

**Organogénesis directa *in vitro*
de *Nicotiana tabacum*
-variedad criollo Havanensis-
a partir de láminas foliares**

**Roberto Hernán Medina Idrovo
Xiomara José González Franco**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2014

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Organogénesis directa *in vitro*
de *Nicotiana tabacum*
-variedad criollo Havanensis-
a partir de láminas foliares**

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

Presentado por

**Roberto Hernán Medina Idrovo
Xiomara José González Franco**

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2014

**Organogénesis directa *in vitro*
de *Nicotiana tabacum*
-variedad criollo Havanensis-
a partir de láminas foliares**

Presentado por:

Roberto Hernán Medina Idrovo
Xiomara José González Franco

Aprobado:

Por: Dinie Espinal, M.Sc.
Asesora Principal

Renán Pineda, Ph.D.
Director
Departamento de Ciencia y
Producción Agropecuaria

Juan Carlos Rosas, Ph.D.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Organogénesis directa *in vitro* de *Nicotiana tabacum* -variedad criollo Havanensis- a partir de láminas foliares.

Roberto Hernán Medina Idrovo y Xiomara José González Franco

Resumen: El tabaco es una planta perteneciente a la familia de las Solanáceas, originaria de Sur América. Se adapta a suelos ácidos y pesados, con poca materia orgánica, y se desarrolla muy bien en altas temperaturas. Es una planta muy importante para Latinoamérica, generando alrededor del 16% del PIB de la región e igualmente importante en la generación de empleos para las regiones del Caribe y América Central. El objetivo de esta investigación fue desarrollar un protocolo para la regeneración *in vitro* de *Nicotiana tabacum* variedad criollo Havanensis, por la vía de organogénesis directa a partir de láminas foliares; que sea la forma más económica y viable para realizar este procedimiento a escala comercial en Honduras. Se realizaron dos experimentos, en el primero se evaluaron dos concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO): 10% y 20% (v/v), con dos tiempos de exposición: 20 y 30 minutos, para determinar el tratamiento más económico y eficiente en la obtención de asepsia de los explantes de *Nicotiana tabacum*. En el segundo experimento se evaluó la auxina ácido naftalenacético (ANA) con dos concentraciones: 0.5 y 1.0 μM , y cuatro citocininas bencil aminopurina (BAP), 6 fulfuril adenina (Kinetina), zeatina y 2 isopentenil adenina (2iP) en dos concentraciones cada una: 5 y 10 μM , para un total de 16 tratamientos. Este experimento tenía como objetivo, determinar la interacción más efectiva de hormonas para la inducción directa de brotes adventicios a partir de explantes foliares de *Nicotiana tabacum*. Al final de la segunda semana, en el experimento de desinfección superficial se observó que el tratamiento de 10% de NaClO a 30 minutos, obtuvo la menor contaminación (2.2%), y fue significativamente diferente al tratamiento de 20% NaClO por 30 minutos (24.4%) con una probabilidad ($P \leq 0.05$). Para el segundo experimento se tomó el peso seco de cada explante en la cuarta semana, se eliminó el peso de raíces y tejido callogénico para cuantificar la producción neta de brotes adventicios. Mediante el análisis de peso seco, se determinó que las citocininas utilizadas presentaron diferencias significativas entre ellas, donde el mayor peso seco de brotes adventicios (200 mg) se observó al utilizar BAP. No se observaron diferencias significativas al utilizar Kinetina y Zeatina (181 y 167 mg respectivamente). El menor peso seco de brotes adventicios se observó al utilizar 2iP (133 mg) ($P \leq 0.05$).

Palabras clave: BAP, brotes adventicios, citocininas, desinfección superficial, kinetina, peso seco, tejido callogénico, zeatina, 2iP.

Abstract: Tobacco belongs to the solanaceae plant family, originally from South America. It can adapt to acidic and heavy soils, with poor organic matter, and develops very well in high temperatures. It's an important plant for Latin America, generating around 16% of the IBP of the region and also generating employment for the Caribbean and Central America region. The objective of this research was to develop a protocol for in vitro regeneration of *Nicotiana tabacum* criollo Havanensis variety, via direct organogenesis from leaf explants; which will also be the most economical and feasible way to perform this procedure on a commercial scale in Honduras. Two experiments were conducted, in the first one two concentrations of sodium hipoclorite (NaClO): 10% and 20% (v/v) with two exposition times: 20 and 30 minutes were evaluated, in order to determine which treatment would be the cheapest and most efficient to obtain the asepsis of the *Nicotiana tabacum* leaf explants. In the second experiment the auxin naftalenacetic acid (NAA) with two concentrations: 0.5 and 1.0 μM , and four citokinins bencilaminopurina (BAP), 6-fulfuriladenina (Kinetin), zeatin and 2-isopentenil adenine (2iP) in two concentrations each one: 5 and 10 μM , for a total of 16 treatments, were evaluated in order to determine the most effective interaction of grow regulators for the induction of direct shoot formation from leaf explants of *Nicotiana tabacum*. At the end of the second week after establishment in the superficial disinfection experiment, the treatment of 10% of NaClO for 30 minutes showed the least contamination percentage of 2.2 and was significantly different from the 20% NaClO for 30 minutes treatment which showed 24.4% of contamination, with a probability of ($P \leq 0.05$). In the second experiment, dry weight of each explant was taken at the end of the fourth week after establishment, roots and callogenic tissue was eliminated to quantify the net adventitious shoot formation. The dry weight analysis showed that the citokinins used presented significant differences among them, where the biggest dry weight (200 mg) was observed when using BAP, there was no significant differences between Kinetin and Zeatin (181 and 167 mg respectively). The least dry weight of adventitious shoots was observed when using 2iP (133 mg) ($P \leq 0.05$).

Keywords: Adventitious shoots, BAP, callogenic tissue, citokinins, dry weight, kinetin, superficial disinfection, zeatin, 2iP.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	v
Índice de cuadros, figuras y gráficos	vi
1 INTRODUCCIÓN	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS	3
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
4 CONCLUSIONES	20
5 RECOMENDACIONES	21
6 LITERATURA CITADA.....	22
7 ANEXOS.....	24

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Medio basal Murashige y Skoog (MS) 1962, usado para el experimento de desinfección de explantes foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> var. criollo Havanensis. El Zamorano, Honduras, 2014.....	4
2. Mezcla de reguladores de crecimiento evaluados en la inducción de organogénesis directa en explantes foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> . El Zamorano, Honduras, 2014.....	7
3. Cuadro de significancia de los factores de variación para el experimento I: elaboración de un procedimiento de desinfección para láminas foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> para la variable contaminación. El Zamorano, Honduras, 2014.....	12
4. Cuadro de significancia de los factores de variación para el experimento II: elaboración de un protocolo de regeneración de <i>Nicotiana tabacum</i> a partir de explantes foliares para la variable peso seco de brotes adventicios. El Zamorano, Honduras, 2014.....	18
5. Efecto del tipo de citocinina en el peso seco de los explantes a los 28 días del establecimiento <i>in vitro</i> de láminas foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> variedad criollo Havanensis. El Zamorano, Honduras, 2014.....	19

