



USAC
TRICENTENARIA
Universidad de San Carlos de Guatemala

DG Dirección General
de Investigación
Universidad de San Carlos de Guatemala

**Informe final de Proyecto de Investigación
DIGI-PUI-004**

Informe final de proyecto de investigación

Universidad de San Carlos de Guatemala

Dirección General de Investigación

Programa Universitario de Investigación en Alimentación y Nutrición –PRUNIAN–

Conservación *in vitro* de dos especies de *Phlebodium* Spp. y *Smilax domingensis* Willd. con propiedades medicinales y peligro de extinción.

Unidad avaladora: Facultad de Agronomía

4.8.63.0.91

Coordinador: PhD Luis Rodolfo Montes Osorio

Guatemala, 27 de febrero de 2026



Informe final de Proyecto de Investigación

Contraportada

Autoridades de la Dirección General de Investigación

Dra. Alice Patricia Burgos Paniagua

Directora General de Investigación

Inga. Liuba Cabrera

Coordinadora del Programa Universitario de Investigación

Autores

PhD. Luis Rodolfo Montes Osorio, Reg. 20000124

Ing. Agr. Mak Milan Cruz Sic, Reg. 950101

Ing. Agr. Pablo Andres Leal Nájera, Reg. 20240822

Aux. María de los Ángeles Oliva Borrayo, Reg. 20250625

El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada con recursos del Fondo de Investigación de la DIGI de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la partida presupuestaria número: 4.8.63.0.91 en el Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas.

Los autores son responsables del contenido, de las condiciones éticas y legales de la investigación desarrollada.

Este informe está licenciado bajo una Licencia *Creative Commons* Atribución-No Comercial-Compartir Igual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0).

Puede copiarse, distribuirse y adaptarse con la condición de dar crédito a los autores, no usarlo con fines comerciales y compartir cualquier obra derivada bajo la misma licencia.

Para más información, visite: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>



Informe final de Proyecto de Investigación

Índice general

Resumen	6
Palabras clave	6
Abstract.....	7
Keywords.....	7
1. Introducción	8
2. Contexto de la investigación	9
2.1. Delimitación de tiempo y espacio	9
2.2. Especificaciones geográficas y edafoclimáticas.....	10
2.2.1. Centro Experimental Docente de Agronomía (CEDA)	10
2.2.2. Finca experimental “Sabana Grande”	10
2.3. Población meta beneficiada.....	11
3. Revisión de literatura	11
3.1. Género <i>Phlebodium</i>	11
3.1.1. Propiedades medicinales del género <i>Phlebodium</i>	11
3.2. <i>Smilax Spp.</i>	12
3.2.1. Propiedades medicinales de <i>Smilax Spp.</i>	12
3.3. Reguladores osmóticos	12
3.4. Inhibidores del crecimiento	12
3.5. Estado del arte	13
4. Planteamiento del problema.....	15
5. Objetivos.....	17
6. Hipótesis.....	17
7. Método.....	17



Informe final de Proyecto de Investigación

7.1.	Tipo de investigación.....	17
7.2.	Diseño de la investigación.....	18
7.2.1.	Diseño específico.....	18
7.2.2.	Unidad experimental.....	18
7.2.3.	Repeticiones.....	19
7.3.	Población, muestra y muestreo.....	19
7.3.1.	Población objetivo.....	19
7.3.2.	Unidades de muestreo y características.....	19
7.3.3.	Criterios de inclusión y exclusión de explantes.....	19
7.3.4.	Muestra y tamaño muestral.....	20
7.4.	Técnicas.....	20
7.4.1.	Cuarentena post colecta.....	20
7.4.2.	Colecta de explantes.....	22
7.4.3.	Protocolo de autoclaveo.....	22
7.4.4.	Preparación de soluciones patrón.....	23
7.4.5.	Tren de desinfección de explantes.....	25
7.4.5.1.	<i>Phlebodium</i> spp.....	25
7.4.5.2.	<i>Smilax</i> Spp.....	27
7.4.6.	Germinación de esporas de <i>Phlebodium Spp.</i>	28
7.4.7.	Establecimiento de plantas madre de <i>Phlebodium Spp.</i>	30
7.4.8.	Creación de medios de cultivo de conservación.....	30
7.4.9.	Medios de evaluación de vigor y viabilidad post conservación.....	31
7.5.	Resumen de las variables o unidades de análisis.....	32
7.6.	Procesamiento y análisis de la información.....	34



Informe final de Proyecto de Investigación

7.6.1.	Análisis cuantitativo.....	34
7.6.2.	Análisis cualitativo.....	35
8.	Aspectos éticos y legales.....	37
9.	Resultados y discusión	37
9.1.	Análisis descriptivo	37
9.2.	Análisis de varianza.....	38
9.3.	Análisis correlacional	45
10.	Beneficiarios directos e indirectos.....	51
11.	Estrategia de divulgación y difusión de los resultados.....	52
12.	Contribución a las Prioridades Nacionales de Desarrollo (PND).....	53
13.	Vinculación.....	54
14.	Conclusiones.....	54
15.	Recomendaciones	55
	Referencias	56



Informe final de Proyecto de Investigación

Índice de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Tren de desinfección cuarentenaria <i>in situ</i>	21
Tabla 2. Soluciones patrón para medio MS.....	23
Tabla 3. Soluciones patrón de fitohormonas	24
Tabla 4. Tren de desinfección de explantes de <i>Phlebodium</i>	26
Tabla 5. Tren de desinfección de explantes de <i>Smilax</i>	28
Tabla 6. Tratamientos de germinación de <i>Phlebodium</i> spp	29
Tabla 7. Tratamientos de conservación	31
Tabla 8. Objetivos, variable, instrumentos y unidad de medida o cualificación utilizada en la investigación.....	32
Tabla 9. Escala de coloración visual	35
Tabla 10. Escala de coloración visual	37
Tabla 11. ANOVA.....	38
Tabla 12. Beneficiarios directos e indirectos de la investigación.....	51
Tabla 13. Estrategias de divulgación y difusión de los resultados	52



Informe final de Proyecto de Investigación

Índice de figuras

Figura	Página
Figura 1. Licuado de <i>Phlebodium pseudoaureum</i> establecido en medio MS 50%	30
Figura 2. Escala de coloración del género <i>Smilax</i>	35
Figura 3. Escala de coloración del género <i>Phlebodium</i>	36
Figura 4. Escala cualitativa de presencia de raíz en <i>Phlebodium</i> spp	36
Figura 5. Prueba de Tukey para variable Altura.....	39
Figura 6. Prueba de Tukey para variable Hojas.....	40
Figura 7. Prueba de Tukey para variable Brotes	41
Figura 8. Prueba de Tukey para variable Raíces	42
Figura 9. Gráfica de presencia de raíz en <i>Phlebodium</i> spp	42
Figura 10. Prueba de Tukey para variable Hojas secas	43
Figura 11. Porcentaje de plantas vivas en relación con necrosis.....	44
Figura 12. Gráfica de nivel de Necrosis	45
Figura 13. Correlación entre variables de respuesta por especie.....	46
Figura 14. Correlación presentada en Mapa de calor	48
Figura 15. Gráfica de vigor de <i>P. decumanum</i>	49
Figura 16. Gráfica de vigor de <i>P. pseudoaureum</i>	49
Figura 17. Gráfica de vigor de <i>Smilax</i> spp	50



Informe final de Proyecto de Investigación

Resumen

La presente investigación tuvo como finalidad, generar protocolos de conservación de germoplasma vegetal *in vitro* de *Phlebodium pseudoaureum*, *Phlebodium decumanum* y *Smilax domingensis*, especies con propiedades medicinales, e identificar los mejores reguladores osmóticos para cada especie. Se utilizaron diferentes concentraciones de sorbitol, manitol y ácido abscísico, en medios de cultivo, para identificar la dosis óptima que minimice el crecimiento de los explantes sin comprometer su viabilidad. Los métodos incluyen el monitoreo del crecimiento, identificar la viabilidad de los explantes, y realizar el análisis estadístico correlacionales.

Se identificó que para la especie *Smilax Spp.* se redujo el crecimiento al utilizar el T24 (Manitol 3%) permite retardar el crecimiento para cada una de las variables morfológicas evaluadas. Sin embargo, se ha observado que el T27 (Sorbitol 1.5 g), permite obtener la menor cantidad de hojas secas. Para *P. decumanum*, el T9 (Sorbitol 1.5 g) se clasifica como mejor inhibidor en altura, hojas, brotes y hojas secas, pero para raíces se considera poco favorable. En *P. pseudoaureum* se establece que el T13 (Manitol 1%), permite inhibir todas las variables de estudio.

Para cada especie medicinal el vigor y la viabilidad del explante se mantuvo a través de los siguientes tratamientos; *Smilax spp.* T24 (Manitol 3%), *P. pseudoaureum* T13 (Manitol 1%) y *P. decumanum* T9 (Sorbitol 1.5 g).

Palabras clave

1. Regulador osmótico	2. Plantas medicinales	3. Conservación <i>in vitro</i>	4. <i>Phlebodium</i>	5. <i>Smilax</i>
-----------------------	------------------------	---------------------------------	----------------------	------------------



Informe final de Proyecto de Investigación

Abstract

The present research aimed to generate protocols for *in vitro* conservation of plant germplasm of *Phlebodium pseudoaureum*, *Phlebodium decumanum* and *Smilax domingensis*, species with medicinal properties, and to identify the best osmotic regulators for each species. Different concentrations of sorbitol, mannitol and abscisic acid were used in culture media to identify the optimal dose that minimizes explant growth without compromising their viability. The methods include monitoring growth, identifying explant viability, and performing correlational statistical analysis.

It was identified that for the species *Smilax* spp. growth was reduced when using T24 (Mannitol 3%), which allows delaying growth for each of the morphological variables evaluated. However, it has been observed that T27 (Sorbitol 1.5 g) allows obtaining the lowest number of dry leaves. For *P. decumanum*, T9 (Sorbitol 1.5 g) is classified as the best inhibitor in height, leaves, shoots and dry leaves, but for roots it is considered less favorable. In *P. pseudoaureum* it is established that T13 (Mannitol 1%) allows inhibiting all the study variables.

For each medicinal species, the vigor and viability of the explant was maintained through the following treatments: *Smilax* spp. T24 (Mannitol 3%), *P. pseudoaureum* T13 (Mannitol 1%) and *P. decumanum* T9 (Sorbitol 1.5 g).

Keywords

Osmotic regulator, Medicinal plants, *In vitro* conservation, *Phlebodium*, *Smilax*



Informe final de Proyecto de Investigación

1. Introducción

La conservación de la biodiversidad es un desafío global, especialmente en regiones tropicales como Guatemala, donde la riqueza de especies es alta, pero, también lo es la amenaza de extinción; las plantas medicinales, en particular, representan un recurso invaluable tanto para la medicina tradicional como para la farmacología moderna (Cruz *et al.*, 2005). Entre estas se encuentran las especies *Phlebodium pseudoaureum* Lellinger y *Phlebodium decumanum* J.Sm., así como *Smilax domingensis* Willd.; las mismas que destacan por contener propiedades medicinales altas, pero que se encuentran en un estado, alto, de vulnerabilidad; la pérdida de estas especies no solo significaría una reducción en la biodiversidad, sino también la pérdida de conocimientos ancestrales y potenciales tratamientos médicos (Bandyopadhyay & Dey, 2022; Cruz *et al.*, 2005).

La propuesta de investigación se centró en conservar a nivel *in vitro* dichas especies, generando un método que permita la preservación de material vegetal en condiciones controladas, minimizando los riesgos asociados a factores ambientales adversos y patógenos. Este método se convierte en un recurso valioso para la fitogenética, en la conservación de sus recursos, de importancia mundial e invaluable, manteniendo el germoplasma nativo protegido y listo para la realización de futuras investigaciones orientadas en el avance de la farmacología; además, este proceso posee ventajas exponenciales en comparación con la conservación *ex situ*, reduciendo el riesgo de pérdida de material por afecciones abióticas adversas y el ataque de agentes patógenos, reduciendo los costos y preservando correctamente el germoplasma. En estudios previos, se han realizado esfuerzos significativos para la conservación de estas especies, donde se ha demostrado que, técnicas como la crioconservación y el cultivo de tejidos son efectivas para preservar el germoplasma de plantas tropicales; en particular se documentó que, el uso de medios de cultivo específicos y la optimización de condiciones de luz y temperatura, son cruciales para el éxito de estos métodos (Sánchez-Chiang *et al.*, 2010). Además, estudios han resaltado la importancia de la conservación *in vitro* para la investigación y el desarrollo de productos fitoterapéuticos, enfatizando en el potencial de estas técnicas para mantener la viabilidad y las propiedades



Informe final de Proyecto de Investigación

medicinales de estas especies a largo plazo (Caceres *et al.*, 2006). Estos antecedentes científicos proporcionaron una base sólida para la realización de la investigación, destacando la viabilidad y la relevancia de la conservación *in vitro* como una estrategia efectiva en conservación de especies medicinales en peligro de extinción.

Por otro lado, el uso de Sorbitol, Manitol y Ácido Abscísico (ABA), han demostrado conceder beneficios considerables en el proceso de conservación (Khalid *et al.*, 2024). En el caso de los dos alcoholes de azúcar (sorbitol y manitol), estos actúan como agentes osmóticos, los mismos que mantienen una presión osmótica en los explantes y siendo inhibidores del crecimiento (Khalid *et al.*, 2024). En comparación, el ABA es una fitohormona que posee injerencia, crucial, en la forma que responde la planta al estrés ambiental, incluyendo el hídrico y el provocado por salinidad alta; esta hormona induce la reserva de proteínas y otros compuestos, permitiendo una mejor capacidad de sobrevivencia ante circunstancias adversas.

La conservación *in vitro* de *Phlebodium pseudoaureum*, *Phlebodium decumanum* y *Smilax domingensis* contribuyó de manera significativa a la preservación de plantas medicinales en peligro de extinción, asegurando la supervivencia de estas especies amenazadas; además, el material conservado será parte de investigaciones futuras, facilitando estudios sobre sus propiedades medicinales y potenciales aplicaciones farmacológicas; incluso llegando a contribuir en la salud pública y seguridad alimentaria, proporcionando alternativas naturales para mitigar enfermedades (Kadam & Pawar, 2020).

