

**EVALUACIÓN DE MATERIALES DE
COBERTURA Y MEDIOS DE CULTIVO
ALTERNATIVOS PARA LA
REPRODUCCIÓN *In Vitro* DE VIOLETA
AFRICANA (*Saintpaulia ionantha*)**

Carlos Manuel Xico Xicay

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2008

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**EVALUACIÓN DE MATERIALES DE
COBERTURA Y MEDIOS DE CULTIVO
ALTERNATIVOS PARA LA
REPRODUCCIÓN *In Vitro* DE VIOLETA
AFRICANA (*Saintpaulia ionantha*)**

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

Presentado por:

Carlos Manuel Xico Xicay

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2008

**EVALUACIÓN DE MATERIALES DE
COBERTURA Y MEDIOS DE CULTIVO
ALTERNATIVOS PARA LA REPRODUCCIÓN
In Vitro DE VIOLETA AFRICANA
(*Saintpaulia ionantha*)**

Presentado por:

Carlos Manuel Xico Xicay

Aprobado por:

Dinie Espinal de Rueda, M.Sc.
Asesora

Miguel Vélez, Ph.D.
Director Carrera de Ciencia y
Producción Agropecuaria

Alfredo Rueda, Ph.D.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

María Bravo, M.Sc.
Asesora

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

Abelino Pitty, Ph.D.
Coordinador Área Fitotecnia

RESUMEN

Xico, C. 2008. Evaluación de Materiales de Cobertura y Medios de Cultivo Alternativos para la Reproducción *In Vitro* de Violeta Africana (*Saintpaulia ionantha*) Proyecto especial de graduación para optar al título de Ingeniero Agrónomo, Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras. 25p

La violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) es una de las flores de interior más populares. La técnica de cultivo *in vitro* se ha vuelto el método más popular para su propagación. Para la obtención de plantas sanas se debe seguir un protocolo desde la obtención de material así como las condiciones de incubación garantizando un medio aséptico. Las soluciones nutritivas juegan un papel importante para obtener vitroplantas. El objetivo de la primera investigación consistió en evaluar ingredientes para la formulación de soluciones nutritivas alternativas utilizadas para facilitar el proceso de regeneración durante la micropropagación de violeta africana. Una segunda evaluación tuvo como propósito evaluar tres materiales de cobertura: papel aluminio, malla micropore y papel resinite (saran wrap), que permitan una mejor aireación y un mayor ingreso de luz en el interior de los recipientes utilizados para el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de violeta africana. En los resultados del primer experimento se observó que el uso de una solución nutritiva a base de Miracle Grow[®] mostró resultados muy similares a los obtenidos al utilizar el medio de cultivo tradicional validado por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de Zamorano, en función de formación de tejido calogénico (TC), peso del TC, formación de raíces y formación de brotes. Así mismo, se observó que la solución nutritiva a base de Miracle Gro[®] promovió una vía organogénica directa de regeneración en los explantes, a diferencia de la solución nutritiva usada tradicionalmente que promovió mayor formación de TC y por consiguiente una vía organogénica indirecta de regeneración. En el segundo experimento, se obtuvieron resultados muy similares en cuanto a formación de brotes, 87% y 90% en formación profusa de brotes utilizando papel aluminio y papel resinite, respectivamente.

Palabras clave: callogénesis, formulaciones nutritivas, medios de cultivo, micropropagación, organogénesis directa.

TABLA DE CONTENIDO

Portadilla.....	i
Hoja de firmas.....	ii
Resumen	iii
Tabla de contenido	iv
Índice de cuadros, figuras, fotografías y anexos.....	v
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	22
LITERATURA CITADA.....	23
ANEXOS	24

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS, FOTOGRAFÍAS Y ANEXOS

Cuadro	Página
1. Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) modificado utilizado para el establecimiento <i>in vitro</i> de vitroláminas foliares de violeta africana (Kyte 1987).....	4
2. Solución Nutritiva “B” utilizada para el establecimiento <i>in vitro</i> de vitroláminas foliares de de violeta africana.....	5
3. Composición del agua de coco utilizada en la formulación de medios de cultivo alternativos “B” y “C” en el establecimiento <i>in vitro</i> de vitroláminas foliares de violeta africana.....	5
4. Solución Nutritiva “C” utilizada para el establecimiento <i>in vitro</i> de vitroláminas foliares de violeta africana.....	6
5. Composición Miracle-Gro [®] 7-7-7 utilizado en la elaboración del medio de cultivo “C” para el establecimiento <i>in vitro</i> de vitroláminas foliares de violeta africana.....	6
6. Composición comparativa de soluciones nutritivas utilizadas para el establecimiento <i>in vitro</i> de vitroláminas foliares de violeta africana.....	7
7. Efecto de la formulación nutritiva en la formación de tejido callogénico a partir de vitroláminas foliares de violeta africana a los 35 días después de la siembra.....	14
8. Efecto de la formulación nutritiva en el peso de tejido callogénico a partir de vitroláminas foliares de violeta africana a los 45 días después de la siembra.....	15

9.	Efecto de la formulación nutritiva en la formación de brotes a partir de vitroláminas foliares de violeta africana a los 45 días después de la siembra.....	15
10.	Efecto de la formulación nutritiva en la formación de raíces a partir de vitroláminas foliares de violeta africana 45 días después de la siembra.....	16
11.	Efecto de la formulación nutritiva sobre el nivel de sobrevivencia a partir de vitroláminas foliares de violeta africana a los 35 días después de la siembra.....	17
12.	Costo de la solución nutritiva tradicional “A” utilizada en la etapa de establecimiento de violeta africana a partir de vitroláminas foliares.....	17
13.	Costo solución nutritiva “B” utilizada en la etapa de establecimiento de violeta africana a partir de vitroláminas foliares.....	18
14.	Costo solución nutritiva “C” utilizada en la etapa de establecimiento de violeta africana a partir de vitroláminas foliares..	18
15.	Efecto del uso de materiales de cobertura en la formación de tejido callogénico a partir de vitroláminas foliares de violeta africana 35 días después de la siembra.....	19
16.	Efecto del uso de materiales de cobertura en la formación de brotes a partir de vitroláminas foliares de violeta africana 45 días después de la siembra.....	19

17.	Efecto del uso de materiales de cobertura en la formación de raíces a partir de vitroláminas foliares de violeta africana 45 días después de la siembra.....	21
18.	Niveles de contaminación y sobrevivencia en el uso de materiales usados como cobertura en la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> de violeta africana.....	21
Figura		Página
1.	Efecto del uso de papel aluminio en la formación de brotes a partir de vitroláminas foliares de violeta africana durante la etapa de establecimiento <i>in vitro</i>	20
2.	Efecto del uso de papel resinite en la formación de brotes a partir de vitroláminas foliares de violeta africana durante la etapa de establecimiento <i>in vitro</i>	20
Anexo		Página
1.	Categorías en la formación de tejido callogénico en el establecimiento <i>in vitro</i> de violeta africana a partir de vitroláminas foliares.....	24
2.	Categorías en la formación de brotes en el establecimiento <i>in vitro</i> de violeta africana a partir de vitroláminas foliares.....	25

INTRODUCCIÓN

La violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) fue descubierta por Walter Von Saint en Tanzania a finales del siglo XIX. Actualmente, es una de las plantas de interior más populares. La diversidad de colores que presentan las flores le dan esa cualidad llamativa (Griffith 1998).

