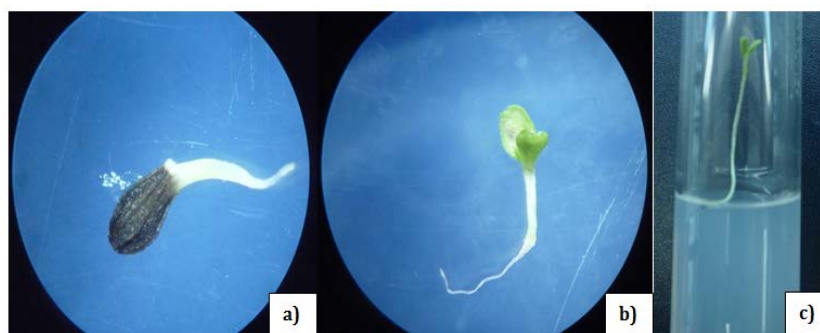


Figura 44. Germinación *in vitro* de semillas de *Valeriana pyramidalis* Kunth, a) aparecimiento de la radícula, b) plántula a los 30 días de incubación y c) plántula a los 60 días de incubación.

Tabla 15

Velocidad de germinación (VG) y tiempo medio en alcanzar la germinación máxima (TM), para cada tratamiento de germinación.

Tratamiento	Concentración de GA ₃	% VG	TM
1	0 mg/L	5	0
2	1 mg/L	11.66	60
3	2 mg/L	10	60
4	3 mg/L	26.66	60

3.6.1.2. Análisis inferencial

Se realizó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, que se muestra en el Cuadro 17, se obtuvo un valor de ($p=0,0003$) menor a ($p=0,005$), determinándose que existe diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de germinación *in vitro* de semillas, también se observa la presencia de dos subconjuntos, la mejor concentración de GA₃ para germinación *in vitro* fue la de (3 mg/L GA₃).

Cuadro 17

Prueba de Kruskal-Wallis para la variable germinación con relación a las diferentes concentraciones de GA₃

Variable	Concentracion de GA3	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Germinación 0	0	20	0.15	0.37	0.00	13.44	0.0003
Germinación 1	1	20	0.35	0.49	0.00		
Germinación 2	2	20	0.35	0.49	0.00		
Germinación 3	3	20	0.80	0.41	1.00		

Trat.	Ranks
0	30.00 A
2	38.00 A
1	38.00 A
3	56.00 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

De acuerdo a la Figura E1.1 (Anexo resultados), los datos están alejados de la línea de tendencia por consiguiente, no se cumple el

supuesto de normalidad necesario en un diseño experimental paramétrico, para verificar el supuesto de normalidad de los mismos, se empleó la prueba de Shapiro-Wilks (modificado), donde se obtuvo un valor de ($p < 0,0001$) menor a ($\alpha = 0,005$), afirmándose que la variable germinación no tiene una distribución normal (Cuadro 18).

Cuadro 18

Prueba de Shapiro- Wilks (modificado) para la variable contaminación de los tratamientos de germinación de *Valeriana Pyramidalis* Kunth.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Germinación	80	0.41	0.50	0.60	<0.0001

En el cuadro 19, se presenta el análisis de regresión logística para la variable dicotómica germinación, se determinó un valor p de 0.0002 que es cercano a 0 y por tanto la variable independiente concentración de GA₃ si influye en la variable dependiente germinación. La regresión logística mostró que existe mayor posibilidad de germinación a concentraciones de 3 mg/L GA₃, que a concentraciones de 2 mg/L GA₃ y 1 mg/L GA₃.

Cuadro 19

Regresión logística para los datos categóricos para la variable dicotómica germinación *in vitro* de semillas.

Parámetros	Est.	E.E.	O.R.	Wald LI (95%)	Wald LS (95%)	Wald Chi ²	p-valor
Constante	-1.73	0.63	0.18	0.05	0.60	7.67	0.0056
Concentracion de GA3_1	1.12	0.78	3.05	0.66	14.14	2.03	0.1538
Concentracion de GA3_2	1.12	0.78	3.05	0.66	14.14	2.03	0.1538
Concentracion de GA3_3	3.12	0.84	22.67	4.37	117.47	13.82	0.0002

En la figura 45 se resume todos los resultados obtenidos para cada de los experimentos realizados en esta investigación.

