

**Efecto del BAP y 2,4-D en la inducción *in vitro*
de tejido callogénico a partir de láminas
foliares, segmentos peciolares y
in vitro-explantes hipocotiledonares y
radiculares de *Moringa oleífera***

María Elizabeth Artiga Suarez

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2012

ZAMORANO
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**Efecto del BAP y 2,4-D en la inducción *in vitro*
de tejido callogénico a partir de láminas
foliares, segmentos peciolares y
in vitro-explantes hipocotiledonares y
radiculares de *Moringa oleífera***

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera Agrónoma en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por:

María Elizabeth Artiga Suarez

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2012

**Efecto del BAP y 2,4-D en la inducción *in vitro* de
tejido callogénico a partir de láminas
foliares, segmentos peciolares y
in vitro-explantes hipocotiledonares y
radiculares de *Moringa oleífera***

Presentado por:

María Elizabeth Artiga Suarez

Aprobado:

Dinie Espinal, M.Sc.
Asesora principal

Abel Gernat, Ph.D.
Director
Departamento de Ciencia y Producción
Agropecuaria

María Alexandra Bravo, M.Sc.
Asesora

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Alfredo Rueda, Ph.D.
Asesor

RESUMEN

Artiga Suarez, M. E. 2012. Efecto del BAP y 2,4-D en la inducción *in vitro* de tejido callogénico a partir de láminas foliares, segmentos nodales y *vitro*-explantes hipocotiledonares y radiculares de *Moringa oleífera*. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería Agronómica, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. 25p.

La *Moringa oleífera* ha cobrado una gran importancia, debido a que es una de las especies vegetales con mayor contenido de aceite en su semilla, entre 30 y 42%. Contiene 18 de los 20 aminoácidos que el cuerpo humano necesita. El objetivo de este estudio fue desarrollar un protocolo para el establecimiento *in vitro* de tejido callogénico a partir de láminas foliares, segmentos peciolares y *vitro*-explantes hipocotiledonares y radiculares de *M. oleífera*. En el primer experimento se evaluó la germinación de la semilla en laboratorio e invernadero. En el laboratorio con dos concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO): 1.25 y 2.25%, con y sin tegumento. En invernadero se evaluó la semilla con y sin tegumento. En el segundo se evaluó desinfección y siembra *in vitro* de láminas foliares y segmentos nodales con dos concentraciones de NaClO: 1 y 2%. En el tercero se midió el efecto de dos concentraciones de BAP: 0.5 y 1.0 mg/L y de dos concentraciones de 2,4-D: 0.1 y 0.5 mg/L, en el establecimiento de láminas foliares y segmentos peciolares. En el cuarto experimento se evaluó el efecto de las mismas concentraciones de BAP y 2,4-D del experimento anterior en el establecimiento de *vitro*-explantes hipocotiledonares y radiculares. Los experimentos se analizaron con un arreglo factorial y un diseño completamente al azar utilizando un análisis de varianza y separación de medias Duncan con una $P \leq 0.05$. El mayor porcentaje de germinación se presentó en las semillas sin tegumento. En invernadero, con semillas sin tegumento se obtuvo menos días promedio a germinación y una altura promedio mayor. Los segmentos peciolares tienen un mayor porcentaje de explantes con callo, pero una menor cobertura callogénica del explante. Al utilizar segmentos hipocotiledonares se reporta un mayor porcentaje de explantes con tejido callogénico y una mayor cobertura del mismo en el explante.

Palabras clave: Contaminación, cultivo de tejidos, desinfección, morango.

CONTENIDO

	Portadilla.....	i
	Página de firmas	ii
	Resumen	iii
	Contenido.....	iv
	Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
1	INTRODUCCIÓN	2
2	MATERIALES Y MÉTODOS	3
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
4	CONCLUSIONES	19
5	RECOMENDACIONES	20
6	LITERATURA CITADA	21
7	ANEXOS	23

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Formulación basal de Murashige y Skoog (1962) utilizado para la germinación de semilla de <i>Moringa oleífera</i>	4
2. Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio y la presencia o ausencia de tegumento en los porcentajes de contaminación y germinación de la semilla de <i>Moringa oleífera</i>	13
3. Efecto de la presencia o ausencia de tegumento en el porcentaje de germinación, días a germinación y altura de la planta 60 días después de la siembra de <i>Moringa oleífera</i>	14
4. Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio en los porcentajes de contaminación de segmentos nodales y hojas de <i>Moringa oleífera</i> .	15
5. Efecto del tipo de explante en la formación de callo a los 35 días después del establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Moringa oleífera</i>	15
6. Efecto de la interacción de BAP y 2,4-D, en la formación de callo a los 35 días después del establecimiento <i>in vitro</i> , a partir de explantes peciolares y hojas de <i>Moringa oleífera</i>	16
7. Efecto de <i>vitro</i> -explantes en la formación de callo a los 35 días después del establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Moringa oleífera</i>	17
8. Efecto de la interacción de BAP y 2,4-D, en la formación de callo a los 35 días después del establecimiento <i>in vitro</i> , a partir <i>vitro</i> -explantes hipocotiledonares y radiculares de <i>Moringa oleífera</i>	18

Figuras	Página
1. Proceso de desinfección para explantes de <i>Moringa oleífera</i>	5
2. Detalle de la categorización utilizada para evaluar el área de cobertura de tejido callogénico en láminas foliares.....	10
3. Detalle de la categorización utilizada para evaluar el área de cobertura de tejido callogénico en segmentos peciolares	10
4. Detalle de la categorización utilizada para evaluar el área de cobertura de tejido callogénico en <i>in vitro</i> -explantes hipocotiledonares..	12
5. Detalle de la categorización utilizada para evaluar el área de cobertura de tejido callogénico en <i>in vitro</i> -explantes radiculares.....	12

Anexos	Página
1. Tratamientos utilizados para evaluar el procedimiento de desinfección y la germinación <i>in vitro</i> de <i>Moringa oleífera</i>	23
2. Tratamientos utilizados para evaluar el procedimiento de desinfección en láminas foliares y segmentos nodales de <i>Moringa oleífera</i>	23
3. Hoja compuesta tripinada de <i>Moringa oleífera</i> y procedencia de segmentos nodales.	24
4. Tratamientos utilizados para evaluar el efecto del BAP y 2,4-D sobre láminas foliares y segmentos peciolares de <i>Moringa oleífera</i>	24
5. Tratamientos utilizados en la evaluación del efecto del BAP y 2,4-D sobre <i>in vitro</i> -explantes hipocotiledonares y radiculares de <i>Moringa oleífera</i>	25
6. Resumen de experimentos realizados para <i>Moringa oleífera</i>	25

1. INTRODUCCIÓN

Moringa oleífera es una planta tropical de la familia Moringaceae, del género *Moringa*, conocida popularmente como marango (García 2003) o simplemente como moringa. La *Moringa* es originaria del sur del Himalaya, el noroeste de la India, Bangladesh, Afganistán y Pakistán. Esta planta se encuentra diseminada en una gran parte del planeta, y en América Central fue introducida en los años de 1920 (Foidl *et al.* 1999).