Dentro de los métodos de propagación vegetativa, el cultivo *in vitro* es una alternativa factible que permite lograr la propagación clonal masiva a partir de escaso material madre y, en algunos casos, la eliminación de enfermedades (Montoya 1991). El término cultivo *in vitro* se aplica a todo cultivo propagado en un medio aséptico, en el cual se tiene control sobre las condiciones ambientales principalmente temperatura, humedad relativa y luz (Roca y Mroginski 1991).

Inicialmente este cultivo se reproducía por semillas posteriormente se propagó por medio de esquejes foliares. La técnica de propagación *in vitro* mediante el uso de segmentos de pecíolo o láminas foliares es la más utilizada comercialmente. Esta técnica permite producir plantas jóvenes genéticamente idénticas a la planta madre y libres de patógenos. (Hurtado y Merino 1997).

La micropropagación consta de cuatro etapas secuenciales: establecimiento, proliferación o multiplicación, enraizamiento y aclimatación. Siendo la etapa de aclimatación la más crítica ya que es donde se producen las mayores pérdidas (Hurtado y Merino 1997). Durante esta etapa las vitroplantas, después de estar en un ambiente controlado con condiciones óptimas para su desarrollo, pasan a un ambiente completamente diferente, en el cual tienen que sobrevivir por sus propios medios, absorbiendo nutrientes, y elaborando sus propios azúcares por medio del proceso fotosintético (Figuroa 2006). En la etapa de crecimiento uno de los factores ambientales que mayor incidencia tiene sobre el porcentaje de sobrevivencia es la humedad relativa en el interior de los tubos de ensayo y frascos de vidrio en los que se encuentran los explantes.

El medio de cultivo constituye la porción sólida o líquida que según el caso sirve de sostén a las vitroplantas y además constituye la porción nutritiva ya que contiene macronutrientes, micronutrientes, carbohidratos, proteínas, aminoácidos, vitaminas y reguladores de crecimiento que la planta emplea para nutrirse y crecer (Montoya 1991). Sin embargo muchos de estos compuestos generalmente son difíciles de conseguir y generalmente su costo es muy alto. Existen productos mas fáciles de adquirir localmente, que pueden sustituir a los costosos y que pueden ser empleados en condiciones menos tecnificadas y costosas (IAEA 2004).

Tradicionalmente el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Reproducción *in vitro* de Zamorano ha utilizado papel aluminio como cobertura de los recipientes, sin embargo este material no permite el intercambio gaseoso y crea un microambiente en el cual la humedad relativa es cercana al 100%. Este exceso de humedad favorece el proceso de vitrificación de los explantes. La vitrificación o hiperhidratación es un conjunto de características físicas, que describen cambios en las hojas, tallo y raíces dándoles una apariencia cristalina, acuosa, húmeda y translúcida. Estos desórdenes y malformaciones especialmente manifiestos en las hojas afectan a dos de los procesos más importantes que realizan las hojas: la fotosíntesis y el intercambio gaseoso (López 1996).

Las causas de estas malformaciones están ligadas, en algunos casos al uso de nutrientes (elementos minerales, carbohidratos) y en otros a reguladores de crecimiento en alta dosis. Una baja intensidad luminosa durante la incubación combinada con una alta humedad relativa y un potencial hídrico son los principales factores causantes de dichas anomalías morfogénicas producidas *in vitro* (López 1996).

Otra limitante que se puede tener con el cultivo *in vitro* es que al utilizar ciertos materiales de cobertura en los contenedores se limita el ingreso de luz al interior de los recipientes. La luz juega un papel fundamental en la morfogénesis de los explantes, básicamente la diferenciación está en función de la intensidad lumínica, el fotoperiodo y la calidad de luz (Roca y Mroginski 1991). Por esta razón mediante esta investigación se propone el uso de otros materiales como alternativa para cubrir los recipientes que permitan un mayor intercambio gaseoso y mayor ingreso de luz en el interior de los recipientes.

En los últimos años el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Reproducción *in vitro* ha mostrado interés por el uso de materiales alternativos como medios de cultivo elaborados a nivel artesanal, con la finalidad de reducir los costos de producción. Actualmente han sido pocos los estudios realizados por la institución, aunque existen reportes en la literatura que recomiendan el uso de fertilizantes foliares en la elaboración de medios de cultivo para violetas (Rick 2008), así como fuentes de fertilizantes a base de sales solubles que aporten macronutrientes, combinados con fuentes energéticas, vitaminas, y aminoácidos compuestos que son básicos en la formulación de soluciones nutritivas (Taji 1996).

El uso de insumos alternativos en la propagación *in vitro* de plantas tiene como objetivo ser más eficiente en la obtención de plantas listas para ser establecidas en el campo a un menor costo, sin descuidar la calidad en términos de asepsia, vigor, y sobrevivencia en el campo definitivo (IAEA 2004).

En esta investigación se evaluó la respuesta regenerativa de vitroláminas foliares de violeta africana cultivadas usando tres tipos de materiales de cobertura y dos formulaciones nutritivas alternativas en la etapa de establecimiento *in vitro* a partir de vitroláminas foliares de violeta africana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación de la investigación:

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Reproducción *in vitro* de la Escuela Agrícola Panamericana.

Recolección de material vegetal:

Se utilizaron vitroláminas foliares de violeta africana obtenidas a partir de vitroplantas de dos meses de edad previamente establecidas en el laboratorio. Estas fueron mantenidas en el área de incubación, a 22°C y 16 horas de luz. A partir de esta plantación madre se seleccionaron láminas foliares con una superficie aproximada superior de 1 cm × 1 cm, se utilizaron bisturíes No.12 para remover el pecíolo y los bordes obteniendo explantes de 1 cm × 1 cm de superficie.

Limpieza de recipientes:

Los recipientes que se utilizaron en la investigación fueron frascos de vidrio de 8 cm de altura por 4 cm de diámetro. Los recipientes se enjuagaron con agua potable y jabón en polvo. Seguidamente se colocaron en un recipiente con agua destilada con la finalidad de eliminar residuos minerales que puedan alterar la composición del medio de cultivo. Finalmente, los frascos se secaron en un horno.

Experimento 1. Evaluación de dos formulaciones nutritivas como alternativa al uso del medio de cultivo tradicional utilizado en la micropropagación de violeta africana

El primer experimento consistió en evaluar tres soluciones nutritivas: tradicional “A” (Cuadro 1), una solución nutritiva “B” (Cuadro 2) y una solución nutritiva “C” (Cuadro 3), en la respuesta regenerativa de explantes foliares de violeta africana durante la etapa de establecimiento *in vitro*. Además, se elaboró una comparación de costos para cada uno de los medios de cultivo empleados en la etapa de establecimiento.

La solución nutritiva tradicional (Cuadro 1) publicada por Kyte (1987) tiene como base las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), utilizando la mitad de la concentración para los macronutrientes y la cantidad completa en el caso de los micronutrientes. Esta solución contiene sacarosa como fuente de carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento BAP (0.14 mg/L) y AIA (2 mg/L), se utilizó Phytigel como agente gelificante.

Cuadro 1. Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) modificado utilizado para el establecimiento *in vitro* de vitroláminas foliares de violeta africana (Kyte 1987).

Componentes	Concentración (mg/L)
½ Macro nutrientes MS*	
NH ₄ NO ₃	825.0
KNO ₃	950.0
KH ₂ PO ₄	85.0
CaCl ₂ . 2H ₂ O	220.0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	185.0
Micronutrientes MS	
KI	0.830
H ₃ BO ₃	6.200
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22.300
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.600
Na ₂ MoO ₄	0.250
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025
FeNaEDTA	50.0
Na H ₂ PO ₄	170.0
Componentes orgánicos	
Inositol	100.0
Acido nicotínico	0.25
Piridoxina	0.40
Tiamina	0.40
BAP	0.14
AIA	2.00
Sacarosa (g)	30.00
Phytigel (g)	1.80
pH	5.5

*MS= Murashige y Skoog 1962

Las soluciones nutritivas “B” y “C” igualmente contienen una fuente de carbohidratos (sacarosa), vitaminas, aminoácidos, agar como agente gelificante además de una solución nutritiva base que aporta macro nutrientes y micronutrientes.