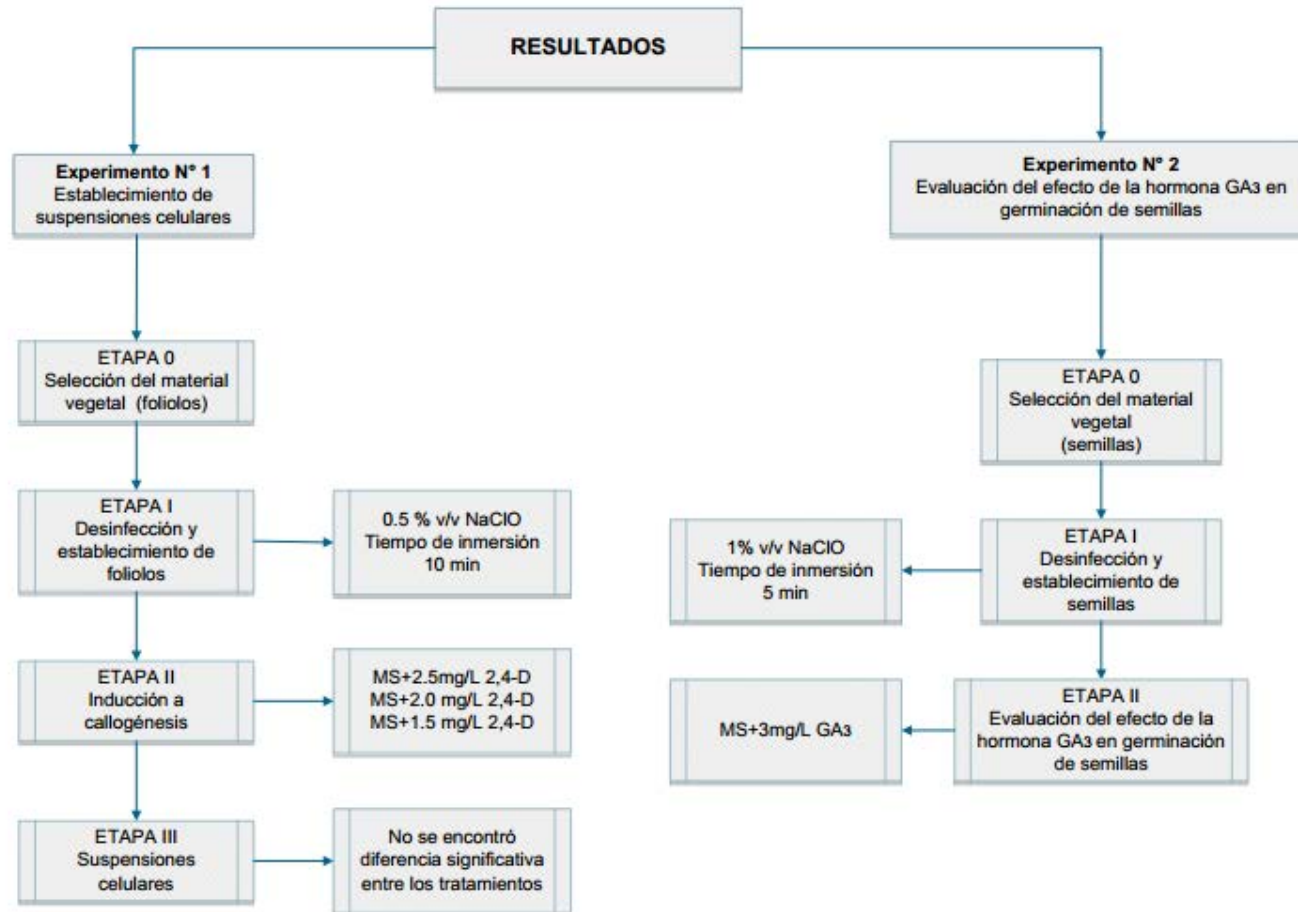


Figura 45. Esquema resumen de resultados.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

El presente estudio permitió establecer suspensiones celulares a partir de segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunt siguiendo una metodología secuencial que involucra la estandarización de un método de desinfección, la selección de un medio adecuado para generación de callo friable, la iniciación de la suspensión celular y la determinación de la curva de crecimiento para cada uno de los tratamientos. A la vez se estandarizó un protocolo de desinfección para semillas y se determinó la concentración óptima de GA₃ para su germinación *in vitro*.

Experimento N° 1: Establecimiento de suspensiones celulares

4.1. Etapa I: Desinfección y establecimiento de folíolos

El éxito de la etapa de desinfección y establecimiento, depende en gran medida de la selección de la planta madre, se debe optar por plantas sanas y vigorosas que no presenten daños causados por patógenos (Freire, 2013). Las plantas de *Valeriana pyramidalis* Kunth seleccionadas, se mantuvieron bajo condiciones controladas en invernadero. Según Trujillo, (2004), esto permite reducir los problemas de contaminación por microorganismos que se encuentran en los tejidos superficiales de la planta. Se aplicó un tratamiento fitosanitario durante 30 días, empleado carbendazamin (3 mL/L) un fungicida sistémico de amplio espectro que afecta al proceso de la mitosis del hongo deteniendo su crecimiento celular (BARPEN, 2014) y 3 g/L de Captan un fungicida de contacto que

inhibe la biosíntesis de su membrana celular (ergosterol) (PROFICOL, 2014).

En los ensayos preliminares donde se emplearon explantes sin tratamiento fitosanitario se evidenció un porcentaje de contaminación de hasta 90% y 100%, con la aplicación del tratamiento fitosanitario los porcentajes de contaminación disminuyeron al 10% y 0% (Tabla A.1.1). (Anexos de resultados).

El establecimiento de un cultivo aséptico es uno de los pasos fundamentales para el desarrollo de cualquier procedimiento en cultivo *in vitro* (Roca & Mroginski, 1993). Las plantas se encuentran contaminadas con un amplio rango de microorganismos, que al estar en contacto con el medio de cultivo pueden proliferarse rápidamente, estos contaminantes (hongos y bacterias) pueden modificar el medio o compiten con el explante por nutrientes (Pacheco, 2005).

El procedimiento de la desinfección superficial de los explantes debe garantizar la eliminación de los microorganismos causando el menor daño posible de la estructura vegetal (Pacheco, 2005). Se puede emplear algunos agentes esterilizantes como hipoclorito de sodio, alcohol, peróxido de hidrogeno, cloruro de planta, iodo y antibióticos. Los agentes de uso más generalizado son el hipoclorito de sodio y el alcohol etílico.

En la desinfección de foliolos de *Valeriana pyramidalis* Kunth se empleó el agente desinfectante hipoclorito de sodio, los resultados obtenidos, confirman lo aseverado por (Bhojwani & Razdan, 1996) quienes mencionan que el hipoclorito de sodio es uno de los agentes desinfectantes más efectivos en la eliminación de microorganismos. Según CESVBC, (2014), cuando el hipoclorito de sodio se adiciona al agua, se genera ácido hipocloroso neutral que penetra con facilidad la

pared celular de los microorganismos matando de manera efectiva a los patógenos.

El análisis estadístico realizado a la variable contaminación, reveló que el tratamiento 2 (0.5 % de Hipoclorito de sodio vs 10 minutos de tiempo de inmersión), fue el mejor tratamiento de desinfección, donde se obtuvo un 80% de explantes no contaminados (Figura A1.2). Al parecer a mayor tiempo de inmersión (10 minutos) de los explantes en hipoclorito de sodio, se obtiene un alto porcentaje de explantes no contaminados.

Dolberg, (2006), asevera que la alta mortalidad de los explantes se evidencia cuando se emplea concentraciones elevadas de hipoclorito de sodio. A pesar que la concentración de hipoclorito de sodio (0.5%) es baja, con relación a las demás concentraciones, el tiempo de inmersión de 10 minutos, garantiza la obtención de explantes asépticos evitando la necrosis del explante. Es importante recalcar que el tiempo de inmersión influye en el nivel de contaminación, más no la concentración de hipoclorito de sodio. Roca & Mroginski, (1991), recomiendan la agregación de agentes tensoactivos como Tween 20 a la solución desinfectante, debido a que potencian la acción del agente esterilizante, reducen la tensión superficial, mejorando el contacto superficial entre explante y solución, además al aumentar el tiempo de inmersión la acción del desinfectante mejora, esto podría explicar la alta efectividad mostrada en los tratamientos de desinfección.