2. Contexto de la investigación

2.1. Delimitación de tiempo y espacio

La investigación se realizó durante un periodo de 11 meses, abarcando desde febrero a diciembre 2025. Esta constó de fase de campo y laboratorio.

La fase de campo fue constituida por la recolección de las especies estudiadas, especialmente del género *Smilax*, en la Finca Experimental “Sabana Grande” y en el Centro Experimental Docente (CEDA) de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de



Informe final de Proyecto de Investigación

Guatemala. Las plantas colectadas se establecieron en el Área de Plantas Medicinales en el CEDA, donde se les estableció un periodo de cuarentena contra fitopatógenos.

Por otro lado, la fase de laboratorio consto de cuatro etapas: 1. Desinfección de material vegetal. 2. Preparación de medios específicos. 3. Establecimiento de plantas madre. 4. Conservación y toma de datos. Esta fase se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular y Cultivo de Células y Tejidos en la Unidad de Vinculación y Gestión de Recursos de la Facultad de Agronomía en la Universidad de San Carlos de Guatemala.

2.2. Especificaciones geográficas y edafoclimáticas

2.2.1. Centro Experimental Docente de Agronomía (CEDA)

Según Monterroso Gonzáles (2011), las condiciones climáticas son tropicales de altitud, con temperaturas moderadas de 18 a 25 °C todo el año; la precipitación anual promedio oscila entre 1,200 y 1,500 mm, con temporadas lluviosas y temporadas secas en distintos meses del año. El suelo del CEDA tiene un origen volcánico y es principalmente franco-arenoso a franco-arcilloso, el mismo posee un buen drenaje y una gran cantidad de recursos naturales; un nivel de materia orgánica alta, lo que mejora su capacidad para retener agua y nutrientes; un pH que varía de ligeramente ácido a neutro; además, posee una topografía variada, con áreas planas y onduladas, permite una variedad de experimentos y prácticas agrícolas (Mansilla Del Cid, 2012; Monterroso Gonzáles, 2011).

2.2.2. Finca experimental “Sabana Grande”

Esta finca se encuentra en la Aldea “El Rodeo”, Escuintla; cuenta con condiciones edafoclimáticas únicas; posee un clima tropical húmedo, con temperaturas cálidas de 24° a 30 °C y una alta humedad relativa; una precipitación anual promedio oscilante entre 2,000 y 2,500 mm, con épocas lluviosas y épocas secas en distintas épocas del año (Ramos Salguero, 2011). Según el estudio de Pinzón Moreira (2008), la finca posee suelos de origen volcánico, que se caracterizan por ser franco-arenosos a franco-arcillosos, con un buen drenaje y una



Informe final de Proyecto de Investigación

gran cantidad de recursos naturales; contiene un nivel de materia orgánica alto, ayudando a la retención de agua y nutrientes, y el pH varía de ligeramente ácido a neutro.

2.3. Población meta beneficiada

La investigación posee como beneficiarios directos a la población guatemalteca, debido a la conservación de germoplasma nativo y farmacológicamente útil, que puede ser brecha para futuras investigaciones enfocadas específicamente en las propiedades medicinales que poseen, y llegar a desarrollar un fármaco asequible para la población común del país. Por otro lado, la generación de los datos y conocimientos es de gran utilidad para la academia y otras instancias que posean interés en el estudio de plantas medicinales nativas.

3. Revisión de literatura

3.1. Género *Phlebodium*

Phlebodium es un género que pertenece a la familia *Polypodiaceae*, el que está compuesto por helechos nativos de las zonas tropicales de América; este género también es conocido por tener un alto nivel de adaptación a distintos ambientes y sitios de desarrollo; dentro de este género, las especies *Phlebodium pseudoaureum* Lellinger y *Phlebodium decumanum* J.Sm. son de particular interés debido a sus propiedades medicinales y su estado de vulnerabilidad (Bandyopadhyay & Dey, 2022; Cruz *et al.*, 2005; Luis *et al.*, 2020).

3.1.1. Propiedades medicinales del género *Phlebodium*

Estas especies poseen propiedades medicinales reconocidas a nivel internacional; iniciando por la propiedad antiinflamatoria, la cual es capaz de inhibir la producción de mediadores inflamatorios, tales como los leucotrienos, lo que genera una reducción del dolor asociado y la inflamación; también posee propiedades expectorantes, antioxidantes, fotoprotectoras, para usos en el área de cosmética; propiedades inmunomoduladores, mejorando la respuesta del sistema inmunológico; y las capacidades ergogénicas, mejorando el rendimiento físico y acelerando la recuperación muscular (Bandyopadhyay & Dey, 2022; Cruz *et al.*, 2005; Luis *et al.*, 2020).



Informe final de Proyecto de Investigación

3.2. *Smilax Spp.*

Conocida comúnmente como “Zarzaparrilla” o “Bejuco de Canastos”; es perteneciente a la familiar *Smilacaceae*, nativa de la América tropical, la cual posee una serie de propiedades medicinales (Méndez *et al.*, 2021).

3.2.1. Propiedades medicinales de *Smilax Spp.*

Esta especie posee una variedad de propiedades medicinales que la han convertido en una especie de interés común desde las épocas prehispánicas, entre las cuales destaca las propiedades antiinflamatorias, depurativas y diuréticas, ayudando a la eliminación de líquidos con utilidad en tratamiento de edemas y problemas renales; además, contiene propiedades antianémicas, aumentando los niveles de hemoglobina, apoyando al tratamiento de la anemia y, también, posee propiedades antirreumáticas, siendo crucial para el tratamiento de enfermedades articulares (Méndez *et al.*, 2021).

3.3. Reguladores osmóticos

Según Samarina *et al.* (2020) estas son sustancias utilizadas para el control del equilibrio de los solutos intracelulares y el entorno extracelular; lo cual es, totalmente, esencial para mantener la viabilidad de los explantes, esto al reducir su crecimiento excesivo, previniendo la deshidratación, Ejemplo de estos reactivos es el sorbitol y manitol, los cuales cubren los procedimientos anteriormente descritos.

3.4. Inhibidores del crecimiento

Estas sustancias retrasan o detienen el crecimiento de las plantas, estos pueden ser naturales o sintéticos y poseen diversas aplicaciones a nivel agrícola e investigativo (Jiroutova *et al.*, 2021). Para el caso del ácido abscísico (ABA) es una fitohormona que juega el papel, crucial, en la regulación del crecimiento (Robichaud *et al.*, 1979).



Informe final de Proyecto de Investigación

3.5. Estado del arte

Conservación *in vitro* mediante almacenamiento de crecimiento lento

Según Chauhan *et al.* (2019) los métodos *in vitro* son valiosos para conservar la biodiversidad vegetal, incluida conservar los recursos genéticos de arvenses propagadas vegetativamente, especies en peligro de extinción, especies con semillas resistentes a enfermedades, genes de élite y materiales modificados genéticamente o materiales genéticamente modificados.

El almacenamiento a mediano plazo a menudo se logra limitando el crecimiento *in vitro* mediante el uso de medios mínimos e inhibidores del crecimiento o almacenándolos a bajas temperaturas, lo que da como resultado un período de incubación más corto, además, la combinación de todos estos elementos también se utiliza en naves de lento crecimiento (Chauhan *et al.*, 2019).

Se aplican sistemáticamente estrategias para la conservación a nivel medio a un gran número de especies de plantas, incluidas varias especies tropicales y templadas amenazadas; para la conservación a largo plazo de las plantas, la gente suele utilizar la criopreservación (almacenamiento en nitrógeno líquido a -196°C), sin embargo, la principal dificultad de la criopreservación reside en el mantenimiento de los cultivos *in vitro*, ya que este proceso es muy técnico y costoso, requiriendo muchos recursos y mano de obra (Chauhan *et al.*, 2019).

Por tanto, conservar *in vitro* plantas de con crecimiento lento proporciona una solución para la conservación a medio y largo plazo de materiales vegetales en un espacio limitado y a un coste menor; el lento proceso de crecimiento permite que los clones se almacenen durante meses o años (dependiendo de la especie) en condiciones estériles sin la necesidad de frecuentes transferencias de plantas posteriores (Chauhan *et al.*, 2019).

Desarrollo de gametofitos *in vitro*, biología reproductiva y señalización de óxido nítrico en helechos



Informe final de Proyecto de Investigación

Según Bhatia y Uniyal (2022) se estudió la biología reproductiva de varias especies de helechos y los efectos del óxido nítrico en el desarrollo y producción de gametos; tiempos de inicio de germinación más prolongados indican una mayor viabilidad de las esporas y que los gametos contenidos en ellas son relativamente más sanos que los que germinaron antes; las tasas de germinación de esporas son relativamente bajas en helechos epífitos (30%) y altas en especies semiacuáticas (95%); en poblaciones complejas, se encontró que los gametofitos masculinos eran más pequeños, escamosos y carecían de forma floral, mientras que los gametos hermafroditas eran grandes, filamentosos y meristemáticos (Bhatia & Uniyal, 2022).

Las tasas de producción de esporas en plantas compuestas de especies epífitas varían ampliamente, lo que sugiere que un sistema de apareamiento mixto les da flexibilidad a los helechos y les permite seguir estrategias tanto evolutivas como ecológicas; el apareamiento endogamético tiene como objetivo crear nuevas poblaciones dispersando microsporas individuales a largas distancias mediante el viento, manteniendo al mismo tiempo una variación genética significativa a través del apareamiento intergamético; se descubrió que la capacidad de germinación de las esporas de *Ceratopteris thalictroides* aumentaba mediante el tratamiento con nitroprusiato de sodio (SNP, un donante de óxido nítrico) en concentraciones más altas (50 μM y 100 μM), mientras que se inhibía en concentraciones más bajas (5 μM y 25 μM) (Bhatia & Uniyal, 2022).

Los suplementos de SNP y NO inhibieron el crecimiento vegetativo del talo; a concentraciones más altas de NO (50 μM y 100 μM), los gametos mostraron un crecimiento anormal y se estimuló la formación de anteridio, pero se inhibió la formación de arquegonios (Bhatia & Uniyal, 2022).

Propagación *in vitro* de *Smilax myosotiflora* con fines comerciales y de conservación

Según Abdullah *et al.* (2021) la micropropagación *in vitro* es altamente eficaz para la multiplicación masiva de especies de plantas valiosas, incluyendo aquellas en peligro de extinción, comercialmente importantes y medicinales; el género *Smilax*, comprende, alrededor de, 350 especies que habitan las regiones subtropicales, tropicales y templadas;



Informe final de Proyecto de Investigación

históricamente, los pueblos indígenas de América y Asia han utilizado el rizoma de *Smilax* como tónico, diurético y antitranspirante; la morfología de *Smilax* incluye un tallo largo, delgado y espinoso, con ramas que se adhieren a los árboles y otros objetos, creciendo gradualmente hacia arriba.

Smilax myosotiflora, conocida como “Ubi Jaga” en Malasia, se utiliza tradicionalmente para mejorar la energía y la salud masculina, con estudios que demuestran que el extracto de rizoma aumenta el deseo sexual y las hojas tienen potencial en el tratamiento de la sífilis, sin embargo, la recolección de materias primas en la naturaleza presenta desafíos debido a la dificultad de extraer los rizomas del suelo y la complejidad de identificar *S. myosotiflora* debido a la similitud morfológica con otras especies de *Smilax*; estos desafíos subrayan la necesidad de soluciones alternativas para la producción sostenible de materia prima (Abdullah *et al.*, 2021).

Para abordar estos desafíos, se ha desarrollado y descrito la generación de cultivos vegetales de *S. myosotiflora* utilizando segmentos nodales; las cepas puras se propagaron en medio Murashige y Skoog (MS) con 6-bencilaminopurina (BAP) para la propagación de brotes y ácido indol-3-butírico (IBA) para la propagación de raíces; el medio basal MS suplementado con 2,0 mg/l de BAP produjo la mayor tasa de formación de brotes, mientras que el medio basal MS al 50% con 0,5 mg/l de IBA produjo la mayor tasa de formación de raíces *in vitro*; las plántulas obtenidas se utilizaron para experimentos de aclimatación en el vivero, demostrando la viabilidad de esta técnica para la producción sostenible de *S. myosotiflora* (Abdullah *et al.*, 2021).

4. Planteamiento del problema

La poca generación de conocimientos etnobotánicos relacionados a plantas medicinales en Guatemala confirma la necesidad e importancia de avanzar en los estudios e investigación de este grupo de plantas. Las plantas medicinales son importantes dentro de la cultura guatemalteca, desde tiempos pasados; nuestros ancestros han hecho uso de sus propiedades



Informe final de Proyecto de Investigación

curativas de manera selectiva, lo cual se ha heredado de generación a generación, hasta nuestros tiempos y su aceptación se ha incrementado en todos los estratos de la sociedad, razón por la cual entidades comerciales se han dedicado a su explotación, comercialización y obtención de beneficios, debido a las bondades que ofrecen sus componentes naturales (Cáceres & Cáceres, 2020).

Las especies del género *Phlebodium* spp. (*P. decumanum*; *P. pseudoaureum*) conocidas como Calahuala, son de importancia debido a sus características medicinales, como las propiedades antiinflamatorias, destacando su capacidad de inhibición de mediadores inflamatorios, o sus propiedades expectorantes, facilitando la expulsión de mucosidades, siendo vital para el tratamiento de afecciones respiratorias (Bonilla *et al.*, 2024; Verazaluce *et al.*, 2023). Por otra parte, *Smilax domingensis* también posee propiedades antiinflamatorias, reduciendo el dolor e inflamación en una variedad de condiciones, como la artritis y otras enfermedades inflamatorias crónicas; también posee la capacidad de eliminar toxinas del cuerpo por sus propiedades depurativas, lo que mejora la salud general y el funcionamiento del sistema digestivo; también es conocida por sus propiedades diuréticas, que promueven la eliminación de líquidos y pueden ser útiles en el tratamiento de edemas y problemas renales (Soledispa *et al.*, 2022). Estas características hacen que estas especies sean diferentes al resto, con características químicas endógenas de carácter medicinal.

La información escasa o nula sobre la utilización de conservación *in vitro* en estas especies, hace evidente la necesidad de incorporar estas especies a estas medidas de preservación de germoplasma (Paiz, 2020). Por otro lado, la conservación de germoplasma vegetal para especies agroindustriales como el banano, caña de azúcar y café, y algunas forestales, han sido muy estudiadas en este tema específico e importante; lo que indica que las plantas medicinales a pesar de su importancia curativas e importancia cultural, no han tenido el soporte científico aplicado para poderlas conservar y generar investigación en la creación de bancos de germoplasma vegetal, por tal razón dichas especies están en vías de extinción (Paiz, 2020).



