

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL
ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE
*Mussaenda erythrophylla***

LADISLAO C. GUERRA B.

4-737-1223

DAVID, CHIRIQUÍ
REPÚBLICA DE PANAMÁ

2013

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE *Mussaenda erythrophylla*

TRABAJO DE GRADUACIÓN SOMETIDO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERÍA AGRONÓMICA EN CULTIVOS TROPICALES

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**

PERMISO PARA SU PUBLICACIÓN, REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL DEBE SER OBTENIDA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

APROBADO:

PROF. M.Sc. SIMÓN VÁSQUEZ

DIRECTOR

PROF. M.Sc. WALDO ESPINOSA

ASESOR

PROF. M.Sc. JAVIER ALMILLATEGUI

ASESOR

DAVID, CHIRIQUÍ

REPÚBLICA DE PANAMÁ

2013

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a mi Padre Celestial por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mis amados padres: Ladislao Guerra y María Bogantes, por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

A mis hermanos Gabriel Guerra, Ambar Guerra, y Luribeth Cedeño por ser parte importante de mi vida y resaltar el hermoso significado de la unidad familiar.

A mis Suegros Modesto Cedeño y Sebastiana López, por llenar mi vida de alegrías y amor cuando más lo he necesitado. Por la confianza, el apoyo y su dedicación.

Agradezco la confianza, el apoyo y el tiempo a mis profesores: Simón Vásquez, Javier Almillategui, Waldo Espinosa, Ricardo Blás, José Ureta, Ziddy Visuetti, Pedro Guerra y a la Lic. Rosmery Serrano por ser un ejemplo de desarrollo profesional a seguir, por haber compartido conmigo sus conocimientos y sobre todo su amistad.

DEDICATORIA

A mi padres Ladislao Guerra y María Bogantes, que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Gracias por todo papá y mamá, por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí. Porque siempre han estado apoyándome y brindarme todo su amor, por todo esto les dedico este esfuerzo y agradezco que hayan estado a mi lado.

A mi fallecido amigo Manuel Miranda, por confiar y creer en mí y haber hecho de mi vida universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidaré. Por ser un excelente amigo, dedico y comparto este logro contigo.

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE *Mussaenda erythrophylla*

Guerra Ladislao, 2013. Desarrollo de una metodología para el establecimiento *in vitro* de *Mussaenda erythrophylla*. Tesis Ingeniería agronómica en cultivos tropicales. FAC. UP 61p.

RESUMEN

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA), entre el 1 de Octubre de 2012 al 15 Mayo de 2013. El objetivo fue el de desarrollar una metodología para el establecimiento *In Vitro* de *Mussaenda erythrophylla*. Los explantes fueron obtenidos de plantas madres previamente seleccionados de viveros comerciales. Estos explantes fueron sometidos a un protocolo de desinfección diseñado en el Laboratorio de cultivos de tejidos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, que consta de etanol, solución alcalina, methalaxyl, NaClO. La investigación se dividió en 2 fases, en la fase 1 se evaluó la sobrevivencia de los explantes en los medios de cultivo, mientras que en la fase 2 se evaluó la sobrevivencia al variar el pH en los medios. Esto a través de los siguientes tratamientos MS+PPM+7.5, MS+PPM+AB, WPM+PPM+AB, WPM+PPM+7.5. El parámetro estadístico para determinar la significancia de los tratamientos fue el modelo Chi-cuadrado del paquete estadístico SAS[®]. Se logró el objetivo de obtener plantas establecidas dentro de los medios de cultivo. Los resultados de la fase 1; el mejor tratamiento fue WPM+PPM+7.5 que obtuvo la mejor sobrevivencia de explantes con un 19%, mientras que en cuanto al pH, no se registró una significancia entre los tratamientos.

Palabras clave: explantes; desinfección; Medio de cultivo; sobrevivencia,

ABSTRACT

This research was conducted at the Laboratory of Biotechnology from the Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA) from October 1, 2012 to May 15, 2013. The aim was to develop a methodology for establishing *Mussaenda erythrophylla in vitro*. The explants were obtained from mother plants previously selected from nursery garden. These explants were subjected to a disinfection protocol designed in the tissue culture laboratory of the Facultad de Ciencias Agropecuarias consisting of ethanol, alkaline solution, methalaxyl and NaClO. The investigation was divided into two phases; phase 1 was to evaluated survival explants in culture media, while phase 2 survival was assessed by varying the pH in the media. This through the following test MS+PPM+7.5, MS+PPM+AB, WPM+PPM+AB, WPM+PPM+7.5. The statistic to determine the significance of the tests was the model chi-square statistical package SAS[®]. It achieves the objective of obtaining plants established within the culture media. The results of Phase 1, the test WPM + 7.5 PPM had the best survival of explants with 19%, while for pH, there was no significance between trials.

Keywords: explants; disinfection; culture medium; survival

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	iii
DEDICATORIA	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE GRÁFICAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Problema	3
1.2 Justificación	3
1.3 Antecedentes	4
1.4 Objetivos	5
1.4.1 Objetivo general	5
1.4.2 Objetivos específicos	6
1.5 Hipótesis	6
1.7 Limitaciones	8
2 REVISIÓN DE LITERATURA	9
2.1 Descripción botánica	9
2.2 Descripción morfológica	9
2.2.1 Altura	9
2.2.2 Hojas	9
2.2.3 Inflorescencias	10
2.3 Ecología de la Mussaenda	10

2.3.1	Suelos.....	10
2.3.2	Riego.....	10
2.3.3	Usos.....	10
2.4	Importancia del Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.....	11
2.5	Fundamentos del cultivo de tejidos vegetal.....	11
2.5.1.	Totipotencia celular	11
1.5.2.	Desdiferenciación / rediferenciación	12
1.5.3.	Balance de reguladores de crecimiento	12
2.6	Etapas del cultivo <i>in vitro</i>	12
2.6.1	Etapas de establecimiento.....	12
2.6.2	Etapas de multiplicación	13
2.6.3	Etapas de enraizamiento	13
2.6.4	Etapas de aclimatación.....	13
2.7	Ventajas y desventajas del cultivo <i>in vitro</i>	14
2.7.1	Ventajas	14
2.7.2	Desventajas	14
3	MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1	Descripción del estudio	15
3.2	Materiales.....	16
3.2.1	Medios de cultivos	16
3.3	Métodos.....	19
3.3.1	Procedimiento CATMOD	19
3.4	Variables a evaluar	20
3.4.1	Sobrevivencia de los explantes.....	20
3.5	Establecimiento del ensayo	21

3.5.1	Preparación de medios de cultivo	21
3.5.2	Introducción de los explantes al laboratorio	22
3.5.3	Desinfección de útiles, herramientas y equipo de laboratorio	26
3.5.4	Etapas de iniciación o establecimiento del cultivo <i>in vitro</i>	27
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1	Respuesta de sobrevivencia en los tratamientos a los 45 días	30
4.1.1	Primer tratamiento	30
4.1.2	Segundo tratamiento.....	32
4.1.3	Tercer tratamiento.....	33
4.1.4	Cuarto tratamiento	34
4.1.5	Resultados del análisis CATMOD para la sobrevivencia de las plantas vivas en los días críticos.....	36
4.2	Análisis del efecto del pH en los medios de cultivos	37
4.2.1	Resultados del análisis para el efecto del pH 5.8 sobre la sobrevivencia	38
4.2.2	Resultados del análisis para el efecto del pH 7.5 sobre la sobrevivencia	39
4.2.3	Resultado final de análisis del efecto del pH en la sobrevivencia de las explantes.....	40
4.3	Análisis del efecto de los medios de cultivos MS vs WPM en la sobrevivencia de las plantas.	40
4.3.1	Medio de cultivo Murashige & Skoog (1962)	41
4.3.2	Medio de cultivo Woody Plant Medium de Lloyd & McCown (1981) ..	43
4.3.3	Resultados finales del establecimiento entre los medios MS y WPM	44
5	CONCLUSIONES	45
6	RECOMENDACIONES	47
7	LITERATURA CONSULTADA	48

ÍNDICE DE CUADROS

No.	TÍTULO	Pág.
I	MEDIOS DE CULTIVO PARA EL ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Mussaenda erythrophylla</i>	16
II	MATERIALES BÁSICOS REQUERIDOS PARA EL DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Mussaenda erythrophylla</i>	17
III	COMPONENTES NECESARIOS PARA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Mussaenda erythrophylla</i>	18
IV	TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN EL DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Mussaenda erythrophylla</i>	28
V	RESULTADOS DEL ANÁLISIS CHI-CUADRADO PARA LA SOBREVIVENCIA DE PLANTAS A LOS 7, 15, 21, 45 DÍAS	30
VI	RESULTADOS DEL ANÁLISIS CHI-CUADRADO PARA pH 5.8 VS 7.5 LOS DÍAS 7, 15, 21, 45	37
VII	RESULTADOS DEL ANÁLISIS CHI-CUADRADO PARA LA SOBREVIVENCIA DE PLANTAS EN LOS MEDIOS DE CULTIVOS MS Y WPM EN LOS DÍAS 7, 15, 21, 45	41

ÍNDICE DE GRÁFICAS

No.	TÍTULO	Pág.
1	Sobrevivencia para el tratamiento MS+PPM+pH7.5	31
2	Porcentaje de plantas vivas MS+PPM+7.5	31
3	Número plantas vivas para el tratamiento MS+PPM+AB	33
4	Porcentaje de plantas vivas MS+PPM+AB	33
5	Número plantas vivas para el tratamiento WPM+PPM+AB	34
6	Porcentaje de plantas vivas WPM+PPM+AB	34
7	Número plantas vivas para el tratamiento WPM+PPM+7.5	35
8	Porcentaje de plantas vivas para el tratamiento WPM+PPM+7.5	35
9	Total de plantas vivas luego del establecimiento	36
10	Número de plantas establecidas en medios de cultivos con pH 5.8 a los 7, 15, 21 y días	38
11	Número de plantas establecidas en medios de cultivo con pH 7.5 a los 7, 15, 21 y 45 días	39
12	Número de plantas vivas por pH a los 7, 15, 21 y 45 días	40
13	Establecimiento en MS	42
14	Sobrevivencia de plantas en el medio MS	42
15	Establecimiento en WPM	43
16	Sobrevivencia en el medio WPM (1981)	44
17	Plantas vivas en medios de cultivos	44

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	TÍTULO	Pág.
1	Preparación de soluciones madres, medios de cultivo y cálculos	21
2	Elección de meristemas axilares de planta madre	22
3	Meristema axilar	23
4	Meristemas axilares listos para ser procesados	23
5	Meristemas axilares de 1 cm	24
6	Batería de desinfección	25
7	Inmersión y agitado de explantes dentro de solución desinfectante alcalina	26
8	Cámara de flujo laminar	27
9	Medios de cultivos	28
10	Explantes sembrados en medio de cultivo WPM+PPM+7.5	29

1. INTRODUCCIÓN

Además de las plantas cultivadas para alimentación y la industria, el hombre a través de los años ha domesticado un sin número de especies de plantas ornamentales.

Una planta ornamental o planta de jardín, es aquella que se cultiva y se comercializa con propósitos decorativos por sus características estéticas, como lo son sus flores, hojas, perfume, la textura de su follaje, frutos y tallos. Estas características de las plantas ornamentales sirven de base para el diseño de jardines, así como también para los arreglos interiores de oficinas, empresas y residencias particulares.

La importancia de este grupo de plantas se ha incrementado con el desarrollo económico de la sociedad y el incremento de las áreas ajardinadas en las ciudades.