El árbol de moringa alcanza de 7-12 m de altura y de 20-40 cm. de diámetro, con una copa abierta y un fuste recto. Las hojas son compuestas y están dispuestas en grupos de folíolos con 5 pares de éstos acomodados sobre el pecíolo principal y un folíolo en la parte terminal. Las hojas son alternas tripinadas con una longitud de 30-70 cm. (Foidl *et al.* 2003).

Los frutos de la moringa son cápsulas trilobuladas, dehiscentes, de 20-40 cm de longitud. Estas cápsulas contienen de 12 a 25 semillas por fruto. Las semillas son de forma redonda y color castaño oscuro, con tres alas blanquecinas (FAO-OMS 2005).

Moringa oleífera ha cobrado una gran importancia, ya que es una de las especies vegetales con mayor contenido de aceite en su semilla, entre 30 y 42%, y de ella se obtiene un biodiesel de gran calidad. Además contiene 18 de 20 aminoácidos que el cuerpo necesita y dentro de esos 18, están los 9 aminoácidos esenciales. También posee un alto contenido de proteínas en sus hojas, ramas y tallos. Sus frutos y flores contienen vitaminas A, B, C y proteínas. Adicionalmente es un cultivo que representa una excelente opción de reforestación, que puede contribuir a la conservación de los suelos evitando la erosión (Salazar, *sf*).

Se conocen pocos trabajos sobre el mejoramiento genético de *M. oleífera* inclusive sobre la propagación *in vitro* de ésta. Esto crea la necesidad de documentar trabajos referentes a esta planta que está tomando gran importancia en la temática de seguridad alimentaria. Para contribuir con las soluciones de esta preocupación en este estudio se trabajara con la propagación *in vitro* del cultivo y el uso de diferentes hormonas para estimular su regeneración en el laboratorio. La razón del uso de la multiplicación *in vitro* es que con esta se obtienen plántulas clonadas, genotípicamente iguales y más uniformes, esto hace posible la propagación de especies o variedades élites (Lopez *et al.* 2011).

En este estudio se evaluó el efecto del BAP y 2,4-D en la inducción *in vitro* de *M. oleífera* a partir de explantes hipocotiledonares, peciolares, segmentos nodales y *vitro-*

explantes hipocotiledonares y radiculares. Para el cumplimiento de este estudio se definieron los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el mejor tratamiento de desinfección para la siembra y establecimiento de semilla de *M. oleífera*.
- Determinar el porcentaje de germinación de semilla de *M. oleífera* bajo condiciones de invernadero y laboratorio.
- Determinar el mejor procedimiento de desinfección para la siembra y establecimiento de láminas foliares, segmentos nodales y peciolares.
- Determinar la mejor dosis de BAP y 2,4-D para la formación de tejido calogénico para explantes peciolares, láminas foliares y *vitro*-explantes hipocotiledonares y radiculares.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria de la Universidad Zamorano, ubicada en el Valle del Yeguaré a 30 km de Tegucigalpa, Honduras.

Material Vegetal. Se utilizaron semillas y plantas madres proporcionada por la Secretaría de Agricultura y Ganadería (SAG) del Gobierno de Honduras a través del Proyecto Moringa- Honduras. Las plantas se mantuvieron bajo un programa de aplicación con Benlate ® fungicida sistémico (ingrediente activo benomilo) a razón de 2gr/L, aplicado dos veces /semana durante tres semanas previo al establecimiento *in vitro* de los explantes.

Medio de cultivo. Para todos los experimentos se utilizó el medio basal Murashige y Skoog (MS) (1962) (Kyte 1987) con el 50% de los macronutrientes (Cuadro 1), el cual se preparó con agua destilada al igual que todas las soluciones que se utilizaron en los experimentos. Se le agregó 1.8 g/L de phytigel y se ajustó el pH a 5.8, con HCl y/o KOH, con un medidor de pH Meter S20 Seven Easy™. El medio de cultivo se dispensó en tubos de ensayo a razón de 10 ml por contenedor. Finalmente los contenedores fueron esterilizados en un autoclave Market Forge Sterilmatic STM-E durante 20 minutos a 15 PSI de presión y a una temperatura de 120 ° C.

Cuadro 1. Formulación basal de Murashige y Skoog (1962) utilizada para la germinación *in vitro* de semilla de *Moringa oleífera*.

Componente	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macroelementos	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de calcio bihidratado	220.000
	KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potasio	85.000
	KNO_3	Nitrato de potasio	950.000
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnesio heptahidratado	185.000
	NH_4NO_3	Nitrato de amonio	825.000
Microelementos	H_3BO_3	Ácido bórico	6.200
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Hierro	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	50.000
Componentes orgánicos		Myo-inositol	100.000
		Ácido nicotínico	0.500
		Piridoxina-HCL	0.500
		Tiamina-HCL	0.400
		Sacarosa	20,000.000
	Phytigel	1,800.00	

Fuente: Kyte 1987.

Condiciones de incubación. La incubación para todos los experimentos se realizó en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 22 °C con una humedad relativa de 75 % y un fotoperiodo de 16 horas luz provistas con lámparas fluorescentes del tipo daylight, con una intensidad de 1800 Lux.

Diseño experimental. Para el análisis estadístico de los experimentos se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA). Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS[®] 9.1, a través de ANDEVA, utilizando un modelo lineal general (GLM), el grado de significancia fue determinado con una probabilidad de 0.05, y la prueba Duncan para la separación de medias.

Desinfección de explantes. El procedimiento de desinfección para los explantes utilizados en todos los experimentos se realizó dentro de la cámara laminar (Figura 1).