Figuras	Página
1. Infraestructura interior de un invernadero aéreo para la producción de plántulas de tabaco. Fuente: Universidad Católica de Salta, Argentina 2006.....	3
2. Hojas de <i>Nicotiana tabacum</i> sumergidas en solución desinfectante a base de hipoclorito de sodio (NaClO). El Zamorano, Honduras, 2014.....	5
3. Escisión de los explantes foliares a partir de hojas inmaduras de <i>Nicotiana tabacum</i> , utilizadas para el experimento de desinfección. El Zamorano, Honduras, 2014.....	6

4. Explante foliar de 1 cm ² de <i>Nicotiana tabacum</i> en el tubo de ensayo con medio de cultivo estéril utilizado para el experimento de desinfección. El Zamorano, Honduras, 2014.....	6
5. Detalle de una relación auxina:citocinica utilizada para la inducción de organogénesis directa a partir de láminas foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> . El Zamorano, Honduras, 2014.....	8
6. Tratamientos para la inducción de organogénesis directa a partir de láminas foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> . El Zamorano, Honduras, 2014.....	8
7. Siembra individual de explantes foliares en frascos de vidrio con la mezcla auxina:citocinina para inducir organogénesis directa. El Zamorano, Honduras, 2014.....	9
8. Eliminación de restos de medio de crecimiento, tejido callogénico y raíces de los explantes de <i>Nicotiana tabacum</i> para evaluar la inducción de brotes adventicios. El Zamorano, Honduras, 2014.....	10
9. Detalle de las bolsas de papel en las que se colocó cada explante y su disposición dentro del horno para someterlos a la deshidratación. El Zamorano, Honduras, 2014.....	10
10. Efecto de los tratamientos en la inducción de brotes adventicios a los 21 días del establecimiento <i>in vitro</i> de láminas foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> variedad criollo Havanensis. El Zamorano, Honduras, 2014.....	14
11. Efecto de los tratamientos en la inducción de tejido callogénico a los 28 días del establecimiento <i>in vitro</i> de láminas foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> variedad criollo Havanensis. El Zamorano, Honduras, 2014.....	15
12. Efecto de los tratamientos en la inducción de tejido radicular a los 28 días del establecimiento <i>in vitro</i> de láminas foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> variedad criollo Havanensis. El Zamorano, Honduras, 2014.....	16
13. Toma de peso fresco de los explantes a los 28 días del establecimiento <i>in vitro</i> de láminas foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> variedad criollo Havanensis. El Zamorano, Honduras, 2014.....	17
14. Toma de peso seco de los explantes a los 28 días del establecimiento <i>in vitro</i> de láminas foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> variedad criollo Havanensis. El Zamorano, Honduras, 2014.....	18

Gráficos

Página

1. Efecto de la interacción de la concentración de hipoclorito de sodio en la solución desinfectante y el tiempo de exposición en la contaminación de explantes foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> . El Zamorano, Honduras, 2014....	13
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Anexos	Página
1. Efecto de los tratamientos en la inducción de brotes adventicios a los 21 días del establecimiento <i>in vitro</i> de láminas foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> variedad criollo Havanensis, El Zamorano, Honduras, 2014.....	24
2. Efecto de los tratamientos en la inducción de tejido callogénico a los 28 días del establecimiento <i>in vitro</i> de láminas foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> variedad criollo Havanensis. El Zamorano, Honduras, 2014.....	25
3. Efecto de los tratamientos en la inducción de tejido radicular a los 28 días del establecimiento <i>in vitro</i> de láminas foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> variedad criollo Havanensis. El Zamorano, Honduras, 2014.....	25
4. Efecto de los tratamientos en el peso fresco de los explantes a los 28 días del establecimiento <i>in vitro</i> de láminas foliares de <i>Nicotiana tabacum</i> variedad criollo Havanensis. El Zamorano, Honduras, 2014.....	26

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos tiene como objetivo mantener viables las células o una unidad funcional de células fuera de su forma normal multicelular. Los pioneros en esta ciencia, quienes removieron células y órganos, los mantuvieron viables y fueron capaces de hacerlos multiplicar y crecer, hicieron un impacto revolucionario en la ciencia (Martin 1994). El cultivo de tejidos es una herramienta usada en un amplio rango de actividades; desde la investigación básica sobre los procesos bioquímicos y morfológicos de la diferenciación celular, hasta la que realizan aquellos laboratorios que se dedican a la investigación en el mejoramiento genético de las plantas; sin olvidar los laboratorios que se dedican enteramente a la producción comercial de plántulas (Roca y Mroginski 1991).

En el año de 1962, Murashige y Skoog desarrollaron el medio nutritivo MS con el que logran un crecimiento rápido en tejidos de tabaco. En la actualidad, las sales inorgánicas de ese medio se usan con bastante éxito en casi todas las especies (Hurtado & Merino 1987); además se identificó el tabaco como la especie más útil en bioensayos de regeneración *in vitro* debido a la facilidad con la que se regenera.

El tabaco fue descrito por primera vez por Linneo en 1753 y pertenece a la familia de las solanáceas. Es una planta perenne, pero en cuanto a su cosecha se maneja como una planta anual. Tanto el tallo como el follaje se encuentran envueltos por una pubescencia formada por tricomas y pelos, muchos de los cuales son glandulares. Las hojas están dispuestas simétricamente en el tallo en espiral, son grandes, succulentas y flexibles. El tabaco es notable por su superficie foliar que fácilmente puede alcanzar los 2.5 m² (Morera 1983).

El tabaco es convencionalmente propagado por semillas que se producen en una cápsula ovoide de unos 3 a 6 cm de longitud que contienen numerosas semillas de aproximadamente 0.75 mm de largo y que albergan alrededor de 100 a 400 semillas (Morera 1983). Actualmente se usan semilleros convencionales o bancales o bien invernaderos aéreos, para obtener una planta sana y fuerte, independientemente del tipo de tabaco que sea. Se tiene que seguir un riguroso sistema de sanidad en los semilleros para garantizar plántulas libres de virus u otras afecciones que empeoran en condiciones de campo (TANASA 2012).

La propagación sexual además de producir un limitado número de descendientes, propicia que todos los descendientes sean genéticamente diferentes. Particularmente el tabaco negro es apreciado por presentar un desarrollo foliar exuberante de más de 20 hojas, y una altura mayor a 2 m (Hernández, *et al.* 2011), lo cual se obtiene mediante el mejoramiento genético; pero que no es alcanzado por todas las plantas de la explotación debido a la misma variabilidad. La clonación *in vitro* es una herramienta potencial para lograr una plantación genéticamente homogénea de las más altas características (George 1993).

