



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 1

Neiva, 28, 05

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

El suscrito: MIGUEL ANGEL BARBOSA VINASCO, con C.C. No. 10 81 415 056. Autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado o titulado ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLO DE MICROPROPAGACION *IN-VITRO* DE LA ARRACACHA (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) EN EL LABORATORIO DE PROTECCIÓN DE PLANTAS DE LA UNIVERSIDAD DEL TOLIMA.

Presentado y aprobado en el año ____2019__ como requisito para optar al título de:

INGENIERO_AGRÍCOLA,

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales "open access" y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma:

Vigilada Mineducación



TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLO DE MICROPROPAGACION *IN-VITRO* DE LA ARRACACHA (*Arracacia xanthorriza* Bancroft) EN EL LABORATORIO DE PROTECCIÓN DE PLANTAS DE LA UNIVERSIDAD DEL TOLIMA.

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Barbosa Vinasco	Miguel Angel

DIRECTOR:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Perdomo Medina	Damaris

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Ingeniero Agrícola

FACULTAD: Ingeniería

PROGRAMA O POSGRADO: Ingeniería Agrícola

CIUDAD: Neiva

AÑO DE PRESENTACIÓN: 2019

NÚMERO DE PÁGINAS: 29 → 52

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas___ Fotografías_x_ Grabaciones en discos___ Ilustraciones en general_x_ Grabados___
Láminas___ Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___ Retratos___ Sin ilustraciones___
Tablas o Cuadros_x_

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

Vigilada mieducación



The arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* B.) is a species of the family Apiaceae, native to the Andean ecoregion, it is a root-storage plant that has become an outstanding food, easily digestible and of great importance due to its food composition, so that it is a species with immense potential on which important research works can be projected from its establishment and in-vitro propagation. The present work is the purpose of establishing an aseptic protocol for the micropropagation of the plant species from the determination of optimal percentages of sodium hypochlorite (NaClO), and parameters in order to introduce the species *A. xanthorrhiza* in the germplasm bank of the Plant Protection Laboratory of the University of Tolima. Once the aseptic protocol was started, the *A. xanthorrhiza* tissue was immersed in 70% alcohol for 1 minute, then the plant tissue was manipulated with tweezers for a rinse in distilled water, after immersing the explant in a solution with the fungicide. Mancozeb at 20% for an estimated time between 5 and 10 minutes, a rinse was induced again in distilled water and a brief drying with sterilized absorbent towels, the vegetable tissue was immersed in 2 different times (5 and 10 minutes), in Hypochlorite Sodium (NaClO) at concentrations 2 and 3%.

APROBACION DE TRABAJO

Nombre Directora de Pasantía:

Firma: Dama W Perdomo M.

Nombre Jurado: Clavdia Milena Amorocho Cruz

Firma: Clavdia Amorocho Cruz

Nombre Jurado: Sonia Echeverry

Firma: Sonia Echeverry

**LABORATORIO DE PROTECCIÓN DE PLANTAS (LPP)
UNIVERSIDAD DEL TOLIMA**



MIGUEL ÁNGEL BARBOSA VINASCO



**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA ING. AGRÍCOLA
SEMESTRE A-2019
SEDE – LA PLATA**

**ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLO DE MICROPROPAGACION *IN-VITRO*
DE LA ARRACACHA (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) EN EL LABORATORIO
DE PROTECCIÓN DE PLANTAS DE LA UNIVERSIDAD DEL TOLIMA.**

Por:

MIGUEL ANGEL BARBOSA VINASCO
Estudiante de Ingeniería Agrícola
Código: 20131120103

Presentado a:

Docente: DAMARIS PERDOMO MEDINA
Directora de pasantía

Trabajo presentado como requisito parcial de grado

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRÍCOLA
SEMESTRE A-2019

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	13
1. MARCO TEÓRICO	15
1.1 Perfil de la entidad	15
1.2 Propagación de especie vegetal (<i>A. xanthorriza</i> B.)	15
1.3 Antecedentes	16
1.4 Arracacha (<i>Arracacia xanthorriza</i> Bancroft)	17
1.5 Reguladores de Crecimiento	18
1.6 Cultivo in vitro de especies vegetales	19
1.7 Aplicación	19
1.8 Agentes desinfectantes	19
2. METODOLOGÍA	21
2.1 Ubicación del área de trabajo	21
2.1.1 Áreas de trabajo en el laboratorio (LPP)	22
2.2 Desinfección de material en el proceso de autoclave para la esterilización a partir de presión y calor húmedo	23
2.3 Fases para el establecimiento <i>in-vitro</i>	24
2.3.1 Fase 1: Generalidades, composición y preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog	24
2.3.2 Fase 2: Recolección y asepsia del material vegetal <i>A. xanthorriza</i>	26
2.3.3 Fase 3: Introducción a la cámara para siembra en los medios Murashige y Skoog de la especie <i>A. xanthorriza</i>	30
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
3.1 Tratamientos de desinfección y medio de cultivo Murashige y Skoog	32
3.2 Tratamientos óptimos establecidos	34
3.3 Estado final del tejido establecido en el banco de germoplasma del LPP. ...	35
4. CONCLUSIONES	38
5. RECOMENDACIONES	39
6. BIBLIOGRAFÍA	40
ANEXOS	44

Anexo A. Evidencias de actividades desarrolladas durante la pasantía supervisada.....	44
Anexo B. Equipos utilizados en el proyecto	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de especie <i>A. xanthorriza</i> B.	17
Tabla 2. Tipos y condiciones de esterilización de material de medios de cultivo del LPP. ¡Error! Marcador no definido. 1	
Tabla 3. Composición y preparación de soluciones stock.....	23
Tabla 4. Tratamientos realizados inicialmente para la desinfección del tejido vegetal de la especie <i>A. xanthorriza</i>	29
Tabla 5. Tratamiento optimizado para el desarrollo adecuado de la especie <i>A. xanthorriza</i> en condiciones <i>in-vitro</i>	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. “Arracacha” <i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancroft....	¡Error! Marcador no definido.	6
Figura 2. Ubicación geográfica del proyecto		189
Figura 3. Invernadero LPP	¡Error! Marcador no definido.	
Figura 4. Riego <i>Arracacia xanthorrhiza</i> B.....	¡Error! Marcador no definido.	
Figura 5. Cuarto de siembra <i>in-vitro</i>		220
Figura 6. Cuarto de control y monitoreo de especies		220
Figura 7. Preparación de medios		22
Figura 8. Explante de <i>A. xanthorrhiza</i> a sembrar		22
Figura 9. Sustancias empleadas para la asepsia <i>A. xanthorrhiza</i>	¡Error! Marcador no definido.	26
Figura 10. Cámara de flujo laminar.....		27
Figura 11. Flameado con alcohol al 96%		27
Figura 12. Limpieza minuciosa y secado de material vegetal.....	¡Error! Marcador no definido.	8
Figura 13. Siembra en medios de cultivo de la especie <i>A. xanthorrhiza</i>		29
Figura 14. Tipos de contaminación y pérdida de material <i>A. xanthorrhiza</i>		30
Figura 15. <i>A. xanthorrhiza</i> en el banco de germoplasma del LPP		301
Figura 16. Fase callogénica de la <i>A. xanthorrhiza</i>		34

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Evidencias de actividades desarrolladas durante la pasantía supervisada	44
Anexo B. Equipos utilizados en el proyecto	50

DEDICATORIA

Dedico este trabajo primordialmente a Dios, por haberme dado la vida y permitirme llegar hasta esta instancia de mi formación profesional. A mi madre y padre, por guiarme con su cariño y apoyo incondicional manifestándose de esa forma que es más grande el amor que me brindan que cualquier diferencia a la que nos podamos enfrentar.

A mi hermano por ayudarme a salir adelante en momentos difíciles y estar junto a mí brindándome su apoyo. A mi hermana menor por ser mi adoración y hacerme sentir su sincero cariño y compañía en los buenos y malos momentos. A mi hermana mayor, porque a pesar de la distancia física es un ejemplo para salir adelante y una mujer a la que admiro inmensamente por la fortaleza y nobleza de su corazón.

A mi compañera sentimental, porque no me deja desfallecer en los momentos difíciles y se ha convertido en una gran fuente de inspiración para salir adelante tanto personal como profesionalmente y de su mano cumplir honorables metas y objetivos.

Miguel Ángel Barbosa Vinasco

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a Dios por protegerme durante todo mi camino y darme fuerzas para superar obstáculos y dificultades encontradas hasta el día de hoy en mi vida.

A la directora de este proyecto de pasantía académica, docente Damaris Perdomo Medina, por la dirección y apoyo que ha brindado a este trabajo que ha facilitado la complementación del mismo, gracias por la confianza desde que iniciamos este proyecto.