Para el medio alternativo “B” (Cuadro 2) se utilizó como fuente de macronutrientes una solución nutritiva base del fertilizante soluble con fórmula comercial 20-20-20, distribuido por Disagro S.A. Esta solución base se preparó disolviendo 250 g del fertilizante 20-20-20 en un litro de agua destilada. En la preparación de la solución nutritiva “B”, se utilizaron 250 ml de la solución base del fertilizante para preparar un litro de solución nutritiva “B”. Así mismo, se utilizó agua de coco, que contiene una gran cantidad de componentes orgánicos (Cuadro 3).

Cuadro 2. Solución Nutritiva “B” utilizada para el establecimiento *in vitro* de vitroláminas foliares de violeta africana.

Componentes	Concentración (mg/L)
Sacarosa (g)	42.0
Solución nutritiva 20-20-20 (g)	250.0
Agua de coco (ml)	100.0
Vitamina B1 (Tiaminteta [®])	0.15
Agar (g)	2.64
pH	5.5

Cuadro 3. Composición del agua de coco utilizada en la formulación de medios de cultivo alternativos “B” y “C” en el establecimiento *in vitro* de vitroláminas foliares de violeta africana.

Compuestos Nitrogenados	Contenido (µg/mL)	
	Aminoácidos	Nitrógeno
Acido aspártico	76.00	0.80
Acido glutámico	327.00	3.11
Serina	65.00	8.70
Glicina	22.00	4.09
Treonina	200.00	23.52
Alanina	468.00	73.80
Histidina	25.00	6.77
Lisina	72.00	13.80
Arginina	77.00	24.80
Metionina	18.00	1.69
Prolina	100.00	12.17
Valina	41.00	4.90
Isoleucina	30.00	3.20
Leucina	30.00	3.20
Fenilalanina	7.00	0.59
Tirosina	13.00	1.00

En la solución nutritiva “C” (Cuadro 4) se utilizó como fuente de macro y micronutrientes una solución nutritiva de Miracle Gro[®] distribuido por Scotts Miracle Gro Products. Se preparó una solución base con 125 ml de Miracle Gro[®] diluida en un litro de agua destilada y posteriormente se utilizaron 125 ml de dicha solución para preparar un litro de la solución nutritiva “C”.

Miracle Gro[®] es un fertilizante soluble con fórmula comercial 7-7-7 (Cuadro 5), recomendado para el cultivo de violetas africanas. Este producto aporta macro y micronutrientes en forma de quelatos lo que hace que sean mucho más disponibles en un amplio rango de pH (Hurtado y Merino 1994).

Cuadro 4. Solución Nutritiva “C” utilizada para el establecimiento *in vitro* de vitroláminas foliares de violeta africana.

Componentes	Concentración (g/L)
Sacarosa	21.26
Solución nutritiva (Miracle Gro [®]) (ml)	125.00
Agua de coco	100.00
Vitamina B1 (tiamina) (mg)	0.075
Agar	1.32
pH	5.5

Cuadro 5. Composición de Miracle-Gro[®] 7-7-7 utilizado en la elaboración del medio de cultivo “C” para el establecimiento *in vitro* de vitroláminas foliares de violeta africana.

Componentes [‡]	Concentración (mg/L)
Nitrógeno	7000.00
Fosforo (P ₂ O ₅)	7000.00
Potasio (K ₂ O)	7000.00
Boro(B)	20.00
Cobre (Cu)	50.00
Hierro Quelatado FeEDTA	100.00
Manganeso (Mn)	80.00
Arsénico (Ar)	0.25
Cadmio (Cd)	1.00
Cobalto (Co)	2.50
Mercurio (Hg)	0.02
Molibdeno (Mo)	2.50
Níquel (Ni)	2.50
Plomo (Pb)	0.23
Selenio (Se)	1.00
Zinc (Zn)	587.00

[‡]Los componentes están derivados de fosfato de amonio, urea, fosfato de potasio, muriato de potasio, ácido bórico, cobre quelatado, hierro quelatado, manganeso quelatado y zinc quelatado (www.regulatory-info.sc.com).

Las soluciones nutritivas fueron formuladas para cubrir los requerimientos de macro y micronutrientes, energía, reguladores de crecimiento, vitaminas, aminoácidos y se adicionaron algunos compuestos orgánicos como agua de coco que aporta varios compuestos nutritivos. En la Cuadro 6 se puede apreciar una comparación de la composición de cada una de las soluciones nutritivas.

Cuadro 6. Composición comparativa de soluciones nutritivas utilizadas para el establecimiento *in vitro* de vitroláminas foliares de violeta africana.

Componentes	Medio A (mg/L)	Medio B (mg/L)	Medio C (mg/L)
Macronutrientes			
Nitrógeno		500.00	7000.00
Fosforo (P ₂ O ₅)		500.00	7000.00
Potasio (K ₂ O)		500.00	7000.00
NH ₄ NO ₃	825.00		
KNO ₃	950.00		
KH ₂ PO ₄	85.00		
CaCl ₂ . 2H ₂ O	220.00		
MgSO ₄ . 7H ₂ O	185.00		
Micronutrientes			
KI	0.83		
H ₃ BO ₃	6.20		
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22.30		
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.60		
Na ₂ MoO ₄	0.25		
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.02		
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.02		
FeNaEDTA	50.00		100.00
Na H ₂ PO ₄	170.00		
Boro(B)			20.00
Cobre (Cu)			50.00
Manganeso (Mn)			80.00
Molibdeno (Mo)			2.50
Níquel (Ni)			2.50
Zinc (Zn)			587.00
Compuestos orgánicos			
Inositol	100.00		
Acido nicotínico	0.25		
Piridoxina	0.40		
Tiamina	0.40	0.15	0.07
BAP	0.14		
AIA	2.00		
Sacarosa (g)	30.00	42.00	21.26
Phytigel (g)	1.80		
Agua de coco (ml)		100.00	100.00
Agar (g)		2.64	1.32

Preparación del medio de cultivo:

Para la preparación del medio de cultivo tradicional “A” se siguió este procedimiento general:

1. En un vaso de precipitación de 5000 ml se agregaron 500 ml de agua destilada y se colocó una barra magnética de agitación en el fondo del vaso para mantener en agitación constante mientras se preparaba el medio. Se prepararon 3.6 litros de medio. Seguidamente se agregaron los macro y micro elementos como se detalla a continuación:
2. 180 ml de la solución madre de macroelementos MS (Murashige y Skoog 1962) previamente preparada a una concentración de 10X.
3. 3.6 ml de la solución madre de microelementos MS preparada a una concentración de 1000X.
4. 18 ml de la solución madre de hierro (FeNa EDTA) preparada a una concentración de 200X.
5. Los compuestos orgánicos: vitaminas, aminoácidos y reguladores del crecimiento.
6. 108 g de sacarosa y se mantuvo en agitación por 5 minutos hasta disolverse completamente.
7. Después de haber agregado cada uno de los componentes del medio de cultivo se procedió a aforar al volumen final de 3.6 litros con agua destilada.
8. Seguidamente se colocó el medio de cultivo nuevamente en el vaso de precipitación para regular el pH con soluciones 0.1N, 1N ó 2N de KOH (Hidróxido de Potasio) y 0.1N y 0.5N de HCl (Ácido Clorhídrico). El valor final de pH fue de 5.5.
9. Se agregaron 6.84 g de Phytigel como agente gelificante. Se calentó en un horno microondas hasta disolver completamente el agente gelificante. Se colocó por 3 minutos en el horno microondas, luego por 1 minuto se colocó sobre el agitador magnético. Este procedimiento se realizó en cuatro ocasiones consecutivas hasta obtener una apariencia cristalina y transparente.
10. Se dispensaron 20 ml del medio de cultivo en cada uno de los recipientes. Para ello se utilizó una dosificadora de vidrio de 50 ml. Durante el dispensado el medio de cultivo se mantuvo en agitación para mantener homogénea la mezcla. Es importante que los contenedores estén previamente identificados con el nombre del cultivo a sembrar y/o tratamiento a evaluar.
11. Finalmente después de dispensar el medio de cultivo en los recipientes, se cubrieron con papel aluminio y se procedió a la esterilización.

