

**Inducción de calogénesis *in vitro* a partir de
láminas foliares de *Sansevieria trifasciata***

María Gabriela Ronquillo López

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria
Noviembre, 2005

Inducción de calogénesis *in vitro* a partir de láminas foliares de *Sansevieria trifasciata*

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

presentado por

María Gabriela Ronquillo López

**Zamorano, Honduras
Noviembre, 2005**

El autor concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

María Gabriela Ronquillo López

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2005

**Inducción de callogénesis *in vitro* a partir
de láminas foliares de *Sansevieria trifasciata***

Presentado por:

María Gabriela Ronquillo López

Aprobada:

Dinie Espinal de Rueda, M.Sc.
Asesor Principal

Abelino Pitty, Ph.D.
Encargado Área de Fitotecnia/
CCPA

Alfredo Rueda, Ph.D.
Asesor

Abelino Pitty, Ph. D
Director Interino Carrera de Ciencia
y Producción Agropecuaria

George Pilz, Ph.D.
Decano Académico

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A mi padre Galo Ronquillo y mi madre Cecilia López por todo su amor, comprensión y apoyo durante estos años.

A mis hermanas María Cristina y Paola Alexandra, mis mejores amigas, por sus palabras de ánimo para seguir cada día y por darme su amor.

A mi sobrinito Conrad, por alegrarme con sus pequeñas sonrisas y travesuras desde su llegada.

Y a mis amigas Violeta y Lorena, por acompañarme en los buenos y malos momentos durante estos años.

AGRADECIMIENTO

A Dios y a la Virgen de La Dolorosa, por guiarme y cuidarme en este camino llamado vida.

A mis padres Galo y Cecilia por su apoyo incondicional y todo su amor, este es el fruto de su abnegada dedicación.

A mis hermanitas, María Cristina y Paola Alejandra por todo su amor y por siempre estar presentes con una palabra de aliento.

A mi sobrino Conrad, porque con sus pequeñas gracias lleno de mucho optimismo y esperanza mis días.

A mi alma mater, por brindarme la oportunidad de ser participe de esta historia llamada Zamorano.

A mi asesora Dinie de Rueda por su apoyo, confianza y por sus palabras de ánimo.

Al Dr. Alfredo Rueda por brindarme su apoyo para la realización de este proyecto.

A la Ing. María Bravo, por su amistad sincera y por toda su ayuda.

A la Ing. Alejandra Lara, por su comprensión, ayuda y amistad.

A Erikita y Zoily, por todo su apoyo y cariño para la realización de esta tesis.

A mis amigas Lorena y Violeta por estar ahí con su consejo.

RESUMEN

Ronquillo, G. 2005. Inducción de callogénesis *in vitro* a partir de láminas foliares de *Sansevieria trifasciata*. Proyecto especial de graduación para optar al título de Ingeniera en Ciencia y Producción Agropecuaria, Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 30 p.

Sansevieria trifasciata es una planta que por su apariencia llamativa y por ser muy resistente al estrés ambiental es muy apreciada por el consumidor. Muchas fincas de producción de ornamentales están volcando su producción a esta planta, ya que hay un nicho potencial de mercado para la misma. El objetivo principal de esta investigación fue desarrollar un método de establecimiento *in vitro* de *Sansevieria trifasciata*. Se realizaron pruebas preliminares para determinar el mejor tipo de explante, posición de siembra, condición fotoperiódica y procedimiento de desinfección. Posteriormente se realizó el experimento 1, que consistió en la evaluación de dos formulaciones nutritivas y el efecto de tres niveles de Ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y tres niveles de 6-Benzyladenina (BAP) en el establecimiento *in vitro* de láminas foliares jóvenes. Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar con 18 tratamientos, tres repeticiones y cada repetición constó de 20 tubos de ensayo. Las variables medidas fueron: a) la respuesta callogénica, b) necrosis y c) contaminación. Para la prueba preliminar se determinó que el mejor explante son las láminas foliares jóvenes de 1 cm², con una posición de siembra vertical polar incubados bajo un régimen fotoperiódico de 16 horas luz. Para desinfectar los explantes se determinó que la utilización de hipoclorito de sodio al 20% durante 15 minutos era la más eficiente, ya que presentó una incidencia de contaminación cero. Para el experimento 1, se determinó que la concentración de 0 y 1 mg/l de BAP y 2,4-D, respectivamente, fue el mejor tratamiento ya que presentó mayor incidencia de callo categoría 3, y a su vez se determinó que la formulación nutritiva de Linsmaier & Skoog era la indicada, ya que no presentó incidencia de necrosis. También se registró una contaminación del 9%, que correspondió al 4% de hongos y al 5% de bacterias. Es recomendable evaluar el efecto de la kinetina, así como concentraciones intermedias de 2,4-D entre 0-1 mg/l para encontrar un punto económico viable y 1-2 mg/l para encontrar la concentración idónea que podría presentar la mejor expresión callogénica (categoría 3). Se recomienda llevar a cabo investigaciones para la programación embriogénica u organogénica del tejido callogénico.