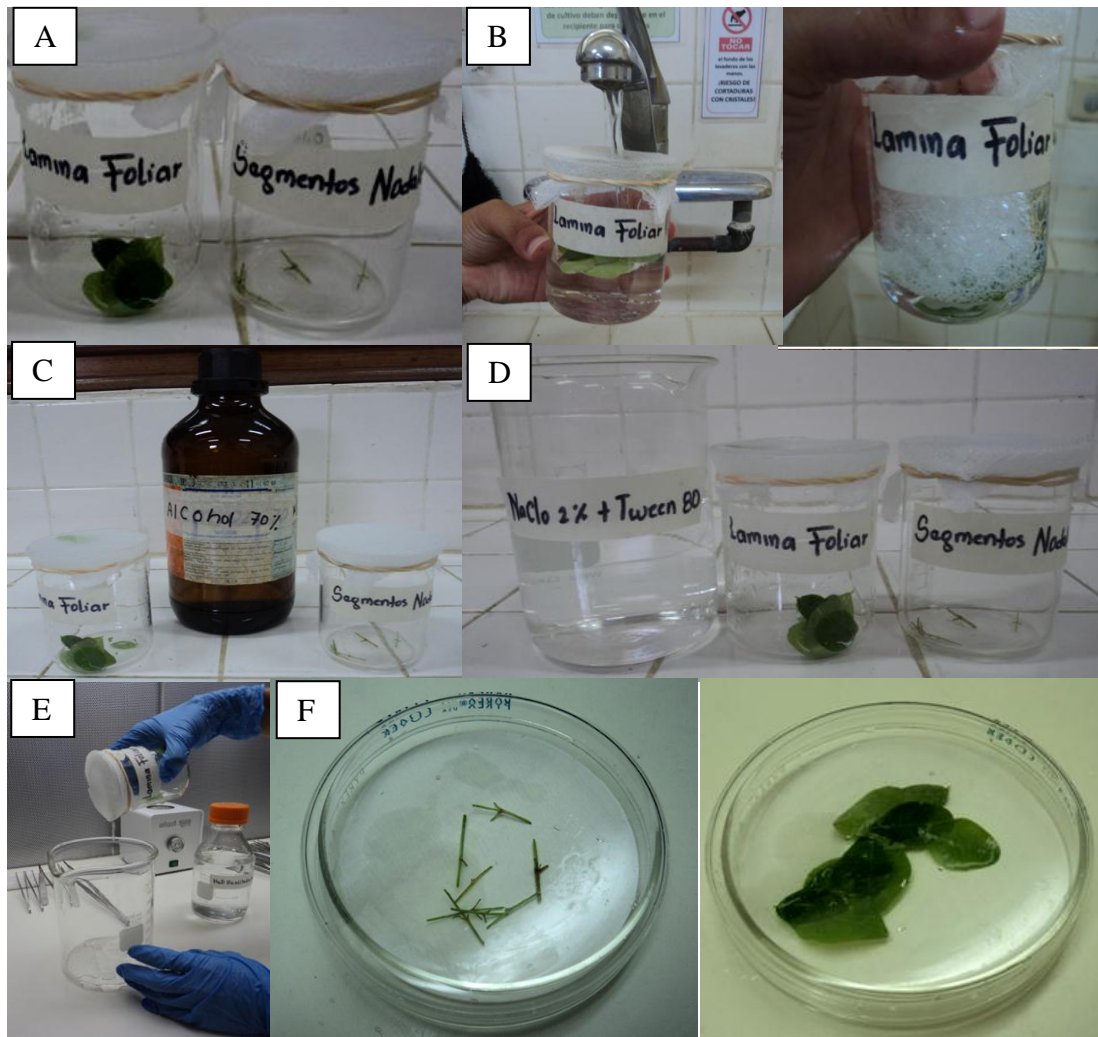


Figura 1. Proceso de desinfección para explantes de *Moringa oleifera*, A-Explantes se colocan en beaker, B-Lavado con agua potable y detergente, C-Sumersión en alcohol al 70% durante 1 min, D- Enjuague con hipoclorito de sodio (NaClO) + dos gotas de Tween 80/100ml, E- Cinco enjuagues de 15 segundos cada uno, F- Explantes listos para la siembra.

Experimento 1. Germinación de semilla de *Moringa oleífera* en condiciones de laboratorio y de invernadero: Experimento 1A. Siembra en condiciones de laboratorio. En este experimento se evaluó el porcentaje de germinación de la semilla y la efectividad del procedimiento de desinfección utilizando dos concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO): 1.25 y 2.25% de ingrediente activo (i.a.), preparadas a partir de un producto comercial desinfectante (Clorox) con una concentración de 4.5% de i.a. El experimento constó de cuatro combinaciones o tratamientos, tres repeticiones por tratamiento, 10 semillas por repetición para un total de 120 semillas.

Procedimiento de desinfección de la semilla. Las semillas recolectadas fueron sometidas a un proceso de desinfección para asegurar un nivel de asepsia dentro de la cámara de flujo laminar y evitar futuras contaminaciones. Antes de iniciar cualquier actividad dentro de la cámara de flujo laminar, esta se desinfectó con alcohol al 70% y las herramientas se esterilizaron a 250°C en un esterilizador de calor seco Z3378550 – Steri 250.

Primeramente las semillas fueron lavadas con agua potable para eliminar restos de suelo presentes en la superficie. Luego en la cámara de flujo laminar, previamente desinfectada, las semillas se introdujeron en alcohol al 70% por 30 segundos. Seguidamente las semillas se mantuvieron durante 10 minutos en la solución desinfectante de hipoclorito de sodio dependiendo del tratamiento. A cada solución desinfectante se le agregó 2 gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución desinfectante. Finalmente se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril antes de proceder a la remoción del tegumento en el tratamiento que así lo requiera.

Remoción del tegumento. Posterior a la desinfección las semillas fueron divididas en semillas con tegumento y sin tegumento. Este proceso de remoción del tegumento se realizó dentro de la cámara de flujo laminar, haciendo uso de dos pinzas con las cuales se empezó a hacer pequeñas hendiduras en la superficie de la semilla, haciendo que el tegumento se vaya desprendiendo poco a poco. El uso de pinzas es importante para no tener contacto directo con la semilla y evitar la contaminación cruzada.

Siembra de la semilla *in vitro*. Para hacer la siembra se hizo uso de pinzas estériles. Después del proceso de desinfección y remoción del tegumento, dependiendo del tratamiento, las semillas se inocularon en el medio MS (Cuadro 1) en tubos de ensayo a razón de una semilla por contenedor.

Variables analizadas. Porcentaje de germinación: Se observó por un periodo de cuatro semanas cada semilla por inicios de germinación. La germinación se tomó diariamente de forma individual para cada semilla y por tratamiento de desinfección. Además se calculó el porcentaje de germinación con base en la ausencia y presencia del tegumento.

El porcentaje de contaminación: Se midió tomando en cuenta presencia o ausencia de contaminación en cada tubo de ensayo se evaluó cada dos días por un periodo de 28 días.

Diseño experimental. Además del diseño experimental general se usó un arreglo factorial (2 x 2) con tres repeticiones donde: Factor A, las semillas en presencia de tegumento y en ausencia de tegumento. El factor B son las dos concentraciones hipoclorito de sodio (NaClO): 1.25 y 2.25% de ingrediente activo.

Experimento 1B. Siembra en condiciones de invernadero. En este experimento se evaluó el efecto de la presencia o ausencia de tegumento en el porcentaje de germinación, días a germinación de la semilla y la altura obtenida por las plántulas a los 60 días después de la siembra. Este experimento constó de dos tratamientos (semilla con tegumento y semilla sin tegumento), tres repeticiones de 10 semillas cada repetición para un total de 60 semillas.

Remoción del tegumento de la semilla. Para preparar las semillas que se sembrarían en invernadero, estas fueron divididas en dos grupos: semillas con tegumento y sin tegumento. El proceso de remoción del tegumento se realizó haciendo uso de dos pinzas con las cuales se empezó a hacer pequeñas hendiduras en la superficie de la semilla, haciendo que el tegumento se vaya desprendiendo poco a poco, hasta tener una semilla lista para la siembra.

Siembra de la semilla *ex vitro*. En el invernadero las semillas fueron sembradas en semilleros, utilizando para ello bandejas múltiples de 50 celdas. El sustrato estéril usado para la siembra tenía 60% arena y 40% suelo (no se conoce el tipo ni su contenido nutricional). La semilla fue sembrada a una profundidad de 2 cm y se cubrió con una capa delgada de sustrato. Se sembraron 30 semillas con tegumento y 30 semillas sin tegumento a razón de una semilla por celda.

Variables analizadas. Días a germinación: Se tomó cada día después de la germinación de la primera semilla. Los datos se tomaron de forma individual para cada semilla y tomando en cuenta la ausencia y presencia del tegumento.