Actualmente hay más de 3.000 plantas que se consideran de uso ornamental.

En Panamá existen pocos datos económicos de plantas ornamentales, sin embargo, Costa Rica exportó 387 millones dólares producto de las plantas de ornamento entre el 2007 y 2011 según la Estadística de 2011, de la Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica. PROCOMER, (2012).

La demanda nacional panameña de plantas ornamentales no logra ser abastecida por la producción local y con el auge del desarrollo turístico y

urbanístico se hace necesario el aumento de la producción de plantas ornamentales a fin de suplir las crecientes demandas de las instalaciones turísticas. Corado, (2012)

Uno de los desafíos de la producción de ornamentales es poder contar con sistemas de propagación de plantas de forma masiva y rápida, donde el material propagado conserve su identidad genética e igualmente presente altos estándares de sanidad y calidad.

A través de la biotecnología vegetal se ha logrado desarrollar metodologías para la propagación *in vitro* de algunas especies de plantas ornamentales, razón por la cual se ha planteado en esta propuesta establecer un sistema estandarizado para la propagación *In vitro* de la especie *Mussaenda erythrophylla* la cuál ha sido altamente demandada como un arbusto decorativo en jardines residenciales y plazas públicas.

Se pretende evaluar además, la respuesta de la especie *Mussaenda erythrophylla* a la propagación *In Vitro*, esta planta ornamental es conocida comúnmente con el nombre de Mussaenda. También se valorará la eficiencia del producto comercial PPM[®] (Plant Preservative Mixture) para el control de la contaminación en la fase de establecimiento *in vitro* de los explantes, ya que es sabido que la contaminación de los medios por hongos, bacterias, y virus generadas por la contaminación endógena de los explantes procedentes del campo lo que es causante de grandes pérdidas en la micropropagación, por lo que, su control es fundamental para el logro de la eficiencia reproductiva.

1.1 Problema

Mediante encuestas realizadas en viveros dedicados a la venta de plantas ornamentales en la Ciudad de David y Dolega en la provincia de Chiriquí, se logró identificar que la técnica que utilizan para la reproducción de “*Mussaenda*”, es mediante el uso de esquejes vegetativos tomado de plantas madres.

Esta técnica, según los encuestados, posee un bajo porcentaje de supervivencia, (menos del 50%) y se requiere de 6 a 8 meses para poder obtener un producto final apto para la venta, lo que da como resultado el déficit de plántones disponibles para satisfacer la demanda.

1.2 Justificación

Tradicionalmente la propagación de *Mussaenda erythrophylla* se realiza de manera vegetativa, por medio de esquejes, con un bajo porcentaje de plantas establecidas (menos del 50%)

Los viveros reproductores, deben contar para la venta con suficientes cantidad de plántones con las mejores condiciones de vigor, sanidad y con comprobada identidad genética, ya que éstos son aspectos que condicionan fuertemente la producción de ornamentales.

En este sentido, la propagación vegetal mediante técnicas biotecnológicas, es una herramienta que puede contribuir a la innovación de los procedimientos de

multiplicación de *Mussaenda erythrophylla*, ya que esta puede ser una alternativa eficiente para la multiplicación rápida y de gran escala de plantones ornamentales libres de plagas y enfermedades.

1.3 Antecedentes

En 1827, Schumach & Thonn, (en línea) describen a *Mussaenda erythrophylla* como nativa de África tropical (Angola, Burundi, Camerún, Costa de marfil, Ghana, Kenia, Sierra Leona, entre otras), también se explica que el nombre del género deriva del término en lengua singalese “mussenda” con el cual vienen llamadas localmente algunas especies pertenecientes al género, y que el nombre de la especie es la combinación de los términos griegos “erythròs”: rojo, “phyllon”: hoja, con referencia al color vistoso de sus sépalos.

La propagación *in vitro* es una técnica basada en colocar un explante en un recipiente con soluciones nutritivas artificiales y hormonas vegetales para propagarla en un medio estéril, (en línea). Cada fragmento origina una planta idéntica a la planta de la cual se tomó dicho explante.

En Panamá la utilización de las técnicas de propagación *in vitro* van en aumento, tanto por parte de instituciones oficiales, como por empresas privadas.

Además de la propagación de especies de cultivo agrícola (Piña, Plátano, Raíces etcétera), diversos laboratorios, privados y estatales a nivel nacional ya

han tendido experiencias en la propagación *in vitro* de orquídeas, la cual tienen un alto valor comercial como especie ornamental.

En Panamá *Mussaenda erythrophylla* tiene gran aceptación como planta ornamental, y es utilizada en todo el país para el diseño de paisajes en parques y jardines; de ella no existen registros comerciales de sus ventas y tampoco se han realizado estudios para su propagación *in vitro*, pero su producción actual claramente no logra abastecer el mercado.

A pesar que la propagación *in vitro* resulta ser una alternativa para propagar masivamente las especies vegetales. En el caso de especies leñosas principalmente se presentan importantes problemas debido a la contaminación endógena en la etapa de establecimiento *in vitro*, razón por la cual es indispensable valorar mediante investigación las estrategias conducentes a reducir los niveles de contaminación durante esta etapa.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

- Evaluar la respuesta de la especie *Mussaenda erythrophylla* al establecimiento *in vitro*.

1.4.2 Objetivos específicos

- Valorar la efectividad del producto preservante PPM[®] (Plant Preservative Mixture) sobre la contaminación bacteriana de los medios de cultivo, solo y en combinación con antibióticos Kanamicina y Erytromicina.
- Establecer si existe reducción de contaminación al variar el pH en el medio de cultivo.
- Estimar la respuesta de *Mussaenda erythrophylla* a la propagación *in vitro* mediante embriogénesis, utilizando los medios de Lloyd & McCown (1981) y Murashige & Skoog (1962)

1.5 Hipótesis

Ho: No hay variación significativa en las tasas de contaminación durante el establecimiento *in vitro* de *Mussaenda erythrophylla* con la utilización del producto PPM[®] solo y en combinación con los antibióticos Kanamicina y Erytromicina.

Ha: Hay variación significativa en las tasas de contaminación durante el establecimiento *in vitro* de *Mussaenda erythrophylla* con la utilización del producto PPM[®] solo y en combinación con los antibióticos Kanamicina y Erytromicina.

Ho: No hay variación significativa en la tasa de contaminación durante el establecimiento *in vitro* de *Mussaenda erythrophylla* al variar el pH del medio de cultivo.

Ha: Hay variación significativa en la tasa de contaminación durante el establecimiento *in vitro* de *Mussaenda erythrophylla* al variar el pH del medio de cultivo.

Ho: No hay variación significativa en la respuesta de la planta *Mussaenda erythrophylla* al establecimiento *in vitro* dependiendo el medio del cultivo Murashige & Skoog (1962) y Lloyd & McCown (1981).

Ha: hay variación significativa en la respuesta de la planta *Mussaenda erythrophylla* al establecimiento *in vitro* dependiendo el medio del cultivo Murashige & Skoog (1962) y Lloyd & McCown (1981).

1.6 Alcances

Este estudio tiene el propósito de superar el mayor problema de la etapa de establecimiento *in vitro*, el cual es reducir los niveles de contaminación

endógena y lograr el establecimiento de *Mussaenda erythrophylla* para su multiplicación.

Además se podrá generar información valiosa para empresas dedicadas a la producción de *Mussaenda erythrophylla* al mejorar las tasas reproductivas de esta especie, de manera que se podrá planificar con mayor precisión las cantidades de plantas que se deseen obtener.

1.7 Limitaciones

La poca información existente y falta de material didáctico, sobre la propagación masiva *in vitro* de *Mussaenda erythrophylla* resulta ser una limitante ya que es necesario invertir tiempo para optimizar los procesos y técnicas del establecimiento y propagación *in vitro* de esta especie.

Es necesario un laboratorio de cultivos de tejidos con la tecnología adecuada para poder aplicar esta técnica de producción.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Descripción botánica

- **Género: Mussaenda**
- **Especie: erythrophylla**

El género *Mussaenda* pertenece a la familia Rubiaceae y comprende cerca de 200 especies, esta planta es nativa del África Tropical, muy común de Guinea a Camerún (en línea). Gran porcentaje de estas especies son utilizadas como plantas ornamentales debido a su colorido y vistosidad ya que poseen corola de diferentes colores entre ellos, rosado, blanco y rojo, con un agradable aroma.

2.2 Descripción morfológica

2.2.1 Altura

La planta *Mussaenda erythrophylla* es un arbusto semi leñoso tropical; en su clima original llega a medir 2,50m o más de altura y sus ramas 1,80m de largo. Colocadas dentro de macetas estas pueden medir 1,50m.

2.2.2 Hojas

Hojas simples, opuestas, aovadas o elípticas con nervaduras bien marcadas, de pecíolo corto, verticiladas de hasta 12cm de longitud.

2.2.3 Inflorescencias

Inflorescencias en panículas terminales, con un lóbulo del cáliz alargado, similar a una hoja de cinco pétalos. Brácteas ovaladas de 6cm de largo.

Corola con los pétalos fusionados de 2-3cm de largo, de color amarillo brillante.

2.3 Ecología de la Mussaenda

2.3.1 Suelos

El suelo requerido por la planta Mussaenda, para un mejor desarrollo, debe ser fértil, rico en materia orgánica, con un pH alcalino entre 7.9 y 8.5, aireado y con buen drenaje.

2.3.2 Riego

Para un buen crecimiento la planta requiere de un riego de forma regular durante el período vegetativo, de modo que el suelo se mantenga húmedo pero no mojado. Pasado este período la planta no requiere de riego.

2.3.3 Usos

La planta Mussaenda es cultivada como planta ornamental o agro-hortícola, también es utilizada como planta medicinal para el cerebro, sistema nervioso, los riñones, como diurético, y para mejorar el ciclo menstrual; Las hojas y la raíz tienen taninos, y son astringentes (en línea).

2.4 Importancia del Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El cultivo de tejido vegetales se desarrolla a partir del siglo XIX aproximadamente, cuando Haberlandt en 1898, logra mantener por varios meses, sin multiplicación, un conjunto de células (pelos o fragmentos de tejido vegetales) tales como *Erithoinium ornthogalum* y *Tradescantia sp.*

El cultivo de tejidos vegetales, son un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales. Jiménez, (1998). La expresión cultivo *in vitro* de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco, en un ambiente artificial y de manera aséptica mediante explantes.

Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes), y el control de los factores que afectan el crecimiento.

2.5 Fundamentos del cultivo de tejidos vegetal

Las respuestas *in vitro* se pueden lograr gracias a los siguientes fundamentos:

2.5.1. Totipotencia celular

Esta es la capacidad de una célula de dirigir el desarrollo total de un organismo. Esto sucede si el núcleo de una célula es idéntico al de un cigoto, es decir, la totipotencia se observa en la capacidad del cigoto de dar origen a cada tipo de célula del adulto. Slack, (2001).

Dos tipos de tejidos jóvenes mantienen la totipotencia celular: los meristemas apicales o axilares y tejidos inmaduros o tejidos de semillas recién germinadas Santangelo, (2000).

1.5.2. Desdiferenciación / rediferenciación

Desdiferenciación consiste en la transformación y pérdida de las características de especialización de un tipo celular para dar parte a células de tipo meristemático, mientras que la rediferenciación consta en la regeneración de una planta de las células provenientes de la desdiferenciación.