Informe final de Proyecto de Investigación

Winthers (1985), recalca la importancia del mantenimiento de bancos de germoplasma, siendo pieza fundamental para programas de mejoramiento genético, asegurando la disponibilidad de material cuando se necesite.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Conservar a nivel *in vitro* el germoplasma de *Phlebodium pseudoaureum* Lellinger., *Phlebodium decumanum* J. Sm. y *Smilax domingensis* Willd. mediante el uso de biotecnología vegetal.

5.2. Objetivos específicos

- Evaluar reguladores osmóticos para la conservación de germoplasma vegetal *in vitro* de tres especies de plantas con propiedades medicinales.
- Identificar el regulador osmótico y su dosis óptima que reduzca el crecimiento de los explantes de las especies vegetales en estudio.
- Caracterizar los explantes de las especies vegetales en función del tiempo y su efecto por el uso de los reguladores osmóticos.
- Evaluar la viabilidad y vigor del germoplasma de los explantes post conservación usando medios de cultivo específicos.

6. Hipótesis

Los inhibidores de crecimiento ácido abscísico, sorbitol y/o manitol, en diferentes dosis, tendrán efecto sobre la conservación a nivel *in vitro* de crecimiento lento, de las especies *Phlebodium pseudoaureum* Lellinger., *Phlebodium decumanum* J. Sm. y *Smilax domingensis* Willd., que permite la conservación viable del germoplasma.

7. Método

7.1. Tipo de investigación.

De acuerdo con los criterios de Frascati (2015), le presente investigación se cataloga como aplicada, debido a la generación de conocimientos nuevos sobre la conservación *in vitro* de



Informe final de Proyecto de Investigación

Phlebodium pseudoaureum, *Phlebodium decumanum* y *Smilax domingensis*; especies que poseen, potencial, interés farmacológico; y estando en peligro de extinción. El estudio se orientó en el objetivo práctico de establecer protocolos, estables y replicables, para la conservación *in vitro* mediante sorbitol, manitol y ácido abscísico.

7.2. Diseño de la investigación.

La investigación se desarrolló con un énfasis cuantitativo de tipo experimental, debido a que se modificaron variables independientes (tipo de regulador osmótico y dosis), con la finalidad de evaluar el efecto que este ejerció sobre la conservación de las tres especies vegetales estudiadas, a nivel *in vitro*.

7.2.1. Diseño específico

Se utilizó un diseño factorial, donde se establecieron 27 tratamientos resultantes de las siguientes combinaciones:

- 3 especies (bloques): *P. pseudoaureum*, *P. decumanum* y *S. domingensis*.
- 3 reguladores osmóticos: sorbitol, manitol y ácido abscísico.
- 3 dosis de cada reactivo: Sorbitol = 0.5, 1 y 1.5%. Manitol = 1, 2 y 3%; y Ácido abscísico = 0.05, 0.1 y 0.5 mg/L.

Estas combinaciones generaron una matriz de tratamientos, mismos que fueron distribuidos de manera aleatoria dentro de cada bloque (especie).

7.2.2. Unidad experimental

La unidad experimental consistió en un frasco de vidrio con capacidad de 115 ml, al que se le incorporó 20 ml de medio modificado en base de Murashige y Skoog (1962) con la dosis específica de cada tratamiento; cada unidad constó de 4 explantes.



Informe final de Proyecto de Investigación

7.2.3. Repeticiones

Se estableció un total de 10 repeticiones por tratamiento, esto permitió obtener datos suficientes para realizar el análisis estadístico. Las repeticiones se establecieron en base a conveniencia y disponibilidad de material vegetal.

7.3. Población, muestra y muestreo.

7.3.1. Población objetivo

La población objetivo se conformó por las tres especies vegetales estudiadas (*Phlebodium pseudoaureum*, *Phlebodium decumanum* y *Smilax domingensis*), mismas que se establecieron como plantas madre, bajo el contexto de unidades biológicas, para posteriormente ser segmentadas para su establecimiento *in vitro*.

7.3.2. Unidades de muestreo y características

Las unidades de muestreo se establecieron como cuatro explantes establecidos dentro de frascos de vidrio con 20 ml de medio de conservación específico. Dichos explantes fueron colectados en el estado fenológico idóneo, con origen controlado y, posteriormente expuestos a tratamientos fitosanitarios previos al establecimiento *in vitro*.

7.3.3. Criterios de inclusión y exclusión de explantes

- **Inclusión**
 - Identificación taxonómica confirmada.
 - Explante sano, sin presencia de síntomas de fitopatógenos o deficiencias nutricionales.
 - Provenir de plantas madre sometidas a cuarentena.
 - Explante con tamaño homogéneo.



Informe final de Proyecto de Investigación

- **Exclusión**

- Explante con contaminación evidente.
- Tejido en etapa de senescencia o altamente lignificado.
- Material sin trazabilidad.
- Explante con oxidación presente.

7.3.4. Muestra y tamaño muestral

La investigación consta de 27 tratamientos totales (3 reguladores osmóticos x 3 dosis x 3 especies); se estableció un total de 10 repeticiones por tratamiento, en base a la conveniencia y disponibilidad de material. La unidad experimental por tratamiento se estableció en 1 frasco de vidrio con 20 ml de medio específico, donde se establecieron 4 explantes de la especie vegetal estudiada. Por ende, el tamaño muestral se establece en 270 frascos y 324 explantes.

7.4. Técnicas.

7.4.1. Cuarentena post colecta

Debido a la alta carga microbiana que poseen las especies vegetales que conviven en un ambiente natural, posteriormente a su colecta, se reubicaron en el Área de plantas medicinales dentro del Centro Experimental Docente de Agronomía.

Ya establecidas las plantas, se realizó un proceso de cuarentena de 15 días, donde se realizaron aplicaciones de fungicidas y bactericidas sistémicos, y antioxidantes, con la finalidad de preparar el material para el proceso de establecimiento a nivel *in vitro*. A continuación, se presenta el tren de desinfección cuarentenaria a nivel *in situ*:



Informe final de Proyecto de Investigación

Tabla 1

Tren de desinfección cuarentenaria in situ

Día	Tratamiento	Producto	Dosis	Frecuencia
Día -14 a -7	Fungicida sistémico	Bellis	50g/100L	Aplicación foliar cada 3 días
	Bactericida sistémico	Cuprimicina	25g/100L	
Día -10 a -5	Antioxidante foliar	Ácido ascórbico	100 mg/L	1-2 aplicaciones para reducir daño oxidativo
Día -3	Riego dirigido	Cuprimicina + Bellis	Misma dosis	Aplicar directo al sustrato
Día 0	Colecta de explantes	–	–	<i>Smilax</i> : brotes jóvenes y yemas axilares. <i>Phlebodium</i> : frondas con esporangios maduros.

Nota. El tren de desinfección establecido para el periodo cuarentenario consta de acción contra los fitopatógenos y acción directa contra la oxidación vegetativa que estos pudieran causar en tejido joven.



Informe final de Proyecto de Investigación

7.4.2. Colecta de explantes

Posteriormente al proceso cuarentenario, se realizó la segmentación de las especies madre para utilizar el material vegetal como explante dentro del cultivo *in vitro*. Para cada uno de los géneros vegetales trabajados se establecieron distintos criterios de calidad que debía de tener el material vegetal y la debida función que el material cumplía dentro del sistema controlado.

Para el género *Smilax*, se recolectaron brotes jóvenes y yemas axilares, esto para realizar una micropropagación clonal estable y generar plantas madre *in vitro* (Rajagopalan & Perl-Treves, 2005). Las limitantes de este tipo de material es la mayor cantidad de carga microbiana que se encuentra en los tejidos vasculares de la planta, dificultando la inocuidad posterior a el establecimiento *in vitro*.

Para las dos especies del género *Phlebodium* la selección de explante es diferente, debido al mecanismo de reproducción de las especies de helechos mediante esporas. Por ende, se recolectaron frondas de helechos adultos con esporangios con coloración madura, característica de la viabilidad de las células reproductoras (Suneetha & Hegde, 2022).

7.4.3. Protocolo de autoclaveo

Para garantizar la inocuidad de los instrumentos utilizados y del medio nutritivo realizado se estableció un protocolo de autoclaveo de un periodo continuo de 121 ° C (250° F), durante 20 minutos; alcanzando un máximo de 20 PSI (1.5 kg/cm²). Este protocolo se realizó sobre los implementos metálicos, cristalería, implementos plásticos (Polipropileno) y medio de cultivo de conservación.

Informe final de Proyecto de Investigación

7.4.4. Preparación de soluciones patrón

En base al planteamiento establecido, se realizaron las soluciones patrón de los nutrientes necesarios para completar el medio Murashige y Skoog (MS). A continuación, se presenta las concentraciones utilizadas para cada solución.

Tabla 2

Soluciones patrón para medio MS

Solución	Concentración	Volumen	Reactivo	Cantidad (g)
Macro A	10X	1 L	KH ₄ NO ₃	16.5
			KNO ₃	19
			MgSO ₄ * 7H ₂ O	3.7
			KH ₂ PO ₄	1.7
Macro B	10X	1L	CaCl ₂ * 2H ₂ O	4.4
Solución de hierro	100X	100 ml	FeSO ₄ * 7H ₂ O	0.278
			NaEDTA	0.336
Micro A	1000X	100 ml	MnSO ₄ * 4H ₂ O	2.23
			ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0.86
			H ₃ BO ₃	0.62
			Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.025
Micro B	5000X	100 ml	CoCl ₂ * 6H ₂ O	0.0125
			CuSO ₄ * 5H ₂ O	0.0125
KI	1000X	100 ml	KI	0.083
Mio-inositol	100X	100 ml	Mio-Inositol	1
Vitaminas	1000X	100 ml	Ácido nicotínico	0.05
			Piridoxina	0.05
			Tiamina	0.01
			Glicina	0.2

(Murashige & Skoog, 1962)

Nota. Estas soluciones se establecen en diferentes concentraciones, mismas que pueden variar dependiendo de la necesidad de la investigación.



Informe final de Proyecto de Investigación

Posteriormente, se realizaron las soluciones patrón para las fitohormonas utilizadas: Ácido giberélico, para medio de germinación de *Phlebodium*; Ácido Abscísico, para el proceso de conservación; y Ácido Naftalenacético, para medición de vigor de explante post conservación.

Tabla 3

Soluciones patrón de fitohormonas

Solución	Concentración	Volumen	Reactivo	Cantidad (g)
Ácido Giberélico	1000 mg/L	100 ml	AG3	0.1
Ácido Abscísico	1000 mg/L	100 ml	ABA	0.1
Ácido Naftalenacético	1000 mg/L	100 ml	ANA	0.1

Nota. Estas soluciones patrón se realizaron con la finalidad de almacenamiento para usos posteriores; las concentraciones directas del medio son más bajas de las establecidas en las soluciones patrón.

Las concentraciones expuestas son orientadas a conservarlas como *Stock* en refrigeración.

Para el caso de los reguladores osmóticos Sorbitol y Manitol, se aplicaron directamente en el medio, sin pasar por solución patrón.



Informe final de Proyecto de Investigación

7.4.5. Tren de desinfección de explantes

7.4.5.1. *Phlebodium* spp.

Para las dos especies del género *Phlebodium* se estableció un tren de desinfección específico, establecido en dos fases.

La fase 1 establece la aplicación directa de bactericida y fungicida sobre las frondas maduras, estas se ingresaron dentro de un recipiente hermético y se estableció un periodo de 24 horas para su correcta desinfección.

Posteriormente a la realización de la fase 1, se realizó la extracción de los soros mediante microespátula. Seguidamente, se colocaron dentro de sobres de papel filtro 2.5 µm, previamente autoclaveados.

Finalmente, la fase 2 contó de la inmersión de las esporas dentro de etanol 70, durante 30 segundos en agitación leve continua, y en hipoclorito de sodio al 1.5%, durante 10 minutos, con 1 ml de Tween 20 y agitación leve cada 2 minutos. Después de cada una de las inmersiones se realizó 3 lavados con agua destilada estéril.

Las esporas esterilizadas se sembraron en medio MS (50%), semilíquido con 1,000 mg/L de ácido giberélico para asegurar su germinación.

A continuación, se presenta el tren de desinfección aplicado.

Informe final de Proyecto de Investigación

Tabla 4

Tren de desinfección de explantes de Phlebodium

Fases	Tratamiento	Concentración	Tiempo	Observaciones	Área
FASE 1	Cámara Cerrada	Benomil (1 g/L) + Cuprimicina (0.25 g/L)	24 horas	Asperjar sobre el material y cerrar el recipiente durante 24 horas. Utilizar agua destilada estéril	EXTERIOR
FASE 3	Etanol	70%	30 seg	Agitación leve, enjuagar 3 veces con agua destilada estéril.	INTERIOR CÁMARA DE FLUJO LAMINAR
	Hipoclorito de sodio	1.5% + 1 ml Tween 20	10 min	Agitación leve cada 2 min, enjuagar 3 veces con agua destilada estéril.	
FASE FINAL	Siembra en medio	MS 50% + 1,000 mg/L Á. Giberélico	–	Asegurar manipulación mínima de explante.	
RESUMEN DE TIEMPO			1 día, 10 min y 30 seg		

Nota. El tren de desinfección se establece de acuerdo a la identificación de los fitopatógenos con más presencia en el tejido vegetal a trabajar.



Informe final de Proyecto de Investigación

7.4.5.2. *Smilax Spp.*

Para el género *Smilax* se realizó una reformulación del tren de desinfección básico, debido a la gran cantidad de contaminación endógena que se encuentra en los tejidos vasculares de la planta en estado silvestre.

Acorde a lo anterior, se implementó una fase intermedia, entre la cámara cerrada y la inmersión en etanol e hipoclorito de sodio.

Posterior a la cámara cerrada, se realiza un lavado inicial del material con jabón antibacterial disuelto en agua estéril con 1 ml de Tween 20; esto con la finalidad de eliminar el restante de los químicos aplicados en cámara cerrada y eliminar cualquier microorganismo que se pudiera encontrar en la superficie del explante.