El objetivo de este estudio fue:

- Desarrollar un protocolo para la regeneración *in vitro* de *Nicotiana tabacum* Var. criollo Havanensis, por la vía de organogénesis directa a partir de láminas foliares; que sea la forma más económica y viable para realizar este procedimiento a escala comercial en Honduras.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. El estudio fue realizado durante los meses de mayo a septiembre del año 2014 en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Carrera de Ingeniería Agronómica, perteneciente al Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria de la Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, ubicada en el Valle del Yeguare a 30 km de Tegucigalpa, carretera a Danlí.

Obtención del material vegetal. El material vegetal fue obtenido de la agroindustria tabacalera LAEPE S.A situada en el Barrio El Carmelo, Danlí, Honduras. Las plántulas fueron donadas por el Sr. Javier Plantada, Vicepresidente Senior de la compañía Suiza Oettinger Davidoff. Se obtuvieron 100 plántulas cultivadas en invernaderos aéreos con fertilizante Osmocote[®], donde las plántulas crecen sobre mesas para evitar el contacto con el suelo (Figura 1). Las plántulas se trasladaron por medio de resiembra a maceteros individuales, para continuar con su crecimiento vegetativo.



Figura 1. Infraestructura interior de un invernadero aéreo para la producción de plántulas de tabaco (Universidad Católica de Salta, Argentina, 2006).

Experimento 1. Elaboración de un procedimiento de desinfección para láminas foliares de *Nicotiana tabacum*

Para efectos de esta investigación, se realizó un experimento preliminar de desinfección, el cual consistió en encontrar un procedimiento efectivo y económico para la obtención de material vegetativo inocuo y viable en la micropropagación.

Formulación nutritiva. Se utilizó la formulación básica de Murashige y Skoog (MS) (Cuadro 1). Se utilizó agua destilada, el agente solidificante Phytigel[®] 1.8 g/L y un pH de 5.8 regulado con ácido clorhídrico (HCL) e hidróxido de potasio (KOH) en pH Meter S20 Seven Easy[™]. Se dispensó 10 ml de solución nutritiva en cada tubo de ensayo para luego ser esterilizado en autoclave Market Forge Sterilmatic STM-E[™] a 15 psi y 120 °C por 20 minutos (Hurtado y Merino 1987).

Cuadro 1. Medio basal Murashige y Skoog (MS) 1962, usado para el experimento de desinfección de explantes foliares de *Nicotiana tabacum* var. criollo Havanensis. El Zamorano, Honduras, 2014.

Componente	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macroelementos	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650.000
	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio dihidratado	440.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	KNO ₃	Nitrato de Potasio	1900.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	COCL.6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	MnSO ₄ .H ₂ O	Sulfato de manganeso hidratado	16.900
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio dihidratado	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Hierro	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	5.000
Componentes orgánicos		Inositol	100.000
		Ácido nicotínico	0.500
		Piridoxina	0.500
		Tiamina	0.400
		Sacarosa	30.000

(Murashige y Skoog 1962)

Preparación del material vegetal. Para la preparación del material vegetal en el invernadero, se cortaron 16 hojas inmaduras al azar, cada una con un área aproximada de 7×5 cm que fueron trasladadas al laboratorio. En el laboratorio se procedió a lavar las hojas con abundante agua y jabón líquido por un minuto. Seguidamente las hojas se colocaron en etanol al 70% por 30 segundos a manera de cubrir las hojas en su totalidad.

Las hojas fueron distribuidas en los cuatro tratamientos de desinfección (Figura 2), utilizando hipoclorito de sodio (NaClO) contenido en cloro comercial Magia Blanca[®] al 4.75% de i.a. A esta solución se le agregaron dos gotas de Tween 80[®] por cada 100 ml de solución desinfectante.

Para los cuatro tratamientos de desinfección se utilizaron dos concentraciones de solución desinfectante y dos tiempos de exposición:

- a) Hipoclorito de sodio (NaClO) al 10% (v/v) durante 20 minutos
- b) Hipoclorito de sodio (NaClO) al 20% (v/v) durante 20 minutos
- c) Hipoclorito de sodio (NaClO) al 10% (v/v) durante 30 minutos
- d) Hipoclorito de sodio (NaClO) al 20% (v/v) durante 30 minutos



Figura 2. Hojas de *Nicotiana tabacum* sumergidas en solución desinfectante a base de hipoclorito de sodio (NaClO). El Zamorano, Honduras, 2014.

Siembra del material vegetal. Se procedió a la siembra en las cámaras de flujo laminar, las cuales fueron encendidas 30 minutos antes de la siembra y fueron desinfectadas con alcohol al 70%. Las pinzas y bisturíes fueron esterilizados a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 segundos en el esterilizador de calor seco Z3378550-Steri 250TM, AC input 120 V.

Para cada tratamiento se enjuagaron las hojas tres veces con agua destilada estéril para luego remover las orillas de las hojas y solo dejar la porción central de la hoja conteniendo la nervadura central (Figura 3). Luego se procedió a cortar los explantes de 1×1 cm colocándose un explante por tubo de ensayo conteniendo medio estéril (Figura 4). Finalmente los contenedores fueron trasladados al cuarto de crecimiento. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento, en la cual cada repetición constó de 15 unidades experimentales (UE), para un total de 180 tubos de ensayo.



Figura 3. Escisión de los explantes foliares a partir de hojas inmaduras de *Nicotiana tabacum*, utilizadas para el experimento de desinfección. El Zamorano, Honduras, 2014.



Figura 4. Explante foliar de 1 cm² de *Nicotiana tabacum* en el tubo de ensayo con medio de cultivo estéril utilizado para el experimento de desinfección. El Zamorano, Honduras, 2014.

Condiciones de incubación. Los tubos de ensayo permanecieron dos semanas a una temperatura promedio de 22 °C y una humedad relativa de 50%. La intensidad de luz fue de 200 Lux y se usó un fotoperiodo de 16 horas luz proporcionado por lámparas fluorescentes Philips twister 23 W CDL™ 110 - 127 V.

Evaluación del experimento. Los explantes se revisaron a diario por 15 días, evaluando en cada uno de ellos presencia o ausencia de hongos o bacterias, tomando como criterio de contaminación la mínima presencia de micelios o colonias sobre el medio de cultivo.

Diseño experimental. Para la evaluación estadística se usó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 × 2 evaluando simultáneamente las interacciones que ocurrieron entre los factores: dos concentraciones de NaClO y dos tiempos de exposición, utilizando la prueba DUNCAN como separación de medias y un nivel de significancia $P \leq 0.05$ empleando el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS versión 9.0[®]) (SAS 2009).