Preparación de soluciones nutritivas alternativas:

Previo a la preparación del medio de cultivo básico se prepararon soluciones madres de los respectivos componentes alternativos como se describe a continuación.

Para el medio de cultivo “B” se utilizaron 250 g del fertilizante 20-20-20 en 1.0 L de agua destilada según recomendación de Taji (1996).

El procedimiento general consistió en preparar 1.2 L del medio de cultivo, al cual se le agregaron 50.4 g de sacarosa, 300 ml de solución nutritiva (20-20-20), 120 ml de agua de coco, 0.18 mg de tiamina. Seguidamente se procedió a aforar al volumen de 1.2 L y estandarizar el pH a 5.5 con soluciones de 0.1N, 1N de KOH (Hidróxido de Potasio) y 0.1N y 0.5N de HCl (Ácido Clorhídrico). Finalmente se agregaron 3.12 g de agar como agente gelificante.

Para el medio de cultivo “C” se utilizaron 125 ml de la solución nutritiva Miracle Gro[®] en 1L de agua destilada según recomendación de Rick (2006).

El procedimiento general consistió en preparar 1.2 litros de medio de cultivo. Al cual se le agregaron 21.26 g de sacarosa, 150 ml de solución nutritiva Miracle gro[®] 120 ml de agua de coco, 0.075 mg de tiamina, seguidamente se procedió a aforar al volumen de 1.2 litros y estandarizar el pH a 5.5 con soluciones de 0.1N, 1N de KOH (Hidróxido de Potasio) y 0.1N y 0.5N de HCl (Ácido Clorhídrico). Finalmente se agregaron 1.58 g de agar.

En la elaboración de la solución nutritiva tradicional se utilizo Phytigel como agente gelificante ya que es el que actualmente está validado y es utilizado en el laboratorio de Cultivo de Tejidos, mientras en las soluciones alternativas se utilizó agar, ya que es un producto mucho mas fácil de conseguir.

Esterilización de instrumentos y medios de cultivo:

Para la esterilización se sometieron el medio de cultivo y los instrumentos a una temperatura de 121°C y 103.39 kPa durante 20 minutos en un autoclave.

Los instrumentos utilizados para el establecimiento de las vitroláminas foliares; bisturíes, pinzas, platos petri, papel toalla también fueron esterilizados bajo las mismas condiciones de temperatura, presión y tiempo.

Siembra de explantes foliares:

La siembra o establecimiento empieza desde la selección de plantas establecidas previamente *in vitro*, las cuales se seleccionaron en función de su tamaño, vigor y estado

fitosanitario. Seguidamente se procedió a limpiar el área de siembra, para ello se encendió la cámara de flujo laminar y se roció las paredes de la cámara con alcohol al 70%, minimizando de esta manera la presencia de agentes contaminantes. Esta actividad de limpieza se realizó 30 minutos antes de iniciar con el establecimiento de los explantes.

Después de la limpieza de las cámaras, se procedió a extraer la vitroplantas del interior de los recipientes y se colocaron en un plato petri estéril en el cual se seleccionaron y extrajeron hojas mayores a 1.5 cm^2 , con una coloración verde y sin daño alguno. Seguidamente se realizaron cortes alrededor de las hojas a las cuales se les removi6 el pec6olo y los bordes d6ndoles un tama6o final de $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$.

Se procedió a colocar un segmento de lámina foliar en posición polar en el interior de cada uno de los recipientes. La inocuidad es un aspecto de suma relevancia a considerar durante la etapa de establecimiento, por tal razón todos los instrumentos y materiales fueron esterilizados periódicamente durante el proceso usando un esterilizador de calor seco que contiene cápsulas de vidrio, los cuales alcanzan una temperatura de 250°C .

Finalizada la siembra de los explantes, los recipientes de siembra se cubrieron con papel aluminio y parafilm en el borde superior para sellar por completo y disminuir el ingreso de pat6genos.

Incubaci6n:

Una vez sembrados los explantes, los recipientes se colocaron en el cuarto de crecimiento a una temperatura promedio de $22 - 24^\circ\text{C}$ y fueron expuestos a un fotoperiodo de 16 horas luz con lámparas fluorescentes del tipo daylight Ecolux 20 w, de 2.4 m de largo, espaciadas a 50 cm y a una altura de 30 cm sobre los explantes, con una intensidad de 1000 a 3000 lux.

Dise6o experimental:

Se us6 un Dise6o Completamente al Azar (DCA), debido a que las condiciones ambientales de temperatura, luz, humedad relativa fueron las mismas para todos los tratamientos a lo largo de la investigaci6n. La unidad experimental fue representada por cada uno de los frascos de vidrio con una lámina foliar.

Se utilizaron tres repeticiones por cada tratamiento con 20 unidades experimentales cada una, lo que hace un total de 180 unidades experimentales.

Variables evaluadas:

Las variables medidas en el primer experimento fueron:

Formación del tejido callogénico (callogénesis):

El tejido callogénico se define como una masa de tejido parenquimatoso. Los explantes aislados en los medios de cultivo pasan por un proceso de diferenciación celular continua y acelerada dando origen a una masa amorfa de tejido con apariencia desorganizada (Hurtado y Merino 1994).

La toma de datos se realizó 35 días después de la siembra y consistió en visualizar los explantes en cuatro segmentos y se utilizó la clasificación (Anexo 1):

Tejido callogénico nulo: los explantes que no mostraron ninguna formación de tejido callogénico.

Tejido callogénico leve: los explantes que mostraron hasta un 25% del área total cubierta por tejido callogénico.

Tejido callogénico intermedio: los explantes que mostraron entre el 26 a 75% del área total cubierta por tejido callogénico.

Tejido callogénico profuso: los explantes que mostraron entre el 76 al 100% del área total cubierta por tejido callogénico.

Peso de los explantes:

A los 45 días después de la siembra se pesaron los explantes. Se sacaron los explantes de los recipientes y se pesaron en una balanza analítica.

Formación de los brotes (Brotación):

La formación de brotes se determinó 45 días después de la siembra visualizando el explante en cuatro segmentos y dependiendo de la proporción del explante que formó brotes se asignó la siguiente clasificación (Anexo 2):

Brotación nula: los explantes que no mostraron formación de brotes.

Brotación leve: los explantes que mostraron hasta un 25% del área cubierta por brotes.

Brotación intermedia: los explantes que mostraron entre 26 y 75% del área del explante cubierto por brotes.

Brotación Profusa: los explantes que mostraron entre 76 y 100% del explante cubierto por brotes.

Formación de raíces:

La formación de raíces se midió 45 días después de la siembra. Se clasificaron los explantes en dos categorías: con o sin presencia de raíces.

