

UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**“EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE
ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) EN LA
INDUCCIÓN DE CALLOS VIABLES IN VITRO DE
LLANTÉN (*Plantago major* L.) EN PUCALLPA”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

ROY HEINZ MATOS FRITZ

PUCALLPA – PERÚ

2022



ANEXO 4

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN O TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos para estudiar y escuchar la sustentación de tesis, presentado por **ROY HEINZ MATOS FRITZ** denominada **“EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) EN LA INDUCCIÓN DE CALLOS VIABLES IN VITRO EN LLANTÉN (*Plantago major* L.) EN PUCALLPA”**, para cumplir con el requisito (académico o título profesional) de **TÍTULO PROFESIONAL**.

Teniendo en consideración los méritos del referido trabajo así como los conocimientos demostrados por el sustentante lo declaramos: **APROBADO POR UNANIMIDAD** con el calificativo (**DIECISIETE**) (17).

En consecuencia, queda en condición de ser considerado Apto por el Consejo Universitario y recibir el Título de **INGENIERO AGRÓNOMO**, de conformidad con lo estipulado en los Art. 3 y 6 del reglamento para el otorgamiento de grado académico de bachiller y título profesional de la Universidad Nacional de Ucayali.

Pucallpa, 01 de marzo del 2022.


.....
Ing. Fernando Pérez Leal, Dr.
Presidente


.....
Ing. Mack-Henry Pinchi Ramírez, Dr.
Secretario

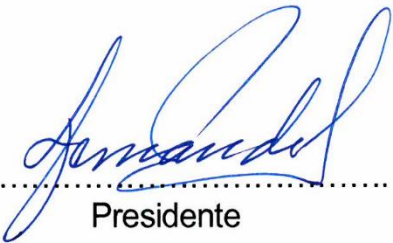

.....
Ing. Roger Fernando Panduro Bartra, Dr.
Miembro


.....
Ing. Pablo Pedro Villegas Panduro, M.Sc.
Asesor

(*) De acuerdo con el Art. 21 del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Ucayali, éstas deberán ser calificadas con términos de Sobresaliente, Aprobado por Unanimidad, Aprobado por Mayoría y Desaprobado.

Esta tesis fue aprobada por el Jurado Evaluador de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Ucayali, como requisito parcial para optar el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo.

Ing. Fernando Pérez Leal, Dr.


.....
Presidente

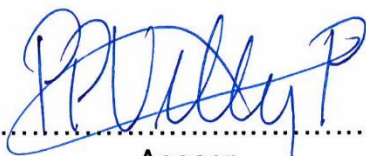
Ing. Mack Henry Pinchi Ramírez, Dr.


.....
Secretario

Ing. Roger Fernando Panduro Bartra, Dr.


.....
Miembro

Ing. Pablo Pedro Villegas Panduro, M.Sc.


.....
Asesor

Bach. Roy Heinz Matos Fritz


.....
Tesista



CONSTANCIA

ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE INVESTIGACION

SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND

N°0510-2021

La Dirección de Producción Intelectual, hace constar por la presente, que el Informe final de Tesis, titulado:

“EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) EN LA INDUCCIÓN DE CALLOS VIABLES IN VITRO DE LLANTÉN (plantago major L.) EN PUCALLPA”

Cuyo(s) autor (es) : MATOS FRITZ, ROY HEINZ
Facultad : CIENCIAS AGROPECUARIAS
Escuela Profesional : AGRONOMÍA
Asesor(a) : MG. VILLEGAS PANDURO, PABLO PEDRO

Después de realizado el análisis correspondiente en el Sistema Antiplagio URKUND, dicho documento presenta un **porcentaje de similitud de 4%**.

En tal sentido, de acuerdo a los criterios de porcentaje establecidos en el artículo 9 de la DIRECTIVA DE USO DEL SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND, el cual indica que no se debe superar el 10%. Se declara, que el trabajo de investigación: SI Contiene un porcentaje aceptable de similitud, por lo que SI se aprueba su originalidad.

En señal de conformidad y verificación se FIRMA Y SELLA la presente constancia.

FECHA 24/11/2021



Dr. ABRAHAM ERMITANIO HUAMAN ALMIRON

Dirección de Producción Intelectual

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE TESIS

REPOSITORIO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI

Yo, ROY HEINZ MATOS FRITZ.

Autor de la TESIS titulada:

"EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE
ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) EN LA INDUCCIÓN
DE CALLOS VIABLES IN VITRO DE LLANTEN (Plantago major L)
EN PUCALLPA"

Sustentada el año: 2022.

Con la asesoría de: Ing M.Sc. PABLO PEDRO VILLEGAS PANDURO.

En la Facultad de: CIENCIAS AGROPECUARIAS.

Carrera Profesional de: AGRONOMÍA.

Autorizo la publicación:

PARCIAL Significa que se publicará en el repositorio institucional solo la caratula, la dedicatoria y el resumen de la tesis. Esta opción solo es válida marcar **si su tesis o documento presenta material patentable**, para ello deberá presentar el trámite de CATI y/o INDECOPI cuando se lo solicite la DGPI UNU.

TOTAL Significa que todo el contenido de la tesis y/o documento será publicada en el repositorio institucional.

De mi trabajo de investigación en el Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de Ucayali (www.repositorio.unu.edu.pe), bajo los siguientes términos:

Primero: Otorgo a la Universidad Nacional de Ucayali **licencia no exclusiva** para reproducir, distribuir, comunicar, transformar (únicamente mediante su traducción a otros idiomas) y poner a disposición del público en general mi tesis (incluido el resumen) a través del Repositorio Institucional de la UNU, en formato digital sin modificar su contenido, en el Perú y en el extranjero; por el tiempo y las veces que considere necesario y libre de remuneraciones.

Segundo: Declaro que la **tesis es una creación de mi autoría** y exclusiva titularidad, por tanto me encuentro facultado a conceder la presente autorización, garantizando que la tesis no infringe derechos de autor de terceras personas, caso contrario, me hago único(a) responsable de investigaciones y observaciones futuras, de acuerdo a lo establecido en el estatuto de la Universidad Nacional de Ucayali y del Ministerio de Educación.

En señal de conformidad firmo la presente autorización.

Fecha: 01 / 03 / 2022.

Email: ROY.MF24@gmail.com

Firma: 

Teléfono: 939 822 906

DNI: 73 4855 70

DEDICATORIA.

A Dios Todopoderoso, por la vida, salud y su misericordia.

A mi madre Olga Fritz Soria, por su gran fortaleza e incondicional apoyo y esfuerzo en todo momento.

A mi padre Roayce Matos Tuesta, que hoy se encuentra en la presencia de nuestro Dios.

A mi tío James Matos Tuesta, por impartir sus experiencias motivadoras.

A mis hermanas Rocio, Deisa y Grace Matos Frtiz, por su cariño.

AGRADECIMIENTO.

A mi alma mater Universidad Nacional de Ucayali por formarme como profesional con los mejores catedráticos de la región Ucayali.

A los catedráticos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, por brindarme sus enseñanzas durante mi formación académica.

Al Ing. M.Sc. Pablo Pedro Villegas Panduro, asesor de la tesis, por sus consejos y apoyo en la ejecución de la tesis.

A mis compañeros de estudios, por su apoyo en el aspecto moral, con los que compartí alegrías y tristezas.

ÍNDICE.

	Pág.
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE CUADROS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
2.2. BASES TEÓRICAS.....	4
2.2.1. El llantén (<i>Plantago major</i> L.).....	4
2.2.1.1. Descripción taxonómica y ciclo de vida.....	5
2.2.1.2. Componentes químicos.....	5
2.2.2. Cultivo de tejidos vegetales y la producción de metabolitos secundarios.....	6
2.2.2.1. El cultivo de callos.....	8
2.2.3. Auxinas y 2,4–Diclorofenoxiacético.....	9
2.2.3.1. Auxinas.....	9
2.2.3.2. 2,4–Diclorofenoxiacético.....	9
2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS.....	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	13
3.2. UBICACIÓN.....	13
3.3. DURACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	13
3.4. ECOLOGÍA Y CLIMA.....	13
3.5. MATERIALES Y EQUIPOS.....	14
3.5.1. Materiales.....	14
3.5.2. Equipos.....	14
3.5.3. Reactivos.....	14
3.6. VARIABLES.....	15
3.7. PROCEDIMIENTOS.....	15
3.7.1. Introducción de semillas de llantén a condiciones de in vitro.....	15

3.7.1.1. Colecta de semillas de campo.....	15
3.7.1.2. Elaboración de medio de cultivo para semillas de llantén.....	16
3.7.1.3. Siembra de semillas a condiciones de in vitro.	16
3.7.2. Introducción de explantes de llantén provenientes de vivero.....	17
3.7.2.1. Colecta de plantas de llantén de campo.....	17
3.7.3. Siembra de explantes en medios de cultivo conteniendo las concentraciones de 2,4–Diclorofenoxiacético estudiados.....	17
3.7.3.1. Elaboración de medios de cultivo conteniendo las concentraciones de 2,4– Diclorofenoxiacético estudiados.....	17
3.7.3.2. Siembra de explantes (hojas y pecíolos) provenientes de plántulas de llantén germinadas in vitro.....	18
3.7.3.3. Siembra de explantes (hojas y pecíolos) provenientes de plantas de llantén de vivero.	19
3.7.4. Evaluación de las variables.....	19
3.8. POBLACIÓN Y MUESTRA.....	20
3.8.1. Población.....	20
3.8.2. Muestra.....	20
3.9. DISEÑO ESTADÍSTICO.....	21
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
4.1. PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN DE EXPLANTES.....	22
4.2. TIEMPO DE INICIO DE FORMACIÓN DE CALLOS.....	24
4.3. PESO INICIAL DE EXPLANTES Y PESO FINAL DE CALLOS.	25
4.4. INCREMENTO DE PESO DE CALLOS.....	27
4.5. PORCENTAJE DE INCREMENTO DE PESO DE CALLOS...	29
4.6. COLOR, TEXTURA Y CARACTERÍSTICAS DEL CALLO.....	31
V. CONCLUSIONES.....	33
VI. RECOMENDACIONES.....	34
VII. LITERATURA CONSULTADA.....	35

RESUMEN.

La investigación tuvo la finalidad de estudiar el efecto de diferentes concentraciones de Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) en la inducción de callos viables in vitro en llantén (*Plantago major* L.) en Pucallpa, el cual fue desarrollado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Meristemas de la UNU, situado en la Carretera Federico Basadre Km 6, en el distrito de Callería, provincia de Coronel Portillo, departamento de Ucayali, por lo cual, se desinfectó semillas de llantén, los cuales fueron sembrados en un medio de cultivo compuesto por sales y vitaminas de Murashige y Skoog, complementados con 30 g/L de sacarosa, 11 g/L de agar, sin reguladores de crecimiento, los cuales, a los 58 días desarrollaron plántulas de 3 cm de altura y 4 hojas, los mismos que fueron cortados y sembrados en los medios de cultivo conteniendo las concentraciones de 2,4-D estudiados, asimismo, se desinfectó hojas y peciolo provenientes de plantas de llantén de vivero, los mismos que fueron cortados y sembrados en los medios de cultivos conteniendo las concentraciones de 2,4-D estudiados, los frascos sembrados fueron acondicionados en la cámara de incubación a 1000 lux de intensidad lumínica, una temperatura controlada de 24 °C, una humedad relativa de 60% y un fotoperíodo de 12/12 horas luz y penumbra. Se empleó un Diseño Completo al Azar, con 6 tratamientos y 15 repeticiones (frascos) y una prueba de Tukey ($P \leq 0,05$), concluyendo que, el uso de semillas de llantén como explantes, desinfectados con Hipoclorito de sodio al 1% por un espacio de 20 minutos y enjuagado con agua destilada por 4 veces, evitó la contaminación por hongos y bacterias, generando un 90% de germinación bajo condiciones de in vitro, no obteniéndose tejido sano a partir de explantes provenientes de plantas de vivero, asimismo, los tratamientos con 0,50 ppm de 2,4-D y 0,75 ppm de 2,4-D lograron los mejores promedios de peso final de callos, incremento de peso de callos de llantén.

Palabras claves: Callos friables, medio de cultivo, regulador de crecimiento, planta medicinal.

ABSTRACT.