Para estructurar un trabajo como este se genera del fruto de ideas, proyectos y esfuerzos previos que corresponden a otras personas. En este caso mi más sincero agradecimiento al ingeniero Iván Darío Loaiza. Mi agradecimiento a la Dra. Hilda Rocío Mosquera, de la Universidad del Tolima, por la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Protección de Plantas y por facilitarme el equipo y conocimiento para llevar a cabo este trabajo.

Gracias a mi familia, por su cariño, solidaridad y por el aliento que me dan para seguir con nuevos proyectos cada día.

...Muchas Gracias

RESUMEN

El presente documento plasma un protocolo para el establecimiento y micropropagación de la especie de arracacha (*Arracacha xanthorrhiza* Bancroft), en condiciones *in-vitro*, protocolo que es producto de la pasantía realizada en el Laboratorio de Protección de Plantas (LPP), de la Universidad del Tolima en la ciudad de Ibagué Colombia en el semestre 2018A y parte del 2018 B. La estructuración del proyecto se llevó a cabo en el LPP- área de Cultivo de Tejidos, la planta madre se obtuvo del municipio de Cajamarca/Tolima y de sus colinos se tuvieron diferentes macetas germinando la especie en el área de invernación del laboratorio, se trabajó específicamente con segmentos de la hoja de dicha planta.

El establecimiento del protocolo consistió en determinar específicamente porcentajes óptimos de hipoclorito de sodio (NaClO), y los parámetros en consecución para introducir la especie *A. xanthorrhiza* en el banco de germoplasma del LPP. Para la desinfección del tejido fue necesario tener en cuenta que previamente se esterilizó los medios de cultivo para la siembra del tejido vegetal; el explante se tuvo en ambientes adecuados y se desinfectó superficialmente para liberarlos de microorganismos exógenos.

Una vez se inició el protocolo aséptico se sumergió el tejido de *A. xanthorrhiza* en alcohol al 70% durante 1 minuto, posteriormente se manipuló el tejido vegetal con pinzas para un enjuague en agua destilada, después de sumergir el explante en una solución con el fungicida Mancozeb al 20% durante un tiempo estimado entre 5 y 10 minutos, se indujo un enjuague nuevamente en agua destilada y un breve secado con toallas absorbentes esterilizadas, se sumergió el tejido vegetal en 2 tiempos diferentes (5 y 10 minutos), en Hipoclorito de Sodio (NaClO) a las concentraciones 2 y 3 %, además 3 enjuagues en Tween-20 y 3 enjuagues más en agua destilada secando delicadamente el explante con copos de algodón. Enseguida se realizó el protocolo de asepsia donde se siembran cuidadosamente los diferentes segmentos en los medios indicados; medios Murashige y Skoog (MS), reguladores de

crecimiento, auxinas y citosinas (Kinetina, ácido naftilacético “ANA”, la citocinina bencilaminopurina “BAP”). En cada Medio se sembraron entre 3 y 4 tejidos de la especie *A. xanthorrhiza*.

El desarrollo de este proyecto dentro de las actividades de la pasantía para establecer el protocolo de micropropagación de la especie *A. xanthorrhiza* demandó realizar numerosas siembras, variando específicamente las concentraciones de NaClO que fueron del 2 y 3% y los tiempos de 5 y 10 minutos, lo cual sería óptimo para el establecimiento de dicha especie en condiciones *in-vitro* y así se llevaría a cabo los objetivos específicos de este proyecto.

ABSTRACT

The present document expresses a protocol for the establishment and micropropagation of the arracacha species (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft), *in-vitro* conditions, protocol that is the product of the internship carried out in the Plant Protection Laboratory (LPP), of the University of Tolima in the city of Ibagué Colombia. The structuring of the project was carried out in the LPP- Tissue Cultivation area, the mother plant was obtained from the municipality of Cajamarca / Tolima and from its colines different pots were germinated, germinating the species in the wintering area of the laboratory, and worked specifically with segments of the leaf of said seedling.

The establishment of the protocol consists of specifically determining optimal percentages of sodium hypochlorite (NaClO), and the parameters to achieve the introduction of the species *A. xanthorrhiza* in the germplasm bank of the LPP. For the disinfection of the tissue it was necessary to take into account that the culture media were previously sterilized to plant the plant tissue; the explant was taken in suitable environments and superficially disinfected to release them from exogenous microorganisms.

Once the aseptic protocol was started, the tissue of *A. xanthorriza* was immersed in 70% alcohol for 1 min, then the plant tissue was manipulated with tweezers for a rinse in distilled water, after immersing the explant in a solution with the fungicide. Mancozeb at 20% for an estimated time between 5 and 10 min, a rinse was induced again in distilled water and a brief drying with sterilized absorbent towels, the vegetable tissue was immersed in 2 different

times (5 and 10 min), in Sodium Hypochlorite (NaClO) at concentrations 2 and 3%, plus 3 rinses in Tween-20 and 3 more rinses in distilled water, gently drying the explant with cotton wool. After the asepsis protocol was performed, the different segments were carefully sown in the indicated means; Murashige and Skoog Means + Auxin and Cytosine Growth Regulators (Kinetin, Naphthylacetic Acid "ANA", Cytokinin Benzylaminopurine "BAP"). In each medium, between 3 and 4 tissues of the species *A. xanthorriza*.

The development of this project within the activities of the internship to establish the micropropagation protocol of the species *A. xanthorriza* demanded numerous plantings, varying specifically in NaClO concentrations that were 2 and 3% and those of 5 and 10 minutes, which would be optimal for the establishment of said species under in-vitro conditions and thus the specific objectives of this project would be carried out.

INTRODUCCIÓN

La arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft), al ser una planta de raíces reservantes comestibles que a pesar de ser originaria de Sudamérica se ha extendido a otras regiones del continente americano y del mundo, convirtiéndose en un alimento destacado especialmente para aquellas poblaciones de países en vía de desarrollo como lo menciona Hermann (1997), por tanto es una especie con un inmenso potencial sobre el cual se pueden proyectar importantes trabajos de investigación a partir de su establecimiento y propagación *in-vitro*.

En el proceso de enseñanza-aprendizaje de las diferentes ramas de la ingeniería agrícola, la vinculación teoría-práctica es un aspecto prioritario, premisa que repercute en áreas como el desarrollo de la agricultura, cultivo *in-vitro* de tejido vegetal y micropropagación de especies de interés agrícola en general. Se eligió trabajar como proyecto dentro de la pasantía con la especie de *A. xanthorrhiza* Bancroft, debido a que es una de las especies nativas de la ecoregión Andina; siendo cultivada en Chile, Perú, Ecuador, Bolivia, Venezuela, Colombia; la *A. xanthorrhiza* perteneciente a la familia Apiaceae (Umbelliferae) (Mabberley, 1993).

El propósito del trabajo realizado se basa en establecer los parámetros protocolarios para la micropropagación de la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) en medios de cultivo *in-vitro*, desde esterilizar tejido vegetal de la especie *A. xanthorrhiza*, a partir de diferentes aplicaciones de asepsia por medio del hipoclorito de sodio (NaClO) y (Tween-20), hasta la introducción del tejido vegetal a condiciones *in-vitro* determinando el procedimiento adecuado para el establecimiento de la especie *A. xanthorrhiza* mediante la metodología Murashige y Skoog (1962).

El documento ilustra el procedimiento llevado a cabo en el laboratorio de Protección de Plantas (LPP) de la universidad del Tolima. El LPP orienta a estudiantes pasantes en lo relacionado con la enseñanza de los conceptos y técnicas útiles

como lo son el cultivo *in vitro* de especies vegetales, montaje y adecuación de la palinoteca, identificación y diferenciación de especies polínicas, entre otras, las cuales están encaminadas a fortalecer el trabajo desarrollado en el laboratorio en las áreas de biotecnología vegetal y protección de plantas.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Perfil de la entidad

El Laboratorio de Protección de Plantas (LPP) de la Universidad del Tolima desarrolla investigación desde febrero del 2001. Se enfoca principalmente en biotecnología vegetal y ciencias básicas en las áreas de ciencias biológicas y biología general.

1.2 Propagación de especie vegetal (*A. xanthorriza* B.)

Las técnicas de propagación basadas en el cultivo de tejidos se han utilizado durante muchos años para la multiplicación del material de plantación de muchas plantas de cultivo de importancia económica, como raíces y tubérculos, flores, árboles frutales y otros. Estas técnicas de propagación están siendo estandarizadas para una variedad de plantas nativas de valor comercial (AgBioForum, 2004).

El desarrollo homogenizado de protocolos que permitan llevar a cabo experimentos propuestos, es el objetivo inicial dentro de un laboratorio de ciencias de la vida, de manera que se puedan estandarizar técnicas de investigación y con ello facilitar la visualización de los resultados esperados (Flores et al., 2009).