Palabras clave: Establecimiento *in vitro*, Linsmaier & Skoog, Murashige & Skoog, 2,4-D, BAP.

CONTENIDO

	Portadilla.....	i
	Autoría.....	ii
	Página de firmas.....	iii
	Dedicatoria.....	iv
	Agradecimientos.....	v
	Resumen.....	vi
	Contenido.....	vii
	Índice de cuadros.....	ix
	Índice de figuras.....	x
1.	INTRODUCCIÓN	1
	Objetivo general.....	3
	Objetivos específicos	3
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	4
2.1	Ubicación	4
2.2	Materiales	4
2.3	Procedimiento para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Sansevieria trifasciata</i>	7
2.4	Prueba Preliminar de establecimiento: Evaluación de dos tipos de explantes con tres posiciones de siembra y dos condiciones fotoperiódicas para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>S. trifasciata</i>.....	9
2.5	Experimento 1. Evaluación de tres concentraciones de hipoclorito de sodio y tres tiempos de exposición para la desinfección de explantes foliares procedentes de hojas jóvenes de <i>S. trifasciata</i>.....	9
2.6	Experimento 2. Evaluación de dos formulaciones nutritivas y el efecto de tres niveles de 2,4-D y tres niveles de BAP en el establecimiento <i>in vitro</i> de láminas foliares jóvenes de <i>S. trifasciata</i>.....	10
2.7	Diseño Experimental.....	11
2.8	Variables Medidas	12
2.8.1	Contaminación	12
2.8.2	Necrosis	12
2.8.3	Callogénesis	12
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
3.1.	Prueba Preliminar de establecimiento: Evaluación de dos tipos de explantes con tres posiciones de siembra y dos condiciones fotoperiódicas para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>S. trifasciata</i>.....	13

3.1.1	Tipo de explante	13
3.1.2	Fotoperíodo.....	13
3.1.3	Tipo de siembra.....	13
3.2	Experimento 1. Evaluación de tres concentraciones de hipoclorito de sodio y tres tiempos de exposición para la desinfección de explantes foliares procedentes de hojas jóvenes de <i>S. trifasciata</i>	14
3.3	Experimento 2. Evaluación de dos formulaciones nutritivas y el efecto de tres niveles de 2,4-D y tres niveles de BAP en el establecimiento <i>in vitro</i> de láminas foliares jóvenes de <i>S. trifasciata</i> ..	14
3.3.1	Contaminación	14
3.3.2	Necrosis	14
3.3.3	Callogénesis	14
4.	CONCLUSIONES.....	17
5.	RECOMENDACIONES	18
6.	BIBLIOGRAFIA.....	19

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Medio básico Linsmaier & Skoog (1965) utilizado para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Sansevieria trifasciata</i> . Zamorano, Honduras, 2005.....	5
Cuadro 2. Medio básico Murashige & Skoog (1962) utilizado para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Sansevieria trifasciata</i> . Zamorano, Honduras, 2005.....	6
Cuadro 3. Tratamientos utilizados para el establecimiento <i>in vitro</i> de láminas foliares jóvenes de <i>S. trifasciata</i> . Zamorano, Honduras, 2005.	11
Cuadro 4. Efecto de las hormonas BAP y 2,4-D en la respuesta calogénica durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>S. trifasciata</i>	15

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flujo de procesos para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Sansevieria trifasciata</i> . Zamorano, Honduras, 2005.....	7
--	---

1. INTRODUCCIÓN

Sansevieria trifasciata es una planta originaria del oeste de África, que ha sido cultivada en Estados Unidos desde 1920. En Florida, muchos cultivadores la producen desde 1930 para el envío a Europa. sin embargo, en la actualidad la mayoría de estas plantas son producidas en América Central y el Caribe (Griffith 1998).

Por su apariencia llamativa y por ser muy resistente al estrés ambiental, *S. trifasciata* es una planta muy apreciada por el consumidor. Actualmente muchas fincas de producción de ornamentales están volcando su producción a esta planta, ya que hay un nicho potencial para la misma.

Las hojas son lanceoladas, carnosas, de color verde y se caracterizan por las bandas transversales gris verdosas o amarillas y por los márgenes de color crema. Cultivada en maceta, esta especie raramente supera los 45 cm de altura; tolera el sol y la sombra, así como el aire seco, pero necesita una temperatura mínima en invierno de 10 °C (Seddon 2004).

Durante el invierno, *S. trifasciata* necesita muy poca agua y basta regarla una vez cada quince días. En el verano se le puede proporcionar un riego al día y se debe proteger contra el sol fuerte ya que de lo contrario cambia el color de la hoja. También es recomendable que durante el verano se le abone con regularidad (Kromdijk 1974).

Aunque todas las plantas superiores producen semillas, no siempre éstas son fácilmente germinables, en ocasiones las produce en poca cantidad o, muchas veces, las plantas cultivadas fuera de sus zonas de origen ni siquiera llegan a producir semillas o las semillas no son viables. Es en estos casos y cuando se desea obtener una gran cantidad de plantas uniformes y bien desarrolladas en poco espacio de tiempo que se acude a la multiplicación vegetativa o asexual (Sánchez 2005).