The purpose of the research was to study the effect of different concentrations of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) on the induction of viable callus in vitro in plantain (*Plantago major* L.) in Pucallpa, which was developed in the UNU's Tissue and Meristem Culture Laboratory, located on Carretera Federico Basadre Km 6, in the Callería district, Coronel Portillo province, Ucayali department, for which llantén seeds were disinfected, which were sown in a culture medium composed of salts and vitamins from Murashige & Skoog, supplemented with 30 g/L of sucrose, 11 g/L of agar, without growth regulators, which, at 58 days, developed seedlings of 3 cm in height and 4 leaves, the same ones that were cut and sown in the culture media containing the concentrations of 2,4-D studied, likewise, leaves and petioles from nursery Plantain plants were disinfected, the same ones that were cut and seeded in the culture media containing the concentrations of 2,4-D studied, the seeded flasks were conditioned in the incubation chamber at 1000 lux light intensity, a controlled temperature of 24 °C, humidity percentage of 60% and a photoperiod of 12/12 hours luminary and gloom. A Complete Random Design was used, with 6 treatments and 15 repetitions (flasks) and a Tukey test ($P \leq 0.05$), concluding that the use of Plantain seeds as explants, disinfected with 1% sodium hypochlorite for a period of 20 minutes and rinsed with distilled water 4 times, I avoid contamination by fungi and bacteria, generating 90% germination under in vitro conditions, not obtaining healthy tissue from explants from nursery plants, likewise, the treatments with 0.50 ppm of 2,4-D and 0.75 ppm of 2,4-D achieved the best averages of final callus weight, increase in the weight of llantén callus.

Keywords: Friable callus, culture medium, growth regulator, medicinal plant.

LISTA DE CUADROS.

En el texto:	Pág.
Cuadro 1. Variables estudiadas.....	15
Cuadro 2. Esquema del análisis de varianza.....	21
Cuadro 3. Tratamientos estudiados.....	21
Cuadro 4. Porcentaje de contaminación por hongos, bacterias y germinación de plántulas sanas de llantén bajo condiciones de in vitro.....	23
Cuadro 5. Porcentaje de contaminación por hongos, bacterias, número de explantes fenolizados y número de explantes sanos de llantén bajo condiciones de in vitro.....	23
Cuadro 6. Tiempo de inicio de formación de callos.....	24
Cuadro 7. Peso inicial de explantes y peso final de callos.....	26
Cuadro 8. Incremento de peso de callos.....	28
Cuadro 9. Porcentaje de incremento de peso de callos.....	29
Cuadro 10. Color, textura y característica del callo.....	31
 En el anexo:	
Cuadro 11A. ANOVA para el tiempo de inicio de formación de callos.....	43
Cuadro 12A. ANOVA para el peso inicial del explante.....	43
Cuadro 13A. ANOVA para el peso final de callos.....	43
Cuadro 14A. ANOVA para el incremento de peso de callos.....	43
Cuadro 15A. ANOVA para el porcentaje de incremento de peso de callos....	44
Cuadro 16A. Composición química de la solución de Murashige y Skoog (1962).....	45
Cuadro 17A. Preparación de medio de cultivo para el proceso de inducción de callos en explantes de llantén.....	46

LISTA DE FIGURAS.

En el texto:		Pág.
Figura 1.	Tiempo de inicio de formación de callos.....	25
Figura 2.	Peso inicial de explantes y peso final de callos.....	26
Figura 3.	Incremento de peso de callos.....	28
Figura 4.	Porcentaje de incremento de peso de callos.....	30
En el anexo:		
Figura 5A.	Semillas de llantén, tratamiento de desinfección.....	47
Figura 6A.	Plántulas de llantén germinadas bajo condiciones de in vitro.....	47
Figura 7A.	Plantas de llantén en condiciones de vivero.....	48
Figura 8A.	Preparación de medios de cultivo MS con la adición de los tratamientos de 2,4–Diclorofenoxiacético.....	48
Figura 9A.	Siembra de explantes provenientes de semillas germinadas in vitro.....	49
Figura 10A.	Preparación y siembra de explantes de llantén provenientes de vivero.....	49
Figura 11A.	Acondicionamiento de frascos en la sala de incubación.....	50
Figura 12A.	Desarrollo de tejido caloso.....	50
Figura 13A.	Evaluación de variables.....	51

I. INTRODUCCIÓN.

Las plantas medicinales contienen ingredientes activos en algunos de sus órganos, y estos ingredientes se administran en dosis suficientes para producir normalmente efectos curativos sobre enfermedades humanas y animales. Se estima que el 10% de las 260.000 plantas que se conocen actualmente pueden ser consideradas medicinales, es decir, están incluidas en artículos médicos de fitoterapia modernos y pasados porque tienen determinados usos (Cosme 2008).

La indagación de compuestos de plantas medicinales se centra en sustancias que ejercen efectos farmacológicos en humanos u organismos. Los compuestos son azúcares y heteroglucósidos (azúcares más compuestos sin azúcar), que pueden ser glucósidos, galactósidos, etc. (Cosme 2008).

Rodríguez (2018) indica que las plantas medicinales contienen de forma natural, multitud de compuestos y derivados moleculares de interés farmacológico, sin embargo, su extracción directa desde la planta resulta costosa y uno de los principales retos de esta industria es mejorar su bajo cociente productividad/beneficio.

El cultivo in vitro de plantas productoras de metabolitos secundarios surge a partir del interés por parte de la industria que se abastece de estas materias primas, en establecer un método de producción. Por ello, la siembra de plantas medicinales es una opción para resolver los problemas que supone un mercado definido por el mantenimiento de la producción regular. En la actualidad la biotecnología a través del laboreo in vitro es la opción eficaz, lo que no implica que esté exenta de problemas, especialmente la estandarización de las condiciones de cultivo in vitro de células vegetales dado el número y variedad de principios activos producidos por las plantas medicinales (Martínez 2018).

Sin embargo, aunque el cultivo in vitro de plantas medicinales se esté incrementando enormemente, sigue presentando todavía algunas dificultades como son poder predecir qué productos derivados de plantas continuarán siendo rentables, salvar impedimentos económicos en el caso de mercados pequeños

y la posibilidad de una disminución brusca del margen de beneficio comercial debido a variantes abruptas de la oferta y la demanda. Por ello, a pesar de décadas de investigación en este sector, hoy en día sólo catorce sustancias derivadas de plantas se producen comercialmente, destacando el paclitaxel como el compuesto más importante de este mercado (Atanasov et al., 2015).

La región Ucayali presenta una gran biodiversidad en cuanto a la abundancia de especies con propiedades medicinales que pueden ser factibles de estudiar su comportamiento bajo condiciones de cultivo de tejidos y específicamente, la inducción para finalizar en el cultivo in vitro de células y el desarrollo de biofábricas productoras de metabolitos de interés medicinal, de los cuales destaca el llantén (*Plantago major*), el cual, crece de manera usual en las huertas de los pobladores, y son usualmente usadas como medicina natural para combatir diversos problemas de salud.

La especie *Plantago major* debido a sus propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, astringentes y anti-sangrantes, tiene un enorme potencial de mercado; también se puede utilizar como agente cicatrizante interno y externo de heridas. La aucubigemina, derivada de la aucubina, es el compuesto activo más relevante y se cree que es responsable de la actividad antibacteriana de las plantas (Blanco et al., 2008), lo cual demuestra la importancia del llantén como una planta medicinal potencial para la región.

Por estos motivos, es necesario estudiar el comportamiento de los tejidos vegetales del llantén (*Plantago major*) frente al efecto de auxinas como el Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético para la inducción de callos viables bajo condiciones de in vitro, con la finalidad de obtener metabolitos secundarios de interés medicinal.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.

Sánchez y Alvarenga (2014), probaron in vitro dos protocolos de inducción de callos de los segmentos de hojas de la planta *Uncaria tomentosa*. Seguidamente, se determinó un cultivo celular en suspensión. El proceso de formación de callos y la cinética de crecimiento del cultivo en suspensión demuestra que el medio de inducción de callos más eficaz consiste en Murashige y Skoog (MS) (1962), suplementado con 2 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de ácido 3-indol butírico (IBA), el cual se utiliza para el proceso de formación de callos mencionado anteriormente. Además, según la etapa de cultivo, las dos morfologías celulares son dominantes en el callo y la suspensión celular, y tienen características propias.

Urrea et al., (2009), desarrolló un método para establecer, propagar y obtener callos de *Lippia dulcis* (Verbenaceae) in vitro, además, también se ha logrado el establecimiento de suspensiones celulares. Las yemas apicales y los segmentos de la planta que quedaron en la cuadrícula fueron utilizados como explantes iniciales. El tratamiento más eficaz para establecer y propagar *L. dulcis* a partir de las yemas o segmentos superiores es el medio MS sin reguladores de crecimiento. Para obtener la textura y el color suficientes, es necesario renovar el medio de formación y proliferación de callos cada 20 días (MS suplementado con 2,4-D 0,1 mg/l). En medio MS en combinación con 2,4-D (0,5 mg/l) + kinetina (0,1 mg/l), se puede establecer una suspensión celular con alta viabilidad.

Matos (2007) observó que la adición de reguladores de crecimiento no es necesaria para obtener callos, pero sí es necesario obtener un mejor porcentaje de formación de callos. Cuando se añadió 2,4-D al medio MS solo, los mejores resultados se obtuvieron a una concentración de 0,1 mg.L-1, y se observó una formación de callos del 15%. Cuando se usó citoquinina sola, BA logró los mejores resultados, con una formación de callo del 17% observada a una concentración de 1 mg.L-1. Cuando se añadió 2,4-D y citoquinina al medio, el resultado depende de la concentración y el tipo de combinación de auxina /

citoquinina utilizada. La mejor respuesta se obtuvo con una combinación de 1 mg. L⁻¹ (80-87%) 2,4-D y 2 mg. L⁻¹ BA. La combinación 2,4-D / kinetina tuvo un menor porcentaje de formación de callos, hasta un 68% a una concentración de 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 1 mg.L⁻¹ de kinetina.

Arias (2002) estudió la inducción de callos de diferentes explantes de *Lepidium peruvianum* (Maca) utilizando auxina 2,4-D y citoquinina en medios con diferentes concentraciones de auxina/citoquinina. La mayoría de los medios utilizados generaron callos, y la relación hormonal más eficaz es auxina/citoquinina 1 μ M, lo que también confirma la presencia de glucosinolatos y alcaloides en el callo obtenido. Asimismo, se observó la presencia variable de las dos partes de glucosinolatos en el callo. Por otro lado, se observó un alto grado de variabilidad en presencia de alcaloides y otros metabolitos desconocidos en el callo obtenido y se observaron las bandas positivas en las muestras de callo y maca.

2.2. BASES TEÓRICAS.

2.2.1. El llantén (*Plantago major* L.).

El llantén es una hierba perenne sin tallos subterráneos ramificados. Debido a que es una planta fácil de ubicar, no se cultiva y se considera una mala hierba. Hay especies relacionadas con *P. major*, como *P. lanceolata* y *P. psyllium* (Blanco et al., 2008).

Debido a sus propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, astringentes y antihemorrágicas, el *P. major* tiene un gran potencial de mercado; también se puede utilizar como agente cicatrizante interno y externo de heridas. La aucubigemina, derivada de la aucubina, es el compuesto activo más relevante y se cree que es responsable de la actividad antibacteriana de las plantas. (Blanco et al., 2008).

2.2.1.1. Descripción taxonómica y ciclo de vida.

P. major pertenece a las Magnoliaceae, Plantago y Plantagoaceae. Es una hierba perenne con un ciclo de vida de seis a siete meses. Su altura es de entre 15 cm y 30 cm; sin embargo, su longitud puede variar según los diferentes hábitats de cultivo (Blanco et al., 2008).

Los tallos de *P. major* son rizomas cortos de color amarillo que pueden alcanzar hasta 15 cm en plantas adultas. Además, las raíces son blancas y de tamaño uniforme, provienen de tallos subterráneos (Blanco et al., 2008).

Las hojas son glabras, ovaladas, de color verde claro, con largos pecíolos adheridos al tallo; miden unos 50 cm de largo y 20 cm de ancho en plantas adultas. Nacen en el suelo en forma de rosetas y se desarrollan verticalmente. Tienen bordes dentados lisos o pequeños, y están inervados por nervios paralelos con tres u ocho venas. El pecíolo es liso, de unos 15 cm de largo (Blanco et al., 2008).

La flor es de color marrón verdoso; su corola es amarilla y muy pequeña (alrededor de 3 mm); por otro lado, las anteras son inicialmente lila y luego se tornan de color amarillo pálido. El pedicelo nace del mismo punto donde comienza el pecíolo y es más largo. La fruta es una pequeña cápsula que se abre horizontalmente cuando está madura, dejando caer las semillas. Cada planta puede producir más de 20.000 semillas. Estas semillas son ovaladas, de tamaño muy pequeño y de sabor ligeramente amargo; cada cápsula tiene de 8 a 16 semillas (Blanco et al., 2008).

2.2.1.2. Componentes químicos.

El llantén, científicamente conocido como *Plantago major*, contiene una variedad de sustancias que contienen azúcar, como sorbitol, sacarosa y fructosa. Además, esta planta también contiene alcaloides vegetales e indoxantina, que son alcaloides (Alonso 2004; Blanco et al., 2008).

El llantén contiene flavonoides, que tienen excelentes propiedades curativas y antioxidantes. Los flavonoides contenidos en el plátano son luteolina y narcotina (Alonso 2004; Blanco et al., 2008).