Amaya y Julca (2006), en la propagación por semillas mencionan que, dependiendo la época de siembra y condiciones ambientales, las plantas de arracacha florecen y producen semillas botánicas o sexuales viables. La propagación a través de las semillas botánicas indica ser promisoría en la reducción y eliminación de algunas restricciones asociadas con la propagación vegetativa, la germinación de la semilla se inicia normalmente entre los 20 y 30 días, dependiendo de la temperatura y el mejor sustrato utilizado ha sido la arena esterilizada para obtener una buena germinación, emergencia uniforme de las plántulas y reducción de patógenos.

La propagación vegetativa de la arracacha con fines comerciales se realiza a partir de los brotes que crecen en la parte aérea de la planta. Al contrario de las semillas sexuales, mantienen la uniformidad y las características del clon que las originó. Ellas no están en reposo absoluto pues ocurren modificaciones bioquímicas y morfológicas desde su origen hasta su enraizamiento y producción de una nueva planta (Amaya y Julca, 2006).

Es un alimento importante en la alimentación por la fácil digestión, por ser rica en calcio, fósforo, hierro, niacina, vitamina A, piridoxina-B6, riboflavina-B2, ácido ascórbico, proteínas, fibras y carbohidratos; características que le otorgan un potencial alimentario y económico a la arracacha (Amaya y Julca 2006).

1.3 Antecedentes

Entre las aplicaciones de la biotecnología vegetal los cultivos Andinos destacan el uso del cultivo *in vitro* de yemas y meristemas caulinares para la micropropagación, conservación y distribución de recursos genéticos de raíces y tubérculos (Mujica *et al.*, 2002).

En la literatura se encuentran investigaciones como la de Landázuri, 1996 citado por Hermann, s.f, donde se menciona el cultivo de puntas apicales y la micropropagación de arracacha usando el medio de cultivo MS suplementado con 3% de sacarosa, 5.6 ppm de BAP y 0.05 ppm de ANA. El medio de cultivo Murashige and Skoog ha sido uno de los medios de crecimiento vegetal que normalmente en la actualidad es empleado por los laboratorios para el cultivo de células vegetales. Fue inventado por los científicos de plantas Toshio Murashige y Folke K. Skoog en el año 1962 durante la búsqueda de un nuevo regulador de crecimiento para el trabajo *in vitro* con plantas.

En dos experimentos realizados en Brasil se evaluaron el efecto del BAP y las concentraciones de GA3 en el desarrollo de la arracacha *in vitro* usando el medio

Murashige y Skoog, y B5 (Gamborg, 1968) mas 0.1 mg L-1 de ANA, con ápices caulinares de 2 mm de los cultivares. Donde concluyeron que los mejores resultados se obtuvieron con medio G5 añadiendo concentraciones alrededor de 0.1 mg L-1 de ANA, 0,3 mg L-1 BAP y 0,25 mg L-1 de AG3 (Madeira, 2005).

En Venezuela un grupo de investigación trabajó en el establecimiento y multiplicación *in vitro* de cultivares de *Arracacia xanthorriza* colectados en Venezuela. El trabajo constituyó un intento por determinar las condiciones apropiadas para la micropropagación de la arracacha, para ello extrajeron a partir de cormelos, ápices caulinares de 4 mm que fueron establecidos asépticamente en diferentes medios, en los resultados observaron diferencias significativas entre los cultivares, en el número de brotes y crecimiento.

1.4 Arracacha (*Arracacia xanthorriza* Bancroft)

La arracacha es una especie de la familia Apiaceae, de ciclo perenne, que se cultiva de manera anual. La planta se compone de diferentes órganos como: los apios o raíces de almacenamiento, que son la parte comestible y de importancia para la comercialización, llegando a producir en promedio un kilogramo por planta; la cepa o tronco, colinos y hojas. (DANE, 2015)

Tabla 1. Clasificación taxonómica de especie *A. xanthorriza* Bancroft.

Clase	Magnoliopsida
Orden	Umbelales (Apiales)
Familia	Apiaceae
Género	Arracacia
Especie	<i>A. xanthorriza</i> Bancroft

Fuente: Rojas, (2006).

Figura 1. “ARRACACHA” *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. (Planta de arracacha mostrando sus raíces tuberosas y brotes utilizados en la Propagación vegetativa).



Fuente: Amaya y Julca (2006).

1.5 Reguladores de Crecimiento

De acuerdo con Hurtado y Merino, 1997, actualmente los reguladores de crecimiento están agrupadas y divididas en: Promotores de Crecimiento (auxinas, citocininas y giberelinas) Inhibidores de crecimiento (ácido abscísico) - El etileno; Los cuales se utilizarán durante el desarrollo *in-vitro* del explante obtenido de la *A. xanthorrhiza*. Ramírez (1989), Hurtado y Merino (1997), coinciden en que los reguladores de crecimiento son un conjunto de sustancias químicas y orgánicas distinto de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas.

1.6 Cultivo in vitro de especies vegetales

Los términos micropropagación, propagación in vitro y propagación por cultivo de tejidos son sinónimos que se usan para denominar procedimientos que consiste en el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células o protoplastos en un medio de cultivo artificial para lograr el desarrollo y producción de plantas completas in vitro (Barba *et al.*, 2001). El cultivo in vitro, consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, de tejidos o células cultivadas asépticamente en un tubo de ensayo o en otro recipiente, donde se puedan controlar estrictamente las condiciones del ambiente y la nutrición (Hartmann y Kester, 1995).

1.7 Aplicación

Según Roca y Espinoza (2004), las aplicaciones agrícolas de la biotecnología y el potencial en países de América Latina y el Caribe, también se enfocan en el potencial de desarrollar productos de valor agregado a partir de la diversidad biológica que alberga la región, la mayoría de las biotecnologías agrícolas implican cultivos de tejidos y marcadores basados en ADN para la conservación de germoplasma, la producción de material de siembra libre de enfermedades y la asistencia para el mejoramiento genético. Según esto existe un gran potencial para la integración de estas tecnologías con análisis químicos en biodiversidad de bioprospección aplicables a especies de interés agrícola.

1.8 Agentes desinfectantes

Existe una amplia gama de sustancias químicas utilizadas para inhibir o matar microorganismos, dentro de los principales grupos de agentes químicos antimicrobianos se encuentran:

Alcoholes (alcohol etílico): Se utilizan como desinfectantes y como antisépticos, producen precipitación y desnaturalización de proteínas, también lesionan la membrana citoplasmática. El alcohol etílico rectificado (95%) provoca gran

deshidratación en los microorganismos, de manera que impide su penetración en los mismos. Por lo tanto, las concentraciones más efectivas son las que oscilan entre el 60% y 80% en agua destilada, siendo la preparación más efectiva al 70%. Concentraciones por debajo del 50% no causan ningún efecto (Pérez *et al.*, 2011).

Detergentes: Actúan degradando las membranas citoplasmáticas. Tienen escaso poder bacteriostático. Se pueden mejorar combinándolos con desinfectantes u otras sustancias tensoactivas como laurilsulfato (Hidalgo *et al.*, 2002).

Derivados clorados: Se inactivan en presencia de materia orgánica. El cloro y derivados son agentes oxidantes. En forma de hipoclorito es utilizado para descartar material biológico (sangre, suero, parásitos, entre otros) (Pérez *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2014).