Porcentaje de germinación: Se hicieron revisiones diarias durante un periodo de tres semanas observando de manera individual si germinó o no la semilla.

Altura de las plantas germinadas. Para cada planta se midió la altura (cm). La medición se hizo cada ocho días, tomando la primera medida a los 12 días después de la siembra y la última a los 60 días después de la siembra.

Experimento 2. Desinfección y siembra *in vitro* de láminas foliares y segmentos nodales. Este experimento se basó en desarrollar un procedimiento de desinfección para láminas foliares y segmentos nodales. Se hizo pruebas con dos concentraciones de

hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% y 2 % de ingrediente activo. Se utilizó un producto desinfectante comercial (Clorox) con una concentración de 4.5% de i.a. El experimento constó de cuatro combinaciones o tratamientos, tres repeticiones por tratamiento, 10 explantes por repetición para un total de 120 unidades.

Material Vegetal y fuente del explante. Para seleccionar las hojas a utilizar se tomó como parámetro que estas fuesen jóvenes ya que es cuando las células de las plantas presentan mayor actividad regenerativa. También mientras más joven es el tejido menor es la diferenciación celular lo que permite un mejor desarrollo *in vitro* (Jiménez 1998).

La *Moringa oleífera* tiene hojas compuestas tripinadas con una división de segmentos nodales en primarios y secundarios procedentes de los folíolos primarios y secundarios respectivamente. Los segmentos nodales fueron seleccionados de las mismas hojas compuestas trinipinadas de donde se obtuvieron también las láminas foliares.

Desinfección de hojas y segmentos nodales. Las hojas y los segmentos nodales recolectados se sometieron al proceso de desinfección detallado en la figura 1.

Siembra y establecimiento *in vitro* de explantes de hojas. Para preparar las láminas foliares se les hizo cortes longitudinales a las hojas, preparando explantes de 1cm² aproximadamente, conteniendo una porción de la vena central. Posteriormente se hizo la siembra la lámina foliar se hizo de forma polar es decir con el envés en contacto directo con el medio de cultivo. Para el establecimiento los explantes de hoja se colocaron en tubos de ensayo a razón de un explante por contenedor, se sellaron y se incubaron.

Siembra y establecimiento *in vitro* de segmentos nodales. Para preparar los segmentos nodales se les hizo cortes en los extremos después de la desinfección, para eliminar las partes dañadas por el procedimiento de desinfección, dejándolos de aproximadamente 1cm de largo. Posteriormente se hizo la siembra se inoculó en el medio MS (Cuadro 1). La siembra se hizo de forma vertical polar. Para el establecimiento los segmentos nodales se colocaron en tubos de ensayo a razón de un explante por contenedor, se sellaron y se pusieron bajo condiciones de incubación.

Variables analizadas. Se evaluó la presencia o ausencia de contaminación en cada tubo de ensayo. Los datos fueron evaluados cada dos días por un período de tres semanas.

Diseño experimental. Además del diseño experimental general se agregó un arreglo factorial (2 x 2) donde el factor A, los dos tipos de explantes, lamina foliar y segmentos nodales y factor B son las dos concentraciones hipoclorito de sodio (NaClO): 1 y 2% de ingrediente activo.

Experimento 3. Efecto del BAP y 2,4-D en el establecimiento *in vitro* de láminas foliares y segmentos peciolares. En este experimento se evaluó el efecto de dos concentraciones de BAP y 2,4-D sobre dos tipos de explantes láminas foliares y segmentos peciolares. El experimento constó de ocho combinaciones o tratamientos, tres repeticiones por tratamiento, 10 explantes por repetición para un total de 240 unidades.

Material Vegetal. Al momento de realizar la selección de los explantes, se tomó como parámetro que estos fuesen jóvenes y del mismo tamaño para reducir la variación en los resultados.

Medio de cultivo. Se utilizó el medio basal MS (Cuadro 1), dos reguladores de crecimiento en dos concentraciones: BAP 0.5 y 1 mg/L y 2,4-D 0.1 y 0.5 mg/L de acuerdo al tratamiento.

Desinfección de láminas foliares y segmentos peciolares. Se realizó con hipoclorito de sodio (NaClO) al 2%.

Siembra y establecimiento *in vitro* de explantes de hojas y peciolo. La siembra de la láminas foliares se hizo de igual forma que en el experimento 2. En el caso de los peciolo, se realizaron dos cortes uno en cada extremo, con el fin de cortar la porción terminal dañada por la desinfección, dejando explantes de aproximadamente 1cm de largo. Se hizo la se inocularon en el medio MS. Posteriormente los explantes se colocaron de forma horizontal en tubos de ensayo a razón de un explante por contenedor, se sellaron y se incubaron.

Variables analizadas. Para cada variable evaluada se tomaron los datos a los 35 días después del establecimiento *in vitro*. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de explantes que presentaron formación de tejido callogénico (TC) cuantificando la cantidad de explantes que formaron callo y el área de cobertura de Tejido Callogénico (ACTC), la formación de ACTC se evaluó mediante una categorización (Figuras 2 y 3).

Diseño experimental. Además del diseño experimental general se agregó un arreglo factorial (2 x 2 x 2) donde el factor A son los dos tipos de explantes, lámina foliar y segmento peciolar, factor B son las dos concentraciones de la citocinina BAP: 0.5 y 1 mg/L y el factor C, dos concentraciones de la auxina 2,4-D: 0.1 y 0.5 mg/L.

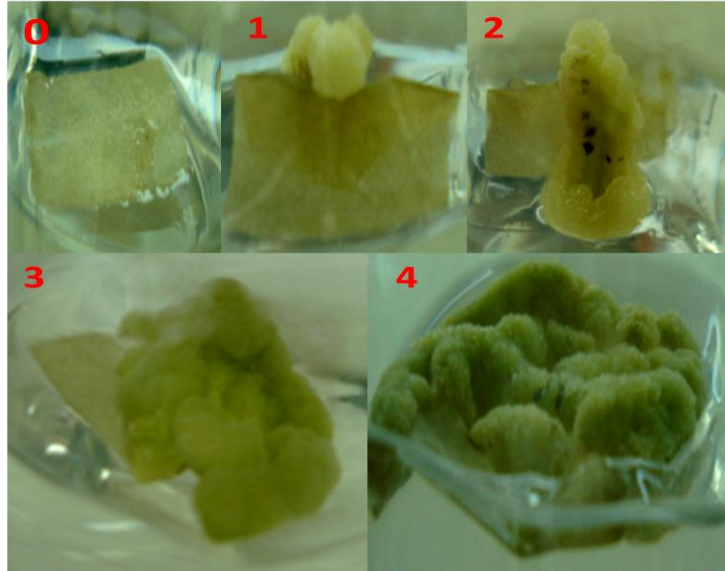


Figura 2. Detalle de la categorización utilizada para evaluar el área de cobertura de tejido callogénico (ACTC) en láminas foliares: 0- Cero formación de ACTC, 1- ACTC leve (1-25%), 2- ACTC intermedia (26-50%), 3- ACTC avanzada (51-75%), 4- ACTC profusa (76-100%).