La composición del llantén contiene vitamina C, que se encuentra principalmente en las hojas de la planta. Además, las plantas suelen contener mucha fibra. No hay muchas sales minerales en la composición de la planta de llantén, pero el potasio llama la atención por su abundancia. El llantén tiene propiedades comestibles porque contiene mucha proteína y fibra, principalmente en las hojas (Alonso 2004; Blanco et al., 2008).

2.2.2. Cultivo de tejidos vegetales y la producción de metabolitos secundarios.

El cultivo de tejidos presenta aspectos y aplicaciones prácticas, de las que enfatiza la producción de metabolitos secundarios vegetales (Kreis 2007). Se declara como una excelente ayuda en los campos de la fitoquímica, primariamente en biogenética y enzimología, como fuente de aislamiento y comercialización de metabolitos secundarios. También se usa para el mejoramiento genético de plantas, la clonación de microorganismos libres de patógenos y la preservación de recursos de germoplasma (George y Debergh 2008).

En comparación con el cultivo tradicional de plantas, la principal ventaja del cultivo in vitro es que puede generar sustancias de utilidad controladas que no se ven afectadas por factores ambientales biológicos y no biológicos, como una mejora significativa en la productividad de metabolitos (Vanisree y Tsay 2007). También se reduce costos y aumenta la producción mediante el control automatizado del proceso y el ajuste del proceso metabólico; existe un método claro, calidad consistente y producción constante del producto, y la posibilidad de establecer un estricto sistema de control de calidad del producto (Paek et al., 2005; Vanisree y Tsay 2007).

El cultivo in vitro igualmente brinda la contingencia de esquematizar albúminas extrañas en explícitas condiciones, incluidas proteínas terapéuticas y antigénicas (Doran 2000). El proceso de extracción puede ser más simple, rápido y eficiente comparado con el fisicoquímico (concentración de sacarosa, nutrientes minerales, reguladores de crecimiento, condiciones de cultivo como pH, destemplanza, estructura gaseosa, agitación, intensidad lumínica), selección de líneas celulares, adición de precursores e intermediarios biosintéticos, extracción continua del producto, elicitación, transformación genética (Goleniowski y Trippi 1999; Wang et al., 2001; Sales et al., 2002; Shohael et al., 2006; Kim et al., 2009; Arora et al., 2010).

La gran necesidad de productos naturales en el mercado cosmopolita hace que el cultivo in vitro sea importante como fuente de metabolitos secundarios, lo que a su vez suscita el progreso de investigaciones sobre los procesos metabólicos que fiscalizan su fabricación. No obstante, no es solo su importancia comercial lo que aprueba que se despliegue la investigación en este campo. La producción de metabolitos secundarios por cultivo in vitro ofrece estrategias para el progreso de la investigación bioquímica concerniente con las vías metabólicas en un ambiente controlado (Karuppusamy 2009).

Aunque se han realizado muchas investigaciones para aumentar la aplicación comercial de la tecnología de cultivo celular en la producción de metabolitos secundarios, todavía hay pocos ejemplos exitosos. La shikonina, la berberina, el ácido rosmarínico y los ginsenósidos (obtenidos de *Lithospermum erythrorhizon*, *Coptis japonica*, *Coleus bluemii*, *Panax ginseng*, respectivamente) son el resultado de una producción a gran escala combinada con el cultivo celular y la tecnología de biorreactores (los tres primeros ejemplos) y el espacio para el cultivo de raíces (cuarto ejemplo) (Bourgand et al., 2001; Vanisree y Tsay 2007). Diversas investigaciones han perfeccionado tácticas para conseguir agregados antitumorales, como paclitaxel de *Taxus* (Ketchum et al., 1999), podofilotoxina de *Podophyllum peltatum* (Kutney et al., 1991), camptotecina de *Camptotheca acuminata* (Wiedenfeld et al., 1999) y vinblastina y vincristina de *Catharanthus roseus* (Verpoorte et al., 1997).

2.2.2.1. El cultivo de callos.

Hostias (2017) indica que el callo está compuesto por masas amorfas producidas por la proliferación de células parenquimatosas. Por lo general, es el resultado de una lesión y se forma un callo cuando se corta el tallo o la raíz. El callo no tiene un patrón de organización predecible, existe en el centro local de actividad del meristemo y, a menudo, aparece en el área del cambium básico con la zona de diferenciación vascular. Desde el punto de vista funcional, que puede desarrollar raíces, brotes y embriones normales, formando así plántulas.

Hostias (2017), también menciona que las peculiaridades frecuentes de la evolución del callo incluyen la compleja relación entre los materiales utilizados para iniciar el callo. Algunos tejidos de los callos están fuertemente lignificados y tienen una textura dura, que no es fácil de separar en pequeños fragmentos. Por el contrario, los callos quebradizos son fáciles de separar y se denominan cultivos friables frágiles ("friable cultures"). El callo puede ser amarillo, blanco, verde o con antocianina. Todo el callo puede estar pigmentado o algunas áreas pueden no presentar pigmentos. Su estructura anatómica presenta cambios considerables a lo largo del proceso de diferenciación celular.

Los explantes empleados para la generación de callos puede ser altamente diferenciado, como una raíz, tallo u hoja, o utilizar tejido menos diferenciado, como hipocótilos y cotiledones de plántulas recién germinadas, incluso embriones cigóticos maduros e inmaduros (Correia y Canhoto, 2010). Además, aunque con menor frecuencia, también se utilizan tejidos florales como estambres, pétalos y ovario (Stefanello et al., 2005). Depende principalmente del tipo de explante, genotipo, medio de cultivo, regulador del crecimiento y su concentración y combinación (Larson et al., 2006, Feeney et al., 2007, Rashmi y Trivedi 2014).

2.2.3. Auxinas y 2,4–Diclorofenoxiacético.

2.2.3.1. Auxinas.

Sharry et al., (2015), mencionan que la auxina incita el aumento y elongación celular y suscita el fraccionamiento celular en el cultivo de tejidos. Se complementan con citoquinina en la etapa de proliferación o sin citoquinina en la etapa de enraizamiento. Se transportan polarmente a través del floema desde la parte superior (tallo y raíz). Su estructura química varía mucho y pueden acumularse en forma inactiva combinados con oligosacáridos y aminoácidos.

Sharry et al., (2015), señale que el ácido indol acético (IAA) es la única auxina natural ubicada en la zona de crecimiento. Es fotosensible, por lo que no es conveniente utilizarlo en cultivo en suspensión. Son auxina sintética, el ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético y ácido indolbutírico (IBA). Son esenciales para el cultivo de meristemas, el proceso de morfogénesis directa e indirecta, la inducción de la embriogénesis somática y el enraizamiento de microestacas, y juegan un papel en la promoción del crecimiento de las puntas de los brotes. La cantidad de auxina agregada depende del nivel endógeno, se utiliza de 0,1 a 5,0 mg/L de IAA y, para la diferenciación de órganos, a menudo se indica que es necesario reducir la concentración de auxina. Si el 2,4-D se usa en muchas especies de plantas, tienden a formar callos.

2.2.3.2. 2,4–Diclorofenoxiacético.

Rico y Ortega (2017) indican que el 2,4-D ha sido el primer promotor sintético del crecimiento vegetal, el herbicida más utilizado en la agricultura, un arma química en la guerra, y ahora se utiliza como regulador del crecimiento para el cultivo de tejidos vegetales para obtener metabolitos con actividad medicinal. Pokorny en 1941, describió la síntesis de 2,4-D y 2,4,5-T, pero no mencionó ningún efecto biológico. Comenzando con 2,4-D, que se desarrolló originalmente en 1941 para promover el crecimiento de las plantas, se

descubrió que era más útil en la agricultura y para controlar el crecimiento de malezas, por lo que rápidamente se convirtió en el herbicida más utilizado en el mundo.

Rico y Ortega (2017). Asimismo, señalaron que el cultivo de tejidos vegetales in vitro, la fisiología y el proceso de crecimiento de las plantas están relacionados con los principios de mantener cultivos bacterianos en condiciones estériles, por lo que hay un medio específico para suscitar el desarrollo de las plantas. La finalidad inicial de esta tecnología es sembrar fragmentos de plantas en un medio específico y agregar pequeñas concentraciones de hormonas de crecimiento, como kinetina y auxinas sintéticas, como 2,4-D, para inducir la propagación de miles de plantas. El siguiente paso es obtener varios metabolitos secundarios y comprender que las células vegetales tienen toda la información para producir este tipo de compuestos, que han jugado un papel importante en la medicina de la sociedad humana durante miles de años. La fabricación de los metabolitos requiere un minucioso manejo de las hormonas vegetales agregadas al medio de cultivo en un intento de activar la respuesta de los tejidos vegetales a situaciones de estrés para producir estos metabolitos. Uno de los moduladores más utilizados es el 2,4-D, debido a que la respuesta que se observa en los tejidos sembrados es un proceso de desdiferenciación, que produce células con características de meristemas, que se multiplican de manera acelerada para producir los callos vegetales, estas células activan sus mecanismos de defensa, por lo tanto, es posible producir metabolitos secundarios producidos por las plantas en el medio natural para hacer frente a situaciones de estrés.

Las especies vegetales en las cuales se ha probado estas técnicas corresponden a plantas generadoras de ingredientes activos medicinales; asimismo, se ha aplicado en plantas que generan ingredientes activos en bajas cantidades, y que, en condiciones convencionales, el costo de cultivo resulta ser elevado.

2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS.

- **Plantas medicinales:** Las plantas medicinales se definen como cualquier especie vegetal que contienen sustancias que puedan utilizarse con fines terapéuticos y puedan emplearse como fuentes de sustancias del cual se sintetice nuevos fármacos (Cruz y López s.f.).
- **Cultivo de tejidos:** Estas técnicas pueden emplear en muchas especies vegetales, manipulando fracciones vivas de tejido vegetal de estas plantas, produciendo multiplicación masiva de tejidos y el resguardando las especies medicinales deseadas (Domínguez 2015).
- **Cultivo de callos:** El callo es un agregado de células proliferantes no especializadas. Crece en un medio semisólido en presencia de carbohidratos, sales minerales, vitaminas y aminoácidos, y se complementa con reguladores del crecimiento vegetal, que determinan y modifican la forma y propician la propagación a gran escala de la especie. Este tipo de propagación de plantas in vitro tiene un gran potencial para la producción de medicamentos a base de vegetales de alta calidad, lo que se puede lograr mediante la micropropagación (Domínguez 2015).
- **Principios activos:** Son sustancias fundamentales que los animales y humanos adicionan en su metabolismo al consumir verduras, semillas o frutas en sus dietas. Estos ingredientes activos no se pueden replicar artificialmente en el laboratorio y deben estar elaborados a partir de plantas, por lo que son insustituibles (Cruz y López s.f.).
- **Metabolitos secundarios:** Aquellos compuestos que tienen efectos farmacológicos o toxicológicos en humanos y/o animales (Durmic y Blache, 2012). Durante años, estos componentes se utilizan en la fabricación de medicinas y conservación de alimentos.
- **Auxinas:** Incluyen un grupo de sustancias, que juntas tienen la destreza

de producir elongación celular; no obstante, se observa que promueven la división celular en el cultivo de tejidos. Hay auxinas denominadas "naturales", que incluye al IAA, indol-3-acetonitrilo, etilindol-3-acetato, indol-3-carboxialdehído, indol-3-acetaldehído, indol-3-acetamida, indol-3-ácido carboxílico, ácido indol-3-propiónico, ácido 5-hidroxiindol-3-acético, ácido indol-3-acetilaspártico, etc.; y entre las auxinas "naturales", el IAA es el compuesto más ampliamente utilizado. Algunas sustancias sintéticas que causan efectos fisiológicos similares también se utilizan ampliamente; son las llamadas "auxinas sintéticas", de las cuales el 2,4-D, ANA y AIB están ampliamente disponibles y son de uso común (Roca y Mroginski 1991).

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN.

La investigación fue de tipo experimental, aplicada, con el propósito de verificar la hipótesis planteada y comprobar el resultado de los tratamientos aplicados acerca del desarrollo del cultivo de callos estimulados por la aplicación de las concentraciones del 2,4-Diclorofenoxiacético.

3.2. UBICACIÓN.

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Meristemas de la Universidad Nacional de Ucayali, ubicado en el distrito de Manantay, Carretera Federico Basadre Km 6.200. Ubicación Geográfica:

- Latitud Sur: 8°24'14".
- Longitud Oeste: 74°34'30".
- Altitud: 156.972 msnm.

3.3. DURACIÓN DEL EXPERIMENTO.

La investigación tuvo una duración de ocho meses, iniciándose en el mes de noviembre del 2019 y culminando en el mes de julio del 2020.