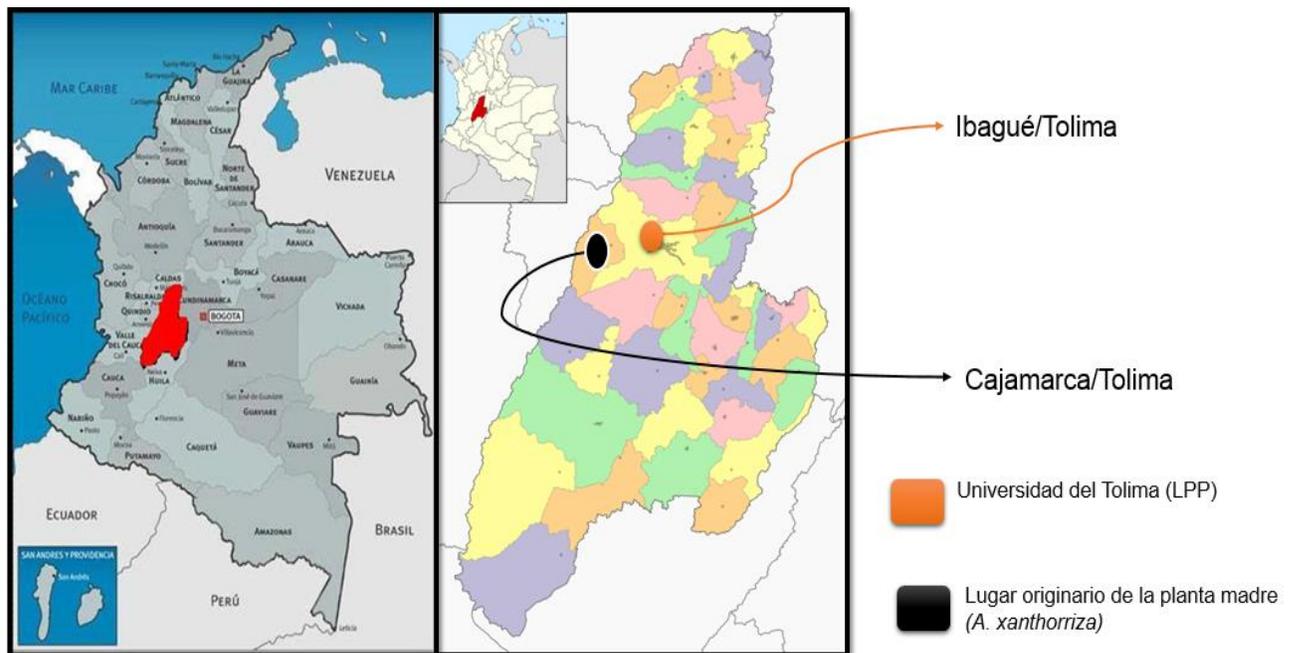
Calor húmedo: Al igual que los procesos de desinfección, la esterilización térmica destruye a los microorganismos en forma gradual; es por esto que no hay un único mecanismo de acción, sino más bien la suma de distintos eventos que se van sucediendo a medida que aumenta la temperatura. El efecto final de la esterilización por calor húmedo a 121°C es la desnaturalización y coagulación de las proteínas (Pérez *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2014).

2. METODOLOGÍA

2.1 Ubicación del área de trabajo

Las actividades de pasantía para el establecimiento del protocolo se llevaron a cabo en el Laboratorio de Protección de Plantas de la Universidad del Tolima en el área de Cultivo de Tejidos – Ibagué/Tolima; se encuentra en la ciudad de Ibagué; Dirección: Cl. 42 #1b-1, Villeta, es una institución académica de educación superior colombiana de carácter público, sujeta a inspección y vigilancia por medio de la Ley 1740 de 2014 y la ley 30 de 1992 del Ministerio de Educación de Colombia.

Figura 2. Ubicación geográfica del proyecto



Fuente: Autor

- De la planta madre originaria del municipio de Cajamarca se obtuvieron diferentes colinos de los cuales se sembraron en macetas para su desarrollo en el área de invernación del LPP, y así contar con suficiente material vegetal para su posterior trabajo experimental *in-vitro*.

2.1.1 Áreas de trabajo en el laboratorio (LPP)

El laboratorio de protección de plantas se divide esquemáticamente en áreas donde se llevan a cabo diferentes trabajos específicos. Las áreas o secciones principales son:

1. **Área de invernación.** Se utiliza principalmente para el crecimiento de las diferentes especies del banco de germoplasma establecidas en el área de cultivo de tejidos donde se trasplantan en macetas, bandejas o camas apropiadas como se ilustra a continuación (Ver Figuras 3 y 4).

Figura 3. Invernadero LPP



Figura 4. Riego *Arracacia xanthorrhiza* B.



Fuente: Autor

2. **Área de incubación.** El área de incubación o crecimiento *in-vitro* proporciona un buen control de los siguientes parámetros: temperatura (20-28°C), iluminación (variable según las necesidades: 1000 a 5000 lux) y humedad relativa (70% - 80%); en este cuarto se encuentran instalada estantería metálica apropiada con dimensiones de: ancho 0.30 m, largo de varía de acuerdo al tamaño del cuarto y altura de 1.80 a 2.20 m, (Figura 5 y 6).

Figura 5. Cuarto de siembra *in vitro*



Figura 6. Cuarto de control y monitoreo de especies



Fuente: Autor

2.2 Desinfección de material en el proceso de autoclave para la esterilización a partir de presión y calor húmedo.

El proceso de limpieza y esterilización del material de uso en el LPP, se llevó a cabo en el área de lavado, que incluye un lavadero grande con una fuente de agua potable y otra con alto grado de pureza, normalmente agua destilada. El área de esterilización tiene un espacio para la autoclave (olla a presión) marca All American que es donde se esterilizó todo el material de vidrio (ver tabla 2). El proceso de esterilización involucra agentes descontaminantes químicos y métodos físicos como se ilustra a continuación, el objetivo principal es el control de microorganismos contaminantes como bacterias y hongos principalmente; además de tejidos que cumplen su ciclo en los diferentes experimentos que se realizan en el LPP y se deben descartar.

Tabla 2. Tipos y condiciones de esterilización de material y de medios de cultivo del (LPP).

MATERIAL	TIPO DE ESTERILIZACIÓN	CONDICIONES
Medios de cultivo	Calor Húmedo en Autoclave	15 libras de Presión por 15 min
Balones, Erlenmeyer, tijeras, tubos de ensayo, tubos falcón, cajas de petri, morteros, frascos de vidrio, tubos eppendorf, punteras para micro pipeta.	Calor húmedo en autoclave	15 libras de presión a 121°C, 2-3 horas.
Material nuevo como puntas y tubos eppendorf	Calor húmedo en autoclave	15 libras de presión por 30 minutos

Fuente: Bitácora de trabajo del LPP, área Cultivo de tejidos.

Para esterilizar los materiales utilizados en la siembra del tejido se usó una presión de 15 lb durante 20 minutos; a esta presión la temperatura fue aproximadamente de 121°C, la cual sería suficiente para eliminar las formas de vida presentes. Sin embargo el calor debe penetrar en cada porción del material para llegar a cualquier organismo viable a regenerarse o espora presente.

2.3 Fases para el establecimiento *in-vitro*.

2.3.1 Fase 1: Generalidades, composición y preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog

Se eligió utilizar el medio de cultivo Murashige y Skoog el cual adquirió satisfactoriamente los nutrientes necesarios que suministraron el desarrollo del tejido sembrado en el mismo. Para la preparación de estos medios de cultivo, primero se revisaron todos los materiales, entre ellos Erlenmeyer, pipetas, frascos para medio de cultivo, láminas cubreobjetos y portaobjetos, alcohol 70%, guantes y descartadores para conocer que se encontrarán en buenas condiciones y facilitarán la preparación del medio.

Para la composición y preparación del medio se siguió la metodología de Murashige y Skoog, 1986; se agregó en un vaso de precipitado de 1 litro de volumen los siguientes elementos las sales minerales, agua destilada, agar, sacarosa; (Ver tabla 3); después, se equilibró el pH entre 5,7 – 5,8, con el pHMETRO Mesa Ph BASIC Satorius y se calentó la sustancia con una plancha con agitador magnético BOECO, hasta punto de ebullición. De esta sustancia se agregó 20 ml por frasco esterilizado previamente, se marcó el frasco con el nombre del medio y la fecha de elaboración y posteriormente se colocó en la autoclave All American para esterilizar el medio; finalmente se limpia el área de trabajo con alcohol al 70%.

El principal objetivo en la preparación del medio es suministrar los nutrimentos minerales en concentraciones adecuadas donde se deben incluir los macroelementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca, Y Mg) y los microelementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe, y Cl). A continuación se describen específicamente las cantidades de nutrimentos minerales y vitaminas que componen el medio que se utilizó:

Tabla 3: Composición y preparación de solución stock

Solución		Sales	Concentración del Stock g/L	g/500 ml	(Final) mg/L	Cantidad De Sal para 200 ml	Alícuota para 1L de medio	
Nutrientes	MACRO	A	NH ₄ NO ₃	82.5	41.25	1650	[10]	20
		B	KNO ₃	95.0	47.50	1900	[10]	20
		C	CaCl ₂ *2H ₂ O	88.0	44.00	440	[40]	5
		D	KH ₂ PO ₃	34.0	18.00	170	[40]	5
	MICRO	E	HBO ₃ NaMoO ₄ *2H ₂ O OCOC ₁₂ *6H ₂ O KI	1.24 0.05 0.005 0.166	0.62 0.025 0.002 5 0.083	0.62 0.25 0.025 0.083	[40]	5
		F	MgSO ₄ *7H ₂ O MnSO ₄ *4H ₂ O ZnSO ₄ *7H ₂ O CuSO ₄ *5H ₂ O	74.0 3.45 1.76 0.005	37.00 1.725 0.86 0.002 5	370 22.3 8.6 0.025	[40]	5
		G	Na ₂ *EDTA FeSO ₄ *7H ₂ O	7.46 5.57	3.73 2.785	37.3 27.8	[40]	5
	Tiamina			0.02	0.01	0.1	-	-
	Suplementos Nutricionales	Ac. Nicotínico	0.1	0.05	0.5	-	-	
	Piridoxina			0.1	0.05	0.5	-	-
Glicina			0.1	0.20	2.0	-	-	
Inositol			100 mg/L	50mg /L	-	-	-	
Otros Componentes	Sacarosa	30	15	-	-	-		
Agar-Agar			8	4	-	-	-	

Fuente: Bitácora de trabajo del LPP área cultivo de tejidos, *MURASHIGE Y SKOOG (1962)*.