Posteriormente, los explantes se sumergieron en una solución de bactericida y fungicida sistémico compatible, durante 60 minutos y agitaciones cada 10 min. Finalmente, se realizó una inmersión más en fungicida, debido a que se identificó una alta proliferación de *Fusarium Spp.* en explantes que pasaron los 7 días de cuarentena por contaminación superficial; situación en la que se determinó la alta contaminación endógena de esta especie.

A continuación, en la tabla 3, contiene el proceso completo de desinfección de explante.

Informe final de Proyecto de Investigación

Tabla 5

Tren de desinfección de explantes de Smilax

Fases	Tratamiento	Concentración	Tiempo	Observaciones	Área
FASE 1	Cámara Cerrada	Benomil (1 g/L) + Cuprimicina (0.25 g/L)	24 horas	Asperjar sobre el material y cerrar el recipiente durante 24 horas. Utilizar agua destilada estéril	EXTERIOR
FASE 2	Lavado inicial	Agua estéril + jabón antibacterial + 1 ml Tween 20	15 min	Agitación continua (130 rpm), seguido de 3 enjuagues con agua destilada estéril.	
	Inmersión en fungicida	60 mg/L (Bellis) + 250 mg/L (Cuprimicina) + 1 ml Tween 20	60 min	Agitación cada 10 min (130 rpm), enjuagar 2 veces con agua destilada estéril.	INTERIOR CÁMARA DE FLUJO LAMINAR
	Inmersión en bactericida				
Inmersión en fungicida	1 g/L (Benomil) + 1 ml Tween 20	60 min	Agitación cada 10 min (130 rpm), enjuagar 2 veces con agua destilada estéril.		
FASE 3	Etanol	70%	30 seg	Agitación leve, enjuagar 3 veces con agua destilada estéril.	INTERIOR CÁMARA DE FLUJO LAMINAR
	Hipoclorito de sodio	1.5% + 1 ml Tween 20	10 min	Agitación normal cada 2 min, enjuagar 3 veces con agua destilada estéril.	
FASE FINAL	Siembra en medio	MS 50% + 1,000 mg/L BAP	–	Asegurar manipulación mínima de explante.	
RESUMEN DE TIEMPO			1 día, 2 horas, 25 min y 30 seg		

Nota. El tren de desinfección se establece de acuerdo a la identificación de los fitopatógenos con más presencia en el tejido vegetal a trabajar.



Informe final de Proyecto de Investigación

7.4.6. Germinación de esporas de *Phlebodium Spp.*

El género *Phlebodium* pertenece al grupo parafilético de las *Pteridofitas*, específicamente al grupo monofilético de *Moniliophyta*; esto nos indica que la reproducción de estas especies se basa en la célula reproductiva llamada espora (Chiou, 1996).

Este proceso se toma en cuenta al trabajar con este tipo de especies en programas de establecimiento *in vitro*, pues la germinación de las esporas radica en el gametofito (1n) que, posterior a la fusión de la gameta femenina y el anterozoide, traduce a un esporofito final (2n) (Chiou, 1996).

En base a lo anterior, se dispuso que las esporas de las dos especies de *Phlebodium*, se establecieran en medios de germinación (MS 25% + Ácido Giberélico). Se creó un ensayo de germinación preliminar para determinar que concentración de AG3, corresponde a la idónea para maximizar la germinación y acortar el tiempo de espera. A continuación, se presenta los tratamientos evaluados.

Tabla 6

Tratamientos de germinación de Phlebodium Spp.

Tratamientos	Medio MS	Fitohormona	Dosis (g/L)
T1	25%	AG3	1
T2			0.5

Nota. Las concentraciones de ácido giberélico pueden variar de acuerdo a la necesidad de la investigación.

En base a los tratamientos expuestos en la Tabla 6, se identificó que la concentración de 0.5 g/L obtuvo mejor rendimiento en la germinación de las especies. Sin embargo, los tiempos de germinación variaron entre las dos especies; para el caso de *P. pseudoaureum* el tiempo de germinación fue de 30 días, siendo lo esperado en este tipo de especies. Por otro lado, *P. decumanum* obtuvo un tiempo de germinación más largo, siendo de 60 días. Esto coincidiendo con lo registrado por Pérez-García et al. (1998), donde asocia este patrón a la latencia prolongada que esta especie posee.

Informe final de Proyecto de Investigación

7.4.7. Establecimiento de plantas madre de *Phlebodium Spp.*

El género *Phlebodium* constituye un grupo de helechos, mismos que posee una reproducción basada en dos fases, asexual y sexual. Posterior a la siembra, las esporas germinaron en prótalos haploides (n), mismos que al encontrarse en un ambiente *in vitro* semi líquido, se dificulta el proceso de fusión de gametos y formación de cigotos diploides (2n) para formación de esporofitos (Krieg & Chambers, 2022). Para mitigar la problemática anterior, se estableció un mecanismo de licuado de tejido haploide a cuatro meses de la germinación de las esporas.

Se esterilizó el recipiente de licuado de tejidos, mediante la inmersión en hipoclorito de sodio 1.5% durante 2 horas. Seguidamente, se introdujo el material vegetal y se licuo con agua destilada estéril; este líquido resultante se incorporó a medios de cultivo MS 50%.

Figura 1

Licuado de Phlebodium pseudoaureum establecido en medio MS 50%



Nota. Este proceso se puede realizar mediante la separación mecánica del tejido haploide.

7.4.8. Creación de medios de cultivo de conservación

A partir del establecimiento *in vitro* de las especies medicinales estudiadas, se realizó la preparación de los medios de conservación basados en tres reactivos (Sorbitol, Manitol y



Informe final de Proyecto de Investigación

Ácido Abscísico) y tres dos diferentes de los reactivos trabajados. A continuación, se presenta la tabla de tratamientos (Ballesteros & Pence, 2018; Chauhan *et al.*, 2019).

Tabla 7

Tratamientos de conservación

Especie	Tratamiento	Regulador osmótico	Dosis
<i>Phlebodium decumanum</i>	1	Á. Abscísico	0.05 mg/L
	2		0.1 mg/L
	3		0.5 mg/L
	4	Manitol	1 %
	5		2 %
	6		3 %
	7	Sorbitol	0.05 %
	8		0.1 %
	9		0.5 %
<i>Phlebodium pseudoaureum</i>	10	Á. Abscísico	0.05 mg/L
	11		0.1 mg/L
	12		0.5 mg/L
	13	Manitol	1 %
	14		2 %
	15		3 %
	16	Sorbitol	0.05 %
	17		0.1 %
	18		0.5 %
<i>Smilax domingensis</i>	19	Á. Abscísico	0.05 mg/L
	20		0.1 mg/L
	21		0.5 mg/L
	22	Manitol	1 %
	23		2 %
	24		3 %
	25	Sorbitol	0.05 %
	26		0.1 %
	27		0.5 %

Nota. Los tratamientos llevan de base las sales del medio MS al 50%, además de los reguladores osmóticos establecidos.



Informe final de Proyecto de Investigación

7.4.9. Medios de evaluación de vigor y viabilidad post conservación

Para evaluar los explantes post conservación, se realizó mediante el uso de medios de recuperación a base de MS completo y Ácido Naftalenacético (ANA) al 0.5 mg/L; con la finalidad de favorecer la regeneración radicular, indicador de la viabilidad integral de los explantes.

7.5. Resumen de las variables o unidades de análisis.

Tabla 8

Objetivos, variable, instrumentos y unidad de medida o cualificación utilizada en la investigación.

Objetivo específico	Variable	Instrumentos	Unidad de medida o cualificación
Evaluar reguladores osmóticos para la conservación de germoplasma vegetal <i>in vitro</i> de tres especies de plantas con propiedades medicinales.	<ul style="list-style-type: none"> • Altura promedio. • No. Brotes. • No. Hojas. • No. Raíces. • No. Hojas secas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cámara de flujo laminar horizontal. • Pinzas. • Regla. 	<ul style="list-style-type: none"> • Centímetros. • Unidades.



Informe final de Proyecto de Investigación

<p>Identificar el regulador osmótico y su dosis optima que reduzca el crecimiento de los explantes de las especies vegetales en estudio.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Altura promedio. • No. Brotes. • No. Hojas. • No. Raíces. • No. Hojas secas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cámara de flujo laminar horizontal. • Pinzas. • Regla. 	<ul style="list-style-type: none"> • Centímetros. • Unidades.
<p>Caracterizar los explantes de las especies vegetales en función del tiempo y su efecto por el uso de los reguladores osmóticos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Coloración. • Necrosis. 	<ul style="list-style-type: none"> • Escala de coloración. 	<ul style="list-style-type: none"> • Escala de coloración.
<p>Evaluar la viabilidad y vigor del germoplasma de los explantes post conservación usando medios de cultivo específicos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • No. Brotes nuevos. • No. Raíces nuevas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cámara de flujo laminar horizontal. • Pinzas. • Regla. 	<ul style="list-style-type: none"> • Unidades.

Nota. Las variables y los equipos e instrumentos, se establecen dentro de la metodología necesaria para el cumplimiento de los objetivos propuestos.



Informe final de Proyecto de Investigación

7.6. Procesamiento y análisis de la información.

7.6.1. Análisis cuantitativo

Como respuesta al enfoque cuantitativo de la presente investigación, se realizaron diferentes análisis estadísticos para la evaluación de los tratamientos en cada una de las variables de respuesta, enfocadas en la búsqueda de variabilidad entre cada uno de los factores de estudio; especies medicinales, tiempo, reguladores y concentración.

Con la finalidad de analizar la distribución y la variabilidad experimental, se utilizó el análisis descriptivo, además, debido a la naturaleza desbalanceada de los datos a nivel estadístico, lo cual responde a la diferencia del comportamiento de los explantes y la mortalidad en ciertos tratamientos, se utilizó el método Satterthwaite's dentro del análisis de varianza de tipo III; logrando así garantizar la precisión de las pruebas de hipótesis durante los distintos tiempos de evaluación (Matthias, 2024).

Al obtener diferencias significativas entre la interacción de los factores, se recurrió a la prueba de medias de Tukey, para seleccionar el mejor tratamiento en base a cada especie (Zhu *et al.*, 2020). Sin embargo, debido a la naturaleza de la morfología divergente entre cada especie, se construyeron dos escalas cualitativas en base a la presencia de raíz, la cual permite reflejar la colorimetría en la zona radicular, permitiendo de esta manera visualizar la posible presencia de raíces adventicias para los géneros *Phlebodium*. Adicionalmente, se realizó una segunda escala cualitativa para determinar la presencia de necrosis en los distintos explantes.

Bajo los diferentes criterios estadísticos, se implementó el análisis de correlación de Pearson, para analizar el comportamiento de los órganos vegetales bajo estrés. Al utilizar un análisis de correlación, permite determinar la relación lineal entre cada órgano, permitiendo de esta manera justificar el comportamiento de las gráficas de medias.

Para cada análisis estadístico se estableció un nivel de significancia del 0.05 y un nivel de confianza del 95%

Informe final de Proyecto de Investigación

7.6.2. Análisis cualitativo

Para la caracterización de los explantes se realizó mediante la observación sistemática de la coloración tisular, esto enfatizada a la aparición de tonos asociados a necrosis o pérdida de la viabilidad. Para ello se aplicó la siguiente escala:

Tabla 9

Escala de coloración visual

No.	Tono	Significado
1	Verde intenso	Tejido sano, sin signos de necrosis.
2	Verde pálido / amarillento	Inicio de estrés fisiológico.
3	Café claro	Necrosis parcial, pérdida de vigor.
4	Café oscuro / negro	Necrosis total, tejido no viable.

Nota. La escala cualitativa se estableció de acuerdo al comportamiento observado por las especies durante el periodo de conservación.

A continuación, se presenta la escala, anteriormente expuesta, mediante fotografías de las especies del género *Smilax* y *Phlebodium*.

Figura 2

Escala de coloración del género Smilax.



Nota. Escala visual de cambios en la pigmentación causadas por exposición a conservación *in vitro*.

Informe final de Proyecto de Investigación

Figura 3

Escala de coloración del género Phlebodium.

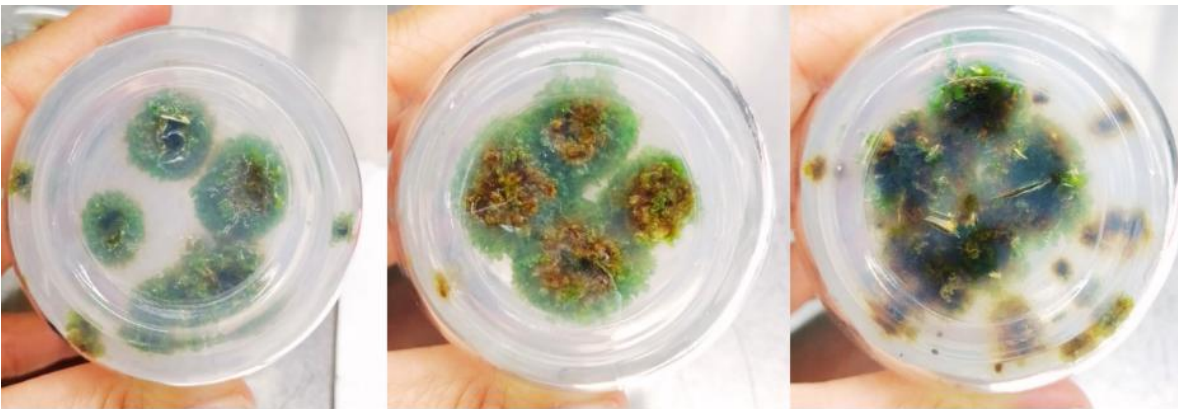


Nota. Escala visual de cambios en la pigmentación causadas por exposición a conservación in vitro.

Para las especies del género *Phlebodium* se realizó una escala cualitativa para determinar la presencia de raíces, esto debido a la naturaleza del explante utilizado. Esto se muestra en la Figura 4.

Figura 4

Escala cualitativa de presencia de raíz en Phlebodium Spp.



Clase 1

Claro

Clase 3

Medio

Clase 5

Oscuro

Nota. Escala visual de cambios en la pigmentación basal de explantes derivada de la presencia de raíces.



Informe final de Proyecto de Investigación

8. Aspectos éticos y legales

La investigación se realizó en el marco legal y ético establecido por la República de Guatemala, no se necesitó ninguna aprobación o permiso a ninguna institución gubernamental.