Sobrevivencia:

Se determinó 25 días después de la siembra. Hace referencia a los explantes que mostraron algún tipo de respuesta inicial principalmente de tejido callogénico. Aquellos explantes que a pesar de estar vivos y de coloración verde pero que no mostraron ningún tipo de respuesta se clasificaron como no sobrevivientes.

Experimento 2. Evaluación de tres tipos de materiales de cobertura durante la etapa de establecimiento *in vitro* de violeta africana

Se evaluaron tres materiales de cobertura: papel aluminio (Diamond[®], Reynolds Consumer Products, Richmond, VA, USA.), cinta adhesiva de uso quirúrgico malla micropore (3M[™] Micropore[™] St. Paul, MN, USA) y papel resinite, utilizado como envoltura de plástico para conservar alimentos (Diamond[®], Reynolds Consumer Products, Richmond, VA, USA). Se comparó y evaluó el efecto que tiene el material de cobertura en la entrada de la luz y en el intercambio gaseoso sobre la formación y obtención final de vitroplantas y por ende la tasa de multiplicación ya sea por una vía directa o indirecta de regeneración.

Preparación de medio de cultivo y coberturas:

El medio de cultivo utilizado fue el tradicional propuesto por Kyte 1987 (Cuadro 1). El proceso de elaboración es el mismo que para el primer experimento, con la diferencia de que se evaluaron materiales de cobertura de los contenedores que permitan mayor ingreso de luz y mejoren la aireación de las vitroplantas.

Para el tratamiento con papel aluminio como material de cobertura se cortaron círculos de 12 cm de diámetro para cubrir completamente la parte superior de los recipientes.

Esterilización del medio de cultivo y sellado:

La esterilización de los instrumentos y del medio de cultivo fue igual al realizado en el primer experimento, sin embargo, la malla micropore y el papel resinite no fueron esterilizados ya que el calor dañaría su calidad. Estos materiales de cobertura fueron manipulados únicamente al momento de la siembra para cubrir los recipientes y reducir el riesgo de contaminación.

Siembra de los explantes foliares:

La metodología empleada en la siembra de los explantes fue similar a la detallada en el primer experimento. Después de sembrar los explantes foliares se cubrieron los frascos con papel aluminio, malla micropore y papel resinite.

Incubación:

Los recipientes de vidrio fueron trasladados al cuarto de crecimiento con temperatura, iluminación y humedad relativa controladas. La temperatura en el cuarto de crecimiento puede oscilar entre 24-26°C, siendo este el rango óptimo para lograr el máximo crecimiento en la mayoría de especies. La interacción humedad-temperatura tiene efecto directo sobre la pérdida de agua de los medios de cultivo, al igual que proliferación de patógenos. El rango óptimo de humedad relativa en el cuarto de crecimiento debe oscilar entre 70% a 80% (Roca y Mroginski 1991).

El traslado al cuarto de crecimiento se hizo bajo las mismas condiciones descritas para el primer experimento.

Diseño experimental:

El diseño experimental utilizado fue un Diseño Completamente al Azar (DCA). Se utilizaron tres repeticiones por cada tratamiento con 20 unidades experimentales cada una, lo que hace un total de 180 unidades experimentales. La unidad experimental fue representada por los frascos de vidrio con un segmento de vitrolámina foliar.

Variables evaluadas:

Al igual que con el anterior experimento se evaluó la sobrevivencia de los explantes, así como la presencia o ausencia de raíces.

La brotación y la formación de tejido callogénico también fueron evaluadas. Para el caso de estas variables se estableció una escala evaluativa en función de la proporción del área del explante que mostró algún tipo de respuesta regenerativa, tal y como se describe en el primer experimento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1. Evaluación de dos formulaciones nutritivas como alternativa al uso del medio de cultivo tradicional utilizado en la micropropagación de violeta africana

Formación de tejido callogénico (TC):

La formación de TC se determinó a los 35 días y fue diferente entre las soluciones nutritivas (Cuadro 7). Con la solución A, la mayoría de explantes formaron tejido profuso o intermedio. Con la solución B la mayoría fue intermedio y con la solución C la mayoría fue leve, ya que estimuló una organogénesis directa.

La formación de TC se debe a la complejidad de las soluciones nutritivas. La solución A contiene BAP (0.14 mg/L) y AIA (2 mg/L) reguladores de crecimiento que participan en los procesos de diferenciación celular (Hurtado y Merino 1997) favoreciendo mayor formación de TC.

Cuadro 7. Efecto de la formulación nutritiva en la formación de tejido callogénico a partir de vitroláminas foliares de violeta africana a los 35 días después de la siembra.

Solución Nutritiva	Formación de tejido callogénico ¹ (%)			
	Nulo	Leve	Intermedio	Profuso
Solución Nutritiva A		1.75 ^b	29.96 ^{ab}	68.28 ^a
Solución Nutritiva B	5.57 ^a	23.61 ^a	45.83 ^a	25.00 ^{ab}
Solución Nutritiva C	3.51 ^a	78.13 ^a	18.35 ^b	

^a Medias con diferente letra en la columna difieren estadísticamente a $P < 0.05$

A solución nutritiva tradicional

B solución nutritiva a base de fertilizante comercial 20-20-20

C solución nutritiva a base del fertilizante comercial Miracle Gro.

¹ Porcentaje de explantes con formación de TC nulo= 0% TC leve=1-25% TC Intermedio=26-75%

TC profuso=76-100% del área total del explante cubierto por TC.

Peso del tejido callogénico:

El peso del TC se midió al final del estudio. Para ello se sacaron los explantes de los recipientes, lo que se denomina una toma destructiva de datos. La solución nutritiva A indujo un mayor crecimiento de TC y fue superior ($P < 0.05$), en comparación a las soluciones B y C (Cuadro 8).

La diferencia en crecimiento de TC puede atribuirse a las hormonas y vitaminas presentes en la solución nutritiva “A”, ya que las soluciones nutritivas “B” y “C” carecen de ellas. Las masas de TC con mayor tamaño indican una mayor multiplicación y reproducción masiva mas eficiente.

Cuadro 8. Efecto de la formulación nutritiva en el peso de tejido callogénico a partir de vitroláminas foliares de violeta africana a los 45 días después de la siembra.

Medio de cultivo	Peso (g)
Solución Nutritiva A	0.94 ^a
Solución Nutritiva B	0.11 ^b
Solución Nutritiva C	0.17 ^b

^{a y b} Medias con diferente letra en la columna difieren estadísticamente a $P < 0.05$

A solución nutritiva tradicional

B solución nutritiva a base de fertilizante comercial 20-20-20

C solución nutritiva a base del fertilizante comercial Miracle Gro.

Formación de los brotes:

La formación de brotes se midió 45 días después de la siembra. Las soluciones A y C mostraron una mayor formación profusa de brotes (Cuadro 9) no existiendo diferencia estadística entre ellas. La solución B mostró una mayor formación leve de brotes (65.56%). No se obtuvo formación profusa de brotes debido a los daños ocasionados por alta dosis utilizada del fertilizante 20-20-20 que causó toxicidad en el tejido.

Los explantes en la solución C mostraron una vía directa de regeneración, lo que se atribuye a la ausencia de reguladores de crecimiento (BAP y AIA), los cuales participan en el proceso de diferenciación celular (Montoya 1991).

Cuadro 9. Efecto de la formulación nutritiva en la formación de brotes a partir de vitroláminas foliares de violeta africana a los 45 días después de la siembra.