Una vez se elaboró la solución stock, se sellaron y cubrieron con cinta milinex y papel aluminio (Ver Figura 7), luego, se esterilizaron nuevamente para tenerlos listos en cámara de flujo laminar para la respectiva siembra.

Figura 7. Preparación de medios



Fuente: Autor

Para esta actividad se trabajó en un espacio óptimo para el almacenamiento de materiales de vidrio, de plástico y de los reactivos químicos que se utilizaron. Este ambiente contó con mesones de preparación de los medios y para colocar balanzas, el medidor de pH, los frascos y demás elementos utilizados.

2.3.2 Fase 2: Recolección y asepsia del material vegetal *A. xanthorriza*.

Recolección del explante: En esta fase, primero se eligió el explante y se determinó trabajar con las hojas de la arracacha, luego, está se manipuló cuidadosamente desde que se cortó transversalmente de la plántula de arracacha germinada en el invernadero del LPP, inmediatamente se lavó superficialmente para limpiar de componentes de suelo en su superficie. El explante se llevó al área de cultivo de tejidos en un recipiente sellado para aislarlo de contaminación y sumergido en agua destilada para evitar su deshidratación. (Ver Figura 8)

Figura 8. Explante de *A. xanthorriza* a sembrar



Fuente: Autor

Para el establecimiento del presente protocolo se utilizó específicamente tejido joven que se obtuvo al sembrar la arracacha en materas del invernadero perteneciente al LPP.

Asepsia del explante: Para la asociación explante-medio se utilizaron instrumentos e implementos como vasos de precipitado (50, 100 y 500 ml), probetas de 100 ml, matraz erlenmeyer (500 y 1000 ml), frascos para los medios, cajas de petri, frascos para almacenar soluciones, pipetas, pinzas, mangos de bisturí N° 3 y 4, papel aluminio y un mechero con alcohol al 96% para la manipulación y correcta desinfección del material vegetal. Se ubicaron sobre el mesón consecutivamente el hipoclorito de sodio (NaClO) al 2 y 3%, el agua destilada, alcohol al 70 y 96%, el agar, los reguladores de crecimiento ANA (ácido naftalenacético), BAP (bencil amino purina), K (Kinetina) y Tween 20. (Figura 9).

Figura 9. Sustancias empleadas para la asepsia *A. xanthorriza*



Fuente: Autor

El cálculo para determinar la concentración se halló mediante **la ecuación de disolución para calcular la concentración de la solución** para la asepsia del tejido vegetal:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Donde:

C₁= Concentración inicial de la sustancia

V₁= Volumen inicial

C₂= Concentración final

V₂= Volumen final

La asepsia de la *A. xanthorriza* se realizó en el cuarto de siembra *in-vitro*, en esta área del laboratorio se trabajó además, en la transferencia de los explantes a los medios Murashige y Skoog, dado que este paso, demandó los más altos niveles de limpieza ambiental, el flujo del aire bajo presión y de la cámara de flujo laminar (ver figura 10).

Figura 10. Cámara de flujo Laminar



Figura 11. Flameado con alcohol al 96%



Fuente: Autor

Es imprescindible antes de ingresar a cámara portar el traje correspondiente como la bata, tapabocas, gorro, polainas y gafas y que se encuentre esterilizado, (Figura 11); en esta fase se flameo con alcohol al 96% la base donde se manipuló el tejido y se limpiaron minuciosamente los mesones y paredes con hipoclorito al 2.5% con toallas absorbentes esterilizadas.

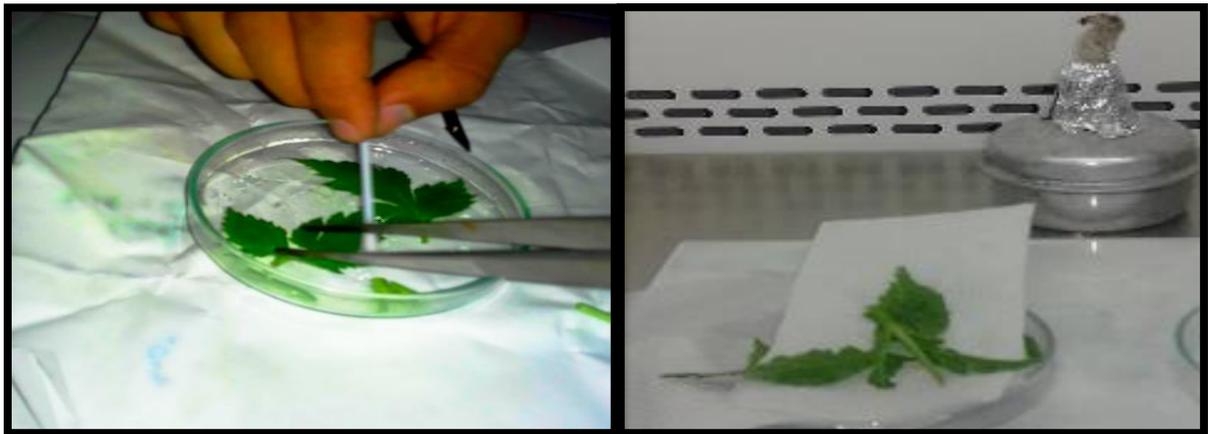
El tratamiento de desinfección para el tejido de la especie *A. xanthorriza* tiene como fin liberar de microorganismos exógenos mediante un lavado superficial inicialmente con agua destilada. Una vez se inició el protocolo aséptico se sumergió el tejido de *A. xanthorriza* en alcohol al 70% durante 1 minuto, posteriormente se manipuló el tejido vegetal con pinzas para un enjuague en agua destilada y se hizo un breve secado con toallas absorbentes esterilizadas, se sumergió el tejido vegetal en 2 tiempos diferentes (5 y 10 min), en Hipoclorito de Sodio (NaClO) a las concentraciones 2 y 3 %, además 3 enjuagues en Tween-20 y 3 enjuagues más en agua destilada donde se secó delicadamente el explante con copos de algodón.

2.3.3 Fase 3: Introducción a la cámara para siembra en los medios Murashige y Skoog de la especie *A. xanthorriza*

Para iniciar el proceso de siembra, primero se lavaron las manos y antebrazos y se desinfectaron con etanol al 70% para reducir la contaminación a la hora de operar la acción de siembra. Los instrumentos metálicos empleados como las cuchillas y pinzas esterilizadas se flamearon con etanol al 96% y el material de vidrio, papel aluminio y frascos con el medio se ingresó ya esterilizado.

Operaciones de transferencia y disección: Se realizaron las operaciones de transferencia y disección lo más cerca posible de la llama del mechero y evitando exposiciones prolongadas de los explantes y medios de cultivo en recipientes abiertos. Se realizaron diferentes cortes en el tejido tratando de conservar la nervadura principal en cada sección del tejido previamente secado con toallas absorbentes esterilizadas o copitos de algodón como se observa en la siguiente figura.

Figura 12. Limpieza y secado de material vegetal



Fuente: Autor

De inmediato se sembró cuidadosamente los diferentes segmentos en los medios; en cada medio se sembró entre 3 y 4 tejidos de la especie *A. xanthorriza* (Ver Figura 13).

Figura 13. Siembra en medios de cultivo de la especie *A. xanthorriza*.