La función principal para cualquier tipo de técnica de propagación de plantas es conservar un genotipo o una población de genotipos específicos, que reproduzcan la planta que en particular se desea (Hartmann 1997).

La propagación de *S. trifasciata* puede ser por métodos sexuales o asexuales. La propagación convencional de esta especie es a través de cortes de la hoja o de división de raíces (Griffith 1998). Este proceso consiste en separar un fragmento vegetal, mantenerlo vivo y lograr que regenere los órganos que le faltan hasta conseguir formar una planta completa (Sánchez 2005). No existen reportes de propagación sexual para *S. trifasciata*.

La micropropagación es un tipo de reproducción, que utiliza porciones muy pequeñas de las plantas, a las cuales se les denomina explantes y que son cultivados asépticamente en un tubo de ensayo o en otro tipo de contenedor. Bajo estas condiciones se puede tener un control estricto del ambiente y de la nutrición (Hartmann 1997). La principal ventaja de la micropropagación es que se puede obtener una cantidad masiva de plantas sanas, uniformes y de mejor apariencia que las propagadas de manera convencional (Castro 1999).

Citado por George (1993) en el establecimiento *in vitro* de *S. trifasciata* se utilizaron secciones de hojas para la inducción de meristemoides, utilizando un medio Murashige & Skoog (MS) suplementado con 0.25 mg/l de 2,4-D. Para el desarrollo de *vitroplantas* a partir de estos meristemoides se utilizó un medio MS más 0.3 mg/l de 6-furfurylaminopurina (Kin) y para la etapa de enraizamiento *in vitro* se utilizó un medio MS conteniendo 1 mg/l de Ácido Naftaleno Acético (ANA). Cada uno de los medios fue ajustado a un pH de 6.3.

Tukan Agro Products es una empresa que nació hace trece años en Santa Cruz de Yojoa, Puerto Cortés, Honduras, iniciando sus operaciones en la finca de producción de ornamentales San Salvador, en la comunidad de El Olvido, Santa Cruz de Yojoa, Puerto Cortés, Honduras.

Esta finca centra su producción en plantas ornamentales de exterior tales como: *Schefflera nora*, *Schefflera capela* y de interior: *Zamioculca zamiifolia*, *Scindapsus aure*. La producción es constante y se trata de mantener el envío de contenedores cada quince días hacia Estados Unidos y a algunos países de Europa. En la actualidad la finca San Salvador, ha entrado en un proceso de certificación MPS-GAP para asegurar la entrada de sus productos a la Unión Europea.

Para la finca de producción de ornamentales San Salvador, *S. trifasciata* representa los futuros rubros de ingreso ya que es considerada como una planta de mucho potencial para los próximos años, en el mercado americano y el mercado europeo. Por las características que posee, así como por su aspecto muy colorido, *S. trifasciata* es muy llamativa para el consumidor, por lo tanto, la finca de producción de ornamentales Tukan Agro está comenzando la producción de esta planta. La propagación convencional de *S. trifasciata* es relativamente fácil, pero presenta el problema de demoras de crecimiento al momento de la siembra de las hojas; como contraparte el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación (LCTM) de Zamorano está llevando a cabo esta investigación para la determinación de un método de reproducción *in vitro*.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Desarrollar un método para el establecimiento *in vitro* de *Sansevieria trifasciata*.

Objetivos específicos:

Desarrollar un procedimiento de desinfección para el establecimiento *in vitro* de *Sansevieria trifasciata*.

Determinar el mejor tipo de explante para el establecimiento *in vitro* de *Sansevieria trifasciata*.

Evaluar la mejor formulación nutritiva para el establecimiento *in vitro* de *Sansevieria trifasciata*.

Evaluar el efecto del Ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2-4,D) y 6-Benzyladenina (BAP) en el establecimiento *in vitro* de *Sansevieria trifasciata* a partir de láminas foliares jóvenes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 UBICACIÓN

El presente ensayo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación (LCTM) de la Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. Ubicada a 30 km al SE de Tegucigalpa, a 800 msnm, con un promedio de temperatura de 24°C y una precipitación de 1100 mm (Espinosa 2001).

2.2 MATERIALES

- Equipo de laboratorio (balanza analítica Fisher AccuSeries IP-54, cámara de flujo laminar Labconco 101-52, que retiene polvo, esporas de hongos, bacterias y toda clase de partículas mayores a 0.3 micrómetros (μm);
- Cuarto de crecimiento que se mantiene a una temperatura de 25°C y 16 horas de luz;
- Cristalería (1080 tubos de ensayo de 25 × 150 mm)
- Reactivos
 - Medio básico Linsmaier & Skoog (LS) (Cuadro 1)
 - Medio básico Murashige & Skoog (MS) (Cuadro 2)
 - Ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2-4,D)
 - 6-Benzyladenina (BAP)
 - Hipoclorito de Sodio
 - Alcohol al 70%
 - Solución Fungicida - bactericida: Agrimicin (Streptomycin-oxitetraciclina (18-36) 2g/L + Benlate (Benzimidazol benomil) 2g/L.
- Material Vegetal (*Sansevieria trifasciata*) procedente de la finca San Salvador, ubicado en la comunidad de El Olvido, Santa Cruz de Yojoa, Puerto Cortés, Honduras. Este material vegetal fue propagado de manera convencional, por división de raíz, con una edad promedio de dos meses. Por ser un cultivo mantenido bajo un régimen sanitario óptimo en la finca no se le dio ningún tratamiento previo a la siembra.