1.5.3. Balance de reguladores de crecimiento

El balance de reguladores de crecimiento vegetal es el último de los tres conceptos básicos de cultivo *in vitro*. Todos los procesos de diferenciación están regulados por el balance de diferentes tipos de reguladores de crecimiento, principalmente auxinas y citocininas.

2.6 Etapas del cultivo *in vitro*

2.6.1 Etapa de establecimiento

Es la etapa más crítica dentro del cultivo *in vitro* el objetivo es lograr la inoculación de los explantes en los medios de cultivo, el éxito dependerá de la edad de la planta donante, la edad fisiológica, el proceso de desinfección, tamaño del explante.

La desinfección del explante es sumamente importante para el establecimiento.

2.6.2 Etapa de multiplicación

El objetivo de esta etapa es la mantener y aumentar la cantidad de plantas establecidas, esto se logra por medio de cortes a los nuevos brotes provenientes de las plantas establecidas.

En esta etapa son importantes los reguladores de crecimiento como auxinas, giberelinas y citoquininas y las condiciones de crecimiento para la multiplicación de los explantes.

2.6.3 Etapa de enraizamiento

Se produce la formación de raíces adventicias, por medio de concentraciones elevadas de auxinas se promueve la rizogénesis.

2.6.4 Etapa de aclimatación

Es la segunda etapa más crítica dentro del cultivo *in vitro*, debido al estrés causado por la evapotranspiración acelerada de las plantas, por lo tanto se tiene una alta reducción en la supervivencia de las plantas.

Se utilizan diferentes tipos de sustrato, mezcla de tierra y arena, sustratos comerciales entre otros. La aclimatación debe llevarse a cabo dentro de invernaderos con humedad relativa controlada.

2.7 Ventajas y desventajas del cultivo in vitro

2.7.1 Ventajas

- La posibilidad de obtener grandes volúmenes de producción de plantas superiores en un menor tiempo,
- Propagación masiva de plantas libres de enfermedades en corto tiempo.
- Las plantas pueden ser propagados en cualquier época del año.
- Facilita el intercambio de material genético entre los países.
- Mantiene la identidad genética del material propagado sin introducir variabilidad genética.

2.7.2 Desventajas

- Requiere de personal especializado.
- Requiere de infraestructura y equipamiento
- Equipo costoso

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Descripción del estudio

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia de la Facultad de Ciencias Agropecuarias localizado en la provincia de Chiriquí, durante el período del 1 de Octubre de 2012 al 15 de Mayo de 2013.

El estudio evaluó el efecto del PPM[®] solo y en combinación con los antibióticos Kanamicina y Erytromicina sobre el control de la contaminación bacteriana generada a partir de los explantes de *Mussaenda erythrophylla*. Durante la etapa de establecimiento *in vitro*. Para ello se utilizó los medios básicos Lloyd & McCown (1981) y Murashige & Skoog (1962) con modificaciones del pH.

Se utilizaron los medios de cultivo Murashige & Skoog (1962) y Lloyd & McCown (1981) combinado con el producto comercial PPM[®] (Plant Preservative Mixture) para controlar la contaminación endógena en la fase de establecimiento *in vitro* de *Mussaenda erythrophylla* ya que las misma son causante de grandes pérdidas en la micropropagación.

Durante esta etapa el control de la contaminación es fundamental para aumentar la eficiencia. El PPM[®] producto comercial utilizado consta de (5-cloro-2-Metil-3[2H]-Isotiazolone 0.1250% + 2-Metil-3[2H]-Isotiazolone 0.0412% +

ingredientes inertes 99.8238%) es un preservante de amplio espectro que puede tener acción biocida, recomendado para controlar la contaminación microbiana en el cultivo de tejidos. Kalin y Assaf, (1999).

Para medir los resultados y comprobar las hipótesis planteadas en el estudio, se tomaron datos a los 7, 15, 21 y 45 días, respectivamente, de inoculado el explante en los medios de cultivos. Se tomaron datos a este tiempo por ser días críticos en el proceso de establecer la metodología del establecimiento *in vitro*.

3.2 Materiales

3.2.1 Medios de cultivos

Cuadro I: MEDIOS DE CULTIVO PARA EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE *Mussaenda erythrophylla*

-
1. *MS+ PPM + 3ml l⁻¹ + medio de cultivo a un pH de 7.5
 2. *MS+ PPM + 3ml l⁻¹ + kanamicina 40mg l⁻¹ y Erytromicina 40mg l⁻¹ a un pH 5.8
 3. **WPM+ PPM + 3ml l⁻¹ + + Kanamicina 40mg l⁻¹ y Erytromicina 40mg l⁻¹ a un pH 5.8
 4. **WPM+ PPM + 3ml l⁻¹ + Medio de cultivo a un pH de 7.5
-

*Murashige & Skoog (1962)

**Lloyd & McCown (1981)

Cuadro II: MATERIALES BÁSICOS REQUERIDOS PARA EL DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE *Mussaenda erythrophylla*

Producto: PPM® (Plant Preservative Mixture)	
Medio de cultivo: Murashige y Skoog (1962) y Lloyd & McCown (1981)	
Material vegetal: ápices meristemales de la planta <i>Mussaenda erythrophylla</i>	
Alcohol 70%	Fungicida
NaClO (Hipoclorito de Sodio)	Pipetas
Solución alcalina	Gotero
Tween	Bisturí
Kanamicina, Erytromicina	Microondas
Desinfectante	Agitadores magnéticos
Vasos químicos	Imanes
Frascos de vidrio	Fósforos
Espátulas	Refrigerador
Bandejas	Juego de Disección
Cámara de flujo laminar	Autoclave
Balanza analítica	

Fuente: El autor

Cuadro III: COMPONENTES NECESARIOS PARA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE *Mussaenda erythrophylla*

	Componente	Murashige & Skoog mg/L	WPM mg/L
I	Macronutrientes		
	Nitrato de Amonio NH ₄ NO ₃	1650	400
	Fosfato de Monopotasio KH ₂ PO ₄	170	170
	Sulfato de Magnesio MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	370
	Cloruro de Calcio CaCl ₂ . 2 H ₂ O	440	96
	Nitrato de Potasio KNO ₃	1900	--
II	Micronutrientes		
	Sulfato de Manganeso MnSO ₄ . 4H ₂ O	22.23	22.3
	Sulfato de Zinc ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	8.6
	Molibdato de Sódio NaMO ₄ 2H ₂ O	0.25	0.25
	Sulfato de Cobre CuSO ₄ 5H ₂ O	0.05	0.25
	Cloruro de Cobalto CoCl ₂ 6H ₂ O	0.05	
	Yoduro de Potasio KI	0.83	
	Ácido Bórico H ₃ BO ₃	6.2	6.2
III	Quelatos de Hierro		
	Sulfato Ferroso FeSO ₄ 7H ₂ O	37.3	27.8
	Acido Etilendiamino tetracetico Na ₂ EDTA	27.8	37.3
IV	Vitaminas		
	Tiaminas-HCl	0.1	0.1
	Piridoxina- HCl	0.5	0.5
	Ácido Nicotinico	0.5	0.5
	Glicina	2.0	2.0
V	Reguladores de Crecimiento		
	Inositol	0.1	0.1
VI	Fuente de Carbono		
	Sacarosa	30000	30000
VII	Agente Gelificantes		
	AGAR	300.5	300.5
VIII	PPM		
	Plant Preservative Mixture	3 ml/l	3ml/l

Fuente: El autor

3.3 Métodos

3.3.1 Procedimiento CATMOD

Se utilizó el procedimiento CATMOD implementado en el paquete estadístico SAS[®], este módulo permite, establecer funciones de los parámetros para dar respuestas a preguntas de interés. Silva, (2002).

Se generaron gráficas para facilitar la interpretación de los resultados que produjo el programa.

El análisis se generó a partir de una base de datos con la información de los datos recogidos durante la etapa de establecimiento *in vitro*.

Las variables consideradas fueron *explantes vivos* y *explantes muertos* (sobrevivencia), en contraste con *los días críticos del establecimiento*, además *el efecto en la variación del pH en los medios de cultivo en la sobrevivencia*.

3.3.1.1 Variable de respuesta dicotómica

Se trabajó con valores de sobrevivencia, correspondientes en los días críticos, asignando el valor 1 a plantas vivas y el valor 0 a plantas muertas.

3.3.1.2 Modelo estadístico Chi-Cuadrado.

El modelo estadístico Chi-cuadrado de cociente de verosimilitudes se aplicó a los datos para comprobar la bondad de ajuste del modelo, de esta forma:

$$Q_L = \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^3 \sum_{k=1}^2 2n_{ijk} \ln \left(\frac{n_{ijk}}{m_{ijk}} \right)$$

Donde n_{ijk} es el número de observaciones mientras que m_{ijk} son los valores respuesta de sobrevivencia.

3.4 Variables a evaluar

Esta etapa comprende desde la inoculación de los ápices meristemático hasta el final de su establecimiento *in vitro* a los 45 días.

Durante el establecimiento las variables se evaluaron de la siguiente forma:

3.4.1 Sobrevivencia de los explantes

Se contaron las plantas y se determinó el porcentaje de sobrevivencia a los 7, 15, 21 y 45 días, para:

- Determinar la efectividad del producto preservante sobre la contaminación bacteriana de los medios de cultivo.
- Si existe reducción de la contaminación al variar el pH.
- Estimar la respuesta de la planta *Mussaenda erythrophylla* a la propagación *in vitro* dependiendo el medio del cultivo.

3.5 Establecimiento del ensayo

3.5.1 Preparación de medios de cultivo

El éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y forma física. Villalobos y Thorpe, (1991).

3.5.1.1 Preparación de soluciones madre

Los medios de cultivo son preparaciones a partir de soluciones madres de macronutrientes, micronutrientes y vitaminas suplementados con reguladores de crecimiento.



Figura 1: Preparación de soluciones madres, medios de cultivo y cálculos

Fuente: El autor

3.5.2 Introducción de los explantes al laboratorio

3.5.2.1 Selección de explantes

Los explantes utilizados en este ensayo fueron seleccionadas de plantas madres de viveros comerciales, para la obtención de los ápices meristemales de 1 cm de largo.



Figura 2: Elección de meristemas axilares de planta madre

Fuente: El autor

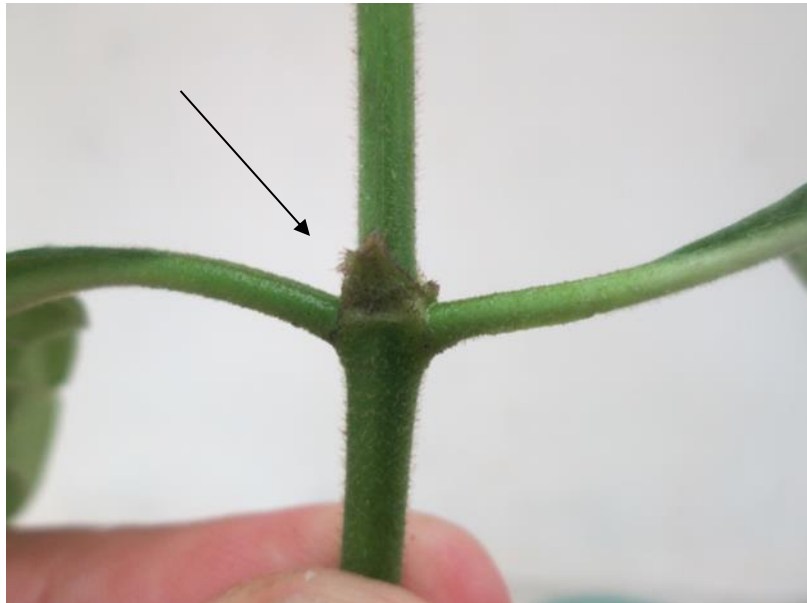


Figura 3: Meristema axilar

Fuente: El autor



Figura 4: Meristemas axilares listos para ser procesados

Fuente: El autor



Figura 5: Meristemas axilares de 1 cm

Fuente: El autor

3.5.2.2 Desinfección de los explantes

Se siguió el siguiente protocolo de desinfección de los explantes:

- Los explantes se sometieron a un lavado de 15 minutos bajo agua corriente y jabón antibacterial comercial, con el objetivo de eliminar cualquier impureza que los explantes puedan traer de la planta madre. A medida que son lavados, los explantes, se cepillan para ayudar con el proceso de limpieza.
- Los explantes se colocaron dentro de una solución de etanol a una concentración de 70% por 20 segundos.