Fuente: Autor

Medios de cultivo utilizados: Para el establecimiento del material vegetal en los medios en el banco de germoplasma se utilizaron medios complementados de la siguiente forma: 10 unidades de medio MS+K (0,2)+A (0,7); 10 unidades medio MS+K (0,7)+A (0,7) y 10 unidades con medio MS+ANA+BAP

Tratamientos experimentales: los tratamientos a utilizar fueron los siguientes:

Tabla 4. Tratamientos realizados inicialmente para la desinfección del tejido vegetal de la especie *A. xanthorriza*

TRATAMIENTO	Hipoclorito de Sodio (NaClO) al 13%	Concentración (%)	Tiempo (minutos)	N° de frascos con Medio de Cultivo MS
1	NaClO	0.5	10	4
2	NaClO	0.75	5	4
3	NaClO	1	2	4
4	NaClO	1.5	1	4

Fuente: Autor

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Tratamientos de desinfección y medio de cultivo Murashige y Skoog

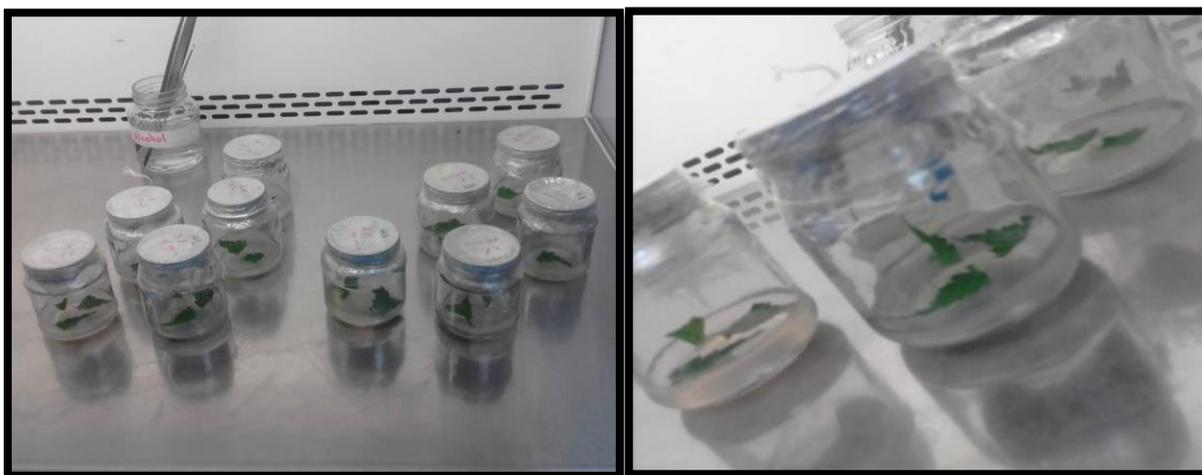
El medio Murashige y Skoog fue apropiado debido a sus fuentes de carbono y el aporte de nutrimentos minerales incorporado en su preparación, según Gamborg et al., 1976, el éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su forma física.

Según Matos et al., 2015, en uno de sus artículos titulado “Establecimiento y Micropropagación *in-vitro* de cinco Cultivares de Apio (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) colectados en Venezuela”, se propone un tratamiento con una concentración del 2% de NaClO por un periodo de tiempo de 15 minutos, lo cual resultó inadecuado en este caso, ya que en uno de los ensayos a los que se sometió el tejido por este lapso de tiempo dio como resultado un explante que en la fase de control evidenció inactividad en sus células al 100%. Estipulando así como antecedente que la cantidad de tiempo que se expuso el material vivo fue demasiada como para llegar al punto de quemar el tejido del material vegetal vivo.

Se deduce al comparar los tratamientos utilizados en partes diferentes a las hojas de la especie *A. xanthorrhiza* que varía la resistencia y tipo de contaminación del tejido a la hora de someterse al tratamiento. A pesar de que estos autores de esta corriente para este tipo de protocolos sugieren concentraciones más bajas y lapsos de tiempos más extensos a los tratamientos, finalmente en el presente protocolo la concentración aplicada fue de 2 y 3 % de NaClO durante 5 y 10 minutos con un porcentaje de material vivo representativo. (Ver Figura 15). También, se usó como aditivo el fungicida Mancozeb al 20% introduciendo el explante durante un tiempo entre 5 y 10 minutos con el fin de eliminar los hongos presentes.

Las condiciones a las cuales estuvieron los explantes en el banco de germoplasma fueron 23°C de temperatura, 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad controlados con el temporizador del cuarto.

Figura 15. *A. xanthorriza* en el banco de germoplasma del LPP



Fuente: Autor

En los tratamientos asépticos realizados antes de lograr desinfectar satisfactoriamente el tejido, es imperante resaltar que para establecer el protocolo de micropropagación de la especie *A. xanthorriza* se realizaron numerosas siembras, variando específicamente en las concentraciones de NaClO, que variaron desde el 0.5% hasta el 5 %, y los tiempos en que se sumergió el explante que fueron desde 1 minuto hasta 20 minutos. Lo anterior se realizó mediante diferentes pruebas y ensayos de tratamientos asépticos planteados por diferentes autores, (Slíva et al., 2010); en su trabajo “Micropropagation and morphogenesis of arracacha (*Arracacia xanthorriza* Bancroft)”, se genera la desinfección del explante de la *A. xanthorriza* con una concentración del 1% de NaClO y un tiempo de 20 minutos sumergidos en la sustancia desinfectante, con esta información se evidenció que dependiendo la parte del explante de la especie (en este caso las hojas) la susceptibilidad y resistencia para el sometimiento a las concentraciones

de los agentes asépticos utilizados no es la misma, sea segmentos de la hoja o la parte basal de los meristemas, no es común que se logró la asepsia con las mismas concentraciones de NaClO y tiempos utilizados en los tratamientos asépticos.

3.2 Tratamientos óptimos establecidos

La ecuación de dilución para calcular la concentración de la solución más conveniente para la asepsia del tejido vegetal finalmente determinó el 2 y 3% de NaClO de concentración.

Se prepararon 200 ml de la sustancia desinfectante a base de NaClO al 2% y 200 ml al 3% de la siguiente forma:

Ejemplo de cálculo 1:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

$$13\% * V_1 = C_2 * V_2$$

$$13\% * V_1 = 2\% * 200 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{2\% (200 \text{ ml})}{13\%}$$

$V_1 = 30,77$ ml de NaClO en 200 ml de solución desinfectante para la concentración del 2%.

Ejemplo de cálculo 2:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_1$$

$$13\% * V_1 = C_2 * V_2$$

$$13\% * V_1 = 3\% * 200 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{3\% (200 \text{ ml})}{13\%}$$

$V_1 = 46,15$ ml de NaClO en 200 ml de solución desinfectante para la concentración del 3%

Teniendo en cuenta estas concentraciones se llevaron a cabo los siguientes tratamientos con el medio de cultivo MS suplementado con ANA (Ácido naftalenacético), BAP (Bencil amino purina), K (Kinetina) y el 2,4D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético), para impulsar el desarrollo vegetativo del explante en el medio.

Los tratamientos que desinfectaron satisfactoriamente el tejido fueron dos, el tratamiento 5 con una solución desinfectante de NaClO al 13%, con concentración del 2%, con un tiempo de 10 minutos y los medios MS+K (0,2)+A(0,7) y MS+K (0,7)+A(0,7) ; y el tratamiento 6 con una solución desinfectante de NaClO al 13%, una concentración del 3%, un tiempo de 5 minutos y los medios MS+ANA+BAP+2,4D (Ver Tabla 5).

Tabla 5. Tratamientos satisfactorios en la desinfectaron el tejido para el desarrollo adecuado de la especie *A. xanthorriza* en condiciones *in-vitro*

TRATAMIENTO	Solución desinfectante	Concentración de NaClO (%)	Tiempo (minutos)	Medio de Cultivo MS Suplementado
5	NaClO al 13%	2	10	MS+K (0,2)+A(0,7) MS+K (0,7)+A(0,7)
6	NaClO al 13%	3	5	MS+ANA+BAP+2,4D

Fuente: Autor

3.3 Estado final del tejido establecido en el banco de germoplasma del LPP.

El haber inducido estos suplementos al medio MS con las concentraciones y tiempos optimizados para el establecimiento de la especie *A. xanthorriza* en condiciones *in-vitro* generó la oportunidad y satisfacción al autor alcanzar no solo los objetivos de establecer el protocolo, sino además, en tan solo las 24 semanas de la pasantía en el LPP se trabajó un poco más de investigación al lograr inducir callo en algunos tejidos en los que se utilizó medios suplementados con la hormona 2,4D como agente mutagénico con el fin de conocer la viabilidad de proyectar

futuras investigaciones con este tipo de tejido mediante la generacion de células en fases de multiplicación masiva.

Debido a lo anterior al terminar el lapso de tiempo correspondiente como pasante del LPP la especie *A. xanthorriza* Bancroft quedó establecida en el banco de germoplasma del área de cultivo de tejidos, con raíz y presencia de callo en fase organogénica como se observa en la figura 18, logro que es importante para pensar en el potencial que tiene la especie y tener en cuenta futuros trabajos en base a lo aprendido.