Experimento 2. Elaboración de un protocolo de regeneración de *Nicotiana tabacum* a partir de explantes foliares

Preparación del material vegetal. Después de realizada la prueba de desinfección y haber observado que el mejor procedimiento de desinfección fue 10% en hipoclorito de sodio (NaClO) por 30 minutos; se procedió a hacer el experimento principal que consistió en evaluar dos dosis de la auxina ácido naftalenacético (ANA): 0.5 y 1.0 μM y cuatro tipos de citocininas: Bencil amino purina (BAP), Zeatina, Kinetina y 2 isopentenil adenina (2iP) con dos dosis para cada citocinina: 5 y 10 μM teniendo un total de 16 tratamientos (Cuadro 2), (Figura 5) y (Figura 6) para la inducción de organogénesis directa en láminas foliares de tabaco.

Cuadro 2. Mezcla de reguladores de crecimiento evaluados en la inducción de organogénesis directa en explantes foliares de *Nicotiana tabacum*. El Zamorano, Honduras, 2014.

Tratamiento	Auxina (μM)	Citocinina (μM)			
	ANA	BAP	Zeatina	Kinetina	2iP
1	0.5	5	-	-	-
2	0.5	10	-	-	-
3	0.5	-	5	-	-
4	0.5	-	10	-	-
5	0.5	-	-	5	-
6	0.5	-	-	10	-
7	0.5	-	-	-	5
8	0.5	-	-	-	10
9	1.0	5	-	-	-
10	1.0	10	-	-	-
11	1.0	-	5	-	-
12	1.0	-	10	-	-
13	1.0	-	-	5	-
14	1.0	-	-	10	-
15	1.0	-	-	-	5
16	1.0	-	-	-	10

Todas las combinaciones están dadas en micromoles (μM). Se utilizó el peso molecular de cada hormona reguladora de crecimiento, para transformarlo a miligramos por litro (mg/L) para efectos de agregar cada concentración de regulador de crecimiento al medio de cultivo: ANA con un peso molecular de 186.2, BAP con 225.3, Zeatina con 203.3, Kinetina con 215.2 y 2iP con 219.2.

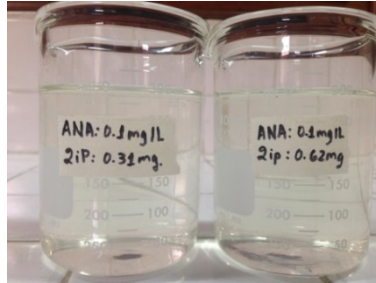


Figura 5. Detalle de una relación auxina:citocinina utilizada para la inducción de organogénesis directa a partir de láminas foliares de *Nicotiana tabacum*. El Zamorano, Honduras, 2014.



Figura 6. Tratamientos para la inducción de organogénesis directa a partir de láminas foliares de *Nicotiana tabacum*. El Zamorano, Honduras, 2014.

Desinfección del material vegetal. Se cortaron de 10 a 12 hojas al azar, jóvenes y completamente formadas, con un área aproximada de 12×7 cm cada una; luego se procedió a lavar el haz y el envés con abundante agua y jabón líquido por un minuto, y seguidamente se colocaron en etanol al 70% por 30 segundos. Para la desinfección se utilizó el método de desinfección más efectivo de 10% en hipoclorito de sodio (NaClO) por 30 minutos ($P \leq 0.05$).

Preparación del medio sólido. Se utilizó el medio de cultivo MS (Cuadro 1) más la mezcla de citocinina y auxina según el tratamiento (Cuadro 2). Se añadió agua destilada, Phytigel[®] (1.8 g/L), se reguló el pH a 5.8 con HCL y KOH, y se colocó 10 ml en cada frasco de vidrio para luego ser esterilizarlo en autoclave a 15 psi con 120 °C por 20 minutos.

Siembra del material. Se procedió a la siembra en cámaras de flujo laminar, las hojas se cortaron en explantes de 1×1 cm. Se sembró un explante por contenedor (Figura 7). De cada tratamiento se hicieron tres repeticiones con 10 UE cada repetición, para un total de 480 UE en 16 tratamientos. Una vez sembrados, los frascos se colocaron en un cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de luz y temperatura iguales a los descritos para los tratamientos de desinfección.



Figura 7. Siembra individual de explantes foliares en frascos de vidrio con la mezcla auxina:citocinina para inducir organogénesis directa. El Zamorano, Honduras, 2014.

Evaluación del experimento. Los frascos fueron revisados semanalmente para la toma de datos, observando las variables de regeneración *in vitro*, formación de tejido callogénico, formación de brotes adventicios y formación de raíces. Se tomó como criterio de evaluación la mínima presencia de cualquiera de las características antes mencionadas, dándole los valores de presencia (1) o ausencia (0) para cada unidad experimental.

Los pesos frescos y secos de todas las UE se tomaron al finalizar la cuarta semana, eliminando tejido callogénico, raíces y residuos de medio de crecimiento (Figura 8), para luego medir la formación de brotes adventicios sobre los explantes de cada tratamiento. Los explantes se colocaron en bolsas de papel de forma individual (Figura 9), luego fueron colocados en un horno a una temperatura promedio de 60 °C por 48 horas (Trigiano y Gray 1999). Se utilizó un horno de convección mecánica marca Precision® modelo 28 con temperatura máxima de 225 °C de 120 V. y para la toma de datos se utilizó una balanza marca Ohaus® modelo Adverurer Pro AV 412, peso máximo de 410 g con un error de 0.01 g a una temperatura de 10 °C a 30 °C.

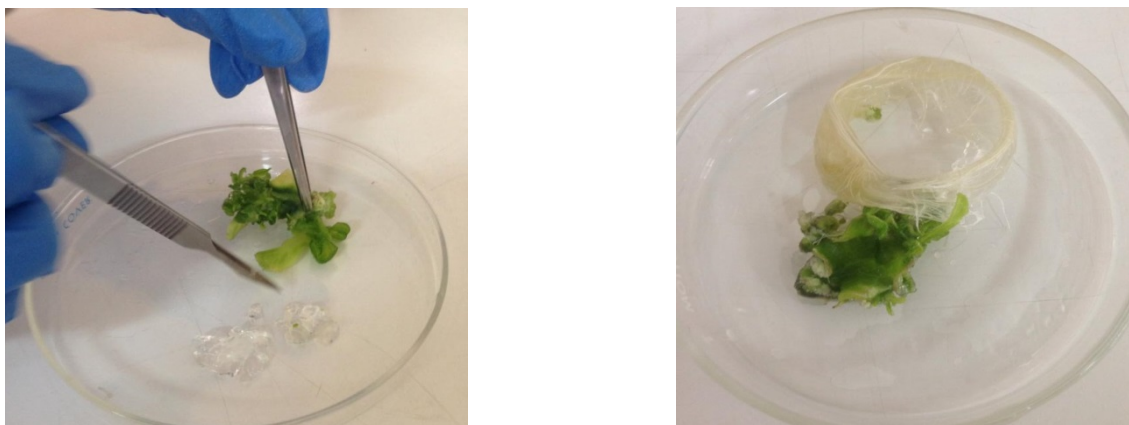


Figura 8. Eliminación de restos de medio de crecimiento, tejido callogénico y raíces de los explantes de *Nicotiana tabacum* para evaluar la inducción de brotes adventicios. El Zamorano, Honduras, 2014.