9. Resultados y discusión

9.1. Análisis descriptivo

El análisis descriptivo tiene como finalidad analizar la distribución y la variabilidad experimental, que se obtuvo durante la metodología.

Tabla 10

Análisis descriptivo de especies medicinales

Especie	Tratamiento	Altura			Brotos			Hojas		
		Media	Mediana	CV	Media	Mediana	CV	Media	Mediana	CV
Decumanum	1	0.27	0.15	117	5.5	1.5	139	4.5	1	165
	2	0.15	0.05	144	3.2	1	205	2.7	0.5	234
	3	0.16	0.05	188	3.3	1.5	162	3.3	1.5	147
	4	0.11	0.05	115	1.7	0	148	1.7	0	146
	5	0.07	0	146	1.1	0	135	1.4	0	132
	6	0.08	0	136	2.7	0	128	2.6	0	129
	7	0.1	0	146	1.6	0	135	1.6	0	135
	8	0.08	0.05	112	2	1	110	2	1	110
	9	1.24	0	149	1.4	0	136	0	0	0
Pseudoaureum	10	0.18	0.15	66.5	5.6	3.5	106	6.4	4	98.4
	11	0.1	0.1	79.5	1	1	112	1.1	1	106
	12	0.13	0.1	89.1	1.7	1	108	1.7	1	108
	13	0.17	0.1	108	0.7	1	67.2	0.7	1	67.2
	14	0.47	0.2	128	1.7	1	93.7	1.5	1	103
	15	0.19	0.15	91.8	1	0.5	112	0.82	0.12	132
	16	0.31	0.4	67	4.4	1.5	133	4.7	2	125
	17	0.38	0.4	79.9	4.82	2.12	147	4.72	1.62	151
	18	0.14	0.05	140	0.65	0	187	0.7	0	174
Smilax	19	4.72	5	46.3	0.85	1	57.6	7.3	7.5	35.9
	20	5.69	5	63.7	0.35	0	232	10.4	8.25	72.5
	21	4.18	3.5	60.2	0.75	0.5	121	8.2	7	40.3
	22	4.15	3	62.7	0.3	0	219	10.7	10.5	45
	23	2.26	2	71.6	0.8	0	132	7.7	7	64.6
	24	1.56	0.8	85.5	0.65	0	144	5.15	5.5	78.5
	25	5.47	5.5	65.7	0.3	0	190	9.15	9	31.2
	26	4.28	4	63.5	0.2	0	205	6.75	7	25.8
	27	4.03	1.75	82.9	0.15	0	244	5.65	6	40.3

Nota. Datos promedio de características fenotípicas de la totalidad de explantes evaluados por cada tratamiento de conservación.



Informe final de Proyecto de Investigación

La tabla 10, representa de forma general el comportamiento de cada especie de interés durante el tiempo de evaluación, siendo estos registrados en tres distintos tiempos (meses). Al observar el coeficiente de variación (CV%) por cada especie, se puede observar una alta variabilidad en cada tratamiento, esto indica que la media para cada una de las variables presenta valores dispersos. Esta variabilidad responde al comportamiento de cada regulador osmótico, en donde algunas unidades experimentales no presentaron formación de hojas y brotes, y en algunos casos la muerte, lo cual es característico bajo condiciones de conservación *in vitro* (Phillips *et al.*, 1994). Sin embargo, esto fue manejado a través del modelo experimental.

9.2. Análisis de varianza

A través del análisis de varianza (ANOVA), se demostró una interacción significativa ($p < 0.05$) entre los factores especie, tratamiento y mes. Este resultado es fundamental, ya que indica que la respuesta de los agentes osmóticos en el crecimiento retardado no es uniforme, sino que varía según la especie evaluada y el periodo de exposición al estrés. Además, para el factor Especie, se observa que el valor estadístico F-valor (929.94) es el más alto, por lo que indica que las diferencias significativas se deben a la genética de las especies, esto valida la necesidad de seleccionar un protocolo de conservación específico para cada especie, optimizando el uso de reguladores osmóticos según las variables de respuesta.

Tabla 11

ANOVA

Factor	Suma Cuadrado	Media Cuadrado	gl efecto	gl error	F-valor	Pr (>F)
Especie	1947.10	973.55	2	254.80	929.9352	<2.2e-16
Tratamiento	123.87	15.48	8	253.94	14.7901	<2.2e-16
Mes	1438.29	719.14	2	456.30	686.9254	<2.2e-16
Especie*Tratamiento	214.99	13.44	16	253.24	12.8347	<2.2e-16
Especie*Mes	1728.77	432.19	4	456.29	412.8301	<2.2e-16
Tratamiento*Mes	197.88	12.37	16	455.26	11.8132	<2.2e-16
Especie*Tratamiento*Mes	257.77	8.06	32	454.51	7.6945	<2.2e-16

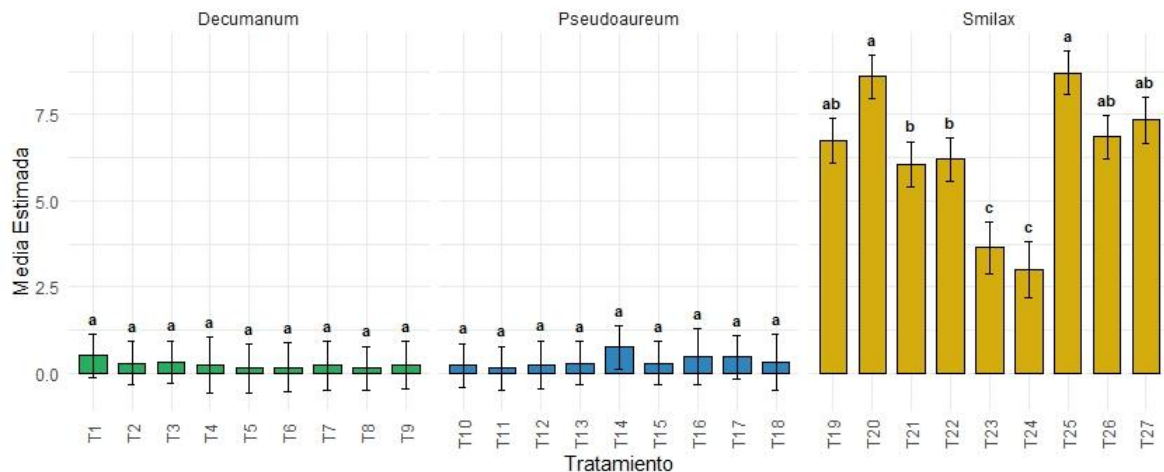
Nota. La datos fueron extraídos del análisis estadístico realizado en el software R.

Informe final de Proyecto de Investigación

Para seleccionar el mejor tratamiento en base a cada especie, se efectuó la prueba de medias de Tukey para cada variable de respuesta.

Figura 5

Prueba de Tukey para variable Altura.



Nota. La gráfica fue creada mediante software estadístico R.

En la Figura 5, se muestra la variable altura, en donde se observa un comportamiento heterogéneo entre especies, tal y como lo sugiere en el ANOVA.

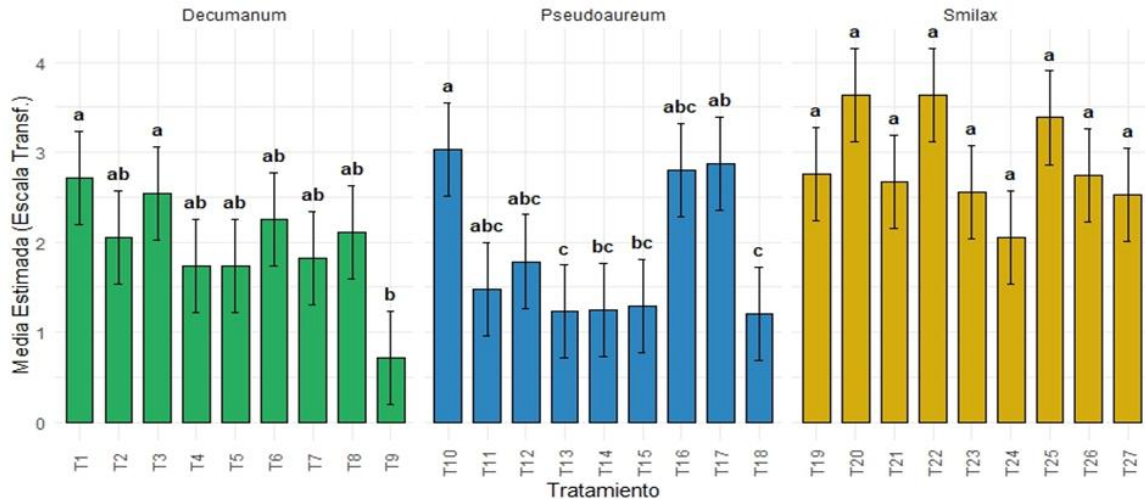
En *P. decumanum* y *P. pseudoaureum*, se observa que la altura promedio en los tratamientos se mantuvo estadísticamente homogéneo; lo que enfatiza que los tres agentes osmóticos con sus divergentes concentraciones mantienen un crecimiento retardado.

Caso contrario con la especie *Smilax Spp.*, donde la altura manifiesta un comportamiento heterogéneo, lo que evidencia la significancia entre los reguladores, permitiendo de esta manera seleccionar como mejor agente retardante en crecimiento al T₂₄, aunque también puede seleccionarse el T₂₃ debido a su similitud dentro de la clasificación de medias. Por lo que para esta especie se establece que el estrés osmótico causado por el uso de manitol, ayuda a reducir el crecimiento vegetativo, tal y como lo sugiere Wilches (2013).

Informe final de Proyecto de Investigación

Figura 6

Prueba de Tukey para variable Hojas.



Nota. La gráfica fue creada mediante software estadístico R.

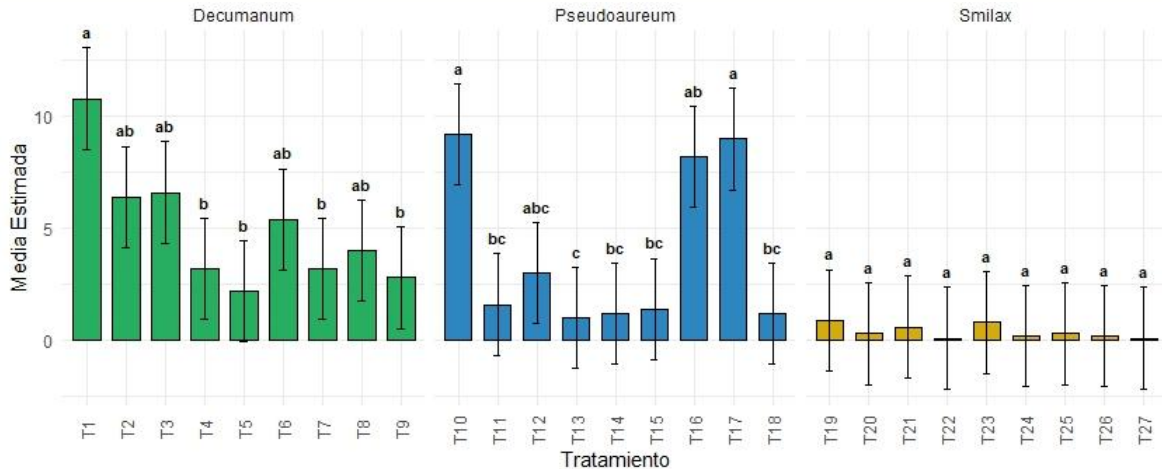
En relación a la variable hojas, en la Figura 6, se observa que para ambas especies de *Phlebodium* tuvieron diferencia en base al número de hojas, donde el T₉ para *P. decumanum* logra obtener la menor cantidad de hojas. Caso contrario para *P. pseudoaureum*, donde el T₁₃ y T₁₈ indican obtener la menor cantidad de hojas, siendo estos el manitol y sorbitol.

Para *Smilax Spp.* el número de hojas se manifiesta en un comportamiento homogéneo entre tratamientos, indicando que los diferentes reguladores osmóticos no difieren entre el número de hojas.

Informe final de Proyecto de Investigación

Figura 7

Prueba de Tukey para variable Brotes.



Nota. La gráfica fue creada mediante software estadístico R.

Para la variable brotes el comportamiento es el contrario, como se observa en la Figura 7, *Smilax Spp.* no presenta un cambio significativo entre tratamientos, indicando que ambos reguladores pueden controlar la aparición de nuevos brotes, lo cual evita la generación de nuevas plantas.

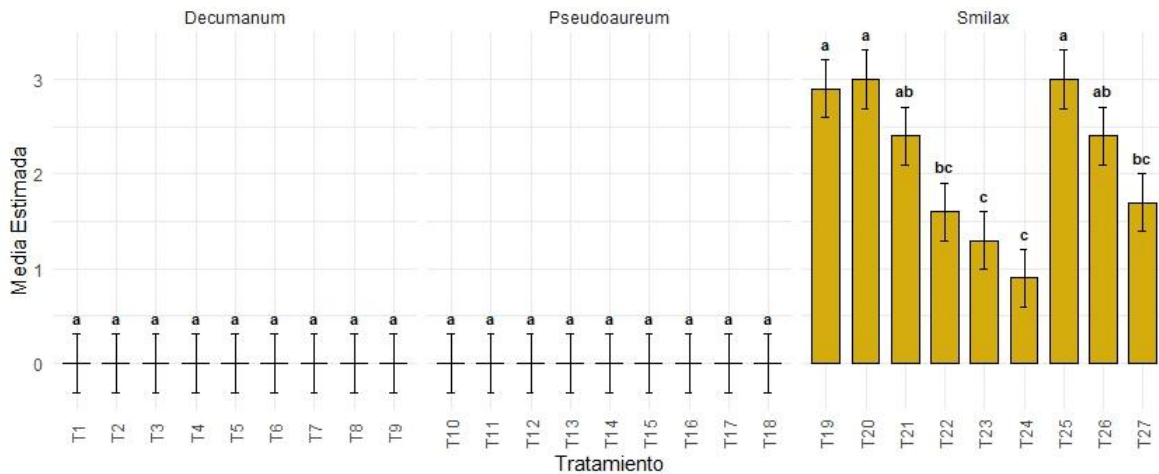
En relación a ambas especies de *Phlebodium Spp.*, se comportaron de forma similar, siendo los tratamientos T4, T5, T7, T9 y T13 los que obtuvieron los valores más reducidos en la generación de brotes.