Cuadro 1. Medio básico Linsmaier & Skoog (1965) utilizado para el establecimiento *in vitro* de *Sansevieria trifasciata*. Zamorano, Honduras, 2005. (Fuente: Kyte, L. y J, Klein. 1996)

Componente	Fórmula	Cantidad (mg/l)
Macronutrientes	NH ₄ NO ₃	1,650.0
	KNO ₃	1,900.0
	KH ₂ PO ₄	170.0
	Mg SO ₄ 7H ₂ O	370.0
	Ca Cl ₂ 2H ₂ O	400.0
Micronutrientes	KI	0.330
	H ₃ BO ₃	6.200
	MnSO ₄ 4H ₂ O	22.300
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.600
	Na ₂ Mo O ₄ 2H ₂ O	0.250
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
	Co Cl ₂ 6 H ₂ O	0.025
Hierro	Fe SO ₄ 7 H ₂ O	2.8
	Na ₂ - EDTA 2 H ₂ O	37.3
	Inositol	100.00
	Sacarosa	30000.00
	Phytigel	1800.00
pH		5.8

Cuadro 2. Medio básico Murashige & Skoog (1962) utilizado para el establecimiento *in vitro* de *Sansevieria trifasciata*. Zamorano, Honduras, 2005. (Fuente: Kyte, L. y J, Klein. 1996)

Componente	Fórmula	Cantidad (mg/l)
Macronutrientes	NH ₄ NO ₃	1,650.0
	KNO ₃	1,900.0
	KH ₂ PO ₄	170.0
	Mg SO ₄ 7H ₂ O	370.0
	Ca Cl ₂ 2H ₂ O	440.0
Micronutrientes	KI	0.830
	H ₃ BO ₃	6.200
	MnSO ₄ H ₂ O	16.900
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.600
	Na ₂ Mo O ₄ 2H ₂ O	0.250
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
	Co Cl ₂ 6 H ₂ O	0.025
Hierro	Fe SO ₄ 7 H ₂ O	27.8
	Na ₂ - EDTA 2 H ₂ O	37.3
Vitaminas	Ac. Nicotínico	0.5
	Piridoxina	0.5
	Tiamina	0.4
	Inositol	100.00
	Sacarosa	30000.00
	Phytigel	1800.00
pH		5.8

2.3 Procedimiento para el establecimiento *in vitro* de *Sansevieria trifasciata*

Para el establecimiento *in vitro* de *S. trifasciata* es necesario seguir un conjunto de procedimientos que aseguran un correcto manejo del material, evitando cualquier tipo de contaminación o factor que pueda incidir negativamente; y por lo tanto asegurando una respuesta favorable del material. Este procedimiento involucra ciertas actividades que se detallan en el siguiente flujo (Figura 1).

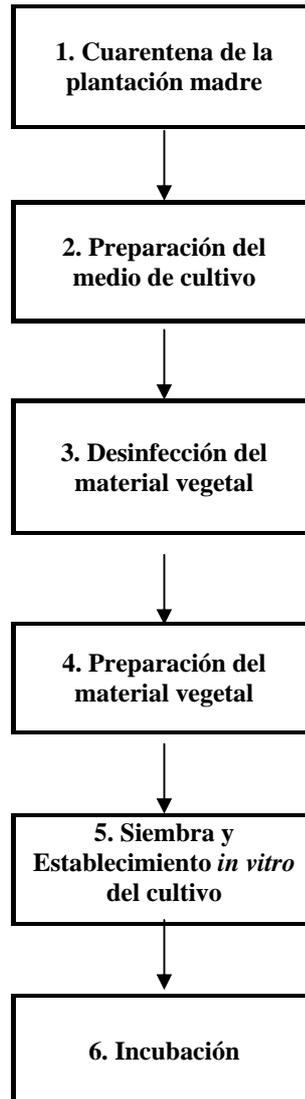


Figura 1. Flujo de procesos para el establecimiento *in vitro* de *Sansevieria trifasciata*, Zamorano, Honduras, 2005

El seguir cada uno de los pasos del establecimiento *in vitro* de *S. trifasciata* asegura la respuesta callogénica del material, evita la contaminación y evita la presencia de algún agente que pueda retrasar el crecimiento.

1. Cuarentena de la plantación madre:

Durante dos semanas antes de la siembra, el material vegetal fue sometido a aplicaciones de una solución fungicida - bactericida de Agrimicin (Estreptomicina-oxitetraciclina (18-6) 2g/L y Benlate (Benzimidazol benomil) 2g/L. Estas aplicaciones se llevaron a cabo día de por medio.