3.4. ECOLOGÍA Y CLIMA.

El clima de la región Ucayali se caracteriza por ser cálido y húmedo, con una temperatura media anual de 26,9 °C, con muy poca variación entre las máximas (30,5 °C) y mínimas (17,4 °C) durante el año. El promedio de horas sol varía notablemente, siendo julio, agosto y setiembre las mayores radiaciones solares registradas; los meses de mayor precipitación con menor cantidad de horas sol son octubre, noviembre, febrero y marzo. La precipitación anual es de 1773 mm (promedio de 25 años), con una distribución que incluye un periodo seco en los meses de junio, julio y agosto (Aybar et al., 2017).

3.5. MATERIALES Y EQUIPOS.

3.5.1. Materiales.

3.5.1.1. Material vegetal.

Se utilizaron semillas de llantén y plantones de llantén.

3.5.1.2. Materiales de laboratorio.

Se emplearon: Matraces Erlenmeyers, vasos de precipitado frascos de vidrio de 250 ml de boca ancha, placas petri, mechero de alcohol, papel aluminio, espátula, pinzas, hojas y mango de bisturí.

3.5.2. Equipos.

Los equipos que se utilizaron fueron: Balanza analítica, cocina con agitación magnética, autoclave, pH metro y cámara de flujo laminar.

3.5.3. Reactivos.

Los reactivos empleados fueron: Sales de Murashige and Skoog, vitaminas de Murashige and Skoog, sacarosa, agar agar, ácido 2,4–Diclorofenoxiacético granulado, hidróxido de potasio, alcohol de 70%, alcohol de 96%, hipoclorito de sodio, Tween 80, fungicida a base de Benomil.

3.6. VARIABLES.

Cuadro 1. Variables estudiadas.

Variables	Indicadores	Instrumentos de medida
Independientes		
Concentraciones de Ácido Diclorofenoxiacético (2,4-D)	Tratamientos: 0,25 ppm de 2,4-D 0,50 ppm de 2,4-D 0,75 ppm de 2,4-D 1 ppm de 2,4-D 2 ppm de 2,4-D 3 ppm de 2,4-D	Concentraciones: ppm
Dependientes		
Introducción de tejido vegetal de llantén	Tipo de tejido: semillas, hojas Porcentaje de explantes sanos Porcentaje de explantes fenolizados Porcentaje de explantes contaminados	Conteo Conteo Conteo Conteo
Inducción de callos	Color de callos Aspecto de callos Peso fresco de callos	Observación Observación Balanza analítica
Intervinientes		
Condiciones ambientales de la cámara de incubación	Temperatura máxima, mínima y media Humedad relativa	Termohidrómetro

3.7. PROCEDIMIENTOS.

3.7.1. Introducción de semillas de llantén a condiciones de in vitro.

3.7.1.1. Colecta de semillas de campo.

Se colectaron inflorescencias conteniendo frutos de llantén, a partir de plantas que se encontraron desarrollándose en viveros en la ciudad de Pucallpa.

Las inflorescencias fueron trasladadas al laboratorio de Cultivo de Tejidos y Meristemas de la UNU para proceder a aplastarlos

levemente con los dedos, de tal manera que se liberen las semillas que se encuentran en la parte interna de los frutos.

Con la ayuda de un colador de plástico, se procedió a separar las semillas de los residuos de las inflorescencias, hasta que se obtenga solo semillas libres de residuos.

Las semillas fueron colocadas en una placa Petri de vidrio, rotulados y guardados en un refrigerador a 4 °C.

3.7.1.2. Elaboración de medio de cultivo para semillas de llantén.

Se preparó 500 ml de medio de cultivo, para 20 frascos de vidrio de 250 ml de capacidad, el cual estuvo constituido de sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 20 g/L de sacarosa y 11 g/L de como agente gelificante, no incorporándole ningún regulador de crecimiento. El pH del medio se ajustó a 5,7–6,0.

El medio de cultivo preparado fue vertido en cada frasco de vidrio, generando una película de 1 cm de espesor, luego se le colocó una tapa elaborada con papel aluminio para aislar la parte interna del frasco del exterior.

Los frascos preparados fueron autoclavado a 121 °C, a 15 libras/cm², por un espacio de 20 minutos.

Concluido el proceso de esterilización, se extrajeron los frascos para trasladarlos a la cámara de siembra para su enfriamiento y siembra correspondiente.

3.7.1.3. Siembra de semillas a condiciones de in vitro.

Se procedió a cortar un trozo de papel filtro de forma cuadrada, en el cual se colocaron las semillas de llantén ya limpias y conservadas. Con la ayuda de dos clips, se sujetaron los extremos del papel filtro

quedando un cartucho.

El cartucho elaborado fue sometido al tratamiento de desinfección, el cual consistió en sumergirlo en una solución de Hipoclorito de sodio al 1% por un espacio de 20 minutos, enjuagándolo con agua destilada por 4 veces.

En una placa Petri estéril, y con la ayuda de pinzas estériles, se abrió el cartucho, para poder tomar las semillas desinfectadas. Se procedió a sembrar 20 semillas por frasco, depositando las semillas sobre la superficie del medio de cultivo.

Los frascos sembrados fueron sellados con cinta de plástico, y acondicionados en los estantes, dentro de la cámara de incubación, el cual presenta condiciones de 1000 lux de intensidad lumínica, una temperatura controlada de 24 °C, porcentaje de humedad de 60% y un fotoperiodo de 12/12 horas luz y oscuridad.

Las semillas germinaron a los 10 días de incubación y a los 58 días de incubación, las plántulas formadas de llantén lograron 3 cm de altura y 4 hojas.

3.7.2. Introducción de explantes de llantén provenientes de vivero.

3.7.2.1. Colecta de plantas de llantén de campo.

Se colectaron plantas enteras de llantén, los cuales se acondicionaron en macetas, conteniendo un sustrato 2:1 (materia orgánica: arena).

Las plantas se acondicionaron en un pequeño jardín, ubicado en las zonas verdes aledañas al laboratorio de Cultivo de Tejidos y Meristemas del UNU.

Se aplicó de manera interdiaria un fungicida sistémico a base de Benomil, diluido en agua (5 g/litro) y asperjado a las plantas con la ayuda

de un aspersor de mano, con la finalidad de eliminar los contaminantes endógenos que puedan encontrarse en las plantas.

3.7.3. Siembra de explantes en medios de cultivo conteniendo las concentraciones de 2,4–Diclorofenoxiacético estudiados.

3.7.3.1. Elaboración de medios de cultivo conteniendo las concentraciones de 2,4–Diclorofenoxiacético estudiados.

Se preparó 500 ml de medio de cultivo, para 15 frascos de vidrio de 250 ml de capacidad, para cada tratamiento, compuesto de sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 30 g/L de sacarosa y 11 g/L de como agente gelificante, incorporándole las concentraciones de 2,4–Diclorofenoxiacético estudiados (0,25 ppm, 0,5 ppm, 0,75 pmm, 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm). El pH del medio se ajustó a 5,7–6,0.

El medio de cultivo preparado fue vertido en cada frasco de vidrio, generando una película de 1 cm de espesor, luego se le colocó una tapa elaborada con papel aluminio para aislar la parte interna del frasco del exterior.

Los frascos preparados fueron autoclavado a 121 °C, a 15 libras/cm², por un espacio de 20 minutos. Concluido el proceso de esterilización, se extrajeron los frascos para trasladarlos a la cámara de siembra para su enfriamiento y siembra correspondiente.

3.7.3.2. Siembra de explantes (hojas y pecíolos) provenientes de plántulas de llantén germinadas in vitro.

Una vez que las plántulas hayan desarrollado hojas, se extrajeron de los frascos de cultivo para proceder a cortar fragmentos de aproximadamente 2 cm de largo, los cuales fueron sembrados en frascos de vidrio, conteniendo los tratamientos en estudio.

Los frascos sembrados fueron sellados con cinta de plástico, y colocados en los estantes, dentro de la cámara de incubación, el cual presento condiciones de 1000 lux de intensidad lumínica, una temperatura controlada de 24 °C, porcentaje de humedad de 60% y un fotoperiodo de 12/12 horas luz y oscuridad.

3.7.3.3. Siembra de explantes (hojas y pecíolos) provenientes de plantas de llantén de vivero.

Las hojas conteniendo pecíolos, fueron desinfectados con alcohol de 70% durante 1 minuto, para luego sumergirlo en una solución de hipoclorito sódico al 2%, más tres gotas de Tween 80, durante 20 minutos.

Inmediatamente, los explantes fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de hipoclorito y etanol, y se agregó al vaso de enjuague una solución de 500 mg/200 ml de Gentamicina.

Los fragmentos de hojas y peciolos fueron extraídos progresivamente de la solución de Gentamicina, para ser cortados sobre una placa Petri estéril, segmentos de aproximadamente 2 cm de largo, los cuales fueron sembrados en frascos de vidrio, conteniendo los tratamientos en estudio.

Los frascos sembrados fueron sellados con cinta de plástico, y acondicionados en los estantes, dentro de la cámara de incubación, el cual presentó condiciones de 1000 lux de intensidad lumínica, una temperatura controlada de 24 °C, porcentaje de humedad de 60% y un fotoperiodo de 12/12 horas luz y oscuridad.

3.7.4. Evaluación de las variables.

Se procedió a realizar el pesado en balanza analítica, de los explantes preparados al momento de la siembra en ambas condiciones (de plántulas germinadas in vitro y de plantas provenientes de vivero).

Se realizaron observaciones de los frascos de manera semanal para determinar el momento en el cual se inicia la formación del tejido calloso a partir de los explantes sembrados.

Luego de 6 meses de incubación, se procedió a pesar el tejido calloso que se formaron a partir de los explantes sembrados sobre los medios de cultivo con las concentraciones de 2,4-Diclorofenoxiacético estudiados.

Asimismo, se determinó por observación, el color, textura y aspecto del tejido calloso, de acuerdo a los tratamientos estudiados.

3.8. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.8.1. Población.

Estuvo constituida por un total de 180 frascos conteniendo explantes provenientes de plántulas de llantén germinadas in vitro y plantas provenientes de vivero.

3.8.2. Muestra.

Estuvo constituida por 15 frascos, correspondiente al número de repeticiones por cada tratamiento estudiado.

3.9. DISEÑO ESTADÍSTICO.

Se aplicó un Diseño Completamente al Azar, con 6 tratamientos y 15 repeticiones (frascos) por tratamiento. Los datos se analizaron con el software SAS, utilizando la prueba de varianza ANOVA y las diferencias entre las medias se determinó mediante la prueba de promedios de Tukey ($P \leq 0,05$).

El modelo estadístico del diseño experimental es el siguiente:

$$Y_{ij} = U + T_i + E_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = Variable respuesta.

U = Media general.

T_i = Efecto del i – ésimo tratamiento.

E_{ij} = Efecto del error experimental.

Cuadro 2. Esquema del análisis de varianza.

F.V.	G.L.
Tratamientos	5
Error	84
Total	89

Cuadro 3. Tratamientos estudiados.

Tratamiento	Descripción	Repeticiones (frascos)
1	0,25 ppm de 2,4-D	15
2	0,50 ppm de 2,4-D	15
3	0,75 ppm de 2,4-D	15
4	1 ppm de 2,4-D	15
5	2 ppm de 2,4-D	15
6	3 ppm de 2,4-D	15

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN DE EXPLANTES.

El cuadro 4, muestra los resultados de contaminación observados en la introducción de semillas de Llantén a condiciones de in vitro.

Cuadro 4. Porcentaje de contaminación por hongos, bacterias y germinación de plántulas sanas de Llantén bajo condiciones de in vitro.

Tratamiento de desinfección de semillas	No de frascos sembrados (20 semillas/frasco)	% Contaminación por hongos	% Contaminación por bacterias	% Germinación de plántulas sanas
Hipoclorito de sodio al 1% por un espacio de 20 minutos, enjuagado con agua destilada por 4 veces	20	0	0	90

El cuadro 4, muestra que el tratamiento de desinfección aplicado a las semillas de llantén, logró cero por ciento de contaminación por hongos y bacterias, generando un porcentaje de germinación de 90% bajo condiciones de in vitro.

El cuadro 5, muestra los resultados de contaminación observados en la introducción de explantes de llantén provenientes de plantas en vivero, a condiciones de in vitro.

Cuadro 5. Porcentaje de contaminación por hongos, bacterias, número de explantes fenolizados y número de explantes sanos de llantén bajo condiciones de in vitro.

Tratamiento	% Contaminación por hongos	% Contaminación por bacterias	% de explantes fenolizados	% explantes sanas
T1	40	30	30	0
T2	60	40	10	0
T3	50	30	20	0
T4	50	20	30	0
T5	40	30	30	0
T6	30	50	20	0

Observando el cuadro 5, se muestra que, la aplicación del tratamiento de desinfección, constituido por 2% de Hipoclorito de Sodio más 3 gotas de Tween 80, expuesto por un espacio de 20 minutos, para luego enjuagar los explantes con agua destilada estéril para luego ser inmersos en una solución de 500 mg/200 ml de Gentamicina, y sembrados en los medios de cultivo en estudio, se determinó que los porcentajes de contaminación por hongos estuvieron en rangos de 30% a 60%, los porcentajes de contaminación por bacterias estuvieron en rangos de 20% a 50% y los porcentajes de explantes fenolizados (oxidados) estuvieron en rangos de 10% a 30%, motivo por el cual no se obtuvieron explantes sanos que puedan ser evaluados en su efecto con las diferentes concentraciones de 2,4–Diclorofenoxiacético.