Para la variable de raíces, se tomaron dos formas distintas para estudiar su comportamiento. Para *Smilax Spp.* se utilizó Tukey. Por otro lado, las especies de *Phlebodium Spp.* se evaluaron en base a una escala cualitativa, definida con anterioridad (Figura 4). A continuación, se muestra la Figura 8 donde se expone la prueba de medias de Tukey para las tres especies evaluadas.

Informe final de Proyecto de Investigación

Figura 8

Prueba de Tukey para variable Raíces.



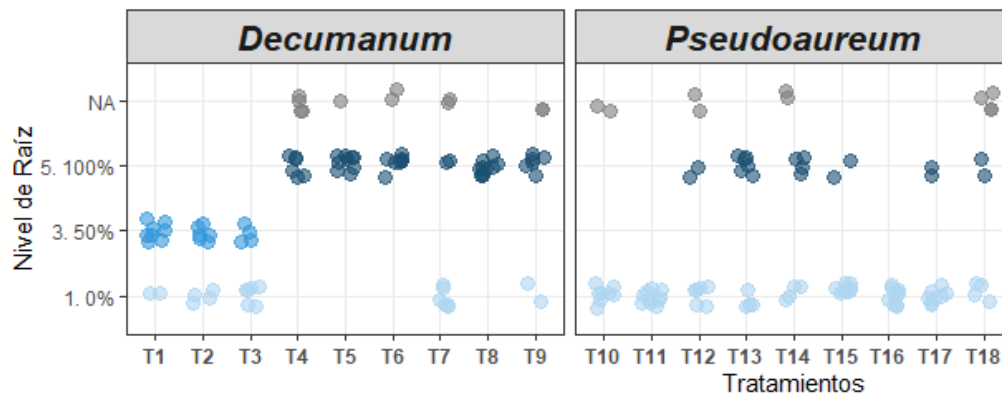
Nota. La gráfica fue creada mediante software estadístico R.

Para *Smilax Spp.*, en la Figura 8, se muestra que el T₂₃ y T₂₄ poseen similitud en sus medias, reduciendo la producción de raíces; por lo que ambos tratamientos pueden ser considerados aptos para este fin, siendo su componente principal manitol bajo divergentes concentraciones.

En el caso de las especies de *Phlebodium Spp.*, como lo anteriormente expuesto, se estableció una gráfica de presencia de raíz, como se muestra en la Figura 9.

Figura 9

Gráfica de presencia de raíz en *Phlebodium Spp.*



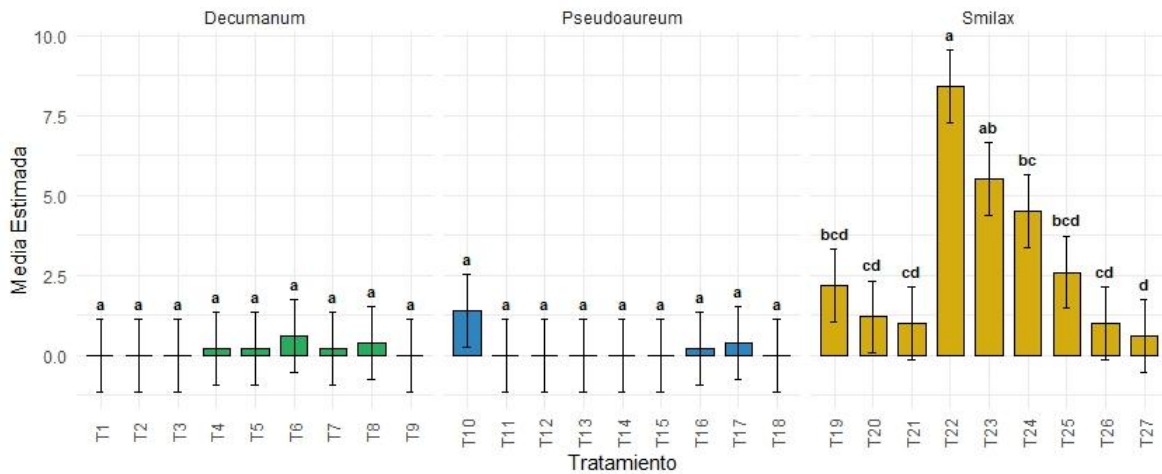
Nota. La gráfica fue creada mediante software estadístico R.

Informe final de Proyecto de Investigación

En la Figura 9, se establece que el T₄, T₅ y T₆ para *P. decumanum*, manifiesta un color café oscuro, indicando la formación de raíces adventicias. Mientras que en *P. pseudoaureum*, se visualiza que el 50% de los tratamientos favorece la presencia de raíces adventicias. Es importante indicar que en la Figura 9, se manifiesta un rango de NA, el cual representa todas las plantas que no pudieron formar raíces debido a la presencia de necrosis total, conduciéndolas a la muerte.

Figura 10

Prueba de Tukey para variable Hojas secas.



Nota. La gráfica fue creada mediante software estadístico R.

En la Figura 10, se observa como el género *Phlebodium* manifiesta de nuevo un comportamiento homogéneo entre tratamientos, aunque se pueden observar que las barras presentan diferente tamaño, este comportamiento se atribuye a la alta heterogeneidad en la respuesta de los explantes, lo cual fue evidenciado por el coeficiente de variación (> 100%).

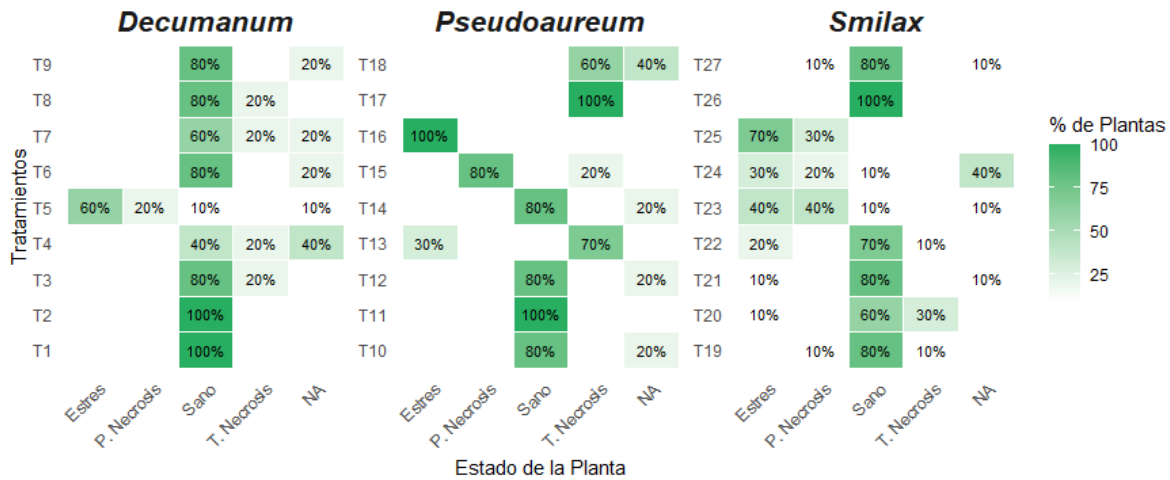
Para *Smilax Spp.*, se observa que el tratamiento T₂₇ presentó la menor incidencia de hojas secas, lo que indica un mayor mantenimiento del vigor del explante. Este comportamiento sugiere que la concentración del agente osmótico en este tratamiento permitió mitigar los efectos drásticos del estrés hídrico, previniendo la senescencia y marchitamiento del tejido foliar.

Informe final de Proyecto de Investigación

En base a los resultados totales del comportamiento de los 27 tratamientos evaluados, se realizó una gráfica de porcentaje de plantas vivas utilizando la escala de necrosis (Tabla 6), que no poseen síntomas de necrosis derivada de la exposición a los reguladores osmóticos. La gráfica se presenta en la Figura 11.

Figura 11

Porcentaje de plantas vivas en relación con necrosis.



Nota. La gráfica fue creada mediante software estadístico R.

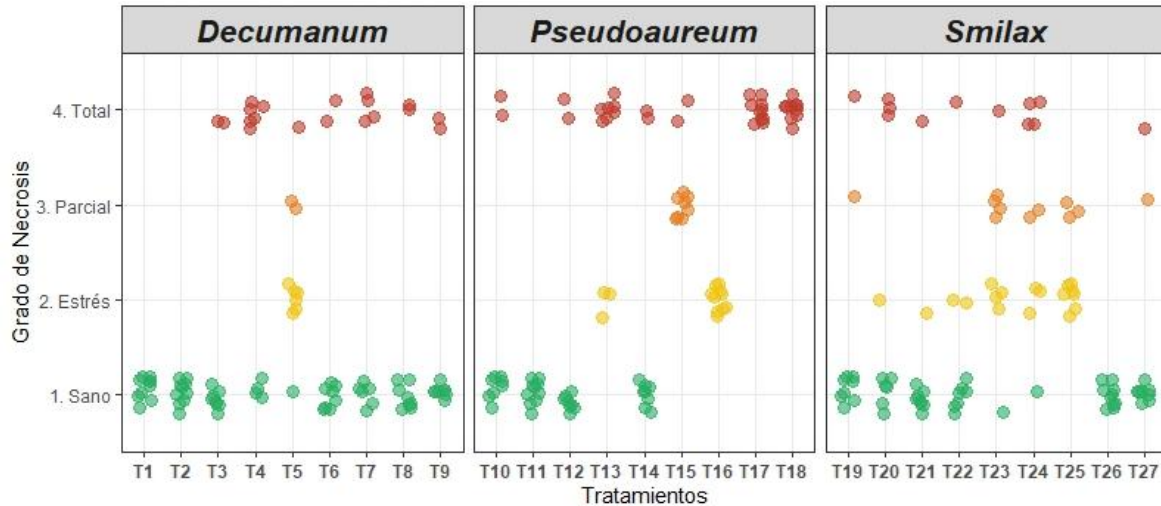
Como se presenta en la Figura 11, la mayoría de explantes en todos los tratamientos se clasifican como sanos o con síntomas de necrosis parcial, el cual es aceptable debido a la función de cada regulador, este comportamiento también se puede observar en la Figura 9, donde a través de un gráfico de dispersión se manifiesta el mismo comportamiento.

En base a los porcentajes presentados, se estableció una gráfica de nivel de necrosis, presentando la cantidad de unidades experimentales que se encuentran en cada escala, de acuerdo a los tratamientos evaluados.

Informe final de Proyecto de Investigación

Figura 12

Gráfica de nivel de Necrosis



Nota. La gráfica fue creada mediante software estadístico R.

En la Figura 12 vuelve a presentarse la situación expuesta en la Figura 11, donde encontramos que la gran parte de los tratamientos mantiene la viabilidad de los explantes; sin embargo, tratamientos como el 5 para *P. decumanum*; tratamientos 13, 15, 16, 17 y 18 para *P. pseudoaureum* y tratamiento 25 para *Smilax Spp.*; únicamente presentan plantas en el rango de inicio de estrés a necrosis total, indicando que el estrés hídrico expuesto sobrepasa la capacidad de los explantes.

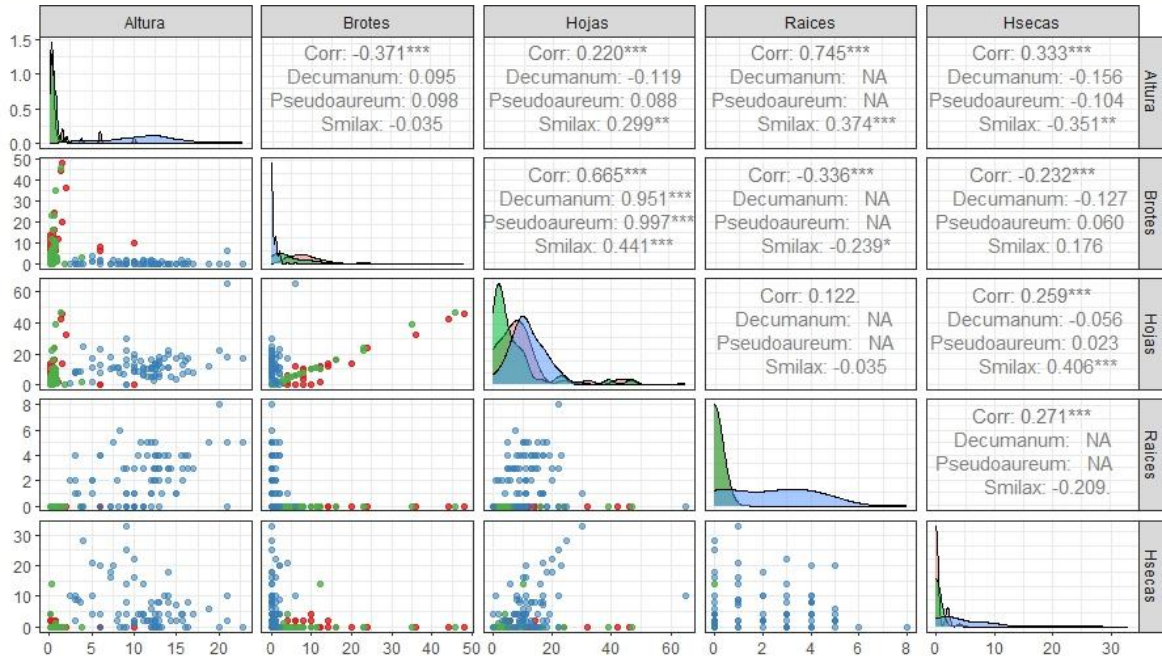
9.3. Análisis correlacional

Para establecer un indicio correlacional de las variables estudiadas en relación a los tratamientos expuestos, se realizó un análisis correlacional entre variables por especie. A continuación, se presenta el análisis.

Informe final de Proyecto de Investigación

Figura 13

Correlación entre variables de respuesta por especie



Nota. La gráfica fue creada mediante software estadístico R.

En la Figura 13, se muestra como la correlación de Pearson es distinta para cada órgano. Mostrando una dependencia directa entre el desarrollo radicular y altura ($r = 0.745$). Esto confirma que al usar reguladores osmóticos que detienen el crecimiento, también logra un control efectivo sobre la producción de raíces, evitando que la planta agote el medio de cultivo rápidamente, lo cual es reflejado en las gráficas de Tukey.