Solución Nutritiva	Brotación ¹ (%)			
	Nula	Leve	Intermedia	Profusa
Solución Nutritiva A	1.57 ^a	22 ^a	26 ^a	50.43 ^a
Solución Nutritiva B	1.44 ^b	65.56 ^a	33 ^a	
Solución Nutritiva C	1.48 ^a	25.53 ^a	28 ^a	45 ^a

^{a y b} Medias con diferente letra en la columna difieren estadísticamente a $P < 0.05$

A solución nutritiva tradicional

B solución nutritiva a base de fertilizante comercial 20-20-20

C solución nutritiva a base del fertilizante comercial Miracle Gro.

¹ Porcentaje de explantes con formación de brotes: nula= 0%; leve=1-25%; intermedia=26-75%; profusa=76-100% del área total del explante cubierto con brotes.

Formación de raíces:

La solución nutritiva “C” indujo mayor formación de raíces (Cuadro 10), sin embargo no existió diferencia con la solución nutritiva “A” ($P>0.05$). En los explantes cultivados en la solución nutritiva “B” no se observó formación de raíces, debido al daño por quemaduras ocasionado a los explantes, retrasando de esta manera el proceso de diferenciación celular.

La formación de raíces no es un proceso de suma relevancia durante la etapa de establecimiento ya que en la etapa de enraizamiento *in vitro* se induce a dicha diferenciación. Sin embargo, si las raíces proceden directamente de la base de los brotes formados representa un beneficio adicional en el proceso. En este estudio se observó que las soluciones nutritivas A y C indujeron la formación de raíces a partir de los brotes, siendo benéfico ya que durante la etapa de multiplicación se podrán obtener vitroplantas con raíces, acortando así el proceso de micropropagación.

Cuadro 10. Efecto de la formulación nutritiva en la formación de raíces a partir de vitroláminas foliares de violeta africana a los 45 días después de la siembra.

Solución Nutritiva	Formación raíces (%)
Solución Nutritiva A	66.29 ^a
Solución Nutritiva B	0.00 ^b
Solución Nutritiva C	80.38 ^a

^{a y b} Medias con diferente letra difieren estadísticamente a $P<0.05$

A solución nutritiva tradicional

B solución nutritiva a base de fertilizante comercial 20-20-20

C solución nutritiva a base del fertilizante comercial Miracle Gro.

Sobrevivencia:

Una parte de los explantes se perdió por contaminación bacteriana y fungosa principalmente. Otros, a pesar de no sufrir ninguna contaminación, tampoco mostraron ningún cambio durante el proceso.

Los niveles más altos se obtuvieron en la solución nutritiva “A” con 89.3% de sobrevivencia (Cuadro 11), seguido de la solución nutritiva “C” con 69.12% de sobrevivencia. En la solución nutritiva “B”, la sobrevivencia fue menor debido a que inicialmente la solución nutritiva causó quemaduras a los explantes limitando la respuesta regenerativa.

Cuadro 11. Efecto de la formulación nutritiva sobre el nivel de sobrevivencia de las vitroláminas foliares de violeta africana a los 35 días después de la siembra.

Medio de cultivo	Sobrevivencia (%)
Solución nutritiva A	89.3 ^a
Solución nutritiva B	41.0 ^c
Solución nutritiva C	69.7 ^b

^a medias con diferente letra difieren estadísticamente a $P < 0.05$

A solución nutritiva tradicional

B solución nutritiva a base de fertilizante comercial 20-20-20

C solución nutritiva a base del fertilizante comercial Miracle Gro.

Costos de las soluciones nutritivas:

Para determinar los costos de un litro de medio de cultivo, únicamente se consideró el costo de los ingredientes. El costo de preparar 1 L del medio de cultivo convencional (Cuadro 12) validado y utilizado por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos es de \$1.35, el de las soluciones nutritivas “B” (Cuadro 2) y “C” (Cuadro 4) es de \$1.43 y \$0.69 por litro de medio respectivamente. Esto indica que con el uso de compuestos alternativos accesibles y de menor precio es posible la propagación *in vitro* de violetas africanas.

Cuadro 12. Costo de la solución nutritiva tradicional “A” utilizada en la etapa de establecimiento de violeta africana a partir de vitroláminas foliares.

Componentes	\$/ml	ml/L	\$/L
Macroelementos	0.0056	50.00	0.2776
Microelementos	0.0053	1.00	0.0053
FeNaEDTA	0.0030	5.00	0.0152
BAP	0.0228	0.08	0.0018
AIA	0.0039	2.00	0.0078
Piridoxina	0.0146	0.40	0.0058
Inositol	0.0006	100.00	0.0565
Niacina	0.0002	0.40	0.0001
NaH ₂ PO ₄	0.0001	170.00	0.0247
Phytigel	0.0003	2000.00	0.5530
Sucrosa	0.000013	30000.00	0.3930
Thiamine Hydrochloride	0.0181	0.40	0.0072
TOTAL			1.3480

Cuadro 13. Costo solución nutritiva “B” utilizada en la etapa de establecimiento de violeta africana a partir de vitroláminas foliares.

Componentes	\$/g	g/L	\$/L
Sacarosa (g)	0.0011	42	0.0462
Solución Nutritiva 20-20-20 (g)	0.0014	250	0.35
Agua de coco (ml)	0.0002	100	0.02
Vitamina B1 (mg)	0.0005	0.15	0.0001
Agar (g)	0.3865	2.64	1.0204
TOTAL			1.4366

Cuadro 14. Costo solución nutritiva “C” utilizada en la etapa de establecimiento de violeta africana a partir de vitroláminas foliares.

Componentes	\$/g	g/L	\$/L
Sacarosa (g)	0.0011	21.26	0.0234
Solución nutritiva Miracle Gro [®] (ml)	0.0011	125.00	0.1375
Agua de coco (ml)	0.0002	100.00	0.0200
Vitamina B1 (mg)	0.0005	0.08	0.00004
Agar (g)	0.3865	1.32	0.5102
TOTAL			0.6911

Experimento 2. Evaluación de tres tipos de materiales de cobertura durante la etapa de establecimiento *in vitro* de violeta africana

El papel aluminio y el papel resinite indujeron formación de tejido callogénico no existiendo diferencia ($P > 0.05$) entre ambos tratamientos. El material malla micropore no mostró ninguna respuesta y mas bien indujo la pérdida de los explantes por evaporación del medio.

Inicialmente los explantes no son capaces de fotosintetizar, sin embargo, la luz juega un papel importante en la diferenciación celular, siendo una de ellas la formación de brotes los cuales tienen la capacidad de fotosintetizar de allí la importancia de usar materiales de cobertura alternativos al papel aluminio que permitan mayor paso de la luz.

Formación de tejido callogénico (TC):

La formación de TC se evaluó 35 días después de la siembra y fue expresada como porcentaje del total de explantes sobrevivientes. La formación de TC profuso en los explantes cubiertos con papel resinite fue de 77.95% y en los explantes cubiertos con papel aluminio fue de 72.24%. A pesar de que el papel resinite es un material transparente

que permitió mayor entrada de luz en el interior de los recipientes, no existió diferencia significativa entre los materiales utilizados como cobertura en la formación de TC (Cuadro 15).

Cuadro 15. Efecto del uso de materiales de cobertura en la formación de tejido callogénico a partir de vitroláminas foliares de violeta africana 35 días después de la siembra.

Material de Cobertura	Formación de tejido callogénico ¹ (%)			
	Nulo	Leve	Intermedia	Profusa
Aluminio	0.0	2.75 ^b	19.3 ^a	77.95 ^a
Papel Resinite	0.0	1.13 ^a	26.63 ^a	72.24 ^a
Malla Micropore	0.0	0.0	0.0	0.0

^{a,yb} Medias con diferente letra difieren estadísticamente a $P < 0.05$

¹ Porcentaje de explantes con formación de TC nulo= 0% TC leve=1-25% TC Intermedia=26-75% TC profusa=76-100% del área total del explante cubierto con TC.