- Luego un periodo de sumergir los explantes en varias soluciones, que a continuación se detallan:
 - 10 minutos en una solución alcalina al 0.05% de concentración.
 - 10 minutos en una solución preparada de Methalaxyl 2g l⁻¹ (fungicida de uso comercial).
 - 10 minutos en una solución de NaClO al 30% + 1/100 ml Tween 80 (solución dispersadora).
 - 10 minutos en una solución de NaClO al 10% + 1/100 ml Tween 80.
- Finalmente, el material se lavó cinco veces en agua esterilizada para eliminar los residuos de cualquiera de estas soluciones desinfectantes.

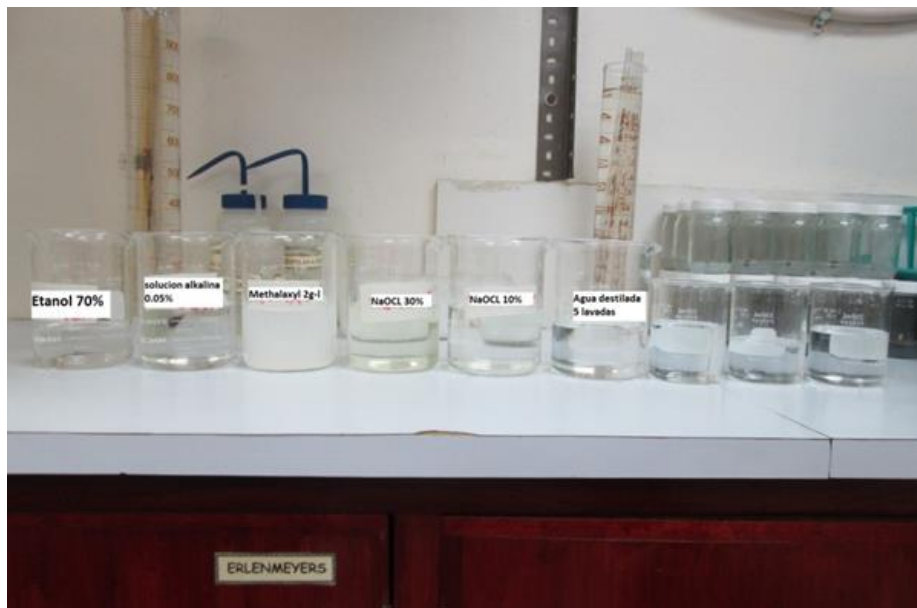


Figura 6: Batería de desinfección

Fuente: El autor

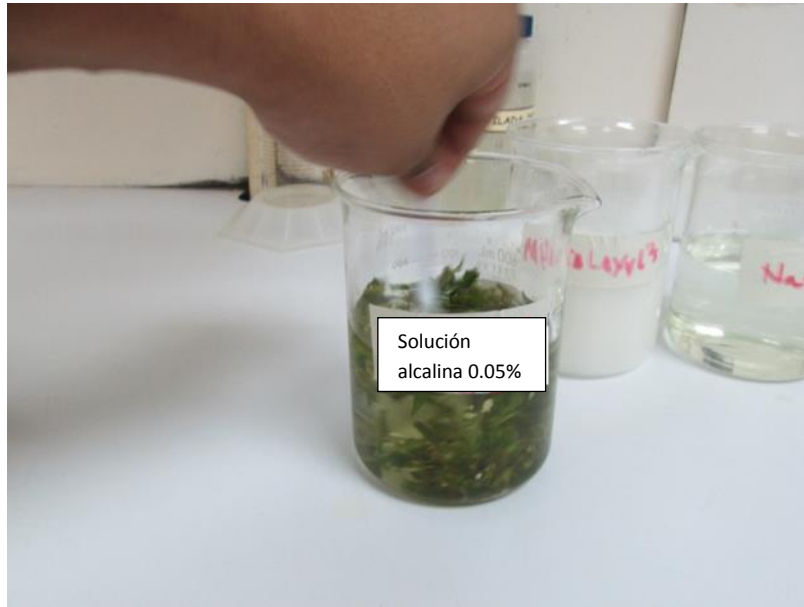


Figura 7: Inmersión y agitado de explantes dentro de solución desinfectante alcalina

Fuente: El autor

3.5.3 Desinfección de útiles, herramientas y equipo de laboratorio

Frascos de vidrio de cuatro onzas fueron lavados con jabón antibacterial y cloro al 5.25% y enjuagados con agua destilada, también: la pinza larga, pinza corta, mango de bisturí, una vez lavados, secados se colocaron en la autoclave a 15lb/pulgada² (1kg/cm²) por 15 minutos a una temperatura de 121°grados centígrados.

Antes del procedimiento de establecimiento se debe cerciorar que los lugares donde se vaya a trabajar estén totalmente asépticos. Se desinfecto con alcohol 70 por ciento: el mechero, el estereoscopio y la cámara de flujo laminar



Figura 8: Cámara de flujo laminar

Fuente: El autor

3.5.4 Etapa de iniciación o establecimiento del cultivo *in vitro*

Luego del proceso de desinfección los explantes fueron llevados a la cámara donde se inocularon en los medios de cultivo (un explante por frasco).

Cuadro IV: TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN EL DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE *Mussaenda erythrophylla*

- 30 frascos del tratamiento Murashige & Skoog (1962) + PPM 3ml l⁻¹ + medio de cultivo a un pH de 7.5
- 30 frascos del tratamiento Murashige & Skoog (1962) + PPM 3ml l⁻¹ + kanamicina 40mg l⁻¹ y Erytromicina 40mg l⁻¹ a un pH 5.8
- 30 frascos del tratamiento Lloyd & McCown (1981) + PPM 3ml l⁻¹ + + Kanamicina 40mg l⁻¹ y Erytromicina 40mg l⁻¹ a un pH 5.8
- 30 frascos del tratamiento 7.5 Lloyd & McCown (1981) + PPM 3ml l⁻¹ + Medio de cultivo a un pH de 7.5

Luego de ser inoculados en los medios de cultivo estos fueron colocados en la sala de crecimiento por 16 horas a una temperatura de 26 °C y una intensidad lumínica de 2.000 lux por un periodo de 45 días.



Figura 9: Medios de cultivos
Fuente: El autor

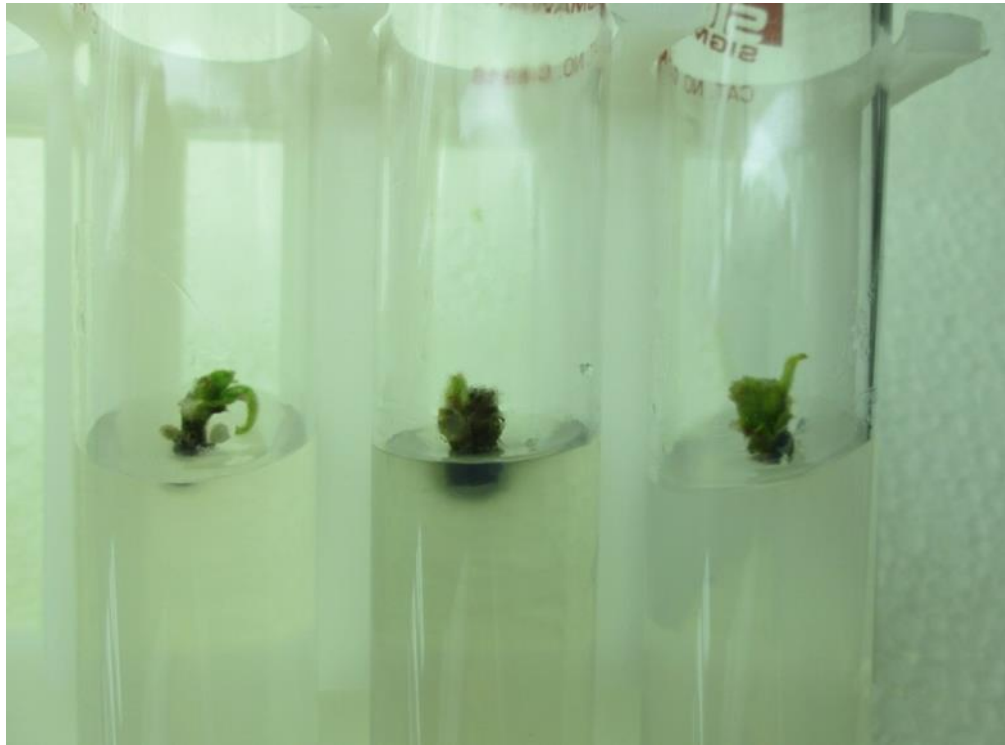


Figura 10: Explantes sembrados en medio de cultivo en WPM+PPM+7.5

Fuente: El autor

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Respuesta de sobrevivencia en los tratamientos a los 45 días

El análisis chi-cuadrado fue realizado por medio del programa CATMOD en un análisis de datos categóricos, el mismo determinó una alta significancia en la sobrevivencia de los explantes a los 45 días después de la inoculación ($P < .0001$).