Para las variables brotes y hojas, se observa una diferencia de valores entre especies, donde el género *Phlebodium* presenta una leve similitud, sugiriendo que cada brote nuevo genera una nueva hoja. Caso contrario para *Smilax Spp.*, donde manifiesta que para la generación de hojas no necesariamente necesita de la aparición de nuevos brotes laterales, por lo que es más eficiente bajo crecimiento mínimo.



Informe final de Proyecto de Investigación

Sin embargo, también se observa que las distintas especies presentan un comportamiento de supervivencia al dejar de aumentar su altura y emitir algunos brotes ($r = -0.371$). Esta detención entre el crecimiento apical por generar brotes, es fundamental para extender los periodos de transferencia, tal como lo indica Carmona *et al.* (2013).

Asimismo, al analizar la relación entre altura y número de hojas, se observó un comportamiento diferencial entre especies. En ambas especies de *Phlebodium*, la correlación es débil; no obstante, presentan una divergencia notable en su proximidad al valor cero. Esta diferencia responde a sus arquitecturas morfológicas contrastantes: *P. decumanum* se caracteriza por frondas masivas con pinnas de gran superficie, caso contrario en *P. pseudoaureum*, ya que presenta una estructura más compacta y regular. La baja correlación entre las especies sugiere que el desarrollo foliar no sigue un patrón de crecimiento lineal con respecto a ambas variables. En estudios botánicos, se han descrito como epifitas facultativas al género *Phlebodium*; no obstante, al compararlas con *Smilax*, se observa una divergencia en su nicho ecológico. A diferencia de los helechos, *Smilax spp.* es una trepadora leñosa que mantiene una conexión edáfica permanente (Zotz, 2016).

Al evaluar la senescencia foliar en relación con la elongación del vástago, se determinó que *Smilax Spp.* presenta una correlación negativa ($r = -0.351$) entre altura y el número de hojas secas. Este fenómeno sugiere que, a mayor crecimiento apical, menor número de hojas secas se observaran, lo cual se manifiesta en el T₂₀. También se observa que en algunos tratamientos el incremento de número de hojas no radica en el aumento de raíces ($r = -0.035$), tal es el caso para *Smilax Spp.* en el T₂₄.

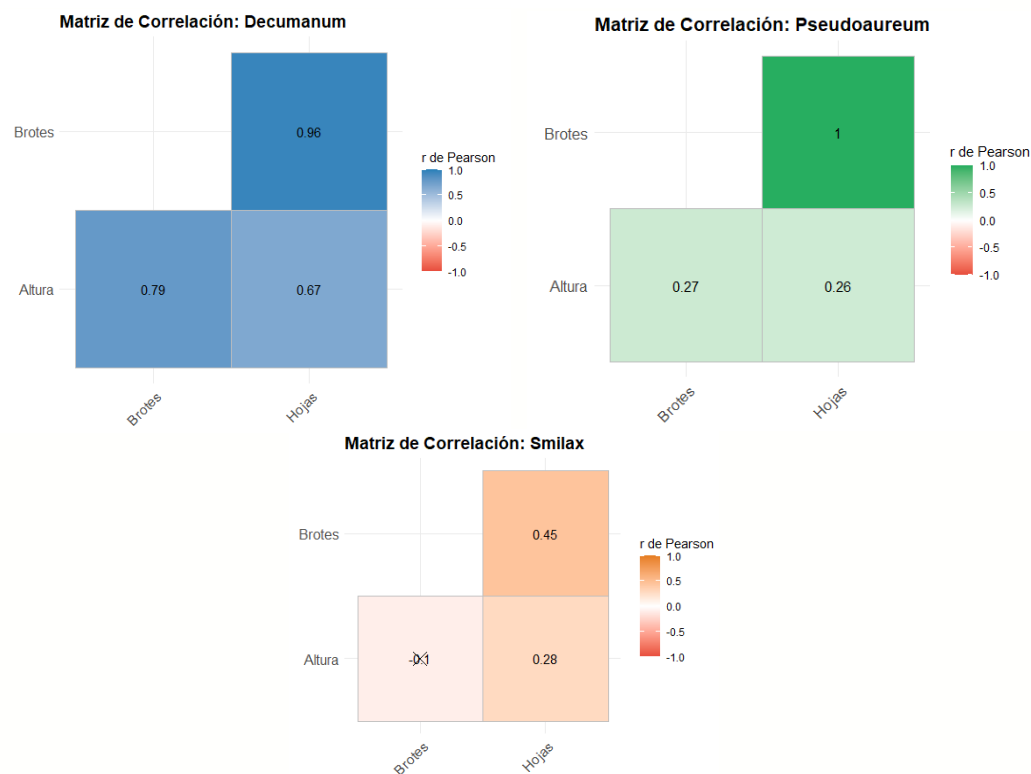
En términos de conservación *in vitro*, un incremento de hojas nuevas no siempre será directamente proporcional al de hojas secas. Esto se observa para cada una de las especies, donde ambas muestran un comportamiento inversamente proporcional ($r = 0.259$). Los comportamientos negativos normalmente sugieren que, si una variable incrementa, la otra decrece; este comportamiento difiere entre la función de los reguladores osmóticos, lo cual se observa en el T₂₇ y T₂₄ en *Smilax Spp.* al comparar la relación entre raíces y hojas secas, debido a su coeficiente $r = -0.209$.

Informe final de Proyecto de Investigación

Si seguimos con la interpretación de correlación, encontraremos que entre especies se encuentran datos identificados como NA, los cuales representan el comportamiento biológico de cada explante que en conjunto con su morfología y hábitat podemos encontrar la respuesta. Para la variable brotes y raíces, las especies de *Phlebodium* se encuentran dentro de este rango, lo cual se justifica en la carencia de una raíz principal, mientras que *Smilax Spp.*, al poseer una raíz principal indica que no necesariamente necesita de la formación de raíces para la generación de brotes laterales, ya que su crecimiento es de dominancia apical. ($r = -0.239$). A continuación, se presenta el análisis de correlación en formato de mapa de calor.

Figura 14

Correlación presentada en Mapa de calor



Nota. La gráfica fue creada mediante software estadístico R.

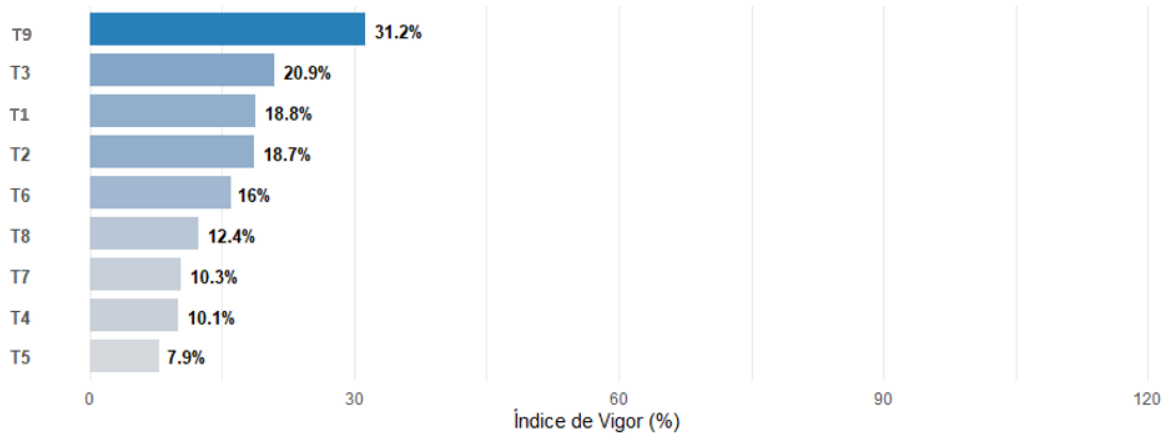
En conservación *in vitro* es fundamental determinar el vigor en que se encuentran los explantes, ya que al ser sometidos a estrés osmótico tienden a presentar signos de mortalidad,

Informe final de Proyecto de Investigación

debido a la falta de accesibilidad a nutrientes para su óptimo desarrollo. A continuación, se presenta la gráfica de vigor de cada una de las especies estudiadas.

Figura 15

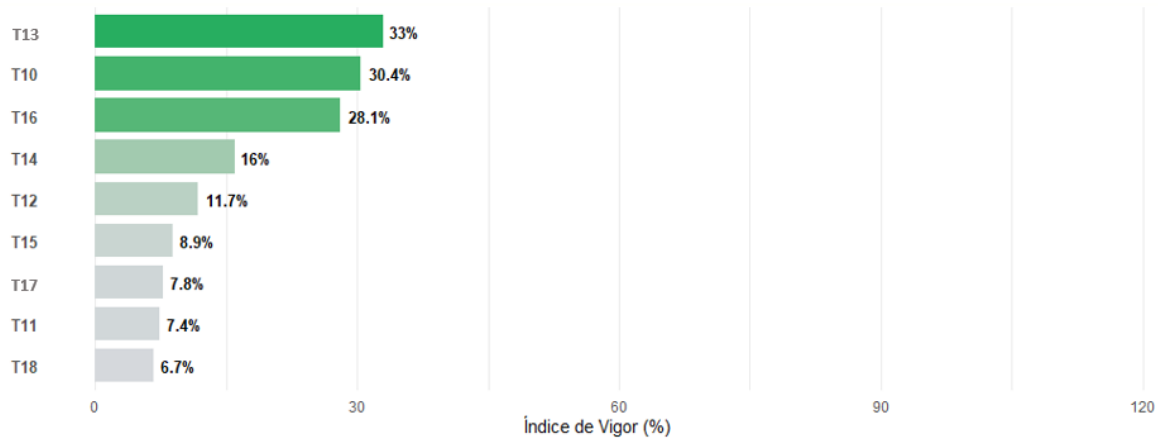
Gráfica de vigor de *P. decumanum*



Nota. La gráfica fue creada mediante software estadístico R.

Figura 16

Gráfica de vigor de *P. pseudoaureum*



Nota. La gráfica fue creada mediante software estadístico R.

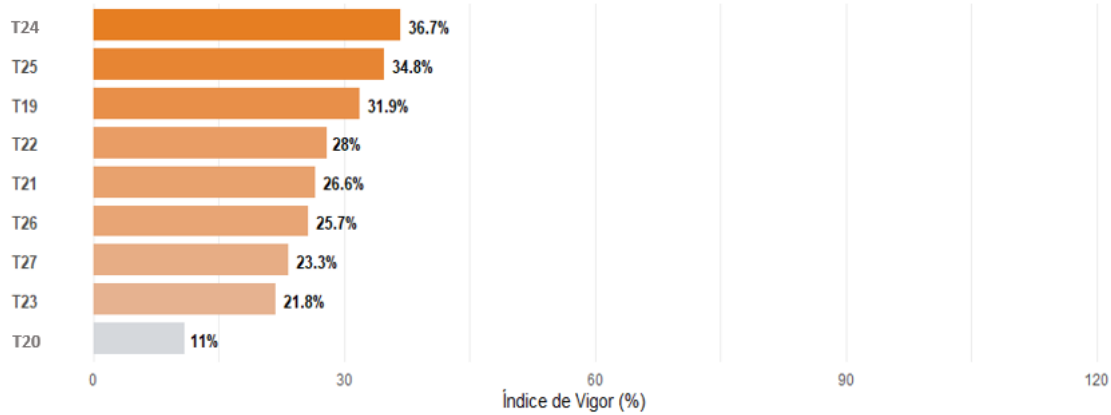
En la Figura 15, se observa que el T₁ mantiene el vigor para la especie *P. decumanum* el cual está compuesto por manitol, a diferencia de *P. pseudoaureum* (Figura 16) donde el tratamiento con mejor respuesta para la conservación del vigor es a base de sorbitol el T₁₇. Tal y como se mencionaba en el ANOVA, a pesar de que ambos son del género *Phlebodium*, difieren en características fisiológicas.



Informe final de Proyecto de Investigación

Figura 17

Gráfica de vigor de Smilax Spp.



Nota. La gráfica fue creada mediante software estadístico R.

La Figura 17, establece que para *Smilax*, el tratamiento T₂₀ a base de manitol, es considerado como el mejor regulador osmótico para la conservación de vigor. Donde, según la Figura 11, indica que mantiene un 60% de plantas sin síntomas de necrosis debido al estrés osmótico.



Informe final de Proyecto de Investigación

10. Beneficiarios directos e indirectos

Tabla 12

Beneficiarios directos e indirectos de la investigación

Resultados, productos o hallazgos	Beneficiarios directos (institución, organización, sector académico o tipo de personas)	Número de beneficiarios directos	Beneficiarios indirectos (institución, organización, sector académico o tipo de personas)	Número de Beneficiarios indirectos
Protocolo de conservación de <i>Phlebodium decumanum</i> .	FAUSAC – USAC Estudiantes que realizaron su EPS	2	Población guatemalteca	1
Protocolo de conservación de <i>Phlebodium pseudoaureum</i> .	FAUSAC – USAC Estudiantes que realizaron su EPS	2	Población guatemalteca	1
Protocolo de conservación de <i>Smilax spp.</i>	FAUSAC – USAC Estudiantes que realizaron su EPS	2	Población guatemalteca	1



Informe final de Proyecto de Investigación

Resultados, productos o hallazgos	Beneficiarios directos (institución, organización, sector académico o tipo de personas)	Número de beneficiarios directos	Beneficiarios indirectos (institución, organización, sector académico o tipo de personas)	Número de Beneficiarios indirectos
Protocolo de desinfección de explante de <i>Smilax Spp.</i>	Gremio científico relacionado al cultivo <i>in vitro</i>	1	FAUSAC -USAC	1

Nota. Clasificación de beneficiarios directos e indirectos del proyecto según alcance e impacto esperado.

11. Estrategia de divulgación y difusión de los resultados.

Tabla 13

Estrategias de divulgación y difusión de los resultados

	Sí	No
Presentación TV		X
Entrevistas radiales		X
Podcast		X
Entrevista DIGI		X
Recursos audiovisuales		X
Congresos científicos nacionales o internacionales	X	
Talleres		X
Publicación de libro		X



Informe final de Proyecto de Investigación

	Sí	No
Publicación de artículo científico	X	
Divulgación por redes sociales institucionales		X
Presentación pública		X
Presentación autoridades USAC		X
Presentación a beneficiarios directos	X	
Entrega de resultados	X	
Docencia en grado	X	
Docencia postgrado		X
Póster científico		X
Trifoliales		X
Conferencias	X	
Otro (describa)		

Nota. Resumen de mecanismos de comunicación empleados para garantizar la transferencia y apropiación de resultados.