Figura 9. Detalle de las bolsas de papel en las que se colocó cada explante y su disposición dentro del horno para someterlos a la deshidratación. El Zamorano, Honduras, 2014.

Se decidió eliminar el peso del tejido callogénico basándose en lo expuesto por George (1993); donde identifica al tejido callogénico como fuente de variación genética en la propagación *in vitro*. Debido a esto, la variable tejido callogénico se tomó como referencia y no como un objetivo de estudio. Aunque la rizogénesis en la etapa I es una forma de organogénesis directa se midió igual que el tejido callogénico ya que esta variable no era el objetivo de la investigación.

Diseño experimental. Para la evaluación de la variable peso seco se usó un diseño completamente al azar con arreglo factorial $(1 \times 2) \times (4 \times 2)$ evaluando simultáneamente las interacciones que ocurrieron entre los factores: una auxina (ANA) por dos concentraciones de ANA por cuatro tipos de citocininas por dos concentraciones para cada tipo de citocinina; dando un total de 16 tratamientos con tres repeticiones por tratamiento; cada repetición constó de 10 unidades experimentales para un total de 480 UE. Se utilizó un análisis de varianza, ANDEVA. Se empleó el método DUNCAN para la separación de medias, con un nivel de significancia ($P \leq 0.05$). Los datos fueron analizados con el programa Statistical Analysis System (SAS versión 9.0[®]) (SAS 2009).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento I: Elaboración de un procedimiento de desinfección para láminas foliares de *Nicotiana tabacum*

Contaminación en los explantes foliares Desde los 2 a los 15 días se observó la incidencia en la contaminación de los explantes. La contaminación se evaluó para la interacción de los factores: concentración de NaClO y el tiempo de exposición a la solución desinfectante, que según el análisis estadístico presentó diferencias significativas. Debido a esto se hizo el análisis para la interacción y no para los factores individualmente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Cuadro de significancia de los factores de variación para el Experimento I: Elaboración de un procedimiento de desinfección para láminas foliares de *Nicotiana tabacum* para la variable contaminación. El Zamorano, Honduras, 2014.

Contaminación	P > F
Concentración de NaClO	0.022
Tiempo de exposición a la solución desinfectante	0.214
Interacción: Concentración × Tiempo	0.006

Los explantes que fueron expuestos a la solución desinfectante de hipoclorito de sodio al 10% (v/v) durante 30 minutos presentaron la menor contaminación (2.2%) siendo significativamente diferente al tratamiento de 20% (v/v) por 30 minutos que presentó la mayor contaminación (24.4%) con respecto al 100% de UE. En total se contaminaron 19 de las 180 UE y la contaminación total fue de 11%.

La contaminación registrada en los explantes del tratamiento de 20% de NaClO por 30 minutos fue en su mayoría producida por bacterias provenientes del material vegetal. No hay que olvidar que aunque la mayor parte de los microorganismos se encuentran en la superficie de los órganos vegetales, existen evidencias de la presencia de patógenos endógenos lo cual trae consecuencias durante el cultivo, pues no pueden ser eliminadas con la desinfección superficial. Además, la prolongada exposición de los tejidos vegetales a sustancias desinfectantes, pueden causar lesiones al explante permitiendo el desarrollo de microorganismos oportunistas (Hurtado y Merino 1987) que es lo que pudo haber ocurrido en el tratamiento del 20% de NaClO por 30 minutos de exposición (Gráfico 1).

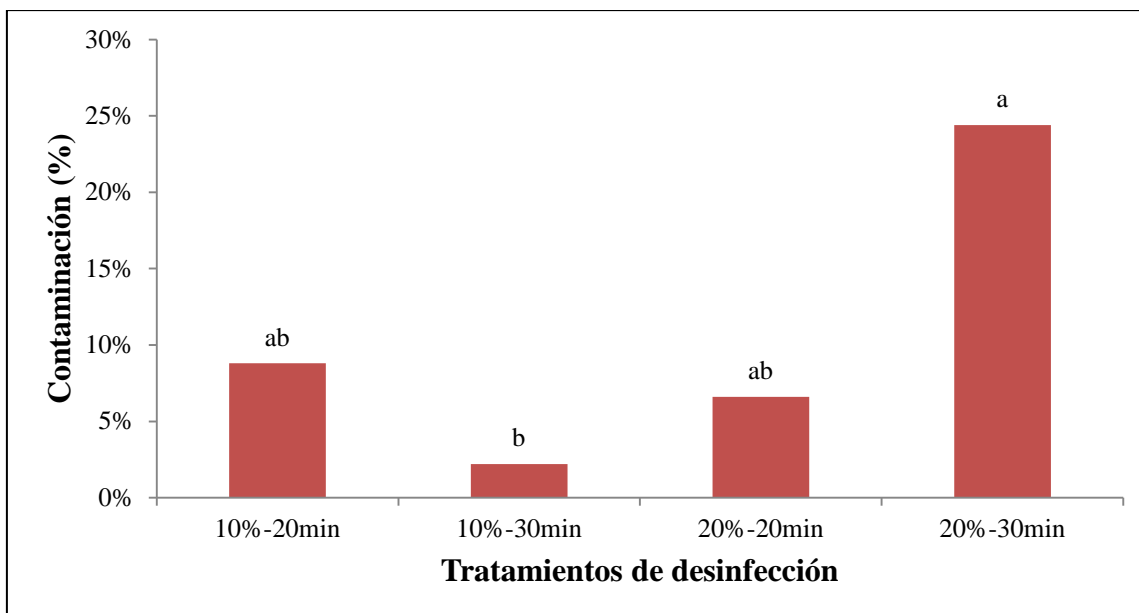


Gráfico 1. Efecto de la interacción de la concentración de hipoclorito de sodio en la solución desinfectante y el tiempo de exposición en la contaminación de explantes foliares de *Nicotiana tabacum*. El Zamorano, Honduras, 2014.

^{ab} Tratamientos con igual letra no difieren entre sí ($P \leq 0.05$).

Aunque los tratamientos de 10% y 20% de NaClO por 20 minutos de exposición no fueron significativamente diferentes del tratamiento de 10% de NaClO por 30 minutos que obtuvo la menor contaminación, éstos no pueden ser usados como tratamientos de desinfección efectivos ya que tampoco difieren significativamente del tratamiento de 20% de NaClO por 30 minutos que presentó la mayor contaminación, y en el caso de ser utilizados pueden dar resultados similares. Con estos resultados se demuestra que no es necesario el uso de más del 10% de NaClO para obtener una desinfección eficiente. La importancia práctica de estos resultados radica en la posibilidad de reducir costos en los procesos de desinfección del material vegetal.