Al respecto, Hartman (1995) señaló que el control de patógenos en la planta madre facilita su introducción en condiciones in vitro, pues cuando se establecen explantes estériles en el medio de cultivo, los factores que inciden en el éxito de esta etapa incluyen la selección de explantes, remoción de contaminantes y condiciones de cultivo. De igual manera, Hurtado (1994) afirma que, los tejidos vegetales contienen en su superficie una abundante microflora, las cuales deben ser removidas por desinfección antes del corte de los tejidos y órganos que será

introducidos a condiciones de cultivo in vitro. El desinfectante apropiado, así como su concentración y el tiempo de exposición, debe ser determinado empíricamente de acuerdo al material vegetativo con el que se utiliza. El mismo autor indica que esto puede deberse a que en cualquier medio de cultivo pueden crecer microorganismos principalmente hongos y bacterias, las cuales compiten ventajosamente en el explante, debido a la mala desinfección del tejido o debido a la presencia de fitopatógenos que se encuentran dentro del explante (endófitos), los mismos que afloran en condiciones de in vitro. Estas afirmaciones, explican la presencia de una alta contaminación de hongos y bacterias, de explantes provenientes de plantas de llantén de vivero, motivo por el cual no se pudo establecer explantes sanos para las evaluaciones de los efectos del 2,4-D y la generación de tejidos callosos a partir de estos.

4.2. TIEMPO DE INICIO DE FORMACIÓN DE CALLOS.

Al efectuar el análisis de varianza para la variable tiempo de inicio de formación de callos, se determinó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos estudiados (ver anexo).

Cuadro 6. Tiempo de inicio de formación de callos.

Tratamiento	Descripción	Tiempo de inicio de formación de callos (días)
1	0,25 ppm de 2,4-D	44,7 a
2	0,50 ppm de 2,4-D	45,2 a
3	0,75 ppm de 2,4-D	44,6 a
4	1 ppm de 2,4-D	44,6 a
5	2 ppm de 2,4-D	45,4 a
6	3 ppm de 2,4-D	45,2 a

*Letras iguales no son significativamente diferentes

Al realizar la prueba de promedios de Tukey, se constató que no existen diferencias significativas entre los tratamientos estudiados, en los cuales, los explantes iniciaron la formación de los tejidos callosos entre 44,6 a 45,2 días, como se muestra en la figura 1.

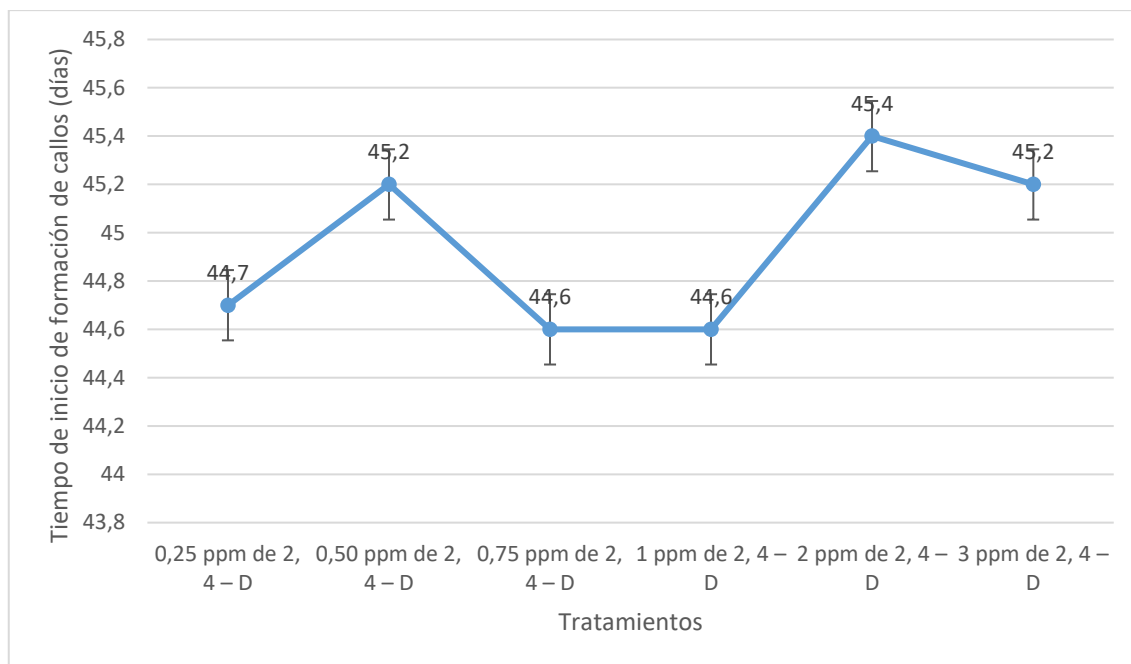


Figura 1. Tiempo de inicio de formación de callos.

Al respecto, Alvarado et al., (2021) determinaron el efecto del 2,4-Diclorofenoxiacético en la inducción de callos a partir de limbos foliares de *Ipomoea batatas* "camote", en medio de cultivo MS, observándose que, a los 50 días de evaluación, en la concentración de 9,48 ppm de 2,4-D se observó la presencia de un 100% de callos, lo cual coincide con los resultados de tiempo de inicio de formación de tejido calloso en los explantes de llantén.

4.3. PESO INICIAL DE EXPLANTES Y PESO FINAL DE CALLOS.

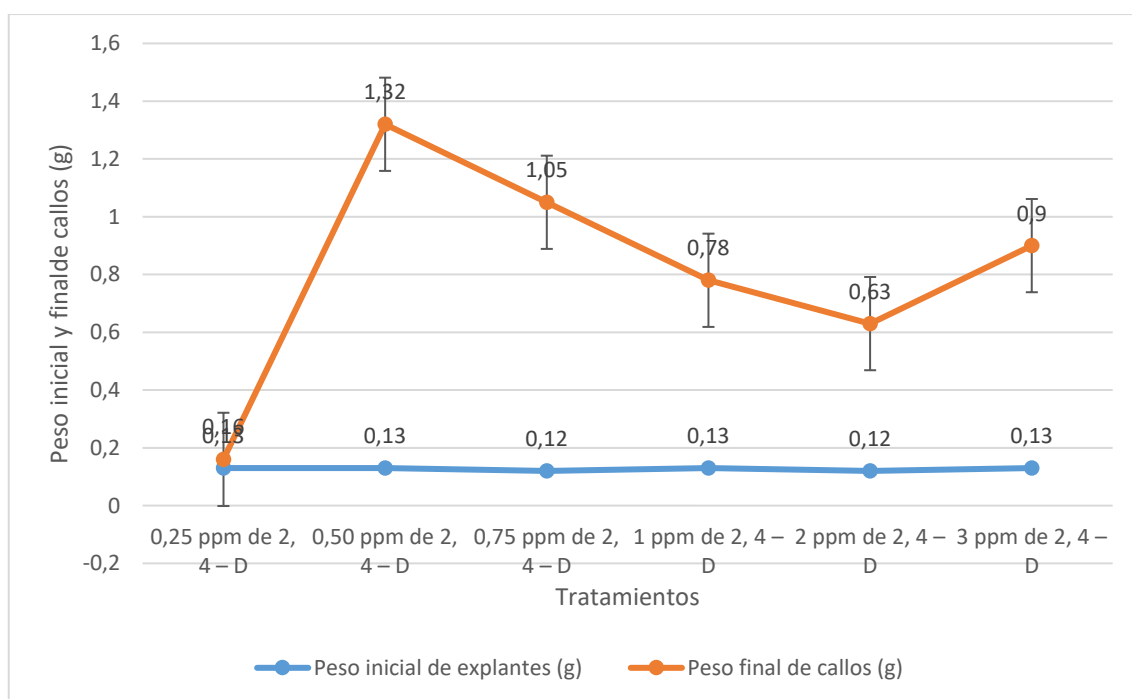
Al efectuar el análisis de varianza para la variable peso inicial de explantes, se determinó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos estudiados, sin embargo, al realizar el análisis de varianza para la variable peso final de callos, se observa que existen diferencias significativas entre los tratamientos estudiados (ver anexo).

Cuadro 7. Peso inicial de explantes y peso final de callos.

Tratamiento	Descripción	Peso inicial de explantes (g)	Peso final de callos (g)
1	0,25 ppm de 2,4-D	0,13 a	0,16 d
2	0,50 ppm de 2,4-D	0,13 a	1,32 a
3	0,75 ppm de 2,4-D	0,12 a	1,05 ab
4	1 ppm de 2,4-D	0,13 a	0,78 bc
5	2 ppm de 2,4-D	0,12 a	0,63 c
6	3 ppm de 2,4-D	0,13 a	0,90 bc

*Letras iguales no son significativamente diferentes.

Al realizar la prueba de promedios de Tukey, para el peso inicial de explantes, se demuestra que no existen diferencias significativas entre los tratamientos estudiados, sin embargo, al realizar la prueba de promedios de Tukey, para el peso final de callos, se observan diferencias significativas entre los tratamientos estudiados, en los cuales, los tratamientos con 0,50 ppm de 2,4-Diclorofenoxiacético y 0,75 ppm de 2,4-Diclorofenoxiacético lograron los mejores promedios de peso de callos formados en 180 días de cultivo in vitro, como se muestra en la figura 2.

**Figura 2. Peso inicial de explantes y peso final de callos.**

Al respecto, Alvez y Oropeza (2015) analizaron la efectividad de las auxinas sintéticas ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (Dicamba), en la inducción del proceso de embriogénesis somática y la regeneración de vitroplántulas de distintas variedades de caña de azúcar, obteniéndose mayor porcentaje de callo embriogénico y mayor regeneración de plantas en medios suplementados con Dicamba (70,83% y 89,00% respectivamente), seguido de los medios con 2,4-D (62,08% y 66,12% respectivamente). Espinosa et al., (2012) evaluaron el efecto del tipo de explante (limbos foliares, tallos y pecíolos) y la concentración de 2,4-D (0; 0,5; 1,0 y 2,0 mg.L-1) en la formación de callos, en *Morus alba* L., utilizando un medio de cultivo con sales y vitaminas MS (1962), observándose que la formación de callos en todos los tipos de explantes se inició en los primeros 15 días posteriores al establecimiento in vitro y el aumento de la concentración de 2,4-D en el medio de cultivo, incrementó el tamaño de los callos, con los mejores resultados en las concentraciones de 1,0 y 2,0 mg.L-1. Teruya (2016) evaluó el efecto de diferentes concentraciones de fitoreguladores de crecimiento en la inducción de callo embriogénico utilizando hipocotilos de *Gossypium barbadense* L. “algodón nativo” color pardo, en medios Murashige-Skoog (MS) suplementados con diferentes concentraciones de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), kinetina (Kin) y agua de coco, observándose la mayor proliferación de callo friable se obtuvo en 82,5% de explantes cultivados en medio MS enriquecido con 0.1 mg/l de 2,4-D y 100 ml/l de agua de coco e incubados en fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad, lo cual demuestra que en estos cultivos, el 2, 4-D indujo al desarrollo de tejido caloso, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio.

4.4. INCREMENTO DE PESO DE CALLOS.

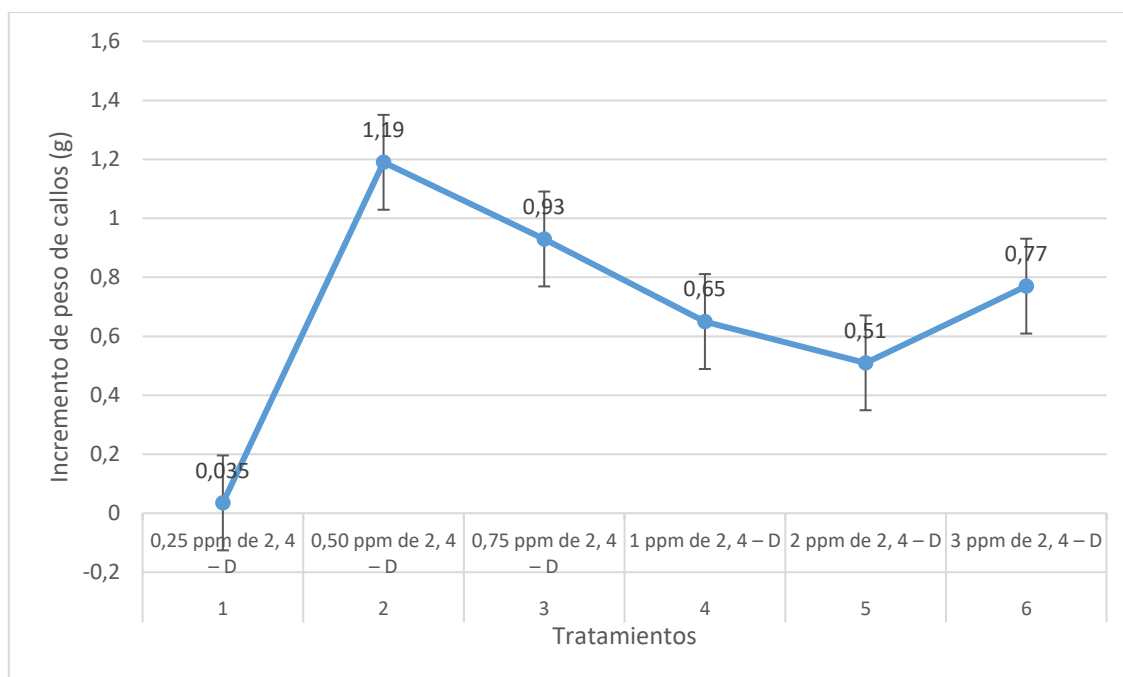
Al efectuar el análisis de varianza para la variable incremento de peso de callos formados, se determinó que existen diferencias significativas entre los tratamientos estudiados (ver anexo).