La necrosis se define como la muerte paulatina del explante debido a daños físicos, agentes esterilizantes o cortes sucesivos del mismo, se caracteriza por presentar cambios de tonalidad, es decir, oscurecimiento del tejido vegetal (Taiz & Lincoln, 2006). De acuerdo al análisis inferencial realizado, no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos, sin embargo en base a las medias obtenidas, el tratamiento 1 (Cuadro 7), es el mejor tratamiento, generando mayor porcentaje de explantes no

necrosados, en este tratamiento se emplea una concentración de (0.5% v/v) de hipoclorito de sodio para un tiempo de inmersión de 5 minutos, evidenciándose que a menor concentración y tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio, la necrosis del explante disminuye, sin embargo con la aplicación de este tratamiento no se garantiza la obtención de explantes asépticos, ya que para la variable contaminación dicho tratamiento, generó el menor porcentaje de explantes no contaminados (Figura 29).

Tras la determinación de la mejor combinación de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión, se optó por la utilización del tratamiento 2 (0.5 % de Hipoclorito de sodio vs 10 minutos de tiempo de inmersión), obteniéndose la media más alta 0,90 (Cuadro 1) en cuanto a la ausencia de contaminación se refiere y una media de 0,70 (Cuadro 4) en cuanto a la ausencia de necrosis, para el proceso de desinfección de foliolos de *Valeriana pyramidalis* Kunth.

4.2. Etapa II: Inducción a Callogénesis

La formación de callo a nivel *in vitro* se genera como un mecanismo de cicatrización en la zona de corte del explante en respuesta a hormonas ya sean endógenas o incluidas en el medio de cultivo. Inicialmente, el tejido foliar diferenciado, empieza a des diferenciarse formando masas de celulares desorganizadas (Petersen & Wilhelm, 2008).

A los 30 y 60 días de incubación se observa la presencia de callos traslúcidos (Figura B1.1) (Anexos de resultados), de textura friable y coloración blanquecina-verdosa, la mayor formación de callo se da a los 60 días, esto se debe principalmente a que a partir de ese tiempo gran parte de 2,4-D añadido al medio es metabolizado por el explante (Bronsema, Redig, Van Oosteven, & Van Onckelen, 1996).

Según la UNAD, (2014), otros factores que determinan la formación de callo son el genotipo del explante, luz, temperatura, formulación del medio de cultivo y posición del explante. En concordancia, con Lorente, (2012) la generación de callo se dio únicamente en el envés de la hoja de manera específica en la nervadura central y los bordes del explante, es decir la zona de contacto con el explante.

Estudios realizados por Zebarjadi, *et al*,(2011) en *Valeriana officinalis* Maurmann *et al*, (2006) en *Valeriana glechomifolia* y Mathur & Ahuja (1991) para *Valeriana wallichii*, señalan que la adición de la auxina 2,4-D al medio, permite la exitosa formación de callo en el explante. En la presente investigación se observó la formación de callo en todos los tratamientos que incluían la auxina 2,4-D, mientras que en el tratamiento control, no hubo formación de callo, estos resultados confirman el efecto directo de la hormona 2,4-D, en la diferenciación de tejidos y formación de callo.

De acuerdo al análisis estadístico realizado, los tratamientos 4, 5 y 6 son los mejores tratamientos para la inducción a callogénesis, evidenciándose que al incrementar la concentración de la auxina 2,4-D, se genera mayor porcentaje de explantes con presencia de callo. Adicionalmente en estos tratamientos se observó la formación de raíces que se originaron del callo (Figura B.1.1) (Anexo de resultados), esto podría explicarse por las altas concentraciones de 2,4-D empleadas, ya que Según Roca & Mroginski (1993), una alta concentración de auxinas potenciará la formación de raíces en los explantes, sin embargo, en las investigaciones realizadas por Zebarjadi, *et al*,(2011), Maurmann *et al*, (2006) y Mathur & Ahuja (1991) también se observó la formación de raíces, lo cual sugiere que este evento es característico del género *Valerianaceae*.

En cuanto a la variable peso promedio de callo formado, se determinó que el mejor tratamiento es TC5 (2.5 mg/L 2,4-D) por registrar los mayores pesos promedio de callo, seguido del tratamiento TC4 (2.0 mg/L 2,4-D) y TC3 (1.5 mg/L 2,4-D). Es importante mencionar que todos los tratamientos fueron incubados en condiciones de oscuridad completa, esto podría explicar el incremento en el peso, ya que según Jimenez (1998), en condiciones de oscuridad no ocurre el efecto degradativo que provoca la luz sobre el 2,4-D permitiendo que se potencie su efecto.

De acuerdo a Sathyanarayana & Varghese (2007), las vitaminas son compuestos orgánicos fundamentales para el desarrollo *in vitro* de la planta al ser catalizadores en rutas metabólicas, por lo que deben ser adicionadas al medio de cultivo, en especial para el mantenimiento del callo, las vitaminas que generalmente se adicionan al medio son tiamina (Vit. B₁), ácido nicotínico (Vit. B₃), glicina, piridoxina (Vit B₆) y mioinositol, éste suele ser un factor determinante de crecimiento de callo ya que fomenta la división celular, es por esto que se empleó medio MS basal, es decir, MS con todas sus sales minerales y vitaminas.

4.3. Etapa III: Suspensiones celulares

El éxito en el establecimiento de una suspensión celular depende del control y optimización de factores como medio de cultivo, cantidad de inóculo inicial y velocidad de agitación. Esquivel & Escalant (1994), recomiendan que a escala de laboratorio, se inicie el establecimiento de la suspensión con cantidades pequeñas de callo, por ende para el establecimiento de las suspensiones de *Valeriana pyramidalis* Kunth se empleó 1 gramo de callo friable, el cual fue colocado en 20 mL de medio, Pérez (2010), menciona que se puede emplear de 1 a 20 gramos de callo, sin embargo, el tiempo de establecimiento de la suspensión será mayor.

Antes de comenzar con los conteos celulares, las suspensiones fueron tamizadas, obteniéndose una suspensión homogénea, Mustafa, Winter, Van Iren, & Verpoorte (2011), enuncian que una suspensión celular homogénea se prefiere como modelo de estudio, ya que provee una alta reproducibilidad en los experimentos.

Durante el desarrollo celular de *Valeriana pyramidalis* Kunth se identificó las 5 fases que se muestran en la figura 11. La fase de retraso (fase 1) se evidenció a los 6 días de cultivo, Roca & Mroginski (1993), menciona que durante el transcurso de esta fase las células se adaptan a su nuevo entorno y por tanto no se da la división celular.