Experimento II: Elaboración de un protocolo de regeneración de *Nicotiana tabacum* a partir de explantes foliares

Regeneración de brotes adventicios (BA) A partir de los 15 días de establecidos los explantes en medio MS suplementado con la relación auxina:citocinina perteneciente a cada tratamiento, se pudo observar la formación de BA. El conteo se realizó a los 21 días entre tratamientos ya que a los 15 días había muy poca presencia de BA y a los 28 días todos los explantes presentaron BA indiferentemente del tratamiento (Figura 10).



Figura 10. Efecto de los tratamientos en la inducción de brotes adventicios a los 21 días del establecimiento *in vitro* de láminas foliares de *Nicotiana tabacum* variedad criollo Havanensis, El Zamorano, Honduras, 2014.

Todas las mezclas de reguladores de crecimiento produjeron una alta cantidad de BA a excepción de los tratamientos ANA + Kinetina con 1.0 y 10 μM respectivamente y ANA + Kinetina con 1.0 y 5 μM respectivamente (Anexo 1). La respuesta de Zeatina y 2iP con los mayores porcentajes de regeneración de BA junto con BAP demuestra que, en un principio Zeatina y 2iP promueven la brotación de forma rápida, pero al ser comparado con el peso seco de los explantes vemos como la actividad de estas hormonas decae con el tiempo y es superada por BAP y Kinetina.

Para los tratamientos de Kinetina que obtuvieron el menor porcentaje de BA podemos comprobar que una alta concentración de ANA en relación a Kinetina en el medio nutritivo provocó que los tejidos permanecieran desdiferenciados por una mayor cantidad de tiempo y no se produjera una formación de órganos tan rápido como en los otros tratamientos (Pierik 1990).

Son pocas las especies que se le pueden sumar al tabaco en su característica de permitir el uso de una gran cantidad de explantes y obtener organogénesis directa o indirecta si se desea (Roca y Mroginski 1991). Esta respuesta por parte del material vegetal, comprueba la facilidad para propagar el tabaco por medio del cultivo *in vitro* de láminas foliares. Debido a esto los explantes se sometieron a la evaluación de peso seco de los brotes adventicios.

Regeneración de tejido callogénico (TC) El callo es un tejido obtenido por el aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una

desdiferenciación celular, presentando estas células una proliferación continua acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido (Hurtado y Merino 1987). Para quienes buscan la multiplicación de plantas de una manera estrictamente clonal, la ruta de la organogénesis indirecta, que se obtiene mediante el cultivo de callos, no es una alternativa; puesto que las evidencias sugieren que la formación de TC constituye la base para obtener variación genética e inestabilidad en las plantas generadas a partir de cultivo *in vitro*, lo cual se considera desfavorable (Roca y Mroginski 1991).

En la cuarta semana del experimento, se observó la presencia o ausencia de TC. Se consideró como presencia de TC aquel explante que presentara una mínima cantidad de masa celular visible a simple vista. Y como ausencia, el explante que no presentara formación de masa celular visible (Figura 11).



Figura 11. Efecto de los tratamientos en la inducción de tejido callogénico a los 28 días del establecimiento *in vitro* de láminas foliares de *Nicotiana tabacum* variedad criollo Havanensis. El Zamorano, Honduras, 2014.

El tratamiento ANA + Zeatina con 0.5 y 10 μM , y el tratamiento ANA + Zeatina con 0.5 y 5 μM respectivamente, obtuvieron el menor porcentaje de presencia de TC; a diferencia del tratamiento de ANA + Kinetina con 0.5 y 10 μM y del tratamiento de ANA + BAP con 1.0 y 10 μM respectivamente que presentaron formación de TC en todos los explantes (Anexo 2). Esto nos permite entender como la relación auxina:citocinica afecta la diferenciación celular, las citocininas rompen la dominancia apical y promueven la división celular y la formación de brotes, las auxinas en combinación con las citocininas promueven al desarrollo de los brotes, un balance no adecuado en la relación auxina:citocinina provoca que los tejidos desarrollen TC o raíces (Astudillo, 2013).

Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Vallejo M. (2008) y Orellana L. (2013) donde al utilizar mayores concentraciones de citocininas sintéticas se obtuvieron mayores porcentajes de regeneración de TC. Aunque la Zeatina y el 2iP presentaron el menor

porcentaje de TC, su rendimiento en peso seco de brotes adventicios fue bajo; por lo tanto dejan de ser una alternativa para la organogénesis directa en *Nicotiana tabacum*.

Se puede apreciar como aún a los 28 días de establecidos los explantes las altas concentraciones de ANA afectaron el rendimiento de Kinetina provocando una mayor cantidad de explantes que formaron TC, esto se debe a la actividad desdiferenciadora de las auxinas que permitió que el tejido vegetal produjera masas de células desorganizadas (Pierik 1990).

Regeneración de tejido radicular (TR) A los 28 días del establecimiento de los explantes, se tomaron los datos de presencia o ausencia de raíces (Figura 12). Se pudo observar que los tratamientos con BAP y Kinetina obtuvieron los menores porcentajes de presencia de raíces; en cambio Zeatina y 2iP fueron los que presentaron una mayor rizogénesis (Anexo 3).

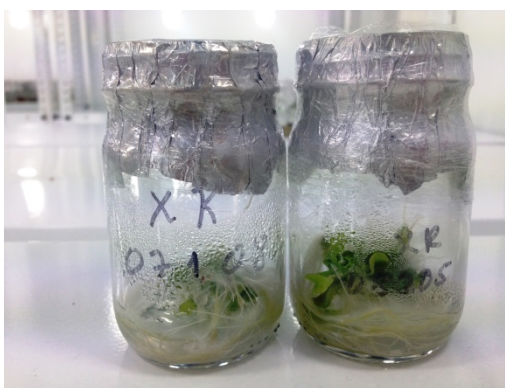


Figura 12. Efecto de los tratamientos en la inducción de tejido radicular a los 28 días del establecimiento *in vitro* de láminas foliares de *Nicotiana tabacum* variedad criollo Havanensis. El Zamorano, Honduras, 2014.

Estos resultados tienen relación indirectamente proporcional al peso seco de los BA que crecieron sobre los explantes y posiblemente se deba a que Zeatina y 2iP son citocininas naturales y ANA es una auxina sintética que tiene efectos más prolongados en tiempo sobre el explante. Las auxinas naturales no se acumulan en grandes cantidades en las células, debido a que existen procesos naturales de inactivación y destrucción de éstas, que son menos eficientes que las auxinas sintéticas, lo que les permite acumularse y tener un período activo relativamente largo al aplicarlas exógenamente (Hurtado y Merino 1987). Se debe tener en cuenta que la proporción de auxinas influye directamente en el estímulo del crecimiento del TR. No obstante, en cantidades algo mayores, inhibe el crecimiento de las raíces primarias, y puede promover la formación de nuevas raíces secundarias (UPV s.f). Además podemos apreciar que los tratamientos que contenían una mayor cantidad de citocininas sintéticas en el medio de cultivo indiferentemente de si era BAP o Kinetina produjeron una menor cantidad de TR, esto se debe principalmente a que las citocininas sintéticas contrarrestaron la actividad rizogénica de ANA hasta el punto en que el

tratamiento ANA + BAP con 0.5 y 10 μ M respectivamente no presentó producción de TR en ninguna de sus UE.