Formación de los brotes:

La formación de brotes se midió 45 días después de la siembra. Este valor representa el total de explantes que formaron brotes en relación al número total de explantes sobrevivientes expresado en porcentaje. Los materiales papel aluminio y papel resinite no mostraron diferencia ($P > 0.05$) en los porcentajes de formación intermedia y profusa de brotes (Cuadro 16).

Los datos de brotación con cada uno de los materiales fueron muy similares a lo largo del experimento, estos datos se tomaron desde los 30, 35, 40 y 45 días después de la siembra y tampoco existió diferencia entre la formación de brotes utilizando papel aluminio (Figura 1) o papel resinite (Figura 2). Con la malla micropore no se observó respuesta regenerativa ya que el medio de cultivo se evaporó ocasionando pérdida de los explantes.

Cuadro 16. Efecto del uso de materiales de cobertura en la formación de brotes a partir de vitroláminas foliares de violeta africana 45 días después de la siembra.

Material de Cobertura	Brotación ¹ (%)			
	Nula	Leve	Intermedia	Profusa
Aluminio	0	3 ^a	10 ^a	87 ^a
Papel Resinite	0	2 ^a	8 ^a	90 ^a
Malla micropore	0	0	0	0

^{a,yb} Medias con diferente letra en la columna difieren estadísticamente a $P < 0.05$

¹ Porcentaje de explantes con formación de brotes: nula=0%; leve=1-25%, intermedia=26-75%; profusa=76-100% del área total del explante cubierto por brotes.

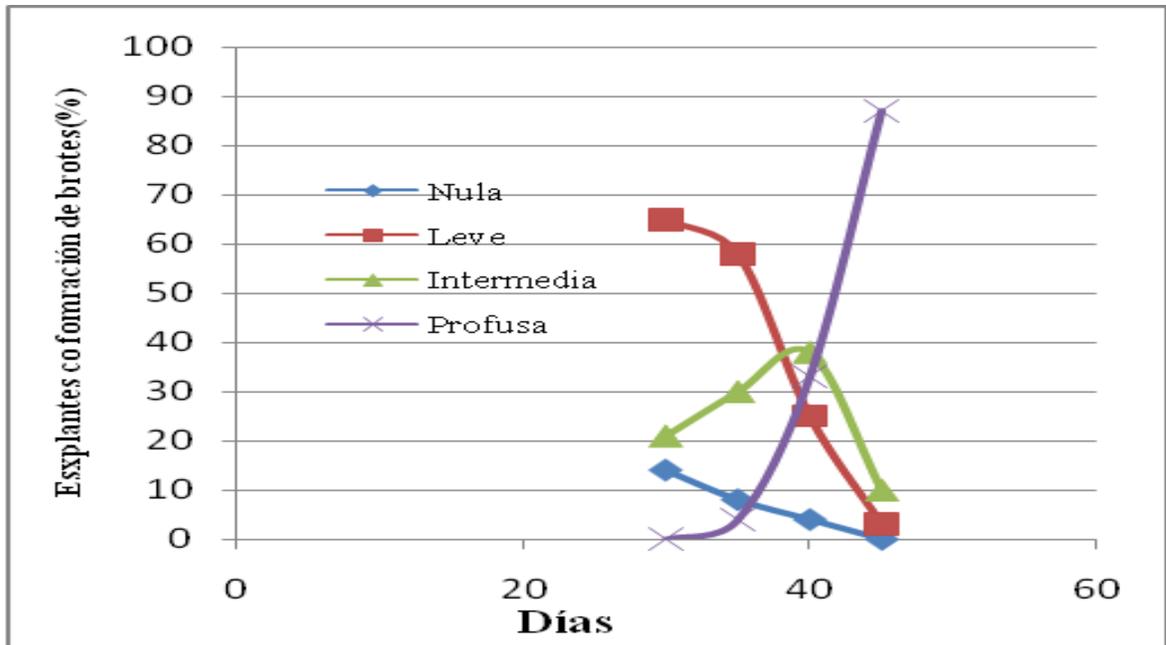


Figura 1. Efecto del uso de papel aluminio en la formación de brotes a partir de vitroláminas foliares de violeta africana durante la etapa de establecimiento *in vitro*.

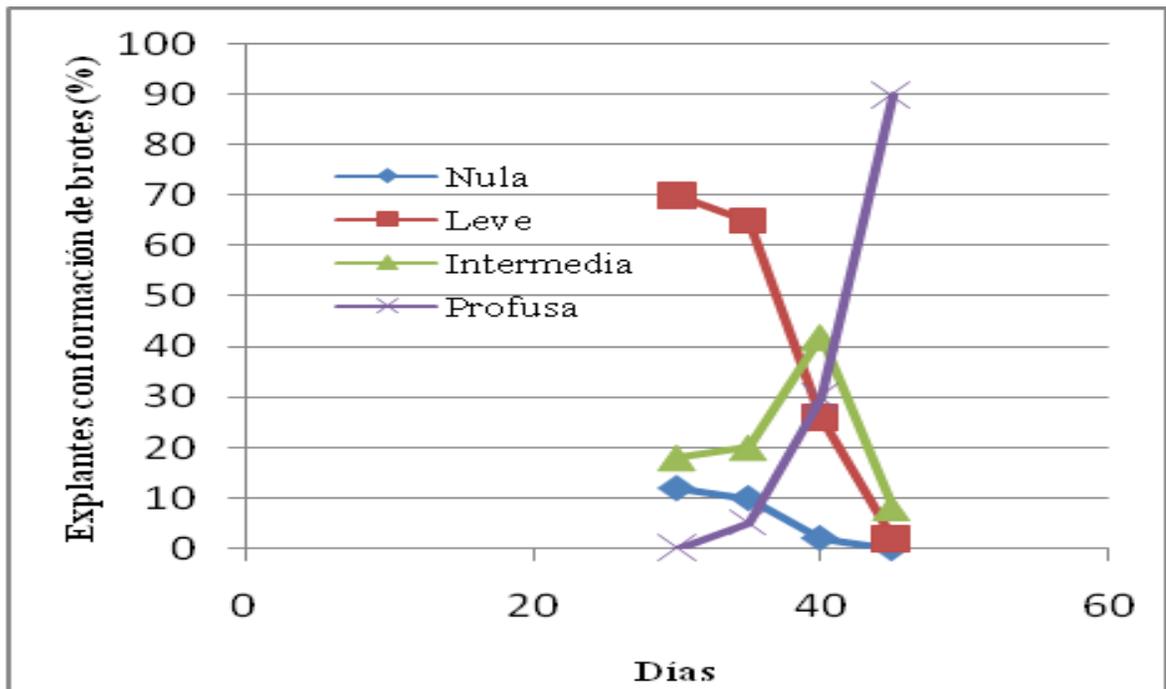


Figura 2. Efecto del uso de papel resinite en la formación de brotes a partir de vitroláminas foliares de violeta africana durante la etapa de establecimiento *in vitro*.

Formación de raíces:

El uso de papel aluminio como cobertura se observó un 95% de explantes que regeneraron raíces, en comparación al uso de papel resinite en el cual únicamente se observó un 3.33% de explantes que formaron raíces. La formación de raíces que se observó en este experimento tuvo una diferencia marcada como en el experimento de soluciones nutritivas ya que en este caso las raíces se formaron a partir de los explantes y no de la base de los brotes como sucedió en el experimento de soluciones nutritivas.