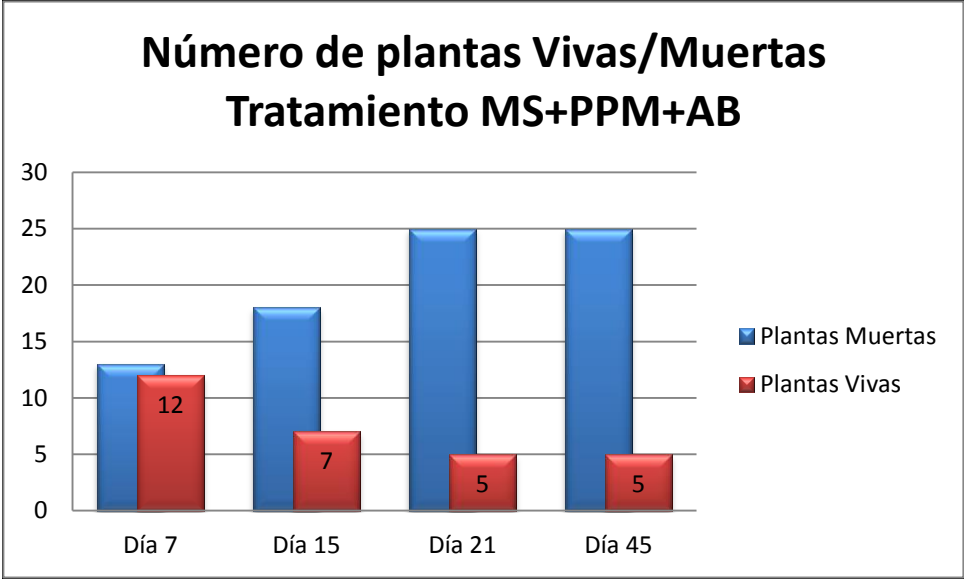
Cuadro V RESULTADOS DEL ANÁLISIS CHI-CUADRADO PARA LA SOBREVIVENCIA DE PLANTAS A LOS 45 DÍAS

Fuente	Grado de Libertad	Chi-cuadrado	P>Chi-cuadrado
Intercepto	1	20.29	<.0001
Tratamiento	3	34.73	<.0001
Día	3	40.59	<.0001

Fuente: El autor

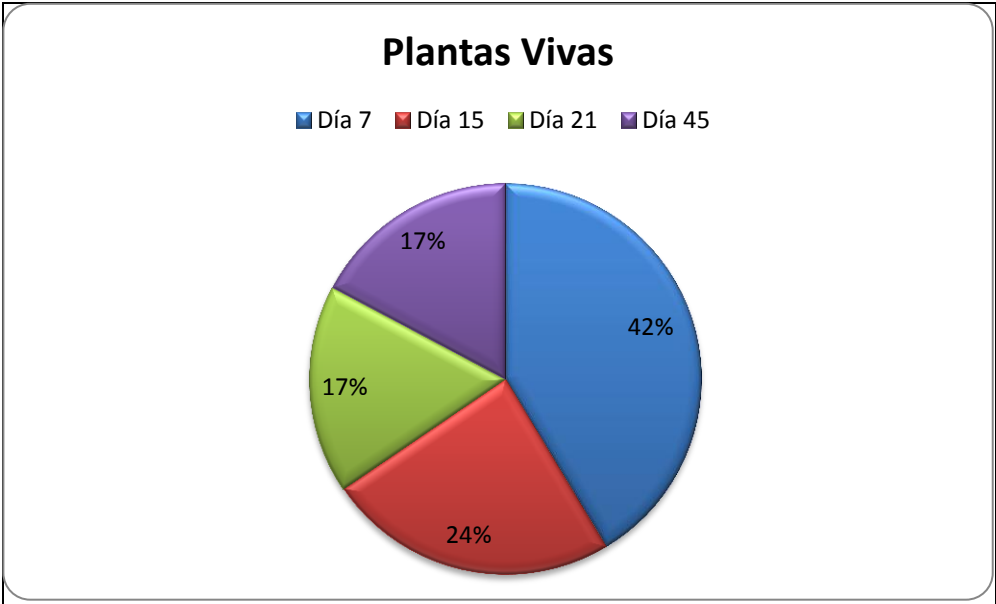
4.1.1 Primer tratamiento

El primer tratamiento muestra un comportamiento con una tendencia, de que, en los primeros días el número de planta vivas es más alto y este decrece hasta estabilizarse, lo que se muestra en los resultados obtenidos; en los 7 primeros días se obtuvo un 42 por ciento; a los 15 días 24 por ciento y se estabiliza a los 21 y 45 días en 17 por ciento.



Gráfica 1: Supervivencia para el tratamiento MS+PPM+pH7.5

Fuente: El autor

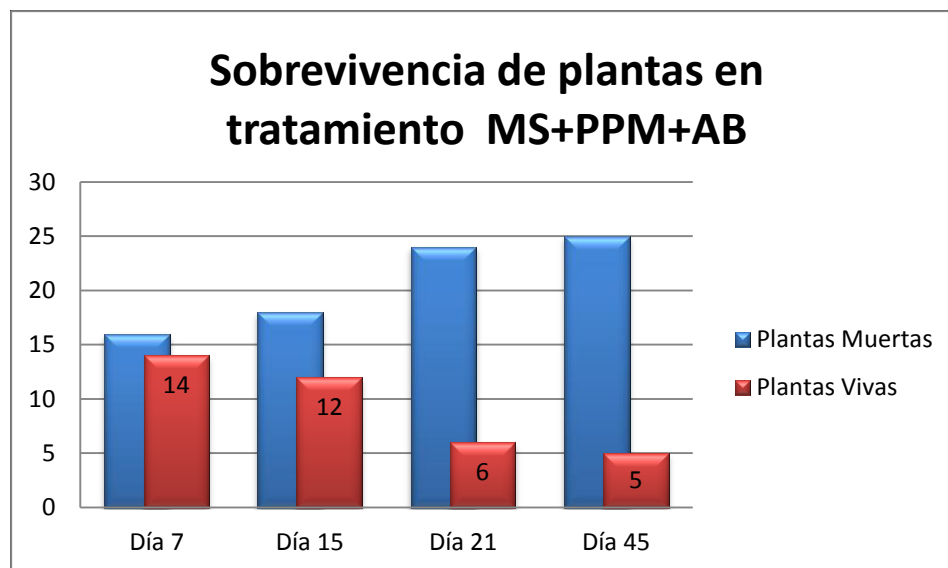


Gráfica 2: Porcentaje de plantas vivas MS+PPM+7.5

Fuente: El autor

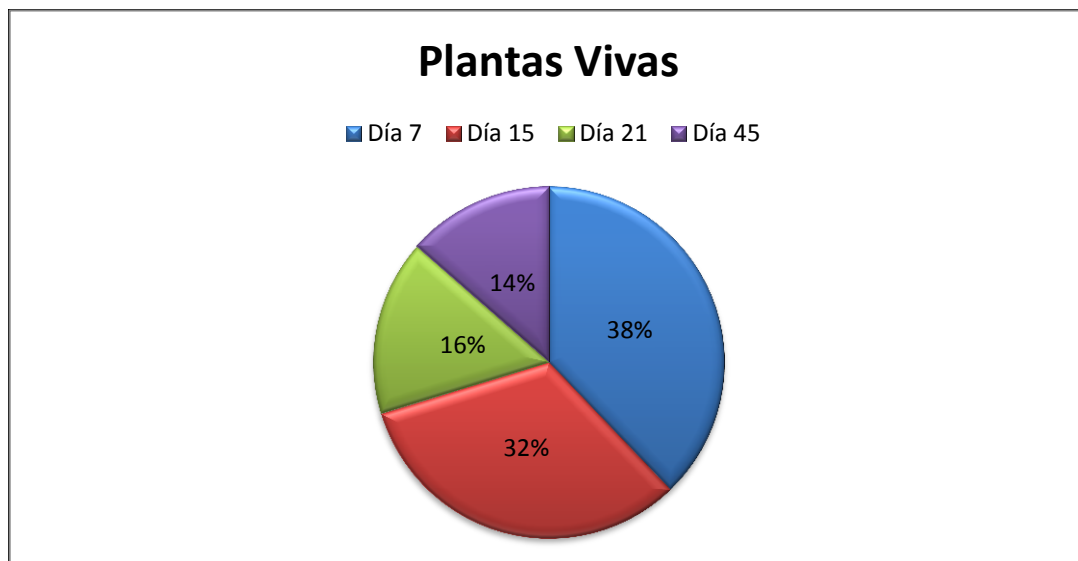
4.1.2 Segundo tratamiento

El segundo tratamiento muestra un comportamiento similar, en el primer conteo resulto 14 plantas vivas y termino con el último conteo en 5 plantas vivas. En porcentaje lo vemos de la siguiente manera: primer conteo a los 7 días: 38 por ciento; segundo conteo a los 15 días: 32 por ciento; tercer conteo a los 21 días: 16 por ciento y el último conteo a los 45 días 14 por ciento.



Gráfica 3: Número plantas vivas para el tratamiento MS+PPM+AB

Fuente: El autor

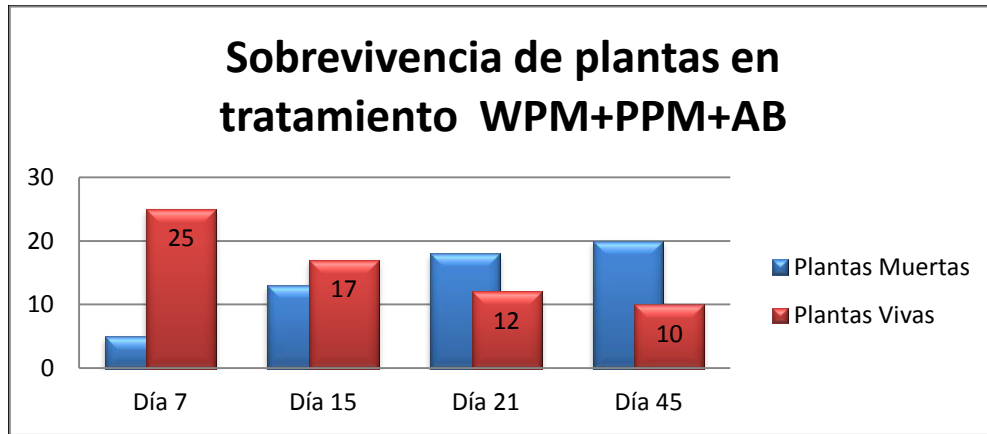


Gráfica 4: Porcentaje de plantas vivas MS+PPM+AB

Fuente: El autor

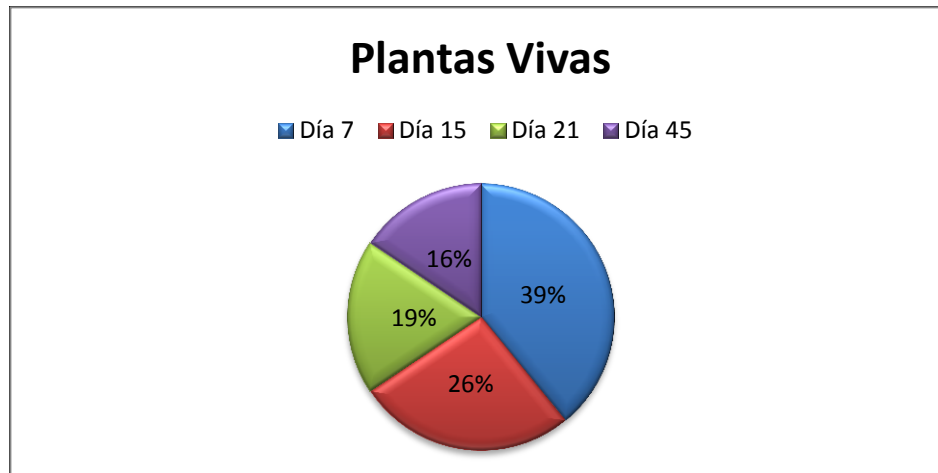
4.1.3 Tercer tratamiento

Este tratamiento muestra un mejor comportamiento que los dos tratamientos anteriores, un mayor número de planta vivas al inicio y al final del conteo. Como se muestra en los gráficos presentados para la sobrevivencia y en el cuadro de porcentajes, el cual finaliza con un 16 por ciento de plantas vivas al último conteo.