La fase exponencial (fase 2) se extiende del día 6 hasta el día 20, esta etapa se caracteriza por un crecimiento celular acelerado y aumento del volumen celular. A partir del día 24 se denota la fase de desaceleración (fase 3) que según Villalobos & Garcia (2012), está asociada al agotamiento de los nutrientes en la suspensión así como al agrupamiento de las células. Entre el día 21 y 24 se denota la fase crecimiento lineal. A partir del día 24 el crecimiento celular empieza a disminuir, esta fase se describe como la fase (4) de desaceleración progresiva, y a partir del día 27 la densidad celular se mantiene siendo esta la fase (5) denominada fase estacionaria.

El análisis estadístico de la cinética celular de los tratamientos empleados en el establecimiento de suspensiones, reveló que no existen diferencias significativas entre los tres tratamientos TS1 (2.5 mg/L), TS2 (2.0 mg/L) y TS3 (1.5 mg/L) (Cuadro 12). Según Trejo & Rodriguez (2007), las células que conforman una suspensión homogénea presentan un comportamiento similar entre sí, esto podría explicar la similitud entre los tratamientos.

En cuanto a la obtención de metabolitos secundarios Trejo & Rodriguez (2007), enuncian que es preferible emplear una suspensión celular en donde se mantengan los agregados celulares, debido a que en una suspensión celular “fina” las células son similares y por tanto resulta difícil que en cada una de ellas se lleven a cabo todos procesos necesarios para la biosíntesis de metabolitos secundarios. Los resultados de Hulst *et al.* (1989), Schlatmann *et al.* (1995), Montiel *et al.* (2007), muestran que la obtención de agregados celulares es una estrategia que favorece la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios en los cultivos *in vitro*, por lo que se esperaría una concentración menor de metabolitos en nuestras suspensiones celulares de *Valeriana pyramidalis* Kunth ya que estas son suspensiones “finas” de células, es decir sin agregados celulares.

Experimento N° 2. Evaluación del efecto de la hormona GA₃ en germinación

4.4. Etapa I: Desinfección y establecimiento de semillas

La contaminación tanto bacteriana como fúngica es uno de los factores determinantes que limitan la supervivencia de las semillas de *Valeriana pyramidalis* Kunth, el proceso de desinfección empleado incluyó dos agentes esterilizantes de amplio espectro como son; el hipoclorito de sodio y el etanol. Según Mateos (2004), el etanol actúa como agente deshidrante, disolviendo las capas lipídicas bacterianas, por lo que resulta letal para las bacterias, pero poco eficiente para hongos y virus, incluir etanol al proceso de desinfección, permitió obtener mayor número de semillas asépticas.

El análisis estadístico reveló que el tratamiento 3 (hipoclorito al 1% vs 5 minutos de inmersión) es el mejor tratamiento de desinfección, pues permitió obtener el mayor porcentaje (80%) de semillas sin contaminación,

esto se contrasta con los resultados obtenidos por Tousi, Radjabian, Ebrahimzadeh, & Niknam, (2010) para *Valeriana officinalis* confirmándose que la concentración de 1% de hipoclorito de sodio es óptima para la desinfección de semillas de valeriana.

En cuanto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio, Tousi, Radjabian, Ebrahimzadeh, & Niknam (2010), sugieren 1 minuto, sin embargo al aplicar este tiempo de inmersión en semillas de *Valeriana pyramidalis* Kunt se obtuvo porcentajes bajos de desinfección, el aumento del tiempo a 3 minutos logró mejorar el proceso.

4.5. Etapa II: Efecto de la hormona GA₃ en germinación *in vitro*

La germinación de la semilla es un proceso complejo que involucra un gran número de variables, la aplicación de cultivo *in vitro* a este proceso permite reducir el efecto de estas variables al proveer un ambiente controlado y libre de contaminación (Prakash & Pierik, 1993).

Los porcentajes de germinación de semillas de *Valeriana pyramidalis* Kunth, fueron favorables, siendo el tratamiento 4 con una concentración de 3 mg/L GA₃ el que generó mayor porcentaje de semillas germinadas (80%). Según Copeland & Donald (2001), factores ambientales como agua, aire, temperatura y en algunos casos la luz, intervienen en la germinación de semillas. En los ensayos los factores ambientales luz y temperatura fueron controlados, debido a que se incubó las semillas a una temperatura entre 18 ± 2 °C y en condiciones de oscuridad, lo cual influyó positivamente en el porcentaje de germinación.

Copeland & Donald (2001), definen a la temperatura óptima de germinación como el rango de temperatura que puede generar mayor

porcentaje de germinación en períodos cortos de tiempo, en base a esta definición podemos concluir que la temperatura óptima de germinación *in vitro* para *Valeriana Pyramidalis* Kunth está entre 16 y 20 grados °C, estos resultados concuerdan con lo aseverado por Grime, *et al.*, 1891, quienes enuncian que la temperatura óptima de germinación de *Valeriana Officinalis* está entre 15 y 20 °C. Este estudio también asegura que la exposición de las semillas de *V. Officinalis* a luz incrementó el porcentaje de germinación, en el caso de *Valeriana pyramidalis* Kunth se alcanzó el porcentaje de germinación más alto en condiciones de oscuridad.

La adición de ácido giberélico al medio de cultivo promovió una mayor y rápida germinación de las semillas de *Valeriana pyramidalis* Kunth *in vitro*, se observó una relación directa entre la concentración de GA₃ y el porcentaje de germinación (Figura 43). Aplicando la concentración de 3 mg/L GA₃ se alcanzó un buen porcentaje de germinación (80%).

Las condiciones de frío y la adicción de GA₃ al medio, favorecen la germinación de semillas, ya que al aumentar los niveles endógenos de GA₃, se estimula la síntesis de α -amilasa en el endospermo amiláceo de la semilla, la enzima antes mencionada interviene en el paso de los productos almacenados en el escutelo (Manjarres & Dallos, 2012; Davies, 2004), es así que se inicia el crecimiento de las plántulas. A su vez, Hernández (2004), enuncia que la fitohormona ácido giberélico rompe la latencia de las semillas, esto podría explicar los favorables resultados obtenidos en nuestro estudio.