Peso fresco de brotes adventicios A los 28 días de establecidos los explantes en el medio de crecimiento MS adicionado con la relación auxina:citocinina, se procedió a limpiar los explantes de todo residuo de medio así como eliminar masas de TC y TR. Seguidamente se tomaron los pesos frescos de todas las UE (Figura 13).



Figura 13. Toma de peso fresco de los explantes a los 28 días del establecimiento *in vitro* de láminas foliares de *Nicotiana tabacum* variedad criollo Havanensis. El Zamorano, Honduras, 2014.

El peso fresco de los explantes no se tomó como criterio de evaluación para la inducción de BA debido a que es afectado por las auxinas que actúan aumentando una exportación de protones desde dentro hacia afuera de la pared celular. Eventualmente los iones de potasio entran a la célula para contrarrestar el movimiento de protones haciendo que el potencial de agua baje en la célula, esto provoca que el agua entre de forma acelerada en espacios inter e intracelulares y que los tejidos aumenten de tamaño, por consiguiente, esto no refleja la actividad citoquinética que ocurrió en el material vegetal. Sin embargo estos resultados guardan relación con los obtenidos mediante el análisis de peso seco de los explantes en el cual BAP obtuvo los mayores pesos (George 1993) (Anexo 4).

Peso seco de brotes adventicios. El peso seco de los explantes se tomó luego de eliminar el peso de TC y TR y someterlos a la deshidratación (Figura 14).



Figura 14. Toma de peso seco de los explantes a los 28 días del establecimiento *in vitro* de láminas foliares de *Nicotiana tabacum* variedad criollo Havanensis. El Zamorano, Honduras, 2014.

El peso seco se tomó como variable determinante ya que representa de forma más acertada la producción neta de brotes adventicios sobre los explantes y así determinar el tratamiento más eficaz para inducir organogénesis directa. Para el análisis de la producción de brotes adventicios se utilizó como factor significativo el tipo de citocinina usado ya que no hubo diferencias significativas para los demás factores de variación (Cuadro 4).

Cuadro 4. Cuadro de significancia de los factores de variación para el Experimento II: Elaboración de un protocolo de regeneración de *Nicotiana tabacum* a partir de explantes foliares para la variable peso seco de brotes adventicios. El Zamorano, Honduras, 2014.

Peso seco de brotes adventicios	P > F
Concentración de ANA [ANA]	0.6732
Citocinina	<.0001
Concentración de la citocinina [Citocinina]	0.0834
Interacción [ANA] × Citocinina	0.0876
Interacción [ANA] × [Citocinina]	0.4534
Interacción Citocinina × [Citocinina]	0.0802
Interacción [ANA] × Citocinina × [Citocinina]	0.9530

Al utilizar BAP se obtuvieron los mayores pesos secos (200 mg), seguidos por Kinetina y Zeatina (181 y 167 mg respectivamente) ($P \leq 0.05$) (Cuadro 5). Las citocininas son muy efectivas promoviendo la brotación directa o indirecta siendo usadas para este propósito en combinación con auxinas. Un correcto balance entre auxinas y citocininas, promueve una organogénesis efectiva y solo se logra a través de la experimentación (George, 1993).

Cuadro 5. Efecto del tipo de citocinina en el peso seco de los explantes a los 28 días del establecimiento *in vitro* de láminas foliares de *Nicotiana tabacum* variedad criollo Havanensis. El Zamorano, Honduras, 2014.

Citocinina	Peso seco (mg)
BAP	200 a
Kinetina	181 b
Zeatina	167 b
2iP	133 c

^{abc} Tratamientos seguidos con distintas letras son significativamente diferentes, según la prueba Duncan con una $P \leq 0.05$

Los resultados del cuadro anterior posiblemente se deban a la forma en la que el material vegetal metaboliza las citocininas, debido a que Zeatina y 2iP son citocininas naturales, estas son rápidamente degradadas por la citocinina oxidasa de las plantas; reduciendo así su actividad en los cultivos *in vitro*. Zeatina por tener un efecto más fuerte que BAP pero de menor duración en el medio de cultivo, pudo producir una gran cantidad de BA y logró igualar a Kinetina. A diferencia de las citocininas naturales, las sintéticas como BAP y Kinetina son más baratas y accesibles para las explotaciones comerciales, además de tener un efecto más prolongado en los explantes (George 1993).

4. CONCLUSIONES

- El uso de la solución desinfectante al 10% de NaClO por 20 minutos, garantiza obtener resultados favorables en la asepsia de los explantes foliares de *Nicotiana tabacum* variedad criollo Havanensis.
- Las citocininas sintéticas como BAP y Kinetina, son más efectivas en el crecimiento de brotes adventicios sobre el explante, pues estas actúan en el explante de forma prolongada.
- Las citocininas naturales como Zeatina y 2iP, presentaron un menor porcentaje de tejido callogénico, pero su producción de brotes adventicios fue muy escasa; razón por la cual no se deben usar en la organogénesis directa clonal.
- Las citocininas naturales son rápidamente metabolizadas por el explante, produciendo así un desbalance en la proporción auxina:citocinina, lo que conlleva a la producción excesiva de raíces.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar la necesidad de usar un agente dispersante de la solución desinfectante como Tween 80[®] para obtener asepsia en los explantes de *Nicotiana tabacum*.
- Evaluar el uso de menores concentraciones de NaClO en la desinfección de láminas foliares de *Nicotiana tabacum*.
- Utilizar citocininas sintéticas como BAP y Kinetina para obtener una mayor producción de brotes adventicios sobre el explante.
- Evaluar otras combinaciones de ANA + BAP y ANA+ Kinetina para encontrar un balance que no produzca formación de tejido callogénico.
- Evaluar la respuesta de los compuestos citocinínicos a la presencia de una auxina natural como AIA.
- Utilizar otro tipo de explante incluyendo ápices meristemáticos y discos vasculares.
- Llevar el experimento a la etapa II para evaluar las tasas de multiplicación *in vitro* del material vegetal.

6. LITERATURA CITADA

Astudillo, J. 2013. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de malanga coco (*Colocasia esculenta* L. Schott). Tesis Ing. Ag. El Zamorano, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana.

George, E. 1993. Plant propagation by tissue culture Part1 the Technology. Great Britain. Butler & Tanner. Second edition. 574p.