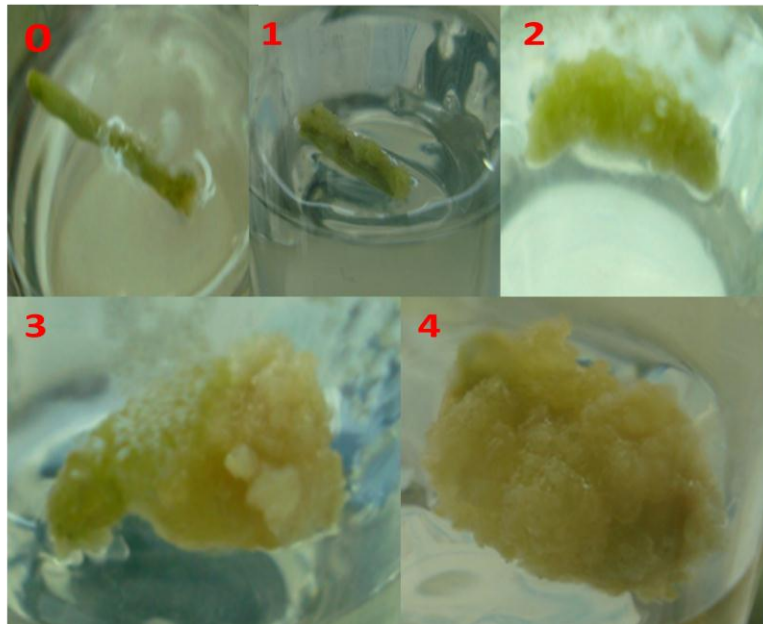


Figura 3. Detalle de la categorización utilizada para evaluar el área de cobertura de tejido callogénico (ACTC) en segmentos peciolares: 0- Cero formación de ACTC, 1- ACTC leve (1-25%), 2- ACTC intermedia (26-50%), 3- ACTC avanzada (51-75%), 4- ACTC profusa (76-100%).

Experimento 4. Efecto del BAP y 2,4-D en el establecimiento *in vitro* de vitro-explantes hipocotiledonares y radiculares. En este experimento se evaluó el efecto de dos concentraciones de BAP y 2,4-D sobre *vitro*-explantes. El experimento constó de ocho combinaciones o tratamientos, tres repeticiones por tratamiento, 7 explantes por repetición para un total de 168 unidades.

Material Vegetal y fuente del explante. Para este experimento fueron utilizados explantes cotiledonares y radiculares procedentes de las vitroplantas obtenidas del experimento 1, las cuales tenían 57 días de germinadas. Al momento de realizar la selección del explante radicular se tomó en cuenta el grosor de la raíz, esto para que hubiese uniformidad y no alterase los resultados.

Medio de cultivo. Se utilizó el medio basal (Cuadro 1), añadiéndole reguladores de crecimiento en dos concentraciones: BAP 0.5 y 1 mg/L y 2,4-D 0.1 y 0.5 mg/L de acuerdo al tratamiento. El resto de los pasos a seguir fueron los mismos que en el experimento 1.

Siembra y establecimiento *in vitro* de los vitro-explantes hipocotiledonares y radiculares. Para la siembra de los explantes radiculares, las raíces seleccionadas se dividieron en segmentos de aproximadamente 1 cm de longitud. Los hipocotiledones se dividieron en segmentos de aproximadamente 0.5 cm de largo. Posteriormente los explantes se colocaron de forma horizontal en tubos de ensayo a razón de un explante por tubo, se sellaron y se incubaron.

Variables analizadas. Para cada variable evaluada se tomaron los datos a los 35 días después del establecimiento *in vitro*. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de explantes que presentaron formación de tejido callogénico (TC): Se evaluó cuantificando la cantidad de explantes que formaron callo y el área de cobertura de Tejido Callogénico (ACTC): La formación de ACTC se evaluó mediante una categorización (Figuras 4 y 5)

Diseño experimental. Además del diseño experimental general se agregó se utilizó un arreglo factorial (2 x 2 x 2) donde el factor A, los dos tipos de *vitro*-explantes: segmentos hipocotiledonares y radiculares, el factor B, dos concentraciones de la citocinina BAP: 0.5 y 1 mg/L y el factor C, dos concentraciones de la auxina 2,4-D: 0.1 y 0.5 mg/L.

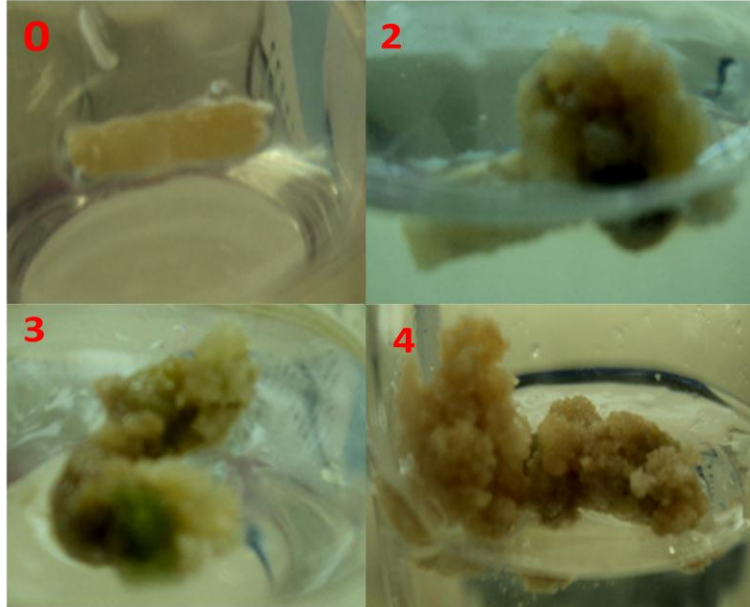


Figura 4. Detalle de la categorización utilizada para evaluar el área de cobertura de tejido callogénico (ACTC) en *in vitro*-explantos hipocotiledonares: 0- Cero formación de ACTC, 2-ACTC intermedia (26-50%), 3-ACTC avanzada (51-75%), 4-ACTC profusa (76-100%).

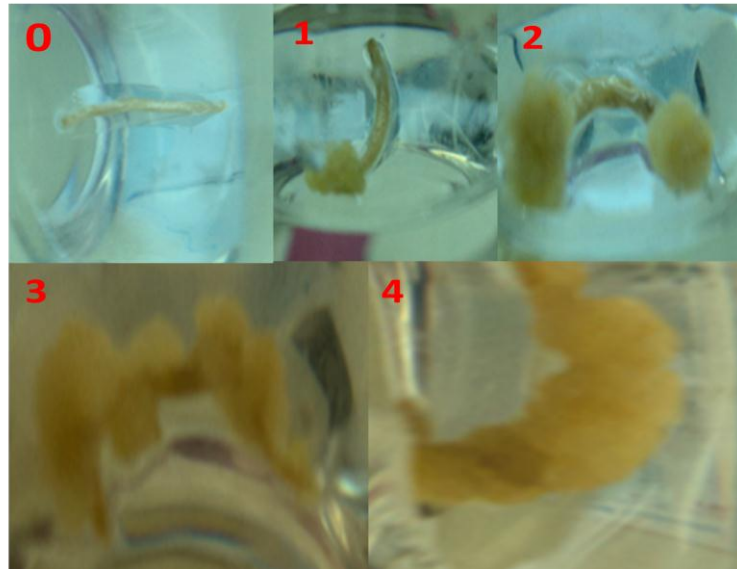


Figura 5. Detalle de la categorización utilizada para evaluar el área de cobertura de tejido callogénico (ACTC) en *in vitro*-explantos radiculares: 0- Cero formación de ACTC, 1- ACTC leve (1-25%), 2-ACTC intermedia (26-50%), 3- ACTC avanzada (51-75%), 4-ACTC profusa (76-100%).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1. Germinación de semilla de *moringa oleífera* en condiciones de laboratorio y de invernadero: Experimento 1A. Siembra en condiciones de laboratorio. Durante las cuatro semanas de evaluación de la semilla en condiciones de laboratorio, se observó tanto para el porcentaje de contaminación como para la germinación, al utilizar semilla con y sin tegumento, con una dosis de 1.25 y 2.25% de i.a. de hipoclorito de sodio no se obtuvieron diferencias significativas (Cuadro 2).