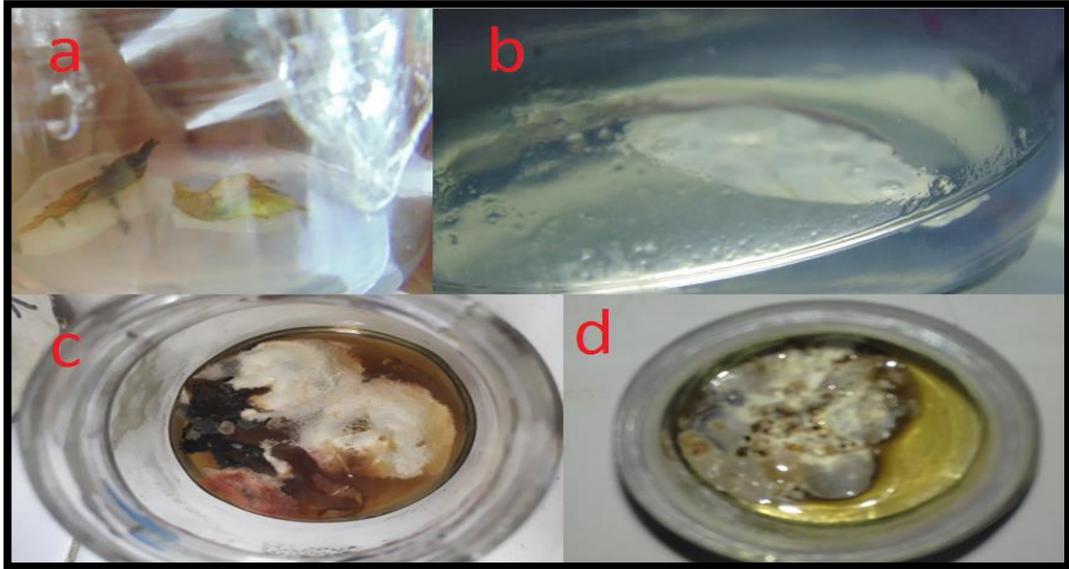
Figura 16. Fase Callogénica de *la A. xanthorriza* establecida en el LPP



Fuente: Autor

Los principales resultados obtenidos a raíz de las siembras y tratamientos que se aplicaron a partir de la tercera semana de iniciar la pasantía alcanzaron a presentar contaminación presentando necrosis, hongos y bacterias hasta de un 90%, esto debido a la falta de habilidades a la hora de manipular el material o la destreza para llevar a cabo el protocolo, igualmente por no ser adecuado los porcentajes y tipos de reactivos que se utilizaron. Sin embargo, se logró conseguir óptimos porcentajes de desinfección en el tejido utilizando los medios de cultivo Murashige y Skoog (MS+ANA+BAP), suplementados con 2,4D, para la semana catorce ya se tenían presentes aspectos relevantes en cuanto a la manipulación del explante y las concentraciones de sustancias desinfectantes y los tiempos adecuados de la exposición del material vegetal para el óptimo procedimiento aséptico del explante. (Ver Figura 17).

Figura 17. Tipos de contaminación y pérdida de material *A. xanthorriza*.



Fuente: Autor

a) Necrosis y presencia de hongos en el medio de cultivo; b) deshidratación del tejido y exceso de sustancias desinfectantes; c) y d) Material descartado por propagación masiva de hongos y bacterias.

4. CONCLUSIONES

Se obtuvieron satisfactoriamente parámetros específicos protocolarios en tres fases fundamentales que establecen en la práctica a la especie *A. xanthorriza* bajo concentraciones y tiempos óptimos para la descontaminación del explante que se establecieron en un 2 y 3 % de NaClO y un lapso de tiempo de 5 y 10 minutos como tratamientos asépticos.

Una vez se obtuvo el protocolo de siembra, los tejidos fueron sometidos a diferentes medios complementados con agentes mutagénicos como el 2,4D, para el desarrollo del tejido fue necesario suplementarlo, ya que no fue suficiente el medio MS, gracias a esa suplementación en la actualidad se tiene tejido en fase organogénica y callogénica como consecuencia de una buena reacción del tejido al medio suplementado.

Se concluye que los diferentes protocolos asépticos utilizados convencionalmente en los laboratorios para el establecimiento de especies vegetales en cultivo *in vitro*, se tiene presente no solo el tipo de tejido que se desea introducir sino también la resistencia del mismo a los agentes desinfectantes, que de un autor a otro pueden existir diferencias importantes a la hora de establecer dicho protocolo, es decir, que no es erróneo el uso alternativo de sustancias que direccionen a cumplir con el fin único del protocolo que es eliminar cualquier tipo de contaminante que dañe o afecte el material que se pretenda establecer.

5. RECOMENDACIONES

Es necesario suplementar con fitohormonas el medio de cultivo para el desarrollo del tejido de la especie *A. xanthorriza* cuando se pretenda el progreso óptimo del tejido vegetal en el caso de que la siembra se realice con segmentos de la hoja.

Se recomienda trabajar únicamente con explantes provenientes de un manejo y control adecuado con respecto a su origen, en este caso del invernadero del LPP, teniendo en cuenta que inicialmente los resultados no fueron viables, además, es muy importante tener buena disponibilidad de tejido de la especie para realizar múltiples ensayos.

Es recomendable tener en cuenta la variabilidad de contaminación que se puede generar a la hora de manipular e implementar un protocolo de este tipo. Por ello se debe pensar en añadir elementos como: el fungicida Mancozeb, Etilen bis ditiocarbamato y zinc 80% debido a la necesidad de combatir el porcentaje de contaminación inicial por hongos, igualmente para la desinfección superficial de bacterias y microorganismos.

6. BIBLIOGRAFÍA

Agricultura trópica et subtropica Vol. 43 (3) 2010. Micropropagation and morphogenesis of arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft).

Amaya, J. E. y Julca, J. L. 2006. "Arracacha" *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. Biodiversidad y Conservación de los Recursos Filogenéticos Medio Ambiente. s/ed. Trujillo, Perú. 15 p.

Barba, A.; Luna, B.; Romero, J. 2001. *Micropropagación de Plantas*. Ed. Trillas. Distrito Federal, México. pp 7-8

Bioagro vol.27 no.2 Barquisimeto ago. 2015. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de cinco cultivares de apio (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) colectados en Venezuela. Disponible en la Web: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612015000200008

Flores, J., Sahelices, M. C.C., & Moreira, M. A. (2009). El laboratorio en la enseñanza de las ciencias: Una visión integral en este complejo ambiente de aprendizaje. *Revista de investigación*, (68), 75-112

Gamborg, O.L., R.A. Millery K. Ojima.1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp.Cell.Res.*50:151-158

Gamborg, O.L.; Murashige, T.; Thorpe, T. A. y Vasil, I. K. 1976. Plant tissue culture media. *In vitro* 12; 473-478.

González Minero, F.J, & Candau, P. (1995). *Dpto. Biología Vegetal y Ecología. Facultad de Farmacia*.41012 Sevilla

Hartmann, H. y Kester, D. 1995. *Propagación de plantas, principios y prácticas*. Mexico, CECSA. pp 649 - 608 p.

Hermann M., Heller J. (1997): *Andean roots and tubers: ahipa, arracacha, maca and yacon*. Gatersleben (Germany). *International Plant Genetic Resources Institute*; ISBN 92-9043-351-5.

Hermann, M. 1997. Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). In: *Andean roots and tubers: Ahipa, Arracacha, maca and yacón. Promoting the conservation and of underutilized and neglected crops*. Hermann, M. and J. Heller (eds). 21. *Institute of Plant Genetic and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy*. Pp. 75 – 172.

Hernández-Navarrete, M. J., Celorrio-Pascual, J. M., Moros, C. L., & Bernad, V. M. S. (2014). Fundamentos de antisepsia, desinfección y esterilización. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(10), 681-688.

Hidalgo Rodríguez, R., Quintana Chávez, M. L., Sánchez Puentes, N., Chiroles Despaigne, S., & Villavicencio Betancourt, O. (2002). El procedimiento de limpieza como garantía del proceso de esterilización. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 40(3), 176-188.

Hodge, W.H. 1954. The edible Arracacha – a Little known root of the Andes. *Economic Botany* 8: pp 195- 221. Disponible en: http://www.redbio.org/rdominicana/redbio2004/Memoria_REDBIO_2004/Talleres-DF/t18-03.pdf

Hurtado, D. y Merino, M. 1997. *Cultivo de Tejidos Vegetales. Primera Edición. Ed. Trillas. Distrito Federal, México* 225p

Julio E. Amaya Robles, José L. Julca Hashimoto. “ARRACACHA” *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. Área Temática: *Biodiversidad y Conservación de los Recursos Fitogenéticos Andinos*. Gerencia Regional de Recursos Naturales y Conservación del Medio Ambiente, 2006. 15 páginas

Mabberley, D.M. 1993. The plant book: A portable dictionary of higher plants utilizing Cronquist's, an integrated system of classification of flowering plants. Cambridge University Press. Cambridge, NY, USA

Madeira, N.R.; Teixeira, J.B.; Arimura, C.T. y Junqueira, C.S. 2005. Influência da concentração de BAP e AG3 no desenvolvimento *in vitro* de mandioquinha-salsa. *Horticultura Brasileira*, Brasília, Brasil. v.23, n.4, p.982-985. (En línea). Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/hb/v23n4/a24v23n4.pdf>

Matos E., Marcano M., Azócar C., y Mora A., Establecimiento y Micropropagación *in-vitro* de cinco Cultivares de Apio (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) colectados en Venezuela. *Bioagro* 27 (2): 121-130.2015

Mujica, A.; Jacobsen. S-E, Juan, I. y Roca, W. (2002). Potencialidades de los cultivos andinos, sub utilizados por la biotecnología. Puno, Perú.