Cuadro 8. Incremento de peso de callos.

Tratamiento	Descripción	Incremento de peso de callos (g)
1	0,25 ppm de 2,4-D	0,035 d
2	0,50 ppm de 2,4-D	1,19 a
3	0,75 ppm de 2,4-D	0,93 ab
4	1 ppm de 2,4-D	0,65 bc
5	2 ppm de 2,4-D	0,51 c
6	3 ppm de 2,4-D	0,77 bc

*Letras iguales no son significativamente diferentes.

Al realizar la prueba de promedios de Tukey, para el incremento de peso de callos, se demuestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos estudiados, en los cuales, los tratamientos con 0,50 ppm de 2,4-Diclorofenoxiacético y 0,75 ppm de 2,4-Diclorofenoxiacético lograron los mejores promedios de incremento de peso de callos formados en 180 días de cultivo in vitro, como se muestra en la figura 3.

**Figura 3. Incremento de peso de callos.**

Al respecto, Sánchez y Alvarenga (2014) evaluaron dos protocolos de inducción de callo a partir de segmentos foliares de plantas in vitro de *Uncaria tomentosa*, determinando el medio de cultivo más eficiente para la formación de callo es el Murashige y Skoog (MS) (1962) complementado con 2 mg/L de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y 1 mg/L de ácido 3-indolbutírico (AIB), generando mayor biomasa, los callos fueron friables, adecuado para el establecimiento de suspensiones celulares, asimismo, Hernández et al., (2019) determinaron el efecto de la concentración de 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) en la inducción de callos in vitro a partir de cotiledones de rocoto cv. Serrano, obteniéndose los mejores resultados en los tratamientos con 0.75 y 1 mg·L de 2,4-D, logrando a los 21 días, 72% de proliferación de callo, concordando con los resultados obtenidos en el presente estudio en los cuales las concentraciones de 0,50 ppm de 2,4-D y 0,75 ppm de 2,4-D, lograron los promedios de peso de tejido callos en Llantén.

4.5. PORCENTAJE DE INCREMENTO DE PESO DE CALLOS.

Al efectuar el análisis de varianza para la variable porcentaje de incremento de peso de callos formados, se determinó que existen diferencias significativas entre los tratamientos estudiados (ver anexo).

Cuadro 9. Porcentaje de incremento de peso de callos.

Tratamiento	Descripción	Porcentaje de incremento de peso de callos (g)
1	0,25 ppm de 2,4-D	21,76 c
2	0,50 ppm de 2,4-D	86,30 a
3	0,75 ppm de 2,4-D	88,36 a
4	1 ppm de 2,4-D	82,09 a
5	2 ppm de 2,4-D	73,03 b
6	3 ppm de 2,4-D	85,22 a

*Letras iguales no son significativamente diferentes.

Al realizar la prueba de promedios de Tukey, para el porcentaje de incremento de peso de callos, se demuestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos estudiados, en los cuales, los tratamientos con 0,50 ppm de 2,4–Diclorofenoxiacético, 0,75 ppm de 2,4–Diclorofenoxiacético, 1 ppm de 2,4–Diclorofenoxiacético y 3 ppm de 2,4–Diclorofenoxiacético lograron los mejores promedios de porcentaje de incremento de peso de callos formados en 180 días de cultivo in vitro, como se muestra en la figura 4.

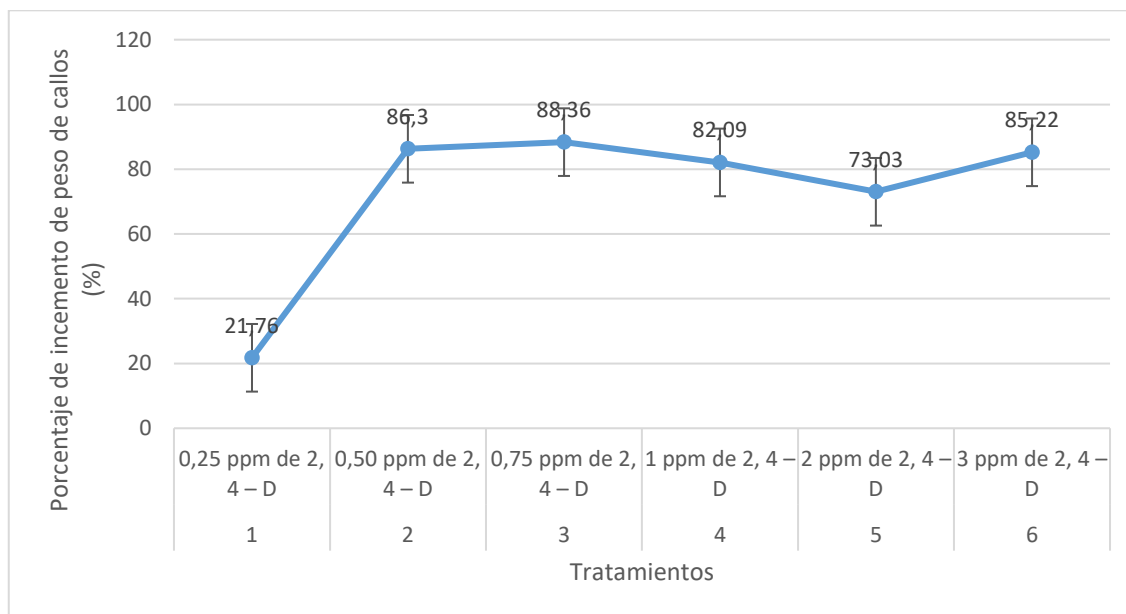


Figura 4. Porcentaje de incremento de peso de callos.

Al respecto, Córdova et al., (2014) estudiaron la inducción de callos in vitro a partir de explantes (hojas, nudos y la pulpa) de *Myrciaria dubia*, en medio MurashigeSkoog (1962) suplementado con ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), bencilaminopurina (BAP) y kinetina (KIN), observándose que, el tratamiento con 2 mg/L de 2,4-D y 0,1 mg/L de BAP estimuló mayor callogénesis en los tres tipos de explantes, formándose los callos a partir de la primera semana (nudos), cuarta semana (hojas) y sexta semana (pulpa), presentando los callos un aspecto friables (hojas y nudos) y no friables (pulpa), asimismo, Bari et al., (2018), estudiaron el efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la inducción de callos de *Salvia hispanica* L. “chía”, observándose un período de latencia hasta el día 20 de cultivo, seguido de un período de crecimiento exponencial entre los días 20 y 54, siendo el tratamiento con 2,4-D (2,25 μ M) el que mostró la más alta velocidad específica de crecimiento ($0,22 \pm 0,01$ /día), el

tiempo de duplicación más bajo ($31,51 \pm 1,00$ día) y la mayor biomasa máxima ($1,46 \pm 0,01$ g PF), dichos resultados concuerdan con el incremento de peso de tejido calloso de llantén, inducido por las concentraciones de 0,50 ppm y 0,75 ppm de 2, 4–D.

4.6. COLOR, TEXTURA Y CARACTERÍSTICA DEL CALLO.

Se realizó el análisis de media, desviación estándar y mediana para las variables color de callos, textura y aspecto del tejido callos para los tratamientos estudiados, en los cuales, los tratamientos 1, 2, 3 y 5 callos con un color marrón oscuro y los tratamientos 4 y 6 presentaron callos con un color negro. En cuanto a la textura del tejido callos, todos tratamientos mostraron tejidos compactos y para el aspecto del tejido calloso, todos los tratamientos mostraron un aspecto duro y compacto.

Cuadro 10. Color, textura y característica del callo.

Tratamientos	Estadísticos	Color	Textura	Aspecto del tejido
1	Media	1,67	1,00	1,00
	Desv. típ.	0,48	0,00	0,00
	Mediana	2,00	1,00	1,00
2	Media	1,93	1,00	1,00
	Desv. típ.	0,79	0,00	0,00
	Mediana	2,00	1,00	1,00
3	Media	2,67	1,27	1,27
	Desv. típ.	0,97	0,45	0,45
	Mediana	2,00	1,00	1,00
4	Media	1,40	1,00	1,00
	Desv. típ.	0,50	0,00	0,00
	Mediana	1,00	1,00	1,00
5	Media	1,93	1,00	1,00
	Desv. típ.	0,88	0,00	0,00
	Mediana	2,00	1,00	1,00
6	Media	1,00	1,00	1,00
	Desv. típ.	0,00	0,00	0,00
	Mediana	1,00	1,00	1,00

Al respecto, Gonzales et al., (2006) se probaron diferentes concentraciones de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) (0; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 y 1,0 mg l⁻¹) para inducir embriogénesis somática en segmentos de hojas jóvenes de plantas de *Plantago major* L. y *Plantago hirtella* Kunth, determinándose que, a partir de la tercera semana de cultivo, se desarrolló un callo de apariencia nodular, friable y con una coloración entre pardo claro y crema siendo este proceso de inducción modificado levemente por la concentración del regulador de crecimiento aplicado al medio, coincidiendo con los resultados obtenidos en la inducción de tejido calloso en llantén, en los cuales, los tejidos presentaron colores marrón oscuro y negro, y de aspecto compacto, producto de las condiciones ambientales de cultivo y de las concentraciones de 2, 4-D al cual estuvieron expuestas.

V. CONCLUSIONES.

De acuerdo a los objetivos propuestos, se concluye:

1. El uso de semillas de llantén como explantes, desinfectados con Hipoclorito de sodio al 1% por un espacio de 20 minutos y enjuagado con agua destilada por 4 veces, evitó la contaminación por hongos y bacterias, generando a su vez, 90% de germinación de bajo condiciones de in vitro, no obteniéndose tejido sano a partir de explantes provenientes de plantas de vivero.
2. Los tratamientos con 0,50 ppm de 2, 4–Diclorofenoxiacético y 0,75 ppm de 2, 4–Diclorofenoxiacético lograron los mejores promedios de peso final de callos de llantén.

VI. RECOMENDACIONES.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se recomienda:

- 1.** Utilizar semillas de llantén proveniente de plantas seleccionadas para la introducción y producción de plántulas bajo condiciones de in vitro.
- 2.** Utilizar las concentraciones de 0,50 ppm de 2,4–Diclorofenoxiacético y 0,75 ppm de 2,4–Diclorofenoxiacético para generar la producción de tejido callos, para ser utilizados como material genético para el cultivo de suspensiones celulares y la producción de metabolitos secundarios medicinales.
- 3.** Estudiar el uso de citocininas en combinación con las concentraciones de 2,4–Diclorofenoxiacético para mantener el crecimiento de callos de llantén de manera indeterminada.
- 4.** Estudiar la aplicación de diferentes concentraciones de 2,4-Diclorofenoxiacético, en la generación de callos en especies medicinales tropicales como el ajo sacha, paico, jergón sacha, entre otros.