Para el porcentaje de germinación, considerando la ausencia y presencia de tegumento, se observó que al utilizar semillas sin tegumento se obtiene el mayor porcentaje de germinación (33%), comparado con las semillas que se sembraron con tegumento que obtuvieron un menor porcentaje de germinación (4%) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio y la presencia o ausencia de tegumento en los porcentajes de contaminación y germinación de la semilla de *Moringa oleífera*.

Semilla	Hipoclorito de sodio (%)	Contaminación (%)	Germinación (%) ^{&}	Germinación (%) [#]
Con Tegumento	1.25	90 ^a	33 ^{ab}	4 ^b
Con Tegumento	2.25	53 ^b	7 ^b	
Sin Tegumento	1.25	73 ^{ab}	0 ^b	33 ^a
Sin Tegumento	2.25	56 ^b	54 ^a	

^{a-b} Medidas con letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$)

[&] Germinación basada en la dosis de hipoclorito de sodio utilizada y la ausencia y presencia de tegumento

[#] Germinación basada en la ausencia y presencia de tegumento

Experimento 1B. Siembra en condiciones de invernadero. Las semillas en condiciones de invernadero presentaron diferencia significativa en los días a germinación y en la altura de las plantas a los 60 días después de la siembra, sin presentar diferencia significativa en el porcentaje de germinación.

Price (2007) afirmó que la semilla de *Moringa oleífera* germina en un intervalo de 1-2 semanas después de la siembra lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este experimento.

La semilla a la que se le removió el tegumento germina en menor número de días (8.7) que la semilla con tegumento (9.6). Esta diferencia en los días a germinación entre semillas con y sin tegumento se puede decir que es por efecto de latencia creada por la presencia de tegumento, siendo esta la razón por la cual las semillas con tegumento tardaron más tiempo en germinar que las semillas sin tegumento (Cuadro 3).

Medina *et al.* (2007) reporta que las plantas de *Moringa oleifera* presentan una altura promedio de 45 cm a las ocho semanas. En este experimento al utilizar semillas sin tegumento se obtuvieron plantas con una altura promedio mayor de 61.73 cm y al sembrar semillas con tegumento la altura promedio fue menor 54.13 cm. Este resultado se le atribuye a los días de germinación, ya que las semillas sin tegumento germinaron primero obteniendo ventaja en el crecimiento y el desarrollo de la planta, comparadas con las semillas con tegumento que germinaron después (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de la presencia o ausencia de tegumento en el porcentaje de germinación, días a germinación y altura de la planta 60 días después de la siembra de *Moringa oleifera*.

Semilla	Germinación (%)	Días a germinación	Altura (cm)
Con Tegumento	50 ^a	9.6 ^b	54.13 ^b
Sin Tegumento	63 ^a	8.7 ^a	61.73 ^a

^{a-b} Medidas con letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$)

Experimento 2. Desinfección y siembra *in vitro* de segmentos nodales y láminas foliares. Este es un experimento preliminar para poder establecer un protocolo de desinfección para el establecimiento del experimento 3. Conforme al análisis estadístico representado se observa diferencia significativa entre los tratamientos utilizados en la desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO). Se obtuvo un menor porcentaje de contaminación, 10 y 20% en los segmentos nodales y hojas desinfectadas con 2% de NaClO, respectivamente, comparado con el 60 y 70% de contaminación de los segmentos nodales y hojas desinfectadas al 1% de NaClO, respectivamente (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio en los porcentajes de contaminación de segmentos nodales y hojas de *Moringa oleífera*.

Explante	Concentración de NaClO (%)	Contaminación (%)
Hoja	1	60 ^a
Hoja	2	20 ^b
Segmento nodal	1	70 ^a
Segmento nodal	2	10 ^b

^{a-b} Medidas con letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$)

Experimento 3. Efecto del BAP y 2,4-D en el establecimiento *in vitro* de láminas foliares y segmentos peciolares. Al finalizar los 35 días después del establecimiento *in vitro* se pudo observar diferencia significativa en el porcentaje de explantes que presentaron formación de tejido callogénico (TC) y el porcentaje de área de cobertura de tejido callogénico (ACTC).

Al utilizar el peciolo como explante inicial para la formación de TC se puede observar un mayor porcentaje de explantes con formación de TC (68%) comparado con el 46% de explantes de hojas con formación de TC (Cuadro 5).

El ACTC se ve influenciado por el tipo de explante, obteniendo mayor porcentaje de ACTC (64.15%) al utilizar hoja como explante inicial, comparado con el 47.4% de ACTC de los peciolo (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto del tipo de explante en la formación de callo a los 35 días después del establecimiento *in vitro* de *Moringa oleífera*.

Explante	Explantos con formación de tejido callogénico (%)	Área de cobertura del explante con tejido callogénico (%)
Peciolo	68 ^a	47.43 ^b
Hoja	46 ^b	64.15 ^a

^{a-b} Medidas con letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa para prueba Duncan ($P \leq 0.05$)

La formación de tejido callogénico puede ser estimulada por una variedad de auxinas y citocininas (Montoya, 1991). Las interacciones entre auxina-citocininas forman parte de un papel fundamental en la formación de tejido callogénico. Esto se comprueba en los resultados obtenidos en este experimento, donde se compara la interacción del tipo de explante y la concentración de BAP y 2,4-D utilizada. Obteniendo resultados satisfactorios en el porcentaje de explantes con formación de callo y el porcentaje de área de cobertura del explante con tejido callogénico, pero sin presentar diferencia significativa en los tratamientos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de la interacción de BAP y 2,4-D, en la formación de callo a los 35 días después del establecimiento *in vitro*, a partir de explantes peciolares y hojas de *Moringa oleífera*.