2. Preparación del medio de cultivo:

El medio se elaboró en bikers de 600 ml que se llenaron con agua destilada estéril manteniéndola en agitación constante con una barra magnética. Luego se añadieron las soluciones madre de macronutrientes, micronutrientes, hierro en las cantidades recomendadas según la formulación básica utilizada y su respectiva concentración de hormonas de acuerdo al tratamiento.

Seguidamente se ajustó el pH a 5.8 utilizando soluciones de hidróxido de potasio o ácido clorhídrico. Finalmente se colocó el agente gelificante, phytigel a razón de 1.8 g/L, y se sometió a calor más agitación constante para asegurar que el agente gelificante se haya disuelto. El medio se dispensó en tubos de ensayo de 25 ×150 mm debidamente identificados, a razón de 10 ml por tubo de ensayo. Finalmente, el medio de cultivo en los tubos de ensayo fue esterilizado en el autoclave durante 20 minutos a 120°C y 15 PSI de presión (Oliva 2003).

3. Desinfección del material vegetal:

Previo a la siembra se removieron las partículas de tierra lavando el material vegetal con agua y jabón por 5 minutos. Luego se sumergió el material vegetal en una solución fungicida-bactericida durante 15 minutos con agitación constante. Seguidamente se hizo un enjuague con alcohol al 70% por 15 segundos y finalmente el material vegetal se mantuvo en una solución de hipoclorito de sodio al 20% conteniendo dos gotas de Tween 20 por cada 100 ml de solución desinfectante durante 15 minutos.

Los explantes sumergidos en la solución de hipoclorito de sodio (20%) se transfirieron a la cámara de flujo laminar, en donde se realizaron tres enjuagues con agua bidestilada estéril para remover el exceso de la solución desinfectante.

4. Preparación del material vegetal:

Con la ayuda de pinzas y un bisturí las láminas foliares se cortaron en explantes de 1 cm² aproximadamente. Para la siembra polar, los explantes fueron identificados con un corte en punta que indicaba la porción distal del material.

5. Siembra y establecimiento *in vitro* del cultivo:

Se sembró un explante por tubo de ensayo y se marcó cada contenedor con la siguiente información: iniciales del nombre del cultivo, tratamiento, repetición y número de contenedor. Una vez concluida la siembra, los tubos de ensayo se sellaron con parafilm como barrera para la entrada de patógenos.

6. Incubación:

Los tubos de ensayo se incubaron en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 25°C y 16 horas de luz durante las 8 semanas en que se llevó a cabo esta investigación.

2.4 Prueba Preliminar de establecimiento: Evaluación de dos tipos de explantes con tres posiciones de siembra y dos condiciones fotoperiódicas para el establecimiento *in vitro* de *S. trifasciata*.

Una prueba preliminar de observación fue realizada, en la que se utilizaron dos tipos de explantes: a) hojas maduras (hojas que mostraron un color verde oscuro) y b) hojas jóvenes (hojas que presentaron un color verde más claro), más tres posiciones de siembra para cada tipo de explante: a) horizontal polar, b) horizontal polar retirando la epidermis y c) vertical polar. Estos materiales se sometieron a dos condiciones de fotoperíodo: a) 16 horas luz durante las 8 semanas que duró el experimento y b) oscuridad total por 48 horas al momento de la siembra más 16 horas luz durante el resto de las 8 semanas que duró el experimento.

Una vez cosechadas las hojas, se les removieron todas las partículas de tierra a través de un lavado de agua y jabón; posteriormente se enjuagaron con alcohol al 70% durante 15 segundos. Seguidamente los explantes se sumergieron en una solución v/v de hipoclorito de sodio al 25% por 15 minutos en agitación constante, para después ser llevados a la cámara de flujo laminar donde se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril para remover el exceso de la solución desinfectante.

Para esta prueba se utilizó el medio LS (Cuadro 1) con la adición de 2,4-D y BAP a razón de 0.5 y 0.3 mg/L respectivamente. Se utilizaron doce tratamientos, cada uno con dos repeticiones y cada repetición constó de 10 tubos de ensayo.

2.5 Experimento 1. Evaluación de tres concentraciones de hipoclorito de sodio y tres tiempos de exposición para la desinfección de explantes foliares procedentes de hojas jóvenes de *S. trifasciata*.

Se realizó un experimento, con tres concentraciones de hipoclorito de sodio (v/v): 20%, 25% y 30% y tres tiempos de exposición: 15, 20 y 25 minutos.

Las hojas jóvenes fueron transportadas del invernadero al laboratorio donde se removió las partículas de tierra con cepillo, agua y jabón. Posterior a esto, se dejó reposar durante 15 minutos en un flujo constante bajo el chorro de agua de la llave. Los explantes se sumergieron en una solución fungicida - bactericida de Agrimicin (Estreptomicina-oxitetraciclina (18-6) 2g/L y Benlate (Benzimidazol benomil) 2g/L. durante 30 minutos con agitación constante. Luego, se enjuagaron con alcohol al 70% durante 15 segundos.