También se determinó la velocidad de germinación (VG) y el tiempo medio en alcanzar la germinación máxima (TM). Para todos los tratamientos donde se aplicó la hormona GA₃, el (TM) fue de 60 días para todos los tratamientos. En el caso de la velocidad de germinación, el valor (VG) más elevado fue de 26.6 y pertenece al tratamiento 4 (3 mg/L) además vemos que VG aumenta al incrementarse la concentración de

GA₃, esta misma tendencia se observa en los resultados obtenidos por Saldívar (2010), quien evalúa el efecto de la hormona ácido giberélico en la germinación de semillas de *Jaltomata procumbens* (Cav.) J. L. Gentry.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- El mantenimiento de las plantas en condiciones de invernadero junto con la aplicación de un tratamiento fitosanitario por 30 días empleando un fungicida sistémico (Carbenzamin) a una concentración de 3 mL/L y un fungicida de contacto (Captan) a 3 g/L, permitió obtener plantas sanas y que el protocolo de desinfección para folíolos de *Valeriana pyramidalis* Kunth sea exitoso.
- El mejor tratamiento de desinfección para folíolos de *Valeriana pyramidalis* Kunth corresponde a una concentración hipoclorito de sodio 0.5% v/v y tiempo de inmersión de 10 minutos, este tratamiento generó bajos porcentajes de contaminación (20%) y necrosis (40%) en los explantes.
- Se determinó que la hormona 2,4-D, influye significativamente en la formación de callo a partir de segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* Kunth, ya que en el tratamiento control (0 mg/L 2,4-D) no hubo formación de callo en los explantes.
- Las concentraciones de 2.5 mg/L; 2.0 mg/L y 1.5 mg/L de la hormona 2,4-D aplicadas en el medio Murashige y Skoog, generaron el mayor porcentaje de inducción a callogénesis (90%) a 30 días de incubación.
- En cuanto a la variable peso fresco de callo por explante, las concentraciones mencionadas, generaron buenos resultados, destacándose la concentración de 2.5 mg/L 2,4-D cuyo peso promedio fue de 3.96 g a 60 días de incubación.
- Se logró establecer suspensiones celulares homogéneas a partir de callo friable evaluándose tres tratamientos TS1 (2.5 mg/L 2,4-D), TS2 (2.0 mg/L 2,4-D) y TS3 (1.5 mg/L 2,4 D). Para la variable densidad celular no se evidenció diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.
- Se obtuvo con éxito la curva de cinética celular de *Valeriana Pyramidalis* Kunth para los tres tratamientos probados,

identificándose cinco fases: 1) retraso o latencia, 2) exponencial, 3) disminución progresiva, 4) lineal y 5) estacionaria.

- El mejor tratamiento de desinfección para semillas de *Valeriana pyramidalis* Kunth corresponde a concentración hipoclorito de sodio 1.0% v/v - tiempo de inmersión: 5 minutos, obteniendo el menor porcentaje de contaminación (20%).
- La hormona GA₃ influye significativamente en la germinación *in vitro* de semillas de *Valeriana pyramidalis* Kunth, ya que en el tratamiento control (0 mg/L GA₃) ninguna semilla germinó.
- La concentración de 3.0 mg/L de la hormona GA₃ aplicada al medio Murashige y Skoog, generó el mayor porcentaje de germinación *in vitro* (80%) de semillas de *Valeriana pyramidalis* Kunth, además se evidencio que la temperatura optima de germinación para esta especie esta entre 16 y 20 grados °C.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- Se recomienda aplicar un tratamiento fitosanitario previo y mantener las plantas seleccionadas bajo condiciones de invernadero por un periodo mínimo de 30 días, esto permitirá la obtención de plantas sanas y menores porcentajes de contaminación.
- Se debe continuar con la siguiente etapa de este estudio, identificando la presencia de valtratos (metabolitos secundarios) tanto en las suspensiones celulares de *Valeriana pyramidalis* Kunth ya establecidas como en los callos obtenidos, para la identificación de valtratos se podría emplear HPLC.
- La utilización de raíces y rizomas de plantas de *Valeriana pyramidalis* Kunth generadas a partir de la germinación *in vitro* de semillas es otra alternativa para la identificación de valtratos.
- Es necesario mantener las suspensiones celulares de *Valeriana pyramidalis* Kunth bajo condiciones de oscuridad, ya que la auxina 2,4-D es fotosensible y en agitación constante, porque las células necesitan un suministro constante de oxígeno.
- Establecer suspensiones celulares de *Valeriana pyramidalis* Kunth con una mayor cantidad de inóculo inicial y determinar si hay una influencia directa en su cinética celular.
- Probar procesos de escalamiento a las suspensiones celulares para la producción de metabolitos secundarios.
- Incluir la especie *Valeriana pyramidalis* Kunth en un banco de germoplasma de valerianas nativas y endémicas del Ecuador.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M., Melgarejo, L., & Romero, M. (2010). *Fitohormonas*. Recuperado el 24 de Mayo de 2014, de Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de biología. Universidad Nacional de Colombia: http://www.bdigital.unal.edu.co/8545/9/05_Cap03.pdf
- APG III. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161:105-121.
- Backlund & Pyck. (1998). Diervillaceae and Linnaeaceae. *Taxon*, 47:657-661.
- Backlund, A., & Moritz. (1996). Phylogeny of the order Dipsacales. In: C.D. Bell & M.J. Donoghue, Phylogeny and biogeography of Valerianaceae (Dipsacales) with special reference to the South American valerians. *Organisms. Diversity & Evolution*, 5 (2):147-159.
- Balandrin, M., & Klocke, J. (1988). Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic plant*, 4: 1-36.
- Baran, T., & Ghosh, B. (2005). *Plant Tissue Culture, Basic and Applied*. Bangalore: Universities Press.
- BARPEN. (2014). *Ficha tecnica KEEMDAZIM 500 SC y 50 WP*. Obtenido de: http://www.bam.com.co/admin_internas/fichas/BARPEN/K/KEMDAZIN%20SC%20.pdf

- Basantes, M. (2011). *Evaluación del efecto de ácido α - Naftalenácetico (ANA), 6-Bencilaminopurina (BAP) y ácido Giberélico (GA3) en las fases de inducción, multiplicación y enraizamiento in vitro a partir de yemas apicales de Valeriana Scandens*. (F. d. Vida, Ed.) Sangolqui, Ecuador: Universidad de las Fuerzas Armadas. ESPE.
- Bell. (2003). *Systematics of Valerianaceae*. Obtenido de <http://phylodiver,sity.net/cbell/Valerianaceae.html>.
- Bell, C. (2004). Preliminary phylogeny of Valerianaceae (Dipsacales) inferred from nuclear and chloroplast DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 3(1): 340-350.
- Bell, C., & Donoghue, M. (2005). Phylogeny and biogeography of Valerianaceae (Dipsacales) with special reference to the South American valerians. *Organisms, Diversity & Evolution*, 5 (2): 147-159.
- Bhojwani, S., & Razdan, M. (1996). *Plant tissue culture: Theory and Practice*. Elsevier.
- Boss, R., Woerdengbag, H., van Putten, F., Hendriks, & Scheffer, J. (1998). Seasonal variation of the essential oil, valerenic acid and derivatives, and valeportriates in Valeriana officinalis roots and rhizomes, and the selection of plants suitable for phytomedicines. *Planta Medica*, 64:43-147.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Review: Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161. 839–851.