Gráfica 5: Número plantas vivas para el tratamiento WPM+PPM+AB

Fuente: El autor



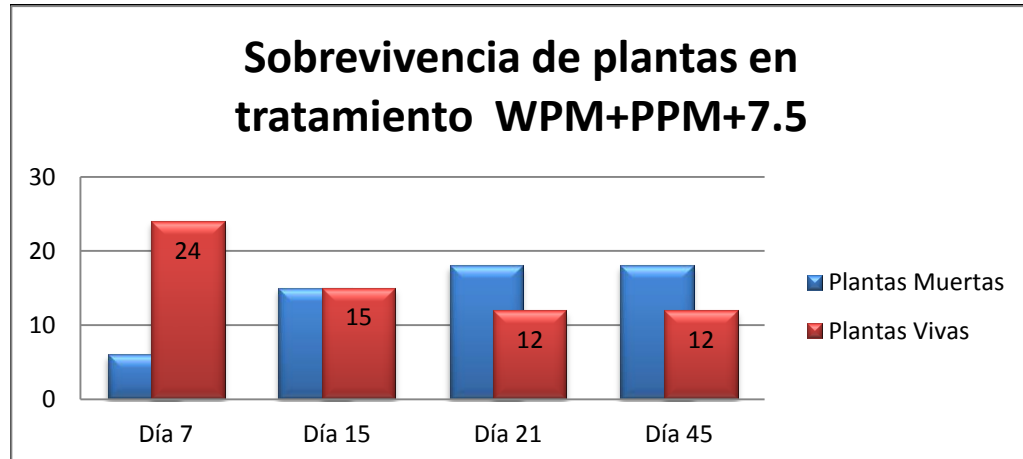
Gráfica 6: Porcentaje de plantas vivas WPM+PPM+AB

Fuente: El autor

4.1.4 Cuarto tratamiento

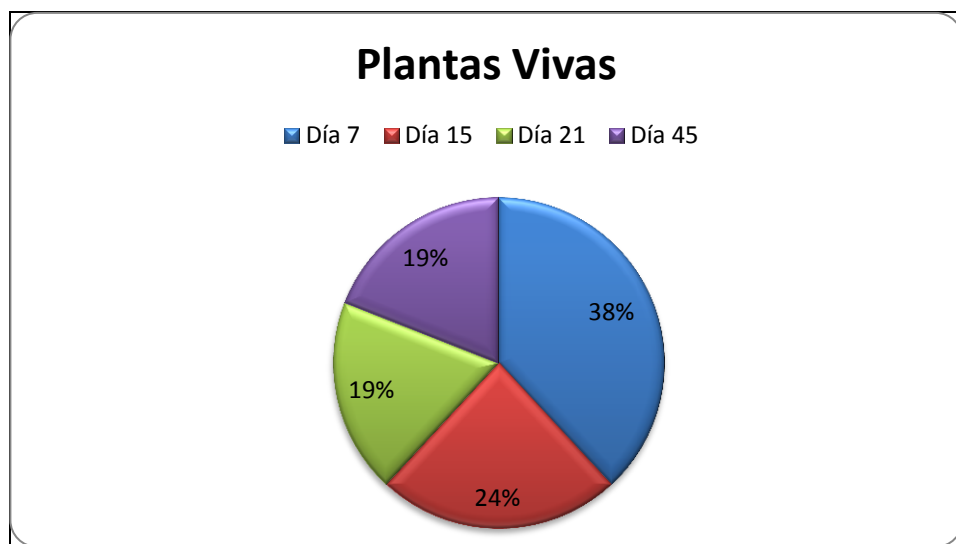
Este tratamiento muestra el mejor comportamiento de todos, ya que se estabiliza a los 21 días la cantidad de sobrevivencia. Inicia con un buen

porcentaje de plantas vivas (38%) y finaliza con el mejor porcentaje de planta vivas con un 19 por ciento.



Gráfica 7: Número plantas vivas para el tratamiento WPM+PPM+7.5

Fuente: El autor

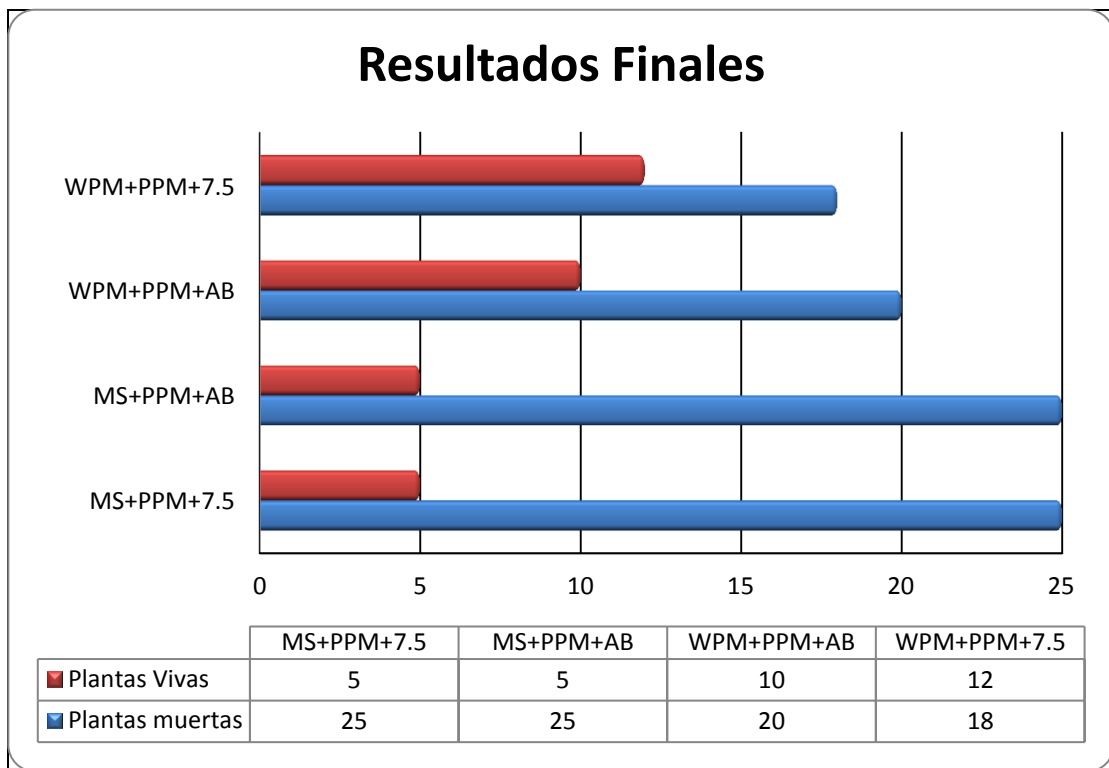


Gráfica 8: Porcentaje de plantas vivas para el tratamiento WPM+PPM+7.5

Fuente: El autor

4.1.5 Resultados del análisis CATMOD para la sobrevivencia de las plantas vivas en los días críticos

El análisis realizado revelo que el cuarto tratamiento: Lloyd & McCown (1981) + PPM 3ml l⁻¹ + Medio de cultivo a un pH de 7.5 (abreviado WPM+PPM+7.5) resulto con mayor número de plantas establecidas al final de la etapa de establecimiento, lo que muestra, que puede ser un método de reproducción de Mussaenda.



Gráfica 9: Total de plantas vivas luego del establecimiento.
Fuente: El autor

4.2 Análisis del efecto del pH en los medios de cultivos

El pH en los tratamientos uno y cuatro fue de 7.5 y en los tratamientos dos y tres de 5.8. El pH de 5.8 es de uso común en el laboratorio en los medios de cultivo; el pH de 7.5 es el experimental con el fin de observar si el pH fue un factor determinante en el porcentaje de sobrevivencia.

Para el análisis también se tomaron los datos a los días 7, 15, 21 y 45; se realizó el análisis chi-cuadrado por medio del programa CATMOD en un análisis de datos categóricos, se determinó que para el pH de los medios de cultivos y la sobrevivencia no existe una varianza significativa entre ellos. ($P < 0.3816$).

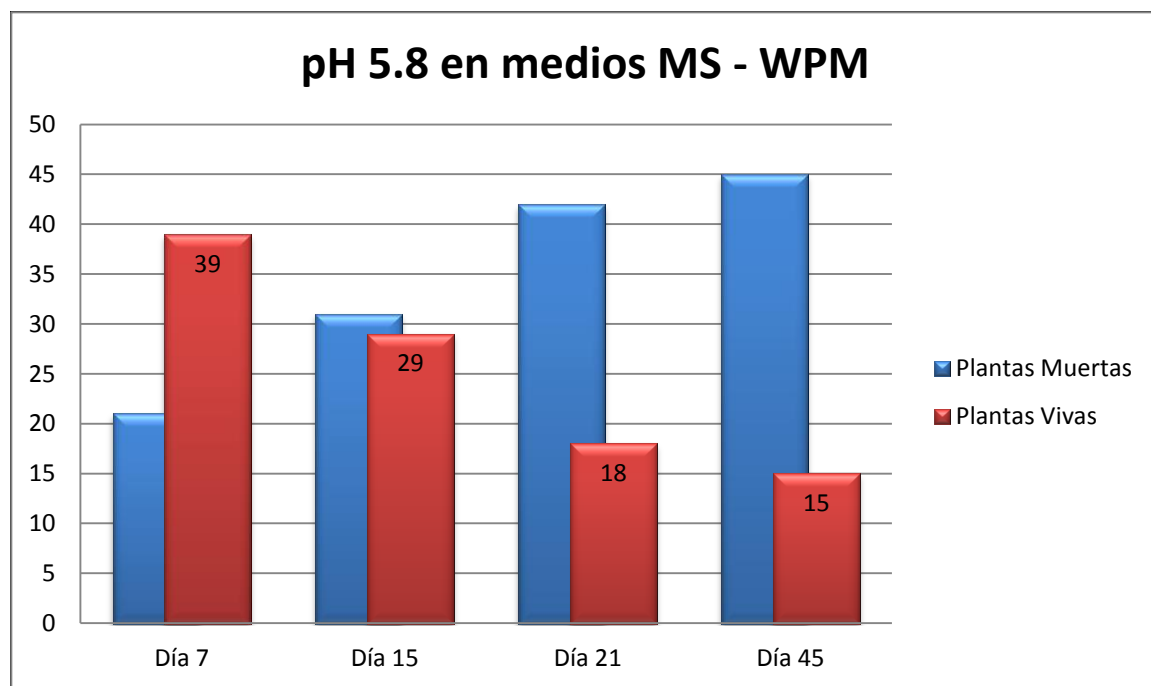
Cuadro VI: RESULTADOS DEL ANÁLISIS CHI-CUADRADO PARA pH 5.8 VS 7.5 LOS DÍAS 7, 15, 21, 45

Fuente	Grado de Libertad	Chi-cuadrado	Pr>Chi-cuadrado
Intercepto	1	18.75	<.0001
pH	1	0.77	<0.3816
Día	3	38.29	<.0001

Fuente: El autor

4.2.1 Resultados del análisis para el efecto del pH 5.8 sobre la sobrevivencia

Los tratamientos analizados fueron: tratamiento dos (Murashige & Skoog (1962) + PPM 3ml l⁻¹ + kanamicina 40mg l⁻¹ y Erytromicina 40mg l⁻¹) y tratamiento tres (Lloyd & McCown (1981) + PPM 3ml l⁻¹ + + Kanamicina 40mg l⁻¹ y Erytromicina 40mg l⁻¹); ambos sin modificación de su pH, donde se valoró la sobrevivencia de plantas en los medios de cultivo, donde se sumó todas las plantas vivas en los dos tratamientos.