Los explantes se sumergieron en cada uno de los tratamientos de hipoclorito de sodio y por el tiempo recomendado, para posteriormente ser transportados a la cámara de flujo laminar en donde se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Finalmente, se procedió a sembrar los explantes en posición vertical en un medio LS (Cuadro 1) suplementado con 2,4 D y BAP a razón de 0.5 y 0.3 mg/L respectivamente. Una vez concluida la siembra se sellaron los tubos de ensayo con parafilm y fueron llevados al cuarto de crecimiento, en el que fueron expuestos a 16 horas luz durante las 8 semanas que duró el experimento.

Para este experimento se utilizaron nueve tratamientos, cada uno con tres repeticiones y cada repetición constó de 10 tubos de ensayo.

2.6 Experimento 2. Evaluación de dos formulaciones nutritivas y el efecto de tres niveles de 2,4-D y tres niveles de BAP en el establecimiento *in vitro* de láminas foliares jóvenes de *S. trifasciata*.

Para el establecimiento de este experimento se utilizaron láminas foliares jóvenes, sembradas en posición vertical de forma polar, siendo el mejor tipo de siembra que se encontró en la prueba preliminar 2.4, con una condición fotoperiódica de 16 horas de luz durante las 8 semanas en el que se llevo a cabo el experimento. Se utilizó el mismo procedimiento de desinfección especificado en el apartado 2.3.3.

Se prepararon los dos medio de cultivo LS (Cuadro 1) y MS (Cuadro 2) con sus respectivas concentraciones de hormonas y siguiendo el mismo procedimiento que se especifica en el apartado 2.3.2. Se utilizaron 18 tratamientos, cada uno con tres repeticiones y cada repetición constó de 20 tubos de ensayo (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos utilizados para el establecimiento *in vitro* de láminas foliares jóvenes de *Sansevieria trifasciata* en Zamorano, Honduras, 2005.

Tratamiento	Medio de Cultivo	Hormona (mg/L)	
		BAP	2-4,D
1	Linsmaier & Skoog	0.0	0.0
2		0.3	0.0
3		0.6	0.0
4		0.0	1.0
5		0.3	1.0
6		0.6	1.0
7		0.0	2.0
8		0.3	2.0
9		0.6	2.0
10	Murashige & Skoog	0.0	0.0
11		0.3	0.0
12		0.6	0.0
13		0.0	1.0
14		0.3	1.0
15		0.6	1.0
16		0.0	2.0
17		0.3	2.0
18		0.6	2.0

2.7 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un arreglo factorial de $(2 \times 3 \times 3)$ en un diseño de bloques completamente al azar (BCA), teniendo como Factor A, dos tipos de formulaciones nutritivas (LS y MS), Factor B, tres concentraciones de BAP (0, 0.3 y 0.6 mg/L) y Factor C, tres concentraciones de 2,4-D (0, 1.0 y 2.0 mg/L).

El ensayo tuvo una duración de 8 semanas. Los datos se sometieron al programa Statistical Analysis System (SAS®, 2001), a través del Análisis de Varianza (ANDEVA) usando el modelo lineal general (GLM). El grado de significancia fue determinado con una probabilidad de $(P < 0.05)$ y la separación de medias de los tratamientos se analizó a través de la prueba Duncan.

2.8 VARIABLES MEDIDAS

2.8.1 Contaminación

La contaminación fue evaluada una vez por semana durante las 8 semanas que duró la toma de datos del experimento. Se determinó la presencia o ausencia de contaminación, para cada explante en cada repetición y en cada tratamiento. Además, se evaluó si la presencia de contaminación fue debido a hongos o bacterias.

2.8.2 Necrosis

Se evaluó una vez por semana durante las 8 semanas que duró la toma de datos del experimento. Para esta variable se determinó la presencia o ausencia de necrosis para cada explante, en cada repetición y en cada tratamiento.

2.8.3 Calogénesis

La presencia callogénica en los explantes se evaluó en todos los explantes una vez por semana de acuerdo a la siguiente escala:

- 0: 0% de tejido callogénico cubriendo el explante
- 1: 25% de tejido callogénico cubriendo el explante
- 2: 50% de tejido callogénico cubriendo el explante
- 3: 100% de tejido callogénico cubriendo el explante

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Prueba Preliminar de establecimiento: Evaluación de dos tipos de explantes con tres posiciones de siembra y dos condiciones fotoperiódicas para el establecimiento *in vitro* de *S. trifasciata*.

Se realizaron pruebas preliminares para determinar el mejor tipo de explante y la mejor posición de siembra tomando en cuenta las condiciones fotoperiódicas.

3.1.1. Tipo de explante

Se determinó que el mejor tipo de explante son las láminas foliares jóvenes, ya que el 50% de los explantes procedentes de láminas foliares jóvenes presentaron formación de callo a las 4 semanas, el restante 50% se perdió por contaminación de bacterias y hongos.

A la cuarta semana las láminas foliares maduras no presentaron ninguna respuesta callogénica; y la totalidad del material se desechó a la quinta semana por contaminación de bacterias y hongos.