- Bronsema, F., Redig, P., Van Oosteven, H., & Van Onckelen, A. V. (1996). Uptake and biochemical analysis of 2,4-D in cultured 4/5-gotic embryos of *Zea mays* L. *Plant Physiol.*
- Bueno, M., Alzugaraya, C., Giubileo, G., Severina, C., & Carnevale, N. (2009). Evaluación de la calidad fisiológica de semillas de *Maytenus vitisidaea* cultivadas in vitro. *EL BOSQUE*, 30(3): 146-150.
- Carlini, E. (2003). Plants and the central nervous system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 75:501-512.
- CATIE, C. A. (1986). *Conceptos metodológicos sobre investigación y desarrollo de tecnología para sistemas de producción de cultivos. Crecimiento vegetal.* (CATIE, Ed.) Turrialba, Costa Rica.
- Cavender, A., & Albán, M. (2009). The use of magical plants by curanderos in the Ecuador highlands. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 5:3.
- CESVBC. (2014). *Manual técnico de desinfección poscosecha.* Obtenido de, de <http://www.lenntech.es/procesos/desinfeccion/quimica/desinfectantes-hipoclorito-de-sodio.htm>
- Chawla, H. (2002). *Induction to Plant Biotechnology.* Science Publishers.
- CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. (1994). *Mejoramiento del Arroz con cultivo de Anteras: Aplicaciones en el desarrollo de germoplasma Adaptado a Ecosistemas Latinoamericanos y el Caribe.* Obtenido de: http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/Digital/SB191.R5_L467_C.3_Me

joramiento_del_arroz_con_cultivo_de_anteras_Aplicaciones_en_el_desarrollo.pdf

Copeland, L., & McDonald, M. (2001). *Principles of seeds science and technology*. Boston, EEUU: Kluwer Academic.

Cordeiro, C., Chung, M., & Do Sacramento, L. (2005). Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 15(3): 272-278.

Criollo, M. (2013). *Propagación in vitro de genotipos seleccionados de tomate de árbol (solanum betaceum cav.) a partir de meristemos, utilizando un sistema de inmersión temporal. Tesis (Ingeniera en Biotecnología)*. Sangolqui, Ecuador: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Davies, P. (2004). *Plant Hormones. Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* USA: Kluwer Academic Publishers.

De la Torre, L., Alarcón, S., Lars, P., Salazar, & Aarhus, J. (2008). *Usos Medicinales de las plantas. Enciclopedia de las plantas Útiles del Ecuador*. . Quito, Ecuador : Herbario QCA & Herbario AAU.

Dolberg, F. (2006). *PROQUIMSA S.A.* Obtenido de Hoja de seguridad de materiales:

http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/Intranet/Download/Hojas_Seguridad/Espanol/7778-54-3sp.pdf

Edmond, J., & Drapala, W. (1958). The effect of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. *Proceeding of the American Society for Horticultural Science*, 71: 738-34.

- Eriksen, B., Harling, G., & Anderson, L. (1989). *FLORA OF ECUADOR*. Quito , Ecuador : Herbario QCA Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Esquivel, A., & Escalant, J. (1994). *Conceptos Básicos Del Cultivo de Tejidos Vegetales*. Turibalba, Costa Rica : Orton IICA / CATI.
- Evans, D., Coleman, J., & Kearns, A. (2003). Chapter 6: Callus Culture. En *Plant Cell Culture* (págs. 63-64). New York, United States: BIOS Scientific Publishers.
- EXA-UNE. (2014). *Fisiología Vegetal*. (U. N. Nordeste, Ed.) Recuperado el 29 de Mayo de 2014, de Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Obtenido de: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Crecimiento.pdf>
- Fernández, S., Wasowski, C., Paladini, C., & Marder, M. (2004). Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacol Biochem Behav.*, 77(2):399-404.
- Freire, P. (2013). *Establecimiento de suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides* para una futura obtención de metabolitos secundarios, empleando la citoquinina thidiazuron (TDZ)*. Tesis (Ingeniera en Biotecnología). Sangolqui , Ecuador : Universidad de las Fuerzas Armadas. ESPE .
- García, F., Roselló, J., & Santamarina, P. (2006). *Introducción al funcionamiento de las plantas*. Valencia , España : Universidad Politécnica de Valencia.
- García, G., Quintero, R., & Munguía, L. (2004). *Biotecnología Alimentaria* . México: LIMUSA.

- Garrido, J. (2007). *Análisis por cromatografía líquida de alta resolución de ácido valerénico o sus derivados en extracto de hojas y raíz de valeriana (Valeriana Prionophylla Stand.)*. (F. d. Farmacia, Ed.) Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- George, E., Hall, M., & De Klerk, J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd Edition*. (M. A.-J. Edwin F. George, Ed.) Springer .
- Grime, J., Mason, A., Curtis, J., Rodman, S., Band, M., Mowforth, & Neal S & Shaw, S. (1891). A comparative study of germination characteristics. *J.Ecol.*, 1017-1059.
- Gutiérrez, H., & De la vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos. Segunda edición*. (s. d. Interamericana editores, Ed.) México, D.F: MCGRAW-HILL.
- Hidalgo, O., Garnatje, T., Susanna, A., & Mathez, J. (2004). Phylogeny of Valerianaceae based on matK and ITS markers with reference to matK individual polymorphism. *Annals of Botany*, 93: 283-293.
- Houghton, P. (1988). The biological activity of valerian and related plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 22:121-142.
- Hurtado, D., & Merino, M. (1987). *Cultivo de Tejidos Vegetales* . Mexico D.F.: Ed. Trillas .
- Hulst AC, Meyer MMT, Breteler H, Tramper J.(1989) Effect of aggregate size in cell cultures of *Tagetes patula* on thiophene production and cell growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30:18-25.