Tratamiento	Explantos con formación de tejido callogénico (%)	Área de cobertura del explante con tejido callogénico (%)
Peciolo (0.5)* + (0.1) ^e	7 ^{ab}	58 ^{abc}
Peciolo (0.5) + (0.5)	77 ^{ab}	37 ^c
Peciolo (1.0) + (0.1)	83 ^a	50 ^{bc}
Peciolo (1.0) + (0.5)	32 ^c	41 ^c
Hoja (0.5) + (0.1)	43 ^c	71 ^{ab}
Hoja (0.5) + (0.5)	55 ^{bc}	53 ^{bc}
Hoja (1.0) + (0.1)	48 ^c	60 ^{abc}
Hoja (1.0) + (0.5)	37 ^c	80 ^a

*mg/Lt de Benziladenina Purina(BAP)

^e mg/Lt de 2,4-D

a-b-c Medidas con letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa para la prueba de Duncan ($P \leq 0.05$)

Experimento 4. Efecto del BAP y 2,4-D en el establecimiento *in vitro* de *vitro*-explantes hipocotiledonares y radiculares. Al finalizar los 35 días después del establecimiento *in vitro* se pudo observar diferencia significativa en el porcentaje de *vitro*-explantes que presentaron formación de tejido callogénico (TC) y el porcentaje de área de cobertura de tejido callogénico (ACTC) (Cuadro 7).

Al utilizar segmentos hipocotiledonares (SH) como *vitro*-explante inicial para la formación de TC se puede observar un mayor porcentaje de explantes con formación de TC (63.6%) comparado con el 43.9% de *vitro*-explantes radiculares (SR) con formación de TC (Cuadro 7).

El ACTC se vio influenciado por el tipo de *vitro*-explante, obteniendo mayor porcentaje de ACTC (98.21%) al utilizar segmento hipocotiledonar como *vitro*-explante inicial, comparado con el 29.8% de ATC de los segmentos radiculares (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto de *vitro*-explantes en la formación de callo a los 35 días después del establecimiento *in vitro* de *Moringa oleífera*.

<i>Vitro</i> -explante	Explantes con formación de tejido callogénico (%)	Área de cobertura del explante con tejido callogénico (%)
Segmento hipocotiledonar	63.6 ^a	98.21 ^a
Segmento radicular	43.9 ^b	29.80 ^b

^{a-b} Medidas con letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa para la prueba de Duncan ($P \leq 0.05$)

Al utilizar segmentos hipocotiledonares (SH) y radicales (SR) como *vitro*-explantes inicial para la formación de TC combinados con las diferentes dosis de BAP y 2,4-D se puede observar que hay un porcentaje óptimo de explantes con formación de TC, pero todos los tratamientos no presentan diferencia significativa Cuadro 8).

Para el porcentaje de ACTC se puede observar diferencia significativa, obteniendo los mayores porcentajes de ACTC (100, 100, 100 y 90.6%) al utilizar SH con dosis de 0.5 y 0.1, 1 y 0.1, 1 y 0.5, 0.5 y 0.5 de BAP y 2,4-D, respectivamente; obteniendo los mismos resultados (80% ACTC) al utilizar SR con dosis de 1 y 0.5 de BAP y 2,4-D, respectivamente.

Si se presenta una diferencia significativa entre los anteriores tratamientos y el resto de los tratamientos con los menores porcentajes de ACTC (25,20 y 0%) obtenidos con SR con dosis de 0.5 y 0.1; 0.5 y 0.5; 1 y 0.1 de BAP y 2,4-D respectivamente (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto de la interacción de BAP y 2,4-D, en la formación de tejido callogénico a los 35 días después del establecimiento *in vitro*, a partir *vitro*-explantes hipocotiledonares (SH) y radicales (SR) de *Moringa oleífera*.

Tratamiento	Explantes con formación de tejido callogénico (%)	Área de cobertura del explante con tejido callogénico (%)
SH (0.5) [*] + (0.1) ^ε	35.2 ^d	100.0 ^a
SH (0.5) + (0.5)	75.0 ^{abc}	90.6 ^a
SH(1.0) + (0.1)	80.9 ^{ab}	100.0 ^a
SH (1.0) + (0.5)	50.0 ^{bcd}	100.0 ^a
SR (0.5) + (0.1)	42.1 ^{cd}	25.0 ^b
SR (0.5) + (0.5)	15.0 ^{ed}	20.0 ^b
SR (1.0) + (0.1)	85.7 ^a	0.0 ^c
SR (1.0) + (0.5)	0.0 ^e	80.0 ^a

*mg/L de Benziladenina Purina(BAP)

^ε mg/L de 2,4-D

^{a-b-c-d-e} Medidas con letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (P≤0.05)

4. CONCLUSIONES

- En el laboratorio, no hubo diferencia en el porcentaje de contaminación de la semilla para las dos concentraciones de NaClO. Las semillas sin tegumento presentaron mayor porcentaje de germinación en comparación a las semillas con tegumento.
- En el invernadero, las semillas sin tegumento presentaron menos días para la germinación y una altura mayor en comparación con la semilla que se sembró con tegumento.
- Para poder establecer el cultivo *in vitro* de láminas foliares y segmentos peciolares, el mejor tratamiento de desinfección fue el hipoclorito de sodio al 2%.
- Los segmentos peciolares muestran un mayor porcentaje de explantes con tejido callogénico (TC), pero una menor cobertura callogénica del explante. Las láminas foliares presentan un menor porcentaje de explantes con TC y una mayor cobertura callogénica del explante.
- Los segmentos hipocotiledonares presentaron mayor porcentaje de explantes con TC y una mayor cobertura callogénica del explante. Los explantes radiculares presentaron menor porcentaje de explantes con TC y una menor cobertura del explante.

5. RECOMENDACIONES

- Tanto en el laboratorio como en el invernadero, es necesaria la remoción del tegumento que cubre la semilla para mejorar los porcentajes de germinación.
- Utilizar soluciones desinfectantes a base de hipoclorito de sodio al 2% para desinfectar y establecer láminas foliares y segmentos nodales de *Moringa oleífera* en condiciones de laboratorio.
- Utilizar láminas foliares para la inducción *in vitro* de TC y segmentos peciolares para una mejor área de cobertura callogénica.
- Utilizar segmentos hipocotiledonares provenientes de *vitro*-plántulas o plántulas que han sido germinadas *in vitro* para la inducción de TC y para una óptima cobertura callogénica del explante.
- Evaluar explantes *vitro*-cotiledonares además de los hipocotiledones y en condiciones de oscuridad durante un mes después de la siembra para acelerar el proceso de inducción callogénica.

6. LITERATURA CITADA

Almeida Montenegro, A.D. 2011. Establecimiento *in vitro* de *Jatropha curcas* L. a partir de hojas cotiledonares y su respuesta a 6-Benciladenina y Ácido indol-3-butírico. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 16 p.

Cysne, J. 2006. Propagación *in vitro* de *Moringa oleifera* L. Tesis Magistral, Ceará, Brasil, Universidad Federal de Ceará. 81 p.

FAO-OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación-Organización Mundial de la Salud). Normas alimentarias FAO/OMS. Comité del Codex (en línea). Consultada 12 agosto. 2012. Disponible en http://www.codexalimentarius.net/download/report/641/al28_24s.pdf.

Foidl, N., Mayorga, L., Vásquez, W. 1999. Utilización del marango (*Moringa oleifera*) como forraje fresco para ganado. Agroforestería para la alimentación animal en Latinoamérica. Roma, Italia. p. 341p.

Foidl N., Makkar, H., Becker, K. 2003. The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. Salaam, Tanzania. 20 p.

García R. 2003. Producción de semillas forestales de especies forrajeras enfatizadas en sistemas silvopastoriles de INAFOR (en línea). Consultado 22 sept. 2012. Disponible en <http://www.inafor.gob.ni/index.php/publicaciones>.