3.1.2. Fotoperíodo

El someter a los explantes a condiciones de luz u oscuridad no tuvo relevancia, ya que se observó el 50% de los explantes entrando en callogénesis en la luz y en la oscuridad.

3.1.3. Tipo de siembra

De las tres formas de siembra se determinó que la siembra de manera polar y en posición vertical era la más adecuada, ya que el 100% de los explantes sembrados en esta posición presentaron regeneración callogénica.

Se observó que la siembra horizontal presentó el 50% de explantes con incidencia de callogénesis; y la siembra horizontal retirando la epidermis presentó un 25% de respuesta callogénica en los explantes.

3.2. Experimento 1. Evaluación de tres concentraciones de hipoclorito de sodio y tres tiempos de exposición para la desinfección de explantes foliares procedentes de hojas jóvenes de *S. trifasciata*.

Se utilizaron diferentes tratamientos de desinfección para la prueba preliminar y para el experimento 1, ya que en la prueba preliminar la desinfección fue fallida porque se observó un índice alto de contaminación del 50% del total de tubos de ensayo sembrado.

No se observó ningún tipo de contaminación en cada uno de los 9 tratamientos de este experimento. Por tal razón se decidió tomar como mejor tratamiento, la concentración de 20% de hipoclorito de sodio por 15 minutos. Este tratamiento correspondió a la menor concentración, expuesta al menor tiempo y se obtuvieron los mismos resultados que en los tratamientos restantes.

3.3. Experimento 2. Evaluación de dos formulaciones nutritivas y el efecto de tres niveles de 2,4-D y tres niveles de BAP en el establecimiento *in vitro* de láminas foliares jóvenes de *S. trifasciata*.

3.3.1. Contaminación

Se presentó un 9% de contaminación en el experimento, del cual un 5% corresponde a bacterias y un 4% a hongos. La contaminación registrada por bacterias se debe a que las plantas provenían de un lote contaminado con nematodos, y esto pudo favorecer la incidencia de bacterias en las plantas; la contaminación registrada por hongos pudo ser favorecida por fallas en las prácticas de asepsia al momento de la siembra.

3.3.2. Necrosis

Se observó marcadas diferencias en el porcentaje de necrosis, los explantes expuestos a medio de cultivo MS presentaron 100% de necrosis 24 horas después de sembrados. A su vez, los explantes expuestos a medio de cultivo LS no presentaron necrosis.

3.3.3. Calogénesis

Con respecto a la respuesta callogénica se encontró diferencia entre los dos medios de cultivo utilizados en el experimento. Esta diferencia radica en el conteo final de explantes que mostraron regeneración callogénica en cada medio de cultivo durante la octava semana: 494 y 487 para los medios LS y MS, respectivamente.

De acuerdo a la agrupación que se muestra después del análisis estadístico, el medio LS es el mejor medio de cultivo, ya que presenta una media superior (1.20) al medio MS (1.09) con respecto a la respuesta callogénica. Esta diferencia es

observada por la mayor incidencia callogénica de los explantes en el medio LS comparado con el medio MS. A nivel químico la diferencia entre estos medios radica en la ausencia de vitaminas como Acido Nicotínico, Piridoxina y Tiamina en el medio LS (Cuadros 1 y 2).

Independientemente del medio de cultivo utilizado, la mejor respuesta regenerativa callogénica se observó utilizando una combinación de 2,4-D y BAP a razón de 1.0 y 0 mg/L respectivamente. Bajo esta combinación se observó más tejido calloso categoría 3 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto de las hormonas BAP y 2,4-D en la respuesta callogénica durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Sansevieria trifasciata*.

BAP	2,4 -D	Respuesta callogénica
mg/L		
0.0	0.0	0.00 ^{e¥}
0.0	1.0	3.00 ^a
0.0	2.0	2.32 ^b
0.3	0.0	0.00 ^e
0.3	1.0	1.87 ^c
0.3	2.0	1.04 ^d
0.6	0.0	0.00 ^e
0.6	1.0	1.00 ^d
0.6	2.0	0.99 ^d

¥ Valores en la misma columna con letra distinta difieren entre sí (P<0.05); prueba Duncan.

Independiente del medio de cultivo utilizado, la segunda mejor respuesta regenerativa callogénica se observó utilizando una combinación de 2,4-D y BAP a razón de 2.0 y 0 mg/L respectivamente. Con esta combinación los explantes presentaron una mayor incidencia callogénica categoría 2 (Cuadro 4).

La mayor incidencia callogénica en estos tratamientos se debe a que el 2,4-D es una auxina muy utilizada en la inducción de tejido callogénico, pero al aumentar la dosis no es necesario que aumente la respuesta, ya que al haber un aumento excesivo de la hormona se invierte el efecto y puede comenzar a inhibir la callogénesis.

Se observó que al utilizar 1 mg/l 2,4-D en el medio LS la formación de callo alrededor del explante encontrada fue mayor que con concentraciones de 2 mg/l de 2,4-D (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto de la formulación nutritiva LS y de las hormonas 2,4-D y BAP en la respuesta calogénica durante el establecimiento *in vitro* de *Sansevieria trifasciata*.