- Iriondo, J., & Pérez, C. (1999). *Propagation from Seeds and Seed Preservation*. London: Manson Publishing.
- Jácome, A. (2011). *Micropropagación in vitro de la especie endémica: jiguero (aegiphila ferruginea), para la producción masiva y conservación de esta especie en peligro de extinción*. Sangolquí, Ecuador: Universidad de las Fuerzas Armadas. ESPE .
- Jaramillo, P. (2008). *Establecimiento del cultivo in vitro de Polylepis microphylla como futura estrategia de conservación de la especie en la provincia de Chimborazo*. (U. d. Armadas.ESPE, Ed.) Sangolquí, Ecuador.
- Jaramillo, T. (2013). *Plantas Nativas de la Hoya de Quito*. (J. B. Quito, Ed.) Quito, Ecuador : Fundación Botánica de los Andes.
- Jiménez, E. (1998). *Cultivo de ápices y meristemos*. En J. Perez (Ed.), *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Santa Clara, Cuba: Ediciones GEO.
- Kobayashi, M., MacMillan, J., Phinney, B., Gaskin, P., Spray, C., & Hedden, P. (2000). Gibberellin Biosynthesis: metabolic evidence for three steps in the early 13-hydroxylation pathway of rice. *Phytochemistry*, 55(4): 317-321.
- Kotowski, F. (1926). Temperature relations to germination of vegetable seeds. *Proc. Amer.Soc.Hort.*, 23:176-184.
- Kutschker, A. (2011). Revisión del género Valeriana (Valerianaceae) en Sudamérica Austral. *Gayana Bot*, 68(2): 244-296.
- Lorente, A. (2012). *Otros factores que influyen en la formación de callo son el genotipo del explante, luz, temperatura, formulación del*

medio de cultivo y posición del explante. España : Universidad de la Rioja.

Lugo, A. (2004). *Cámara thoma y Neubauer.* Gab Laboratory.

MacMillan, J., & Takahashi, N. (1968). Proposed procedure for the allocation of trivial names to the gibberellins. *Nature*, 217: 170-171.

Manjarres, H., & Dallos, M. (2012). Establecimiento de un protocolo de propagación de gulupa (*passiflora edulis sims.*) A partir de embriones cigóticos y yemas axilares. *Agronomía*, 53 -64.

Manzano, A. (2011). *Proyecto de factibilidad para el cultivo de momórdica Charantia, achochilla, con mujeres microagricultoras de la Parroquia san jacinto del búa, provincia de Santo Domingo de los tsáchilas y su comercialización en la ciudad de Quito.* Quito, Ecuador : Universidad Politécnica Salesiana.

Marujano, M., Jordan, G., & Aréchiga, M. (2007). Efecto del ácido giberélico en la germinación de tres especies del género *Opuntia* (Cactaceae) del Desierto Chihuahuense. *Ecología. Universidad Autónoma de México*, 52(2):46-51.

Mateos, P. (2004). *Control de las poblaciones microbianas, esterilización y desinfección.* (U. d. Microbiología, Editor) Obtenido de <http://www.atl-gestion.com/Asepsia%20y%20desinfeccion.htm#ancho141391>.

Mathur, J., Singh, & Ahuja, P. (1991). Plant regeneration from callus cultures of *Valeriana wallichii* DC. . *Plant Cell Rep.*, (9):523-6.

- Mikell, J., Ganzera, M., & Khan, I. (2001). Analysis of sesquiterpenes in *Valeriana Officinalis* by capilar electrophoresis. *Pharmazie*, 56:946-948.
- Montiel G, Breton C, Thiersault M, Burlat V, Jay-Allemand C, Gantet P (2007) Transcription factor Agamous-like 12 from *Arabidopsis* promotes tissue-like organization and alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* suspension cells. *Metab.Eng.* 9: 125-132.
- Muñoz, F. (2002). *Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. 4ta reimpresión*. Madrid, España: Grupo Mundi Prensa.
- Mustafa, R., Winter, W., Van Iren, F., & Verpoorte, R. (2011). Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols*, 715:720.
- NTP/NIH. (2009). *National Toxicology Program, U.S. National Institutes of Health*. Recuperado el 20 de Octubre de 2013, de Chemical Information Review Document for Valerian (*Valeriana officinalis* L.: <http://ntp.niehs.nih.gov/>
- Oliveira, P., Tamariz, C., & Gutiérrez, M. (2010). Desinfección e influencia del bencil aminopurina (BAP) y ácido naftalén acético (ANA) en la multiplicación in vitro de *Perezia coerulescens* planta medicinal alto andina. *Rev. Aporte Santiaguino*, 3(1): 1. ISSN 2.
- OMS, W. H. (1999). *Monographs on Selected Medicinal Plants* (Vol. Vol 1). Geneva: World Health Organization.
- Osorio, M. (2002). XII Congreso Nacional Farmacéutico. Mesa redonda: El medicamento en la oficina de farmacia, plantas medicinales. *Memorias*

Oxford . (2004). *Hemocitómetro.Diccionario de Biología. España. 2da reimpresión*. Londres: Grupo Mundi Prensa.

Pacheco T. (2005). *Determinación de una metodología de desinfección y un medio de cultivo para la introducción y micropropagación in vitro de once ecotipos de curcubitáceas y cuatro de passifloras*. Latacunga : Universidad Técnica de Cotopaxi.

Paek, Y., Chakrabarty, D., & Hahn, J. (2005). Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. . *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 81:287-300.

Pérez, F., & Pita, M. (2001). *Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas*. (P. y. Ministerio de Agricultura, Ed.) Madrid , España : Universidad Politécnica de Madrid.

Pérez, J. 2010. Evaluación de la producción de fotoquímicos a partir de cultivo de células en la suspensión de *Nerium oleander*

Pérez, M. (2008). *Evaluación de la producción de metabolitos anticancerígenos a partir de células en su suspensión de *Caléndula officinalis**. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

Petersen, M., & Wilhelm, A. (2008). *Chapter 17. Plant Cell Cultures*.
Obtenido de: <http://www.wiley-vch.de/books/biotech/pdf/v01plant.pdf>

PhytoTechnology Laboratories, P. (2003). *Tissue Culture Media-Composition*.
Obtenido de: <http://www.phytotechlab.com/pdf/tissueculturemediacomposition.pdf>

- Pierik, R. (1997). *In vitro* culture of higher plants. *Dordrecht: Klower Acad. Publ.*
- Prakash, J., & Pierik, R. (1993). *Plant Biotechnology: Comercial prospects and problems*. New Dehli: Oxford.
- PROFICOL. (2014). *Fungicida Agrícola*. Obtenido de: <http://www.proficol.com.co/uploads/productos/archivos/FT%20PRO-GRO.pdf>
- Ramachandra, R., & Ravishankar, G. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.*, 20: 101-153.
- Razdan, M. (2003). *Introduction to plant tissue culture*. Enfield: Science publishers. Second Edition.
- Roca, W., & Mroginski, L. (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. (W. M. Roca, Ed.) Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Rodríguez, R. (1997). Micropropagation of *Valeriana edulis* ssp *procera*. *Planta Med*, 63(3):274-5.
- Rojas, S., García, J., & Alarcón, M. (2008). *Propagación asexual de plantas*. Bogota : Corpoica.
- Ross, J., Reid, J., Swain, S., Hasan, O., Poole, A., Hedden, P., & Willis, C. (1995). Genetic regulation of gibberellin deactivation in *Pisum*. *Plant J.*, 7(3): 513-523.
- Rúales, C., & Guevara, E. (2010). La flora patrimonial de Quito descubierta por la expedición de Humboldt y Bonpland en el año 1802. *Avances*, Vol 2(No.3), B54-B63.