12. Contribución a las Prioridades Nacionales de Desarrollo (PND)

Los resultados obtenidos en la presente investigación están enfocados en la contribución al Plan Nacional de Desarrollo “K’atun Nuestra Guatemala 2032”; dentro del mismo, se contribuyó a la Prioridad Nacional de Desarrollo (PND) de *Acceso al agua y gestión de los recursos naturales*. Esto debido a que la investigación se realizó en base a especies vegetales con propiedades medicinales, nativas de Guatemala y en peligro de extinción; con un enfoque en su conservación y en la utilización del material vegetal en investigaciones subsecuentes que estén relacionadas a la implementación de dichas especies en propuestas de agro industrialización, para la generación de alternativas medicinales tradicionales.



Informe final de Proyecto de Investigación

13. Vinculación

La investigación se realizó bajo la vinculación de la Facultad de Agronomía, específicamente con el Centro Experimental Docente de Agronomía (CEDA) y la Finca Experimental “Sabana Grande”.

Por otro lado, se mantuvo una vinculación para divulgación de resultados con la Escuela Villa de los Niños, zona 6; y Villa de las Niñas, zona 13.

14. Conclusiones

- 1) La evaluación de diferentes concentraciones de reguladores osmóticos, permitió diagnosticar y evaluar el comportamiento de los explantes para tres especies de plantas medicinales. Su principal función consistió en la elaboración de protocolos técnicos para el establecimiento de conservación de germoplasma vegetal *in vitro*, a través de la búsqueda y práctica exhaustiva.
- 2) A través del uso de distintas concentraciones de reguladores, se identificaron las dosis más efectivas para cada uno, permitiendo inhibir el crecimiento de los explantes. En *Smilax Spp.*, al utilizar el T24 permite retardar el crecimiento para cada una de las variables. Sin embargo, se ha observado que el T27, permite obtener la menor cantidad de hojas secas. Para *P. decumanum*, el T9 se clasifica como mejor inhibidor en altura, hojas, brotes y hojas secas, pero para raíces se considera poco favorable. En *P. pseudoaureum* se establece que el T13, permite inhibir todas las variables de estudio.
- 3) Utilizando el análisis de varianza se identificó que para el factor meses muestra diferencias significativas, lo cual manifiesta que, durante el transcurso de tiempo, los explantes presentan distintos cambios fisiológicos, lo cual es justificado a través de la correlación entre órganos vegetales.



Informe final de Proyecto de Investigación

- 4) Para cada especie medicinal el vigor y la viabilidad del explante se mantuvo a través de los siguientes tratamientos; *Smilax Spp.* T24, *P. pseudoaureum* T13 y *P. decumanum* T9.

15. Recomendaciones

- Realizar pruebas con tratamientos donde se regule la sacarosa para reducir más el crecimiento vegetal.
- Evaluar los reguladores osmóticos con formulación de medio MS modificado, reduciendo sales; o con otro tipo de medios de cultivo.



Informe final de Proyecto de Investigación

Referencias

- Abdullah, N., Hassan, N. H., Yahya, M. F., Wahid, M. S. A., Khalid, R., Ramuddin, S., & Abdullah, R. (2021). *In vitro* propagation of *Smilax myosotiflora* (Ubi Jaga) for conservation and commercial purposes. *International Journal of Agriculture, Forestry and Plantation*, 12, 110-113.
- Ballesteros, D., & Pence, V. C. (2018). Fern Conservation: Spore, Gametophyte, and Sporophyte Ex Situ Storage, *In vitro* Culture, and Cryopreservation. En Springer eBooks (pp. 227-249). https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_11
- Bandyopadhyay, A., & Dey, A. (2022). Medicinal pteridophytes: ethnopharmacological, phytochemical, and clinical attributes. *Beni-Suef University Journal Of Basic And Applied Sciences*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00283-3>
- Bhatia, M., & Uniyal, P. L. (2022). *In vitro* Gametophyte Development, Reproductive Biology, and Nitric Oxide Signaling in Ferns. *SpringerLink*, 261-283. https://doi.org/10.1007/978-981-16-6170-9_12
- Bonilla, P. J., Bolaños, M. J. G., Monestel, E. M., Pérez, H. A., & Valverde, V. Á. (2024). Exploring ferns extracts for UV protective bio-activity: natural compounds in the potential prevention of skin-cancer and other skin diseases. *ISEE Conference Abstracts*, 2024(1). <https://doi.org/10.1289/isee.2024.1097>
- Cáceres, A., & Cáceres, S. (2020). Principales plantas medicinales disponibles en Guatemala con actividad contra virus respiratorios que infectan al ser humano – Revisión narrativa. *Ciencia Tecnología y Salud*, 7(3), 412-441. <https://doi.org/10.36829/63cts.v7i3.978>
- Caceres, A., Gupta, M., Ocampo, R., Mendoza, J., Herrera, Solis, P., Cruz, S., & Martinez, V. (2006). MULTIDISCIPLINARY DEVELOPMENT OF PHYTOTHERAPEUTIC PRODUCTS FROM NATIVE CENTRAL AMERICAN PLANTS. *Acta Horticulturae*, 720, 149-156. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2006.720.14>



Informe final de Proyecto de Investigación

- Carmona, O. E., Díaz, L. C., & Beltrán, J. D. (2013). Efecto de los osmolitos sacarosa, manitol y sorbitol en la conservación *in vitro* de *Dioscorea alata*, *D. bulbifera*, *D. rotundata* y *D. trifida* por el método de crecimiento mínimo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 53-69.
- Chauhan, R., Singh, V., & Quraishi, A. (2019). *In vitro* conservation through Slow-Growth storage. En Springer eBooks (pp. 397-416). https://doi.org/10.1007/978-3-030-24631-0_19
- Chiou, W. (1996). The biosystematics of pteridophytes: Aspects of morphology and reproductive biology of some epiphytic ferns - ProQuest. <https://www.proquest.com/openview/99228876b388a5bdbe73356d607f553c/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y>
- Cruz, S. M., De Solis, N., Solis, P. N., Gupta, M. P., & Cáceres, A. (2005). Caracterización fitoquímica de extractos de frondas y rizomas de dos especies del género *Phlebodium* provenientes de Honduras y Guatemala. *Revista Científica*, 40-43. <https://doi.org/10.54495/rev.cientifica.edicionespecial2005.201>
- Jiroutova, P., Kovalikova, Z., Toman, J., Dobrovolna, D., & Andrys, R. (2021). Complex Analysis of Antioxidant Activity, Abscisic Acid Level, and Accumulation of Osmotica in Apple and Cherry *In vitro* Cultures under Osmotic Stress. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(15), 7922. <https://doi.org/10.3390/ijms22157922>
- Kadam, S. T., & Pawar, A. D. (2020). CONSERVATION OF MEDICINAL PLANTS: a REVIEW. *International Ayurvedic Medical Journal*, 8(7), 3890-3895. <https://doi.org/10.46607/iamj0807112020>
- Khalid, U., Kainat, W., Anjum, N., & Joyia, F. A. (2024). EFFECT OF VARYING CONCENTRATIONS OF PHYTAGEL, SORBITOL AND MANNITOL ON HYPERHYDRICITY OF *IN VITRO*. . . ResearchGate. <https://doi.org/10.62460/TBPS/2024.012>



Informe final de Proyecto de Investigación

- Krieg, C. P., & Chambers, S. M. (2022). The ecology and physiology of fern gametophytes: A methodological synthesis. *Applications In Plant Sciences*, 10(2), e11464. <https://doi.org/10.1002/aps3.11464>
- Luis, V. Q. J., Alberto, Z. G., De Granada, U., & De Granada Programa de Doctorado En Farmacia, U. (2020). Estudios de caracterización y actividad biológica de extractos de *Phlebodium decumanum*. Universidad de Granada. <http://hdl.handle.net/10481/63915>
- MANSILLA DEL CID, L. A. (2012). Trabajo de graduación: Apoyo Técnico al Centro Experimental Docente de Agronomía “DOMINGO AMADOR” -CEDA-, en cuanto a la elaboración de un diagnóstico empresarial, servicios varios y evaluación de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) como sustrato alternativo para la producción de plántulas forestales. - Repositorio Institucional USAC. <http://www.repositorio.usac.edu.gt/6550/>
- Matthias, V. D. (2024). A Modified Satterthwaite (1941,1946) Effective Degrees of Freedom Approximation. arXiv (Cornell University). <https://doi.org/10.48550/arxiv.2409.14606>
- MONTERROSO GONZÁLES, C. A. (2011). Trabajo de graduación realizado en el uso actual de las instalaciones y funcionamiento administrativo del Centro Experimental Docente de Agronomía “DOMINGO AMADOR” (CEDA), Facultad De Agronomía, Universidad de San Carlos De Guatemala. - Repositorio Institucional USAC. <http://www.repositorio.usac.edu.gt/6857/>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Paiz, A. (2020, 12 junio). Plantas medicinales: el conocimiento maya que no debemos perder. Actualidad UVG. <https://noticias.uvg.edu.gt/plantas-medicinales-conocimiento-maya-uvg/>



Informe final de Proyecto de Investigación

- Pérez-García, B., Riba, R., Mendoza, A., & J, I. R. (2015). Compared gametophytic development of threespecies of *Phlebodium* (Polypodiaceae, *s.str.*). *Revista de Biología Tropical*, 1059-1067. <https://doi.org/10.15517/rbt.v46i4.20674>
- Phillips, R. L., Kaeppler, S. M., & Olhoft, P. (1994). Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 91(12), 5222-5226. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5222>
- PINZÓN MOREIRA, E. A. (2008). ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE USO DE LA TIERRA, DIAGNÓSTICO Y SERVICIOS REALIZADOS EN LA FINCA SABANA GRANDE, ALDEA EL RODEO, ESCUINTLA. Repositorio Centroamericano SIIDCA-CSUCA. <https://repositoriosiidca.csuca.org/Record/RepoUSAC9185>
- Rajagopalan, P. A., & Perl-Treves, R. (2005). Improved Cucumber Transformation by a Modified Explant Dissection and Selection Protocol. *HortScience*, 40(2), 431-435. <https://doi.org/10.21273/hortsci.40.2.431>
- RAMOS SALGUERO, C. W. (2011). Diagnóstico y servicios en la Finca Sabana Grande, El Rodeo Escuintla, con énfasis en la propuesta de riego por aspersión para caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en la sección El Rodeo. - Repositorio Institucional USAC. <http://www.repositorio.usac.edu.gt/6867/>
- Robichaud, C. S., Wong, J., & Sussex, I. M. (1979). Control of *in vitro* growth of viviparous embryo mutants of maize by abscisic acid. *Developmental Genetics*, 1(4), 325-330. <https://doi.org/10.1002/dvg.1020010405>
- Soledispa, P., Mangas, R., Sarmiento, G., & Miranda, M. (2022). *Smilax* Species Used in Traditional Medicine of Ecuador. Chemical Composition and Pharmacological Properties. En CRC Press eBooks (pp. 149-163). <https://doi.org/10.1201/9781003173991-13>



Informe final de Proyecto de Investigación


- Sánchez-Chiang, Neiva, & Jiménez, Víctor M. (2010). Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana*, 21(1), 193-205. Retrieved September 10, 2024, from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212010000100020&lng=en&tlng=es.
- Suneetha, C., & Hegde, S. (2022). Micropropagation of pteridophytes. En *FERNS* (pp. 201-242). https://doi.org/10.1007/978-981-16-6170-9_9
- Verazaluce, J. J. G., Guisado-Barrilao, R., Figueroa, E. L., Hernández-Cruz, G., Rangel-Colmenero, B. R., Ocaña-Peinado, F. M., Hoyos-Flores, J. R., Jerez-Mayorga, D., & Guisado-Requena, I. M. (2023). Effect of *Phlebodium Decumanum* on muscle damage, inflammation and cortisol during a precompetitive mesocycle in a National Volleyball Team. *Retos*, 47, 878-886. <https://doi.org/10.47197/retos.v47.93850>
- Wilches, O. E. C. (2013). Efecto de los Osmolitos Sacarosa, Manitol y Sorbitol en la conservación *in vitro* de *Dioscorea alata*, *D. bulbifera*, *D. rotundata* y *D. trifida* por el método de crecimiento mínimo. <https://revistaaccb.org/r/index.php/accb/article/view/19>
- Zhu, B., Jiao, J., & Steinhardt, J. (2020). When does the Tukey Median work? *IEEE XPLORE*, 1201-1206. <https://doi.org/10.1109/isit44484.2020.9173995>
- Zotz, G. (2016). Plants on Plants – The Biology of Vascular Epiphytes. En *Fascinating life sciences*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39237-0>



Informe final de Proyecto de Investigación


Declaración del coordinador del proyecto de investigación

El coordinador (a) de proyecto de investigación con base en el Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación cofinanciados por medio del Fondo de Investigación, artículo 20, elaboró este informe en función de los datos recabados en el proyecto.

<p>PhD Luis Rodolfo Montes Osorio</p>	
<p>Fecha: 27 de febrero de 2026</p>	

Aval del director (a) del instituto, centro, unidad o departamento de investigación o coordinador de investigación del centro regional universitario

De conformidad con el artículo 19 del Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación cofinanciados por medio del Fondo de Investigación otorgo el aval al presente informe final de las actividades realizadas en el proyecto “Conservación in vitro de dos especies de *Phlebodium Spp.* y *Smilax domingensis* Willd. con propiedades medicinales y peligro de extinción.”. en mi calidad de Director del Instituto de Investigaciones Agronómicas -IIA-, mismo que ha sido revisado y cumple su ejecución de acuerdo a lo planificado.

<p>PhD Eddi Alejandro Vanegas Chacón Director Instituto de Investigaciones Agronómicas y ambientales -IIA-</p>	
<p>Fecha: 27 de febrero de 2026</p>	



Informe final de Proyecto de Investigación

Recepción de la Dirección General de Investigación

<p>Inga. Liuba Cabrera Coordinadora Programa Universitario de Investigación en Alimentación y Nutrición –PRUNIAN–</p>	
<p>Fecha: 27 de febrero de 2026</p>	

/Digi2025