Jiménez, E. 1998. Cultivo de ápices y meristemas. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Santa Clara, Cuba. 56 p.

Kyte, L. 1987. Plants from test tubes an introduction to micro propagation. Portland, Oregon, Timber Press. 160 p.

Lopez, D., Peñate, L., Daquinta, M., Pina, D., Escalona, M. Cultivo de *Jatropha curcas*, L. (Euphorbiaceaceae). Resultados preliminares y estrategias futura (en línea). Consultado 6 jul. 2012. Disponible en <http://www.cubasolar.cu/biblioteca/Ecosolar/Ecosolar21/HTML/articulo03.htm>

Medina, M., García, D., Clavero, T., Iglesias, J. 2007. Estudio comparativo de *Moringa oleifera* y *Leucaena leucocephala* durante la germinación y la etapa inicial de crecimiento. Trujillo, Venezuela. 10 p.

Montoya, L. 1991. Cultivos de Tejidos Vegetales. Editorial EALON. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 77 p.

Price, M. 2007. Nota técnica de ECHO, El árbol de marango. Florida, Estados Unidos. 21p.

Ruiz Ruiz, B.J. 2000. Efecto de BAP y 2,4-D en la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andraeanum* L. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 36 p.

Salazar, R. s.f. Cultivo de Marango (*Moringa oleífera*) El árbol de la vida. Proyecto COMXCOL y asociación ecológica y social de Colombia. 7 p.

SAS, 2009. SAS User guide. Statal Analysis Institute Inc., Cary, N.C., United States of America.

Silva, A., Alves, M., Santos, K., Machado, C., Menezes, L. 2008. Propagação sexuada de moringa (*Moringa oleífera* Lam.). Aracaju, Brasil. 18 p.

Silva, F. y Bernabé M. 2008. Potenciales usos y delimitación del área de cultivo de *Moringa oleífera* en Argentina. Buenos Aires, Argentina. 16 p.

7. ANEXOS

Anexo 1. Tratamientos utilizados para evaluar el procedimiento de desinfección y la germinación *in vitro* de *Moringa oleífera* (Experimento 1A).

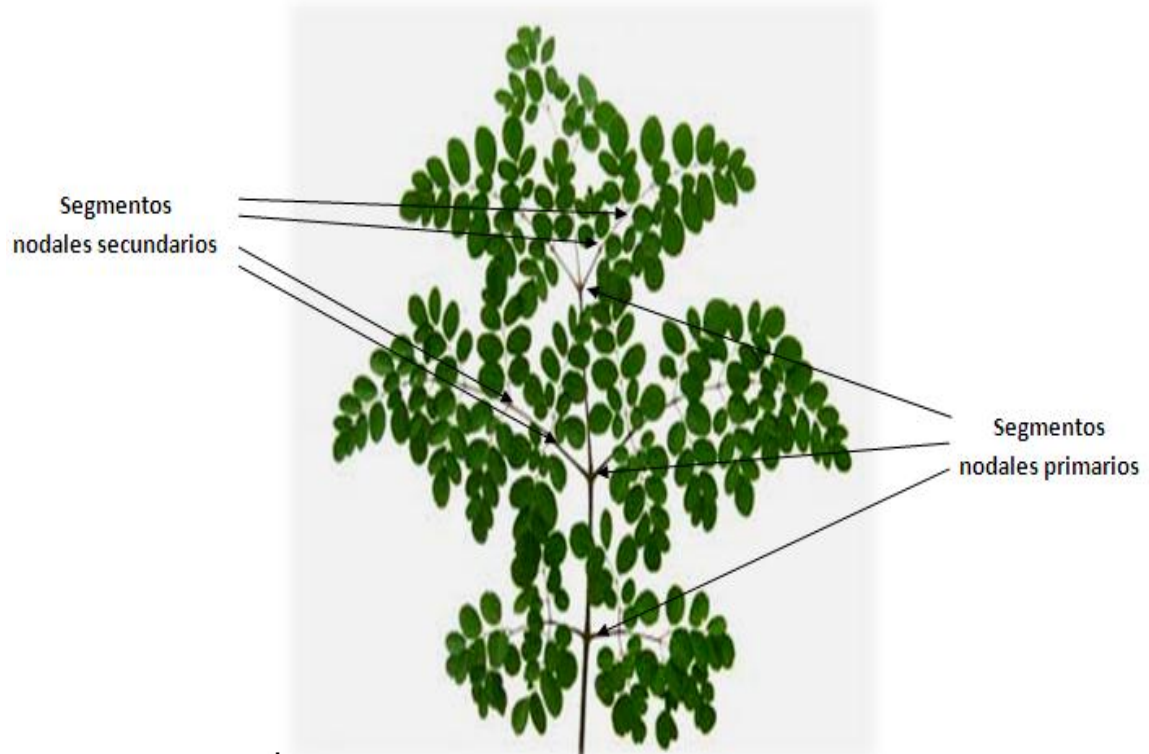
Presencia/ Ausencia de tegumento	Concentración de i.a. de la solución desinfectante* (%)
Con tegumento	1.25
	2.25
Sin tegumento	1.25
	2.25

*Para la solución desinfectante de utilizó un producto comercial Clorox con 4.5 de i.a. de NaClO

Anexo 2. Tratamientos utilizados para evaluar el procedimiento de desinfección en láminas foliares y segmentos nodales de *Moringa oleífera* (Experimento 2).

Tipo de Explante	Concentración de i.a. de la solución desinfectante* (%)
Lámina Foliar	1
	2
Segmentos nodales	1
	2

*Para la solución desinfectante de utilizó un producto comercial Clorox con 4.5 de i.a. de NaClO



Anexo 3. Hoja compuesta tripinada de *Moringa oleifera* y procedencia de segmentos nodales.

Anexo 4. Tratamientos utilizados para evaluar el efecto del BAP y 2,4-D sobre láminas foliares y segmentos peciolares de *Moringa oleifera* (Experimento 3).

Tipo de Explante	BAP (mg/L)	2, 4-D (mg/L)
Lámina foliar	0.5	0.1
	0.5	0.5
	1.0	0.1
	1.0	0.5
Segmento peciolar	0.5	0.1
	0.5	0.5
	1.0	0.1
	1.0	0.5

Anexo 5. Tratamientos utilizados en la evaluación del efecto del BAP y 2,4-D sobre *vitro*-explantes hipocotiledonares y radicales de *Moringa oleífera* (Experimento 5).

Tipo de <i>vitro</i> -explante	BAP (mg/L)	2, 4-D (mg/L)
Hipocotiledonares	0.5	0.1
	0.5	0.5
	1.0	0.1
	1.0	0.5
Radiculares	0.5	0.1
	0.5	0.5
	1.0	0.1
	1.0	0.5

Anexo 6. Resumen de experimentos realizados para *Moringa oleífera*.

Experimento	1A y 1B	2	3	4
Tipo de Evaluación	Desinfección	Desinfección	BAP*2,4-D	BAP*2,4-D
Semilla				
Segmentos nodales				
Láminas foliares				
Segmentos peciolares				
<i>vitro</i> -hipocotiledones				
<i>vitro</i> -raíces				