- Russowski , D. (2007). *Produção de valepotriatos em culturas líquidas de plantas de Valeriana glechomifolia Meyer (Valerianaceae)*. Rio Grande Do Sul : Universidade Federal do Rio Grande Do Sul .
- Russowski, D., Maurmann, N., Rech, S., & Fett-Neto, A. (2006). Role of light and medium composition on growth and Valepotriates contents in *Valeriana glechomifolia* whole plant liquid cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol 86(No. 2), 211-218.
- Saldívar P, Laguna A, Gutiérrez F, Domínguez M. 2010. Ácido giberélico en la germinación de semillas de Jaltomata procumbens (Cav.) J. L. Gentry. *Agronomía Mesoamericana*. 21(2):327-329
- Salles, L., Silva, A., Fett-Neto, A., von Poser, G., & Rech, S. (2002). *Valeriana glechomifolia*: in vitro propagation and production of valepotriates. *Plant Sci* , 163:165–168.
- Sathyanarayana, B., & Varghese, D. (2007). *Plant tissue culture practices and new experimental protocols*. New Delhi: I. K. International.
- Schlatmann JE, Vinke JL, ten Hoopen HJG, HeijnenJJ (1995). Relation between dissolved oxygenconcentration and ajmalicine production rate inhigh density cultures of *Catharanthus roseus*.*Biotechnol. Bioeng.* 45: 435-439.
- Serrani, J. (2006). *Interacción de Giberelinas y Auxinas en la Fructificación del Tomate*. Tesis. Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biotecnología.
- Silva, A., Rech, S., & von Poser, G. (2002). Quantitative determination of valepotriates from *Valeriana* native to south Brazil. *Planta Med.*, 68:570–572.

- Silva, A. (2009). *Análise química de espécies de valeriana brasileiras*. (U. F. Sul, Ed.) Porto Alegre, Brasil: Instituto de Química.
- Srivastava, L. (2002). *Auxins*. In: *Plant Growth and Development: hormones and environment*. New York, USA: Academic Press.
- Taiz, L., & Lincoln, E. (2006). *Fisiología Vegetal*. 3era edición. Universidad Jaume I, D.L.
- Talón, M. (2000). *Giberelinas*. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. (A.-B. J. M., Ed.) España: Interamericana, Mc Graw Hill.
- Tigabu, M., & Odén, P. (2001). Effect of scarification, gibberellic acid and temperature on seed germination of two multipurpose Albiza species from Ethiopia. . *Seed Science and Technology*, 29:11-20.
- Torres, F. (2011). *Germinación in vitro y cinética de crecimiento de callo de Mammillaria huitzilopochtli DR.Hunt*. Tesis. (F. d. Biología, Ed.) Veracruz, México: Universidad Veracruzana .
- Torres, K. (1989). *Tissue culture techniques for horticultural crops*. New York, USA : An AVI Book.
- Tousi, E., Radjabian, Ebrahimzadeh, H., & Niknam, V. (2010). Enhanced production of valerenic acids and valepotriates by *in vitro* cultures of *Valeriana officinalis* L. *International Journal of Plant Production*, 1735-6814.
- Trejo, G.; Rodríguez, M.; (2007). La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. *INFERENCIA.*, 671-675.

Tropicos.org, M. B. (2014). *Tropicos*. (T. o. M.B.G, Editor) Obtenido de <http://www.tropicos.org/>

Trujillo. (2004). *Micropropagación: Fundamentos del cultivo de tejidos*. Cuba : Centro de Bioplantas.

UNAD. (2014). *Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Lección 5.1.1 Callogénesis*. Obtenido de http://datateca.unad.edu.co/contenidos/203024/203024/leccin_511_callognesis.html

Universidad Politécnica de Valencia. (3 de Junio de 2014). *Tema 14: Fitorreguladores*. Obtenido de http://www.euita.upv.es/variados/biologia/temas/tema_14.htm

University of Bristol, U. (24 de Mayo de 2014). Obtenido de Plant-Hormones: Gibberilins: <http://www.plant-hormones.info/gibberellins.htm>

Vanisree, M., & Tsay, H.-S. (2007). Chapter 12. Plant Cell Cultures: Production of Biologically Important Secondary Metabolites from Medicinal Plants of Taiwan. En O. Q. Kayser, *Medicinal Plant Biotechnology: From Basic Research to Industrial Applications* (pág. 2). WILEY-VCH.

Vanisree, M., Lee, C., Lo, S.-F., Nalawade, S., Lin, C., & Tsay, H.-S. (2004). Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin. Review*, 45: 1-22.

- Verpoorte, R., Contin, A., & Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem. Review*, 1: 13-25.
- Villalobos, M., & Garcia, E. (2012). Características marcadoras en suspensiones celulares embriogénicas de banano cien BTA-03(AAAA) y su parental Williams (AAA). *Bioagro*, 73-82.
- Villalobos, V., & Thorpe, T. (1991). Micropropagación: conceptos, metodologías y resultados. En C. d. aplicaciones, *Centro Internacional de Agricultura Tropical, (CIAT)* (págs. 127-141). Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, (CIAT).
- Zebarjadi, A., Najafi, S., Ghasempour, H., & Motamedi, D. (2011). Establishment of a practical tissue culture for producing hairy roots of *Valeriana officinalis* L. via *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol. 5(20), 4985-4990 .
- Zenk, M. H. (1991). 6: Chasing the enzymes of secondary metabolism: plant cultures as a pot of gold. *Phytochemistry*, 30, 30: 3861–3863.
- Zhao, J., Davis, C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances. Review*, 23: 283-333.

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Evelyn Consuelo Carrera Navarrete

COORDINADOR DE LA CARRERA

M.Sc. María Augusta Chávez

Lugar y fecha: **SANGOLQUÍ, SEPTIEMBRE DEL 2014**