VI. LITERATURA CONSULTADA.

- Alonso, J. 2004. Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos. Buenos Aires-Argentina. S. edt; 2004., Pp. 218 – 220, 684 – 689.
- Alvez, B.; Oropeza, M. 2015. Efecto de Dicamba y de ácido 2,4 Diclorofenoxiacético sobre la embriogénesis somática en caña de azúcar. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XVII No. 2 diciembre 2015 85-94. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54280
- Alvarado, L.; López-Medina, S.; Mostacero-León, J.; López-Zavaleta, A.; Gil-Rivero, A.; De La Cruz-Castillo, A.; Villena-Zapata, L. 2021. Efecto del 2,4 Diclorofenoxiacético en la inducción de callos a partir de limbos foliares de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. “camote”. REBIOL, 41(1):120-126. DOI: <http://dx.doi.org/10.17268/rebiol.2021.41.01.12>
- Andrys, D.; Kulpa, D.; Grzeszczuk, M. et al. (2017). Antioxidant and antimicrobial activities of *Lavandula angustifolia* Mill., field-grown and propagated in vitro. Folia Horticulturae, 29(2): 161-180. DOI: <https://doi.org/10.1515/fhort-2017-0016>.
- Arias-Ramírez, A.R. 2002. Biotecnología y metabolitos secundarios en *Lepidium peruvianum* Chacón, Maca. Tesis para optar el título de Biólogo con mención en Genética. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. Lima, Perú. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/1401/Arias_ra.pdf?sequence=1
- Arora, J.; Goyal, S.; Ramawat, K. 2010. Enhanced stilbene production in cell cultures of *Cayratia trifolia* through co-treatment with abiotic and biotic elicitors and sucrose. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 46:430-436
- Atanasov, A.; Waltenberger, B.; Pferschy, E. et al. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33(8): 1582-1614. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.08.001.
- Aybar-Camacho, C.; Lavado-Casimiro, W.; Sabino, E.; Ramírez, S.; Huerta, J.; Felipe-Obando, O. 2017. Atlas de zonas de vida del Perú – Guía

Explicativa. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú (SENAMHI). Dirección de Hidrología.

Bari, M.; Marconi, P.; López, M.; Álvarez, M. 2018. Influencia de reguladores de crecimiento sobre el establecimiento de cultivos in vitro de *Salvia hispánica* L. ("chía") y sobre su contenido de ácidos grasos. *Dominguezia* - Vol. 34(2) – 2018. Disponible en:

<http://www.dominguezia.org/volumen/articulos/34207.pdf>

Blanco, B.; Garro, A.; Saborio, G. 2008. Descripción Anatómica, Propiedades Medicinales y Uso Potencial de *Plantago major* (Llantén mayor). México D.F-Mexico; S. edt., 2008. P.p. 17-24

Bourgau, F.; Gravot, A.; Milesi, S.; Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161:839-851.

Chandra, S.; Lata, H.; Varma, A. (2013). *Biotechnology for Medicinal Plants Micropropagation and Improvement*. Springer-Verlag (Berlin-Heidelberg). Capítulos 8 y 9 pp. 191-241. ISBN 978-3-642-29974-2.

Correia, S.; Canhoto, J. 2010. Characterization of somatic embryo attached structures in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae). *Protoplasma* 242: 95-107. DOI: 10.1007/s00709-010-0130-z.

Córdova, A.; Cobos, M.; Imán, S.; Castro, J. 2014. Un método eficiente para la inducción de callos in vitro en *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh "Camu Camu". *Scientia Agropecuaria* 5 (2014) 25 – 34. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/agro/v5n1/a03v5n1.pdf>

Cosme Pérez, I. 2008. El uso de las plantas medicinales. *Revista intercultural*. Universidad Veracruzana Intercultural. Disponible en: https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/8921/tra6_p23-26_2010-0.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Cruz Hernández, D.; López Silva, V. s.f. Plantas medicinales. Disponible en: http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/ifig/Plantas_medicinales_Seminario_Final_Silva_Nataly.pdf

Debnath, M.; Malik C.; Bisen, P. 2006. A Tool for the Production of High Quality Plantbased Medicines. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7: 33-49. DOI: 10.2174/138920106775789638.

- Domínguez, F. 2015. La biotecnología y las plantas medicinales. Ciencia. Julio – Setiembre 2015. disponible en:
https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/66_3/PDF/Biotecnologia.pdf
- Doran, P. 2000. Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr Opin Biotechnol* 11:199-204.
- Durmic, Z.; Blache, D. 2012. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Animal Feed Science and Technology*, 176 (2012) 150– 162.
- Espinosa, A.; Silva, J.; Sariég, S.; Cholo-Masapanta, L.; Delgado, H. 2012. Efecto del tipo de explante y la concentración de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético en la formación de callos en *Morus alba* L. *Pastos y Forrajes*, Vol. 35, No. 4, octubre-diciembre, 407-416, 2012. Disponible en:
<http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v35n4/pyf06412.pdf>
- Feeney, M.; Bhagwat, B.; Mitchell, J.; Lane, W. 2007. Shoot regeneration from organogenic callus of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90: 201–214.
- George, E.; Debergh, P. 2008. Micropropagation: Uses and Methods. En: George EF, Hall MA, de Klerk G-J (Eds) *Plant propagation by tissue culture* 3rd Edition, pp. 29-64. Springer, Dordrecht.
- Goleniowski, M.; Trippi, V. 1999. Effect of growth medium composition on psilostachyionolides and altamisine production. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 56:215-218.
- González, A.; Oropeza, C.; Vargas, C.; De García, E. 2006. Embriogénesis somática en dos especies del género *plantago* (*Plantago major* L. y *Plantago hirtella* Kunth). *Agronomía Trop.* v.56 n.4 Maracay dic. 2006. Disponible en:
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2006000400029
- Hartman, H. 1995. Propagación de plantas. Compañía Editorial Continental S.A. Cuarta Reimpresión. México.
- Hernández-Amasifuen, A.; Argüelles-Curaca, A.; Cortez-Lázaro, A.; Díaz-Pillasca, H. 2019. Efecto de la concentración de 2,4-Diclorofenoxiacético en la inducción de callos in vitro utilizando cotiledones de rocoto (*Capsicum*

- pubescens* RUIZ & PAV.). *The Biologist* (Lima), 201, 1(2), jul-dic: 97327-334. Disponible en: <https://revistas.unfv.edu.pe/rtb/article/view/368/332>.
- Hostias Rodríguez, K. 2017. Inducción de callos embriogénicos en tallos de *Persea amareicana* Mill. "Palto" cultivar fuerte utilizando diferentes concentraciones de 2,4-Diclorofenoxiacético y 6-Bencil Aminopurina. Tesis para optar el título de Biólogo. Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Ciencias Biológicas. Trujillo, Perú. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/10807/Hostia%20Rodriguez%20Karen%20Jannet.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Hurtado, D. 1994. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas S.A. Tercera Reimpresión. México.
- Karuppusamy, S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research* 3:1222-1239.
- Ketchum, R.; Gibson, D.; Croteau, R.; Shuler, M. 1999. The kinetics of taxoid accumulation in suspensión cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotech Bioeng* 62:97-105.
- Kim, O.; Bang, K.; Kim, Y.; Hyun, D.; Kim, M.; Cha, S. 2009. Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures elicited by methyl jasmonate. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 98:25-33.
- Kreis, W. 2007. *In-vitro* culturing techniques of medicinal plants. En: Kayser O, Quax W (Eds) *Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application*, pp. 157-185. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Kutney, J.; Arimoto, M.; Hewitt, G.; Jarvis, T.; Sakata, K. 1991. Studies with plant cell cultures of *Podophyllum peltatum* L. I. Production of podophyllotoxin, deoxypodophyllotoxin, podophyllotoxone, and 4'-demethylpodophyllotoxin. *Heterocycle* 32:2305-2309.
- Larson, C.; Gómez, C.; Sánchez, M.; Ríos, D. 2006. Inducción de caulogénesis indirecta en *Eucalyptus globulus*. *Bosque* 27(3): 250-257.
- Martínez Ávila, Y.; Gómez López, L. 2011. Impacto social de una estrategia de intervención sobre prescripción racional de medicina verde en Céspedes durante 2011. *Rev. Cuba Plantas Med.* 2013;18(4):609–18.

- Martínez Milla, F. 2018. El cultivo in vitro: una alternativa al cultivo tradicional de plantas medicinales. Trabajo de fin de grado. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Disponible en:
<http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/FRANCISCO%20MARTINEZ%20MILLA.pdf>
- Matos Acurero, A. 2007. Inducción de callo en plantas silvestres de zábila (*Aloe vera*) con diferentes combinaciones de 2,4 - D, BA y Kinetina. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. Volumen 41, No. 4, 2007, pp. 503–516. Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/45164525_Induccion_de_Callo_en_Plantas_Silvestres_de_Zabila_Aloe_Vera_con_Diferentes_Combinaciones_de_2-4_Ba_y_Kinetina.
- OMS. Medicina tradicional: definiciones [Internet]. WHO. Disponible en:
http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/.
- Paek, K.; Chakrabarty, D.; Hahn, E. 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 81:287-300.
- Rashmi, R.; Trivedi, M. 2014. Effect of Various Growth Hormone Concentration and Combination on Callus Induction, Nature of Callus and Callogenic Response of *Nerium odorum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. DOI 10.1007/s12010-013-0693-1.
- Rico, L., Ortega-Rubio, A. 2017. Paradoja de la ciencia: el polémico ácido 2,4–Diclorofenoxiacético (2,4–D). *Ciencia y Desarrollo*. Disponible en:
<https://www.researchgate.net/publication/321978254>
- Roca, W.; Mroginski, L. 1991. Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. En: *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. (Ed. por W.M. Roca y L.A. Mroginski). CIAT. Cali. 211 – 238.
- Rodríguez Amaro, M. 2018. Cultivo in vitro: alternativa al cultivo tradicional de plantas medicinales. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Disponible en:
<http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MIGUEL%20RODRIGUEZ%20AMARO.pdf>
- Sales, E.; Nebauer, S.; Arrillaga, I.; Segura, J. 2002. Plant hormones and *Agrobacterium tumefaciens* strain 82.139 induce efficient plant regeneration

- in the cardenolide-producing plant *Digitalis minor*. Journal of Plant Physiology 159:9-16
- Sánchez Calvo, L.; Alvarenga Venutolo, S. 2014. Calogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato). Tecnología en Marcha. Vol. 28, N° 1, Enero-Marzo. Pág 105-120. Disponible en: <http://www.scielo.sa.cr/pdf/tem/v28n1/0379-3982-tem-28-01-00105.pdf>
- Sharry, S.; Adema, M.; Abedini, W. (coordinadores). 2015. Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro. Editorial de la Universidad de La Plata. Primera edición. ISBN 978-950-34-1254-1. Buenos Aires, Argentina. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento_completo_pdf-PDFA.pdf?sequence=1.
- Senplades. 2013. Objetivo 3. Mejorar la calidad de vida de la población - Plan Nacional 2013 - 2017 [Inter- net]. 2013 [citado 24 de julio de 2016]. Disponible en: <http://www.buenvivir.gob.ec/33>.
- Shohael, A.M.; Ali, M.B.; Yu, K.W.; Hahn, E.J.; Paek, K.Y. 2006. Effect of temperature on secondary metabolites production and antioxidant enzyme activities in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos. Plant Cell Tiss Organ Cult 85:219-228.
- Teruya-Kamiyama, M.S. 2016. Evaluación de fitorreguladores del crecimiento en la inducción de callo embriogénico en *Gossypium barbadense* L. 1753 “algodón nativo” color pardo. Tesis para optar el título profesional de Licenciada en Biología. Universidad Ricardo Palma. Facultad de Ciencias Biológicas. Escuela Profesional de Biología. Disponible en: https://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/urp/921/Teruya_ms.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Urrea, A.; Castrillón, P.; Monsalve, Z. 2009. Propagación in vitro y desdiferenciación tisular en *Lippia dulcis*. Actual Biol 31 (90): 21-29, 2009. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/acbi/v31n90/v31n90a2.pdf>
- Vanisree, M.; Tsay, H. 2007. Plant cell cultures: Production of biologically important secondary metabolites from medicinal plants of Taiwan. En: Kayser O, Quax W (Eds) Medicinal plant biotechnology. From basic

research to industrial application, pp. 267-285. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Verpoorte, R.; Van Der Heijden, R.; Moreno, P. 1997. Biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cells. En: Cordell GA (Ed) The alkaloids, pp. 221-299. Academic Press, San Diego.

Wang, C.; Wu, J.; Mei, X. 2001. Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. Appl Microbiol Biotechnol 55:404-410.

Wiedenfeld, H.; Furmanowa, M.; Roeder, E.; Guzewska, J.; Gustowski, W. 1997. Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in callus and plantlets of *Camptotheca acuminata*. Plant Cell Tiss Organ Cult 49:213-218.

VII. ANEXO.

Cuadro 11A. ANOVA para el tiempo de inicio de formación de callos.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Tratamientos	5	9.15555556	1.83111111	1.66	0.1539
Error	84	92.80000000	1.10476190		
Corrected Total	89	101.95555556			

R-Square: 0.089799

C.V.: 2.336880

Cuadro 12A. ANOVA para el peso inicial del explante.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Tratamientos	5	0.00129714	0.00025943	0.72	0.6093
Error	84	0.03021543	0.00035971		
Corrected Total	89	0.03151257			

R-Square: 0.041163

C.V.: 14.83970

Cuadro 13A. ANOVA para el peso final de callos.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	11.77185800	2.35437160	15.83	0.0001
Error	84	12.49053760	0.14869688		
Corrected Total	89	24.26239560			

R-Square: 0.485189

C.V.: 47.46582

Cuadro 14A. ANOVA para el incremento de peso de callos.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Tratamientos	5	11.81638573	2.36327715	15.79	0.0001
Error	84	12.57595427	0.14971374		
Corrected Total	89	24.39234000			

R-Square: 0.484430

C.V.: 56.51343

Cuadro 15A. ANOVA para el porcentaje de incremento de peso de callos.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Tratamientos	5	49046.808889	9809.361778	212.20	0.0001
Error	84	3883.110667	46.227508		
Corrected Total	89	52929.919556			

R-Square: 0.926637

C.V.: 9.339683

Cuadro 16A. Composición química de la solución de Murashige y Skoog (1962).