Pérez-Uz, B., de Silóniz, M. I., Torralba, B., & Vázquez, C. (2011). Metodología de esterilización en el laboratorio microbiológico. *Reduca (Biología)*, 3(5).

Noriega, L. 2001. *El apio andino (Arracacia xanthorrhiza, Bancroft) y su cultivo en Capurí*.

Ramírez, N. (1989). *Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed. Pueblo y Educación. La Habana, Cuba.* pp 31-39

Roca, W., Espinoza, C., y Panta, A. (2004). Aplicaciones agrícolas de la biotecnología y el potencial de valorización de la biodiversidad en América Latina y el Caribe.

Roca, W y mroginski L. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Publicación CIAT Cali Colombia.

Sanchez, I. Raíces andinas, Contribución al Conocimiento y la Capacitación. Arracacha (*Arracaccia xanthorrhiza*) Caracterización y Conservación de Germoplasma. Universidad Nacional de Cajamarca.

Seminario, J. 2004. Raíces Andinas; *Contribuciones al Conocimiento y a la capacitación. Serie Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003)*. Universidad de Cajamarca, Centro internacional de Río Negro y Molino. Mérida- Venezuela.

Slíva Š., Viehmannová I., Vítámvás J. en su trabajo "Micropropagation and morphogenesis of arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). *AGRICULTURA TROPICA ET SUBTROPICA. 1Institute of Tropics and Subtropics, Czech University of Life Sciences, Prague Czech RepublicFaculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences, Prague, Czech Republic. VOL. 43 (3) 2010.*

ANEXOS

Anexo A. Evidencias de actividades desarrolladas durante la pasantía supervisada

1) *A xanthorriza* en el invernadero del LPP



2) Clase magistral de cultivo de tejidos



3) Siembra contaminada por hongos



4) Control de planta madre germinada en el invernadero del LPP



Fuente: Autor

5) Área de invernación, desarrollo y control de plántulas



6) Alcohol al 70 % como desinfectante para el protocolo



7) Siembra de especie *Arracacia xanthorriza* en condiciones *in-vitro*



8) Procedimiento de repique del banco de germoplasma



Fuente: Autor

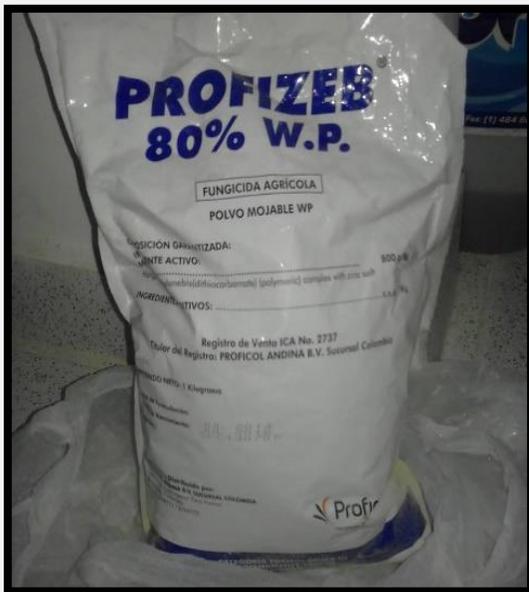
9) Captador volumétrico de polen y esporas tipo Hirst



10) Inducción y ensayos de repique con material vegetal



11) Mancozeb, Etilen bis ditiocarbamato y zinc 80% como agente desinfectante



12) Montaje de placas con material esporopolínico en glicerogelatina

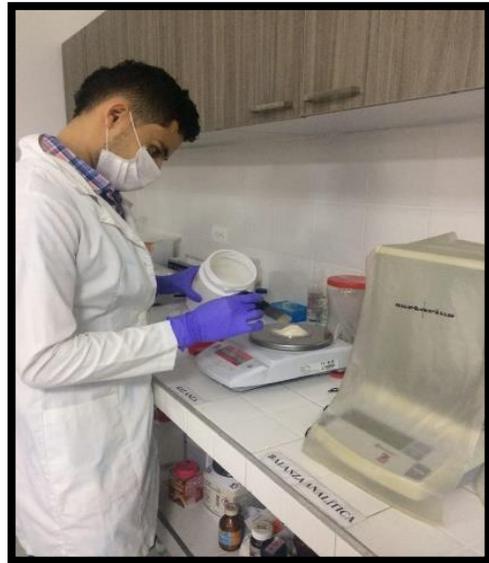


Fuente: Autor

13) Grupo de investigación y pasantes del LPP



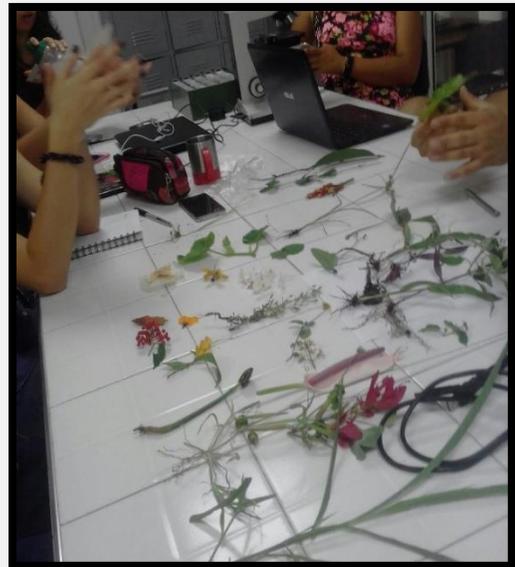
14) Preparación de medios – pesaje de sales minerales



15) Material contaminado-presencia de hongos



16) Clase magistral de botánica



Fuente: Autor

Fuente: Autor

17) Salida de campo-recolección de material vegetal



18) Medición de pH medio para solución de medios de cultivo



19) Clase magistral de aeropalinología



20) Ensayo de siembra de tejido de la especie *Arracacia xanthorrhiza* in-vitro



Fuente: Autor

21) Tejido con raíz y presencia de callo en fase organogénica



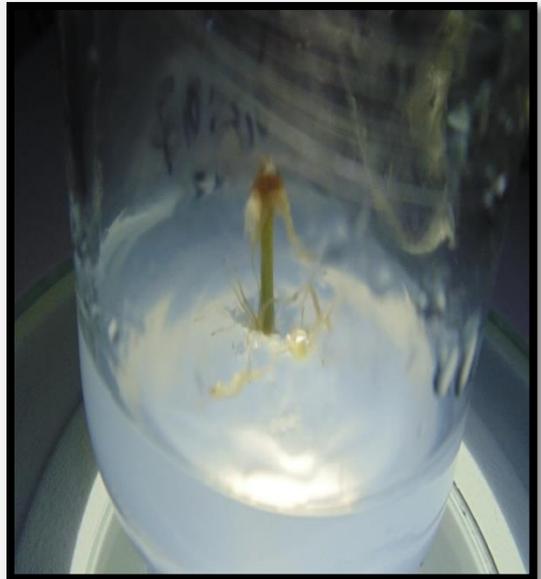
22) Tejido fase callogénesis



23) Tejido (hoja *A. xanthorriza*) deshidratado, en medio MS



24) Tallo de especie *A. xanthorriza* B. produciendo raíz



Anexo B. Equipos utilizados en el proyecto

Plancha de calentamiento con agitador magnético BOECO

Se emplea para calentar recipientes con líquidos, de forma controlada.



Autoclave

- Para la esterilización de material y medios de cultivo del Laboratorio



**pHMETRO Mesa Ph BASIC
Satorius**

- Es un sensor utilizado en el método electroquímico para medir el pH de una disolución.



Agitador Magnético

- Es un dispositivo que se utiliza en los laboratorios para mezclar líquidos o preparar disoluciones y suspensiones.



Balanza Analítica

- Es el instrumento que hace posible conocer con exactitud: la Masa de matriz destinada al análisis, la masa de sustancias para preparar soluciones de concentración exacta.