BAP	2,4 -D	Respuesta calogénica¹
mg/L		
0.0	0.0	0.00 ^{g[‡]}
0.3	0.0	0.00 ^g
0.6	0.0	0.00 ^g
0.0	1.0	3.00 ^a
0.3	1.0	1.73 ^c
0.6	1.0	1.00 ^{ef}
0.0	2.0	2.89 ^b
0.3	2.0	1.08 ^d
0.6	2.0	0.98 ^{ef}

[‡] Valores en la misma columna con letra distinta difieren entre sí (P<0.05); prueba Duncan

¹ 0 = 0% de callo en el explante, 1 =25% de callo en el explante, 2 =50% de callo en el explante y 3=100% de callo en el explante

4. CONCLUSIONES

Se determinó que el mejor procedimiento de desinfección para explantes foliares procedentes de hojas jóvenes de *S. trifasciata* se hace utilizando un enjuague con alcohol al 70% por 15 segundos, seguidamente se mantienen los explantes durante 15 minutos y con agitación constante, en una solución de hipoclorito de sodio al 20% conteniendo dos gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución desinfectante, y finalmente tres enjuagues con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar.

Para la inducción callogénica y el establecimiento *in vitro* de *S. trifasciata*, la mejor formulación nutritiva es la de Linsmaier & Skoog (1965) con una concentración de 0 y 1 mg/L de BAP y 2,4-D respectivamente.

Para el establecimiento *in vitro* de *S. trifasciata* el mejor tipo de explante son láminas foliares de 1 cm² procedentes de hojas jóvenes.

Para el establecimiento *in vitro* de *S. trifasciata* se determinó que la mejor posición de siembra es la forma vertical polar.

5. RECOMENDACIONES

Aplicar una solución fungicida - bactericida de Agrimicin (Estreptomicina-oxitetraciclina (18-6) 2 g/L y Benlate (Benzimidazol benomil) 2 g/L al material vegetal en el campo por un período mínimo de 4 semanas.

Durante la inducción callogénica de *S. trifasciata* a partir de explantes foliares, evaluar concentraciones intermedias de la auxina 2,4-D entre los rangos de 0 – 1 mg/l para encontrar un punto económicamente viable.

Durante la inducción callogénica de *S. trifasciata* a partir de explantes foliares, evaluar concentraciones intermedias de la auxina 2,4-D entre los rangos de 1 – 2 mg/l para encontrar la concentración idónea que podría presentar la máxima expresión callogénica (categoría 3).

Durante la inducción callogénica de *S. trifasciata* a partir de explantes foliares, evaluar diferentes pH para el medio MS para ver su efecto en la presencia de necrosis.

Evaluar concentraciones de kinetina para ver su efecto en el establecimiento *in vitro* del cultivo.

Hacer estudios hormonales para la reprogramación embriogénica u organogénica de la callogénesis inducida en la etapa de establecimiento.

Realizar estudios para la multiplicación *in vitro*, enraizamiento *in vitro* y aclimatación de *vitroplantas* de *S. trifasciata*.

Realizar estudios para determinar las tasas de multiplicación *in vitro* de *S. trifasciata*.

Analizar económicamente el costo de producir una *vitroplanta* de *S. trifasciata*.

6. BIBLIOGRAFIA

- Castro, A. 1999. Aclimatación de dos especies de helecho propagadas *in vitro*: *Nephrolepis exaltata* cv, *Bostoniensis* (helecho bostoniensis) y *Nephrolepis cordigera* (helecho cola de quetzal). Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 22 p
- Espinosa, C. 2001. Evaluación del uso de ápices meristemáticos y de explantes cotiledonares e hipocotiledonares en el establecimiento *in vitro* de *Tabebuia guayacan* (Cortés). Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 35 p
- George, E. 1993. Plant propagation by tissue culture Vol. 2. Londres, Gran Bretaña. Exegetics Limited. 574 p
- Griffith, L. 1998. Tropical Foliage Plants. Ball. Estados Unidos. 318 p
- Hartmann, H. 1997. Propagación de Plantas. Cecs. México. 322 p
- Kromdijk, G. 1974. Plantas de Interior. Ayma. España. 222 p
- Kyte, L.; J, Klein. 1996. Plants from test tubes. An introduction to micropropagation. Timber Press, Portland, Oregon. 240 p
- Oliva, A. 2003. Producción *in vitro* de helecho Cola de Quetzal (*Nephrolepis cordifolia*) comparando y evaluando los costos de dos sistemas de multiplicación y dos concentraciones de kinetina. Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 38 p
- Sánchez, J. 2005. La multiplicación vegetativa (En línea). Consultado: 9 Sep. 2005. Disponible en: <http://www.arbolesornamentales.com/multiplicacionvegetativa.htm>
- SAS, 2001. Statistical Analysis System. SAS Institute. US
- Seddon, G. 2004. Minienciclopedia de las Plantas de Interior. Folio. España. 191p