Solución A	Contenido
KNO ₃	19,00 g/L
NH ₄ NO ₃	16,50 g/L
CaCl ₂ . 2H ₂ O.....	3,30 g/L
MgSO ₄ . 7 H ₂ O.....	3,70 g/L
KH ₂ PO ₄	1,70 g/L
Solución B	
H ₃ BO ₃	620 mg/L
MnSO ₄ . 4H ₂ O.....	2,23 g/L
ZnSO ₄ .4 H ₂ O.....	860 mg/L
KI.....	83 mg/L
Na ₂ MoO ₄ . 4 H ₂ O.....	25 mg/L
CuSO ₄ . 5H ₂ O.....	2,5 mg/L
CoCl ₂ . 6H ₂ O.....	2,5 mg/L
Solución C	
Na ₂ EDTA.....	3,72 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	2,78 g/L
Solución D	
Ácido Nicotínico.....	50 mg/L
Piridoxina (B ₆).....	50 mg/L
Tiamina (B ₁).....	10 mg/L
Glicina	200 mg/L



Figura 5A. Semillas de llantén, tratamiento de desinfección.

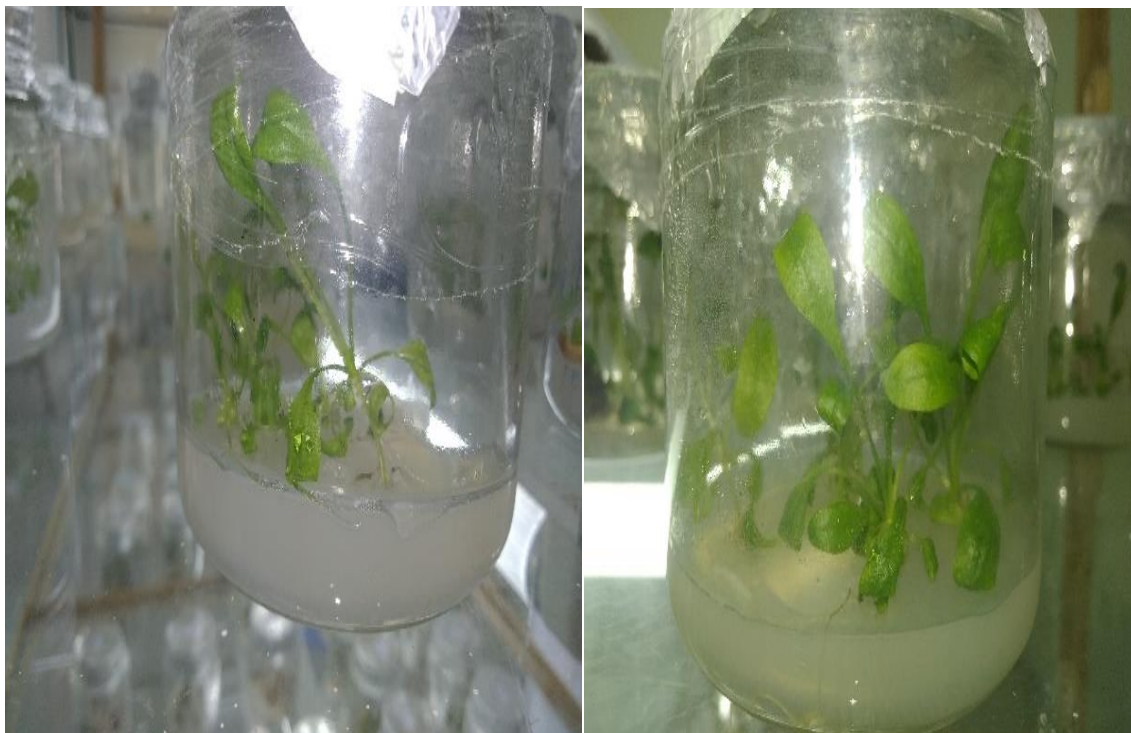


Figura 6A. Plántulas de llantén germinadas bajo condiciones de in vitro.



Figura 7A. Plantas de llantén en condiciones de vivero.



Figura 8A. Preparación de medios de cultivo MS con la adición de los tratamientos de 2,4-Diclorofenoxiacético.

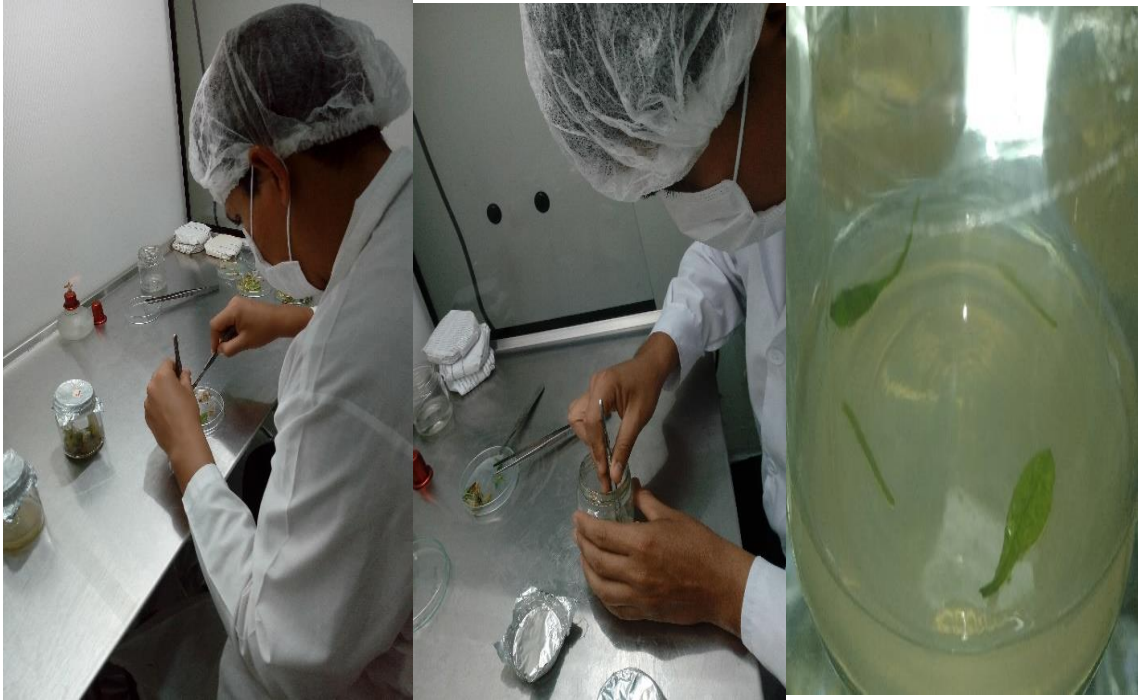


Figura 9A. Siembra de explantes provenientes de semillas germinadas in vitro.



Figura 10A. Preparación y siembra de explantes de llantén provenientes de vivero.



Figura 11A. Acondicionamiento de frascos en la sala de incubación.

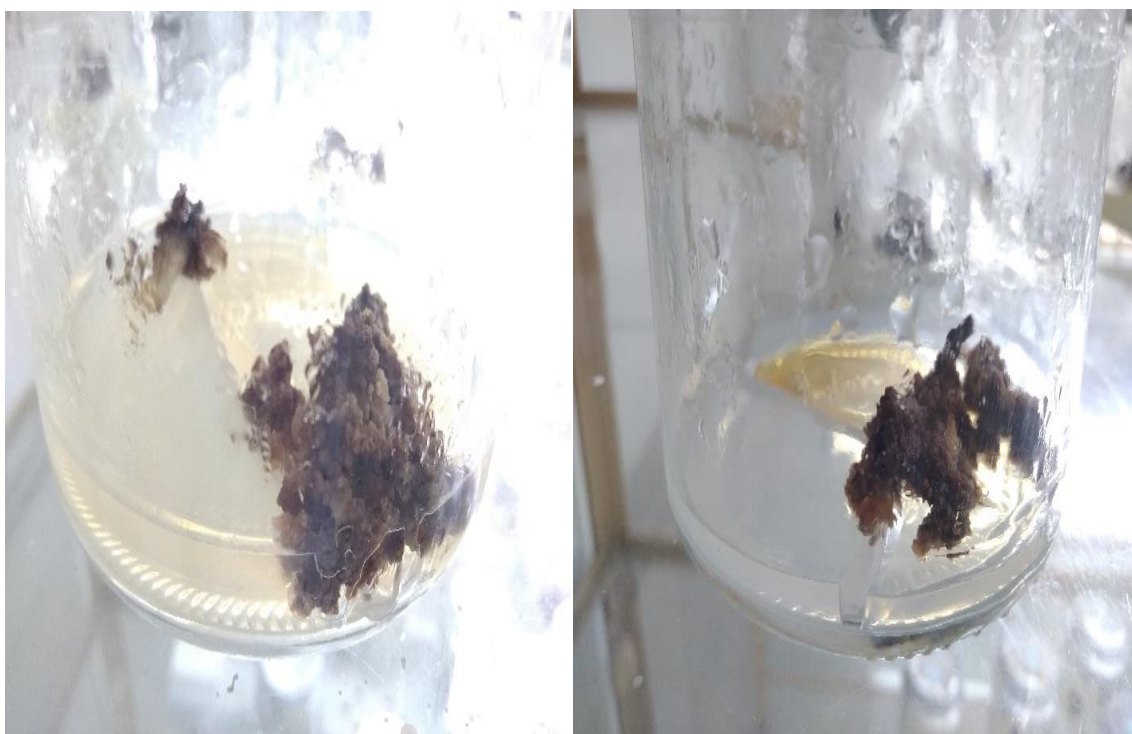


Figura 12A. Desarrollo de tejido calloso.

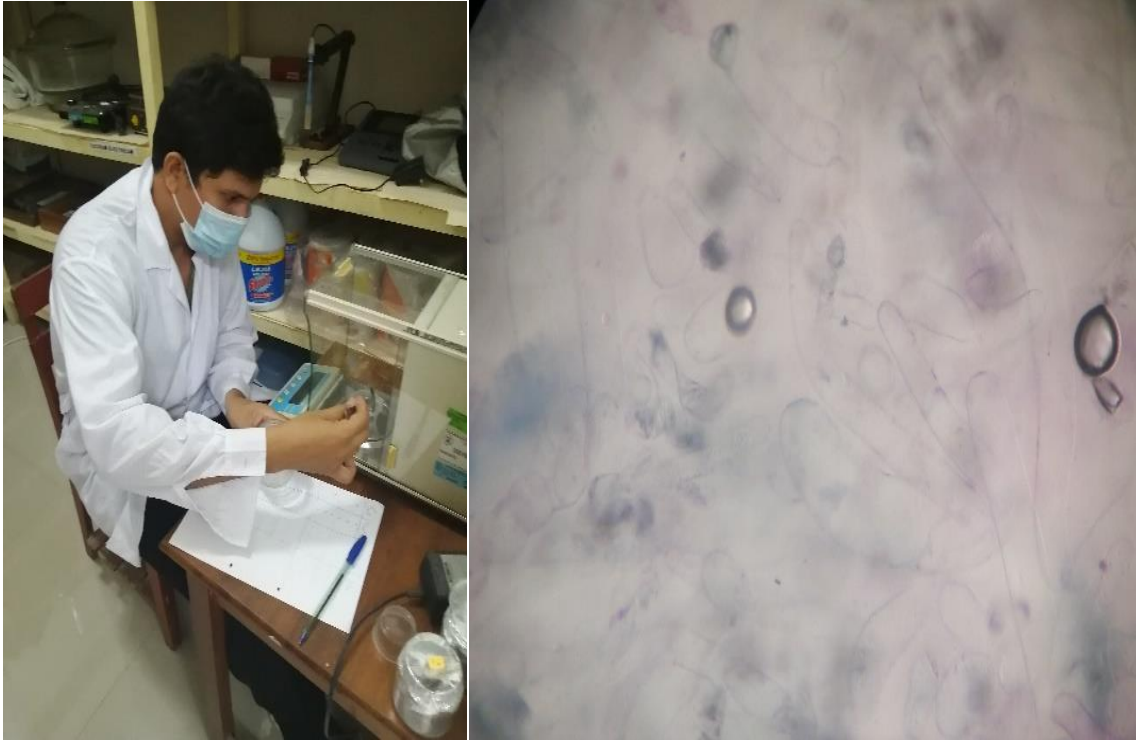


Figura 13A. Evaluación de variables.