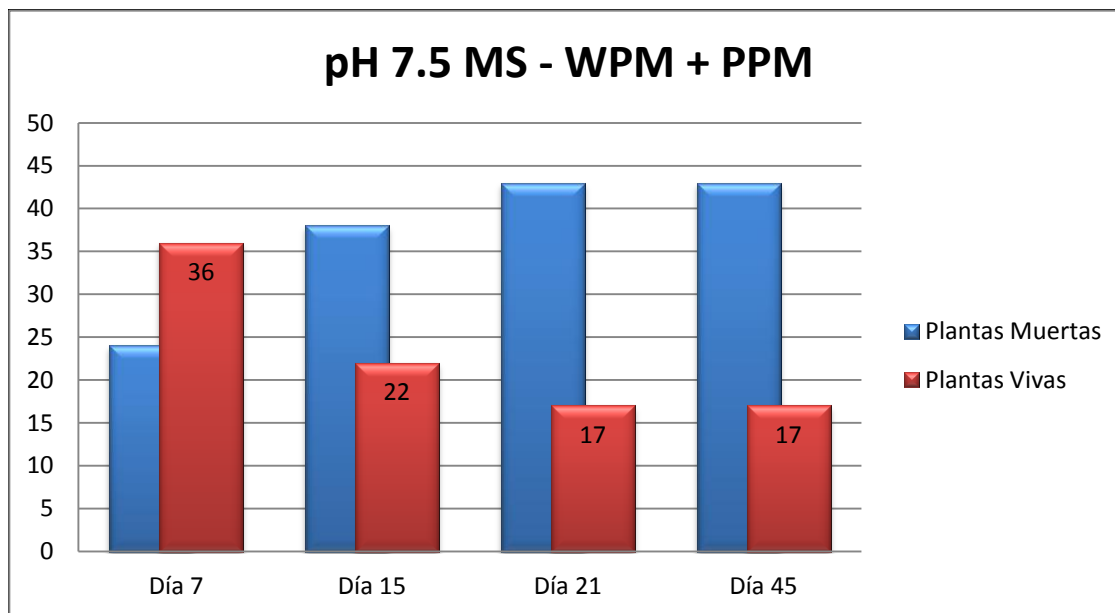


Gráfica 10: Número de plantas establecidas en medios de cultivos con pH 5.8 a los 7,15, 21 y 45 días

Fuente: El autor

4.2.2 Resultados del análisis para el efecto del pH 7.5 sobre la sobrevivencia

Los tratamientos analizados fueron: tratamiento uno (Murashige & Skoog (1962) + PPM 3ml l⁻¹ + medio de cultivo a un pH de 7.5) y tratamiento cuatro (Lloyd & McCown (1981) + PPM 3ml l⁻¹ + Medio de cultivo a un pH de 7.5). Igual que el primer análisis, se sumaron todas las plantas vivas a los siete, quince, veintiuno y cuarenta y cinco días, lo que nos indica que, según el análisis de Chi cuadrado no existe una diferencia significativa entre los pH analizados.

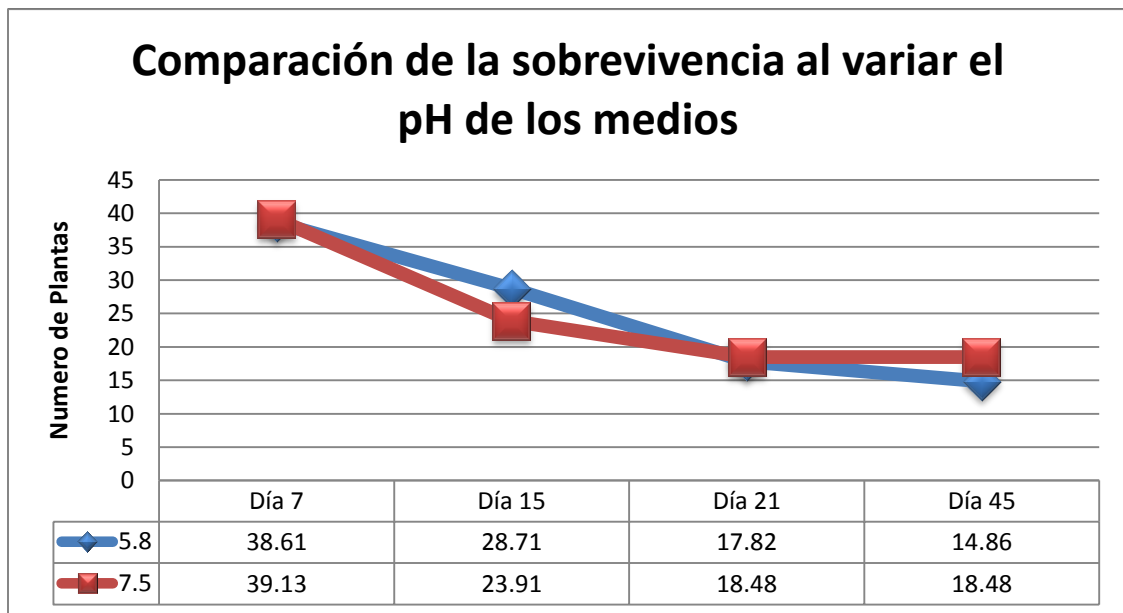


Gráfica 11: Número de sobrevivencia de plantas con pH 7.5 a los 7, 15, 21 y 45 días

Fuente: El autor

4.2.3 Resultado final de análisis del efecto del pH en la sobrevivencia de las explantes

En cuanto a esta variable el análisis determino que no hubo un efecto significativo entre ellos (0.3816), se mantuvo uniformidad entre ellos. Los resultados se muestran en forma de gráfica lineal.



Gráfica 12: Porcentajes de plantas vivas por pH a los 7, 15, 21 y 45 días

Fuente: El autor.

4.3 Análisis del efecto de los medios de cultivos MS vs WPM en la sobrevivencia de las plantas.

Se analizaron los medios de cultivos Murashige & Skoog (1962) y Woody Plant Medium de Lloyd & McCown (1981), en busca de cuál de ellos fuese más eficiente para el establecimiento de *Mussaenda in vitro*.

Se realizó el análisis Chi-cuadrado, por medio del programa CATMOD en un análisis de datos categóricos, determino que entre los medios de cultivos MS y WPM existe una varianza significativa entre ellos. (<.0001)

CUADRO VII: RESULTADOS DEL ANÁLISIS CHI-CUADRADO PARA LA SOBREVIVENCIA DE PLANTAS EN LOS MEDIOS DE CULTIVOS MS Y WPM EN LOS DÍAS 7, 15, 21, 45.

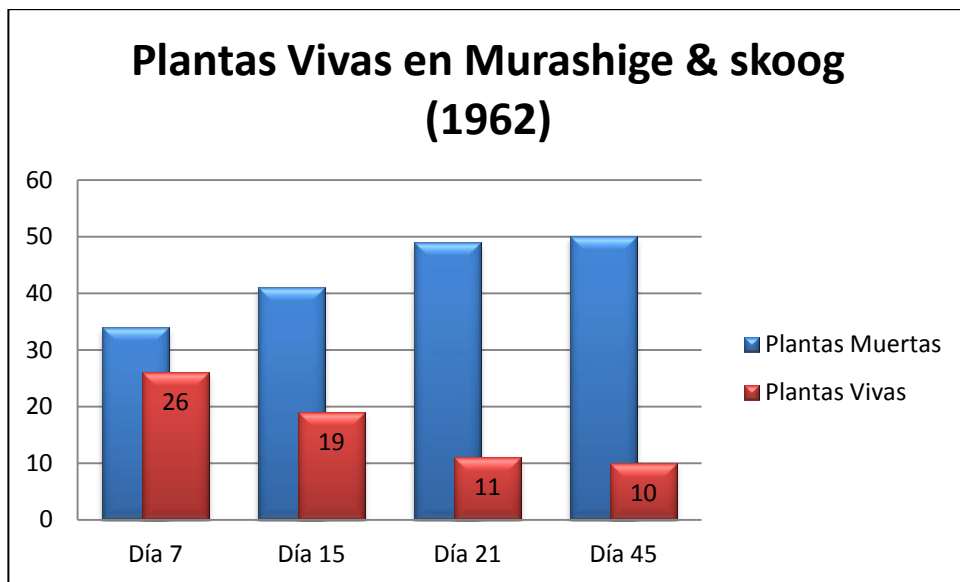
Fuente	Grados de libertad	Chi-cuadrado	Pr>Chi-cuadrado
Intercepto	1	20.12	<.0001
Medio cultivo	1	33.77	<.0001
Día	3	40.52	<.0001

Fuente: El autor

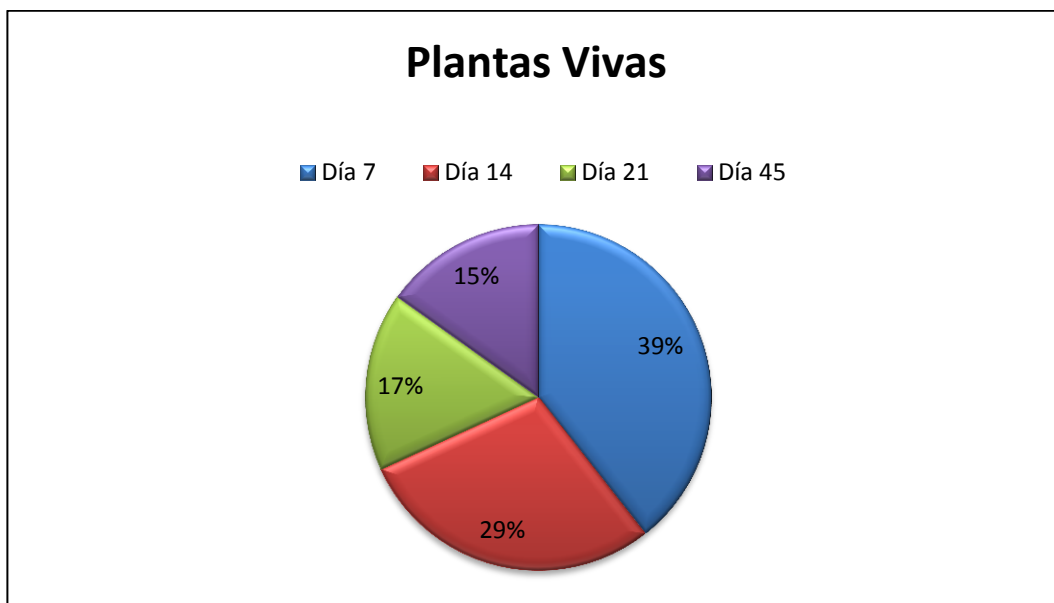
4.3.1 Medio de cultivo Murashige & Skoog (1962)

Los tratamientos analizados fueron: tratamiento uno (Murashige & Skoog (1962) + PPM 3ml l-1 + pH a 7.5) y tratamiento dos (Murashige & Skoog (1962) + PPM 3ml l-1 + kanamicina 40mg l-1 y Erytromicina 40mg l-1); ambos Murashige & Skoog (1962), donde se valoró la sobrevivencia de plantas en los medios de cultivo.

El número de plantas establecidas al final de los 45 días fue de 10 plantas.