Hernández, M. J. *et al.* 2011. Efecto del número de hojas por planta en algunas características morfológicas, el rendimiento y la calidad del tabaco negro variedad “Corojo 2006” cultivada bajo tela. Revista Cuba Tabaco. Vol. 12. N° 1. 27p.

Hurtado, M. D. y Merino, M. M. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. México DF, México. Editorial Trillas. 232p.

Murashige T & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473-97.

Martin, B. 1994. Tissue Culture Techniques an Introduction. Boston, Massachusetts, USA. Birkhäuser. 241p.

Morera, F. 1983. El cultivo del Tabaco. San José, Costa Rica. Editorial EUED. 47p.

Orellana, L. 2013. Efecto de tres concentraciones de bencil aminopurina en la multiplicación *in vitro* de yuca – genotipo CM 6119-3 –. Tesis Ing. Ag. El Zamorano, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana.

Pierik, R.1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madrid, España. Ediciones Multi-Prensa.Tercera edición. 326p.

Roca, W. y Mroginski, L. A. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical. 970p.

SAS. 2009. SAS User guide. Statistical Analysis Institute Inc. Cary N.C.

Tabacalera Nacional S.A. TANASA. 2012. Guía de cultivo Tabaco Burley. Durán, Guayas, Ecuador. Philip Morris International. 29p.

Trigiano, R. y Gray, D. 1999. Plant tissue culture and laboratory exercises. Boca Raton, Florida, USA. CRC Press. Second edition. 455p.

Universidad Católica de Salta. 2006. Cultivo de tabaco en invernaderos. Edición 2. Consultado el 1 de septiembre 2014. Disponible en http://www.e-pol.com.ar/newsmatic/index.php?pub_id=325&sid=2001&aid=10862&eid=2&NombreSeccion=Articulo&Accion=VerArticulo

Universidad Politécnica de Valencia. Desconocido. Fitorreguladores. En línea consultado el 5 de septiembre del 2014. Disponible en [http://www.euita.upv.es/varios/biologia/temas/tema_14.htm#Miller y Skoog descubrieron la kinetina, una citoquinina artificial](http://www.euita.upv.es/varios/biologia/temas/tema_14.htm#Miller%20y%20Skoog%20descubrieron%20la%20kinetina%20una%20citoquinina%20artificial).

Vallejo, M. 2008. Establecimiento *in vitro* de *Dendrobium* spp. A partir de explantes foliares. Tesis Ing. Ag. El Zamorano, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 13p.

7. ANEXOS

Anexo 1. Efecto de los tratamientos en la inducción de brotes adventicios a los 21 días del establecimiento *in vitro* de láminas foliares de *Nicotiana tabacum* variedad criollo Havanensis, El Zamorano, Honduras, 2014.

Tratamiento	Concentración (μ M)	Presencia de brotes (%)
ANA + Kinetina	0.5 + 10	100
ANA + BAP	1.0 + 10	100
ANA + Zeatina	1.0 + 5	100
ANA + BAP	1.0 + 5	100
ANA + Zeatina	0.5 + 5	100
ANA +2iP	1.0 + 5	97
ANA + Zeatina	1.0 + 10	97
ANA + 2iP	0.5 + 5	97
ANA + 2iP	0.5 + 10	93
ANA + BAP	0.5 + 5	90
ANA + BAP	0.5 + 10	90
ANA + Kinetina	0.5 + 5	87
ANA + Zeatina	0.5 + 10	87
ANA +2iP	1.0 + 10	87
ANA + Kinetina	1.0 + 10	70
ANA + Kinetina	1.0 + 5	33

Anexo 2. Efecto de los tratamientos en la inducción de tejido callogénico a los 28 días del establecimiento *in vitro* de láminas foliares de *Nicotiana tabacum* variedad criollo Havanensis. El Zamorano, Honduras, 2014.

Tratamiento	Concentración (μ M)	Presencia de tejido callogénico (%)
ANA + Kinetina	0.5 + 10	100
ANA + BAP	1.0 + 10	100
ANA + Kinetina	1.0 + 5	93
ANA + BAP	1.0 + 5	93
ANA + Kinetina	1.0 + 10	86
ANA + BAP	0.5 + 5	83
ANA + Kinetina	0.5 + 5	83
ANA + Zeatina	1.0 + 5	63
ANA + 2iP	0.5 + 10	60
ANA + BAP	0.5 + 10	53
ANA + 2iP	0.5 + 5	43
ANA + Zeatina	1.0 + 10	43
ANA + 2iP	1.0 + 10	40
ANA + 2iP	1.0 + 5	23
ANA + Zeatina	0.5 + 10	20
ANA + Zeatina	0.5 + 5	13

Anexo 3. Efecto de los tratamientos en la inducción de tejido radicular a los 28 días del establecimiento *in vitro* de láminas foliares de *Nicotiana tabacum* variedad criollo Havanensis. El Zamorano, Honduras, 2014.

Tratamiento	Concentración (μ M)	Presencia de raíces (%)
ANA + Zeatina	1.0 + 5	100
ANA + 2iP	0.5 + 5	96
ANA + Kinetina	1.0 + 5	93
ANA + 2iP	0.5 + 10	93
ANA + Zeatina	1.0 + 10	86
ANA + Zeatina	0.5 + 5	86
ANA + 2iP	1.0 + 5	86
ANA + 2iP	1.0 + 10	73
ANA + BAP	0.5 + 5	73
ANA + Zeatina	0.5 + 5	73
ANA + Kinetina	0.5 + 5	70
ANA + BAP	1.0 + 5	66
ANA + Kinetina	1.0 + 10	40
ANA + Kinetina	0.5 + 10	13
ANA + BAP	1.0 + 10	13
ANA + BAP	0.5 + 10	0

Anexo 4. Efecto de los tratamientos en el peso fresco de los explantes a los 28 días del establecimiento *in vitro* de láminas foliares de *Nicotiana tabacum* variedad criollo Havanensis. El Zamorano, Honduras, 2014.

Tratamiento	Concentración (μM)	Peso fresco (gr)
ANA + Kinetina	0.5 + 10.0	4.0
ANA + BAP	1.0 + 5.0	3.9
ANA + BAP	1.0 + 10.0	3.9
ANA + BAP	0.5 + 5.0	3.8
ANA + BAP	0.5 + 10.0	3.6
ANA + Kinetina	1.0 + 10.0	3.3
ANA + Kinetina	0.5 + 5.0	3.3
ANA + Zeatina	1.0 + 10.0	3.0
ANA + Zeatina	0.5 + 10.0	3.0
ANA + 2iP	0.5 + 5.0	2.8
ANA + Zeatina	0.5 + 5.0	2.7
ANA + Zeatina	1.0 + 5.0	2.6
ANA + 2iP	0.5 + 10.0	2.5
ANA + Kinetina	1.0 + 5.0	2.2
ANA + 2iP	1.0 + 10.0	1.9
ANA + 2iP	1.0 + 5.0	1.8