Gráfica 13: Establecimiento en MS
Fuente: El autor

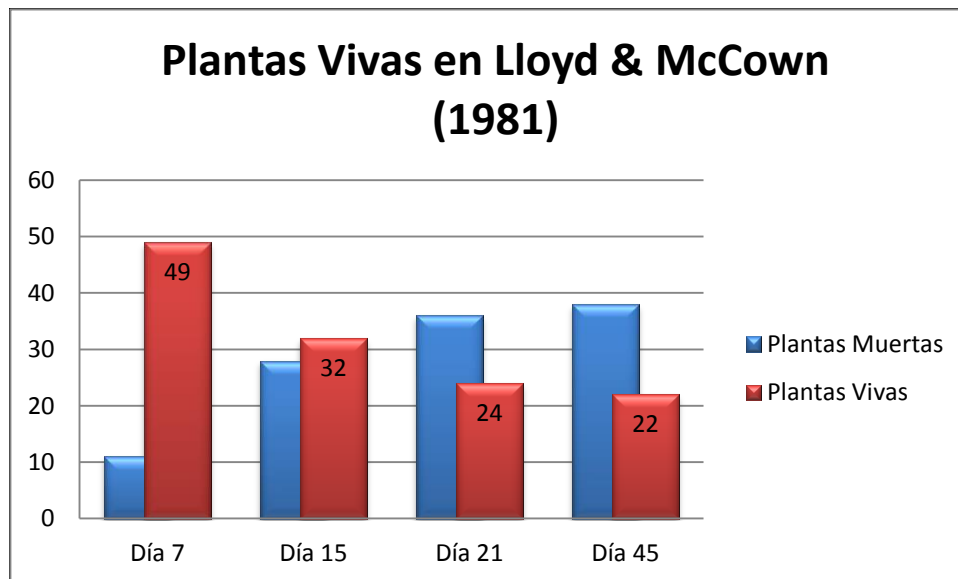


Gráfica 14: Supervivencia de plantas en el medio MS
Fuente: El autor

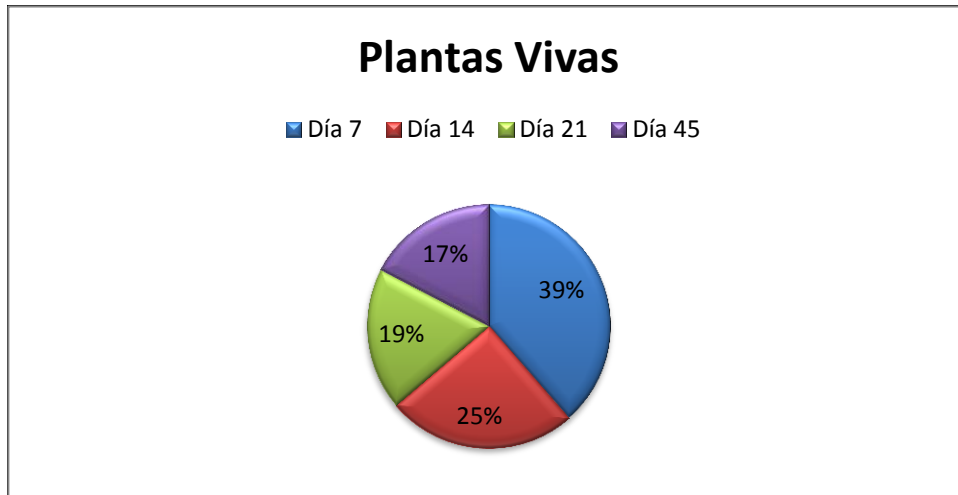
4.3.2 Medio de cultivo Woody Plant Medium de Lloyd & McCown (1981)

Los tratamientos analizados fueron: tratamiento tres (Lloyd & McCown (1981) + PPM 3ml l⁻¹ + kanamicina 40mg l⁻¹ y Erytromicina 40mg l⁻¹) y tratamiento cuatro (de Lloyd & McCown (1981) + PPM 3ml l⁻¹ + pH a 7.5); ambos Lloyd & McCown (1981), se valoró la sobrevivencia de plantas en los medios de cultivo.

El número de plantas establecidas al final de los 45 días para este medio de cultivo fue de 22 plantas.



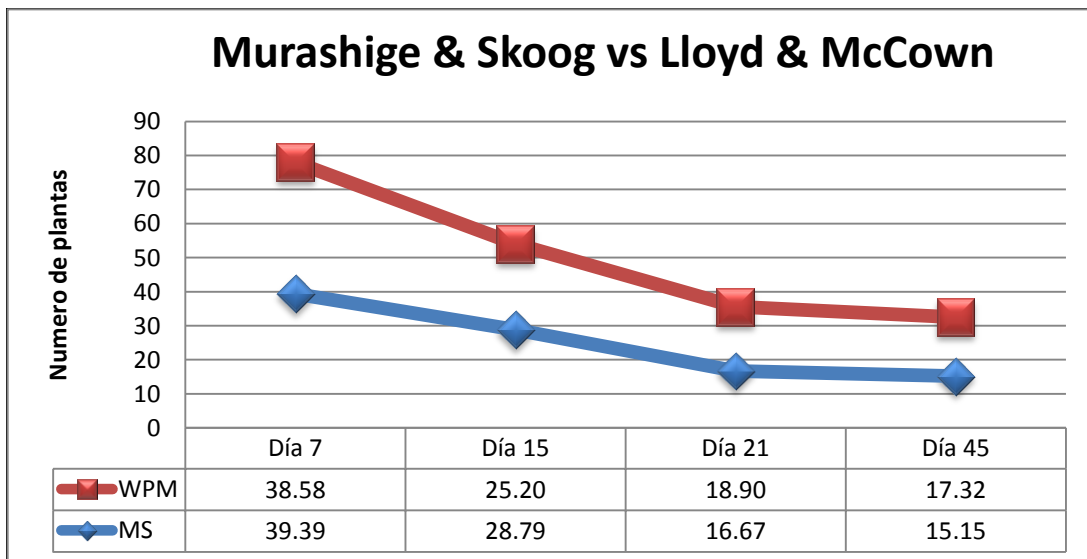
Gráfica 15: Establecimiento en WPM
Fuente: El autor



Gráfica 16: Supervivencia en el medio WPM (1981)
 Fuente: El autor

4.3.3 Resultados finales del establecimiento entre los medios MS y WPM

Los porcentajes de supervivencia en los medios MS y WPM en una gráfica comparativa.



Gráfica 17: Plantas vivas en medios de cultivos
 Fuente: El autor

5 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos bajo los tratamientos realizados en el establecimiento *in vitro* de *Mussaenda erythrophylla* tenemos las siguientes conclusiones:

De acuerdo al objetivo general, concluimos que:

Se logró desarrollar una metodología con resultados positivos para el establecimiento *in vitro* de *Mussaenda erythrophylla*, esta especie mostró una buena adaptación y resistencia a los procesos y técnicas aplicadas al establecimiento *in vitro*

De acuerdo al primer objetivo específico, concluimos que:

Al momento de valorar la efectividad del producto preservante PPM[®] solo y en combinación con antibióticos sobre la contaminación de los medios, se encontró una diferencia significativa al utilizar antibióticos y PPM[®].

De acuerdo al segundo objetivo específico, concluimos que:

En cuanto a la sobrevivencia de plantas al variar el pH en los medios de cultivo, no se obtuvo una diferencia significativa en el establecimiento *in vitro*.

De acuerdo al tercer objetivo específico, concluimos que:

Se notó una diferencia significativa en la sobrevivencia de plantas en el medio de cultivo Lloyd & McCown (1981).

El medio de cultivo tratamiento Lloyd & McCown (1981) + PPM 3ml I-1 + medio de cultivo a un pH de 7.5, obtuvo los mejores resultados dentro de los tratamientos, con un total de 22 plantas vivas.

6 RECOMENDACIONES

Producto de este ensayo, establecimiento *in vitro* de la planta *Mussaenda erythrophylla* se puede recomendar lo siguiente:

- Para la obtención de mejores explantes, se recomienda la utilización de plantas que hayan crecido en viveros, de esta forma se reduce la cantidad de contaminación endógena de los explantes.
- Al momento de reproducir la planta *Mussaenda erythrophylla* es preferible utilizar del método Lloyd & McCown (1981) + el medio preservante PPM, ya que dio la mayor cantidad de plantas vivas.
- Para un mayor prendimiento de los implantes utilizar partes de la planta jóvenes, partes de la planta muy nuevas no soportan el proceso de desinfección y las partes más viejas tienden a contaminarse más en los medios.
- De acuerdo a nuestra experiencia para este tipo de planta, y su mejor desinfección de los implantes, sumergirlas solo por veinte segundos en alcohol al 70%, ya que por más tiempo los implantes se debilitan y pierden vigor y se encuentran más plantas muertas.
- Se recomienda utilizar esta metodología como punto de partida para nuevas variantes y modificaciones a nuevas metodologías de establecimiento y obtener mejores resultados de plantas vivas. También el de establecer ensayos con diseños factoriales para obtener mejores resultados.

7 LITERATURA CONSULTADA

BLANCO, M y VALVERDE, R; 2004. **Micropropagación de *Philodendron corcovadense***. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Pág. 39-46.

CASTILLO, ALICIA; 2004. **Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo**. Unidad de Biotecnología, INIA. Uruguay.

CALDERON, J; CHACON, M Y LOPEZ, K; 2012. **Estadísticas de comercio exterior de Costa Rica 2011**. PROCOMER. Costa Rica. Pág. 68

CRAMER, C. S Y BRIDGEN, M. 1998. **Growth regulator effects on plant height of potted *Mussaenda* 'Queen Sirikit'**. HortScience, USA. Revista 33. Pág. 78-81

CORADO, EDWIN. 2012. **Guía práctica de cultivo y cuidado de plantas ornamentales y su comercialización, para mejorar las condiciones de vida de los habitantes de la aldea El jícaro Yupiltepeque, Jutiapa**. Guatemala. Pág. 32

KALIN, M; y G, ASSAF; (1999). **PPM Plant Preservative Mixture. Plant cell technology's new preservative biocide**. USA. Pág 3-6

JIMÉNEZ, E. (1998) **Generalidades del cultivo in vitro**. En: Pérez JN. (eds). **Propagación y Mejora genética de plantas por Biotecnología**. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba, Pág. 13 - 24.

JIMÉNEZ, VM (2001) Review, **Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones**. Sociedad de Brasileira de Fisiología Vegetal, 13 (2) Pág. 196 - 223.

MURASHIGE, T. 1974. **Plant propagation through tissue cultures**. Ann. Rev. Plant Physiology. 25:135-166.

MURASHIGE, T AND SKOOG. F.(1962). **A Revised Médium for Rapad growth and Bioassays With Tabacco Tissue Cultures**. Physiol. Plant. Pág. 473-497

PARROTT, W (2002) **La embriogénesis somática en las angiospermas**. VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara, Cuba, Pág. 7 - 15.

SANTANGELO, E (2000) **Efforts in *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus vulgaris* multiple shoots induction**. Hannover, Alemania. Pág. 20-21

SLACK, J. (2001). **Essential developmental biology**. Blackwell science Ltd. Reinos Unidos. 2001

SILVA, B.; CAÑON, J. (2002). **Análisis de variables categóricas mediante el procedimiento CATMOD**. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria. España. 2002.

VILLALOBOS, V.M. Y THORPE, T.A. 1991. **Micropropagación: conceptos, metodología y resultados**. En: **Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones**. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical). Pág. 127-141.

7.1 DE INTERNET

Mussaenda erythrophylla fuente consultada referente a la planta y disponible en:

_____. (En línea) Cultivo de tejidos. Artículo de Wikipedia.com consultado el 22 de abril de 2013. Disponible en http://es.wikipedia.org/wiki/Cultivo_de_tejidos.com

_____. (En línea) Phottomazza, Francia 1999. Dr. Guiseppe Mazza journalist scientific photographer. Procedencia de *Mussaenda erythrophylla* Consultado 2 enero 2013. Disponible en <http://www.photomazza.com/?Mussaenda-erythrophylla&lang=es>

_____. (En línea) *Mussaenda erythrophylla*. Wikipedia, enciclopedia libre. Consultado 2 enero 2013. Disponible en http://es.wikipedia.org/wiki/Mussaenda_erythrophylla

_____. (En línea) IDIAP (2013). Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. Disponible en: <http://www.idiap.gob.pa/>