Cuadro 17. Efecto del uso de materiales de cobertura en el porcentaje de formación de raíces a partir de vitroláminas foliares de violeta africana 45 días después de la siembra.

Material de Cobertura	Formación de Raíces ¹ (%)
Aluminio	95.00 ^a
Papel Resinite	3.33 ^b
Malla micropore	0.0

^{a y b} Medias con diferente letra difieren estadísticamente a $P < 0.05$

¹ Porcentaje de explantes que formaron raíces

Sobrevivencia y contaminación:

La malla micropore mostró una contaminación de 52% mientras que el papel resinite una de 1.66% y en el papel aluminio no la hubo. Las causas principales de contaminación al utilizar malla micropore fueron por bacteria y hongo, además se observó pérdida del medio de cultivo por evaporación atribuible al tamaño de los orificios del material que permitió una excesiva aireación reduciendo la humedad relativa en el interior de los recipientes.

Para determinar el nivel de sobrevivencia solamente se consideraron aquellos explantes que mostraron respuesta regenerativa. Los explantes cultivados bajo papel aluminio presentaron mayor ($P < 0.05$) sobrevivencia (91.66%), comparado con los explantes cultivados con papel resinite donde se obtuvo 69.67% de sobrevivencia, bajo malla micropore murieron todos.

Cuadro 18. Porcentaje de contaminación y sobrevivencia en el uso de materiales como cobertura en la etapa de establecimiento *in vitro* de violeta africana.

Cobertura	Contaminación (%)	Sobrevivencia (%)
Aluminio	0.00	91.66 ^a
Malla micropore	52.00 ^a	0.00 ^c
Papel Resinite	1.66 ^b	69.67 ^b

^{a y b} Medias con diferente letra difieren estadísticamente a $P < 0.05$

CONCLUSIONES

- El fertilizante 20-20-20 como fuente de macro nutrientes causó daños por quemaduras en los explantes, impidiendo la respuesta regenerativa.
- Miracle Gro[®] favoreció la formación de raíces y la brotación de explantes en una vía directa.
- El papel aluminio utilizado como material de cobertura fue el que mostró mejores resultados en la formación de TC y brotación de los explantes.
- La malla micropore utilizada como material de cobertura permite la evaporación del medio de cultivo.
- El uso de papel resinite como material de cobertura, a pesar de ser transparente, no mostró diferencia en la formación de TC, brotación y formación de raíces de los explantes comparado con el uso de papel aluminio.
- El costo de elaboración de la solución nutritiva a base de Miracle Gro fue de \$0.69/L comparado a \$1.35/L de la solución nutritiva tradicional.

RECOMENDACIONES

- Para estimular una organogénesis directa en explantes foliares de violeta africana se recomienda el uso de Miracle Gro[®] como fuente de macro y micro nutrientes.
- Para obtener alta tasa de multiplicación por la vía indirecta organogénica, se recomienda el uso del medio de cultivo tradicional ya que se obtiene mayor crecimiento de TC.
- Evaluar el uso del fertilizante 20-20-20 como fuente de macronutrientes a dosis menores a 250 g/L para evitar daños por quemaduras a los explantes.
- El papel resinite puede ser un sustituto del papel aluminio como material de cobertura, ya que se obtienen los mismos resultados en la diferenciación celular.
- No utilizar malla micropore como material de cobertura, ya que permite la pérdida del medio de cultivo por evaporación.

LITERATURA CITADA

Figuerola N. 2006. Pre aclimatación in vitro de plantas de violeta africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) y su efecto sobre aclimatación. Universidad Católica de Valparaíso, Chile. 59 p.

Griffith, L. 1998. Tropical Foliage Plants: a grower guide. Ball Publishing, Batavia, Estados Unidos. 318 p.

Hurtado D y Merino M. 1997. Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas. México, D.F. México. 232 p.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA) 2004. Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Viena, Austria 105 p.

Kyte L. 1987. Plants from test tubes: an introduction to micropropagation. Pórtland, Oregon. Timber Press 160p.

López C. 1996. Vitrificación de Plantas Cultivadas *in vitro*. (en línea) disponible en: <http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS28/28vitrificacion.html> consultado 14-octubre-2008.

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

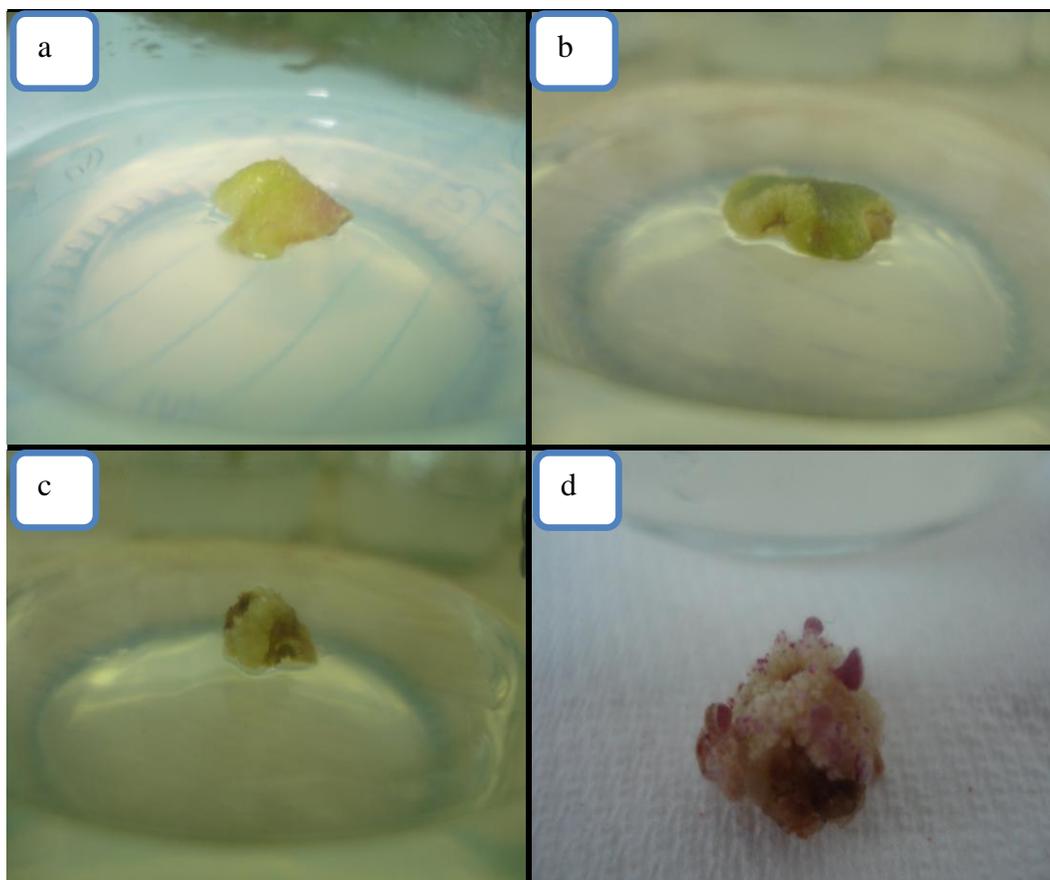
Rick. W. 2006. Tissue culture in the Home Kitchen. (En línea) disponible en: <http://www.omnisterra.com/botany/cp/slides/tc/tc.htm> consultado 20-junio-2008.

Roca M y Mroginski L. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 969 p.

Taji A. 1996. Plant Tissue Culture for Home Gardeners. Universidad de Nueva Inglaterra (en línea) disponible en: <http://www.une.edu.au/agss/hort/horticultural-science.php> consultado 20-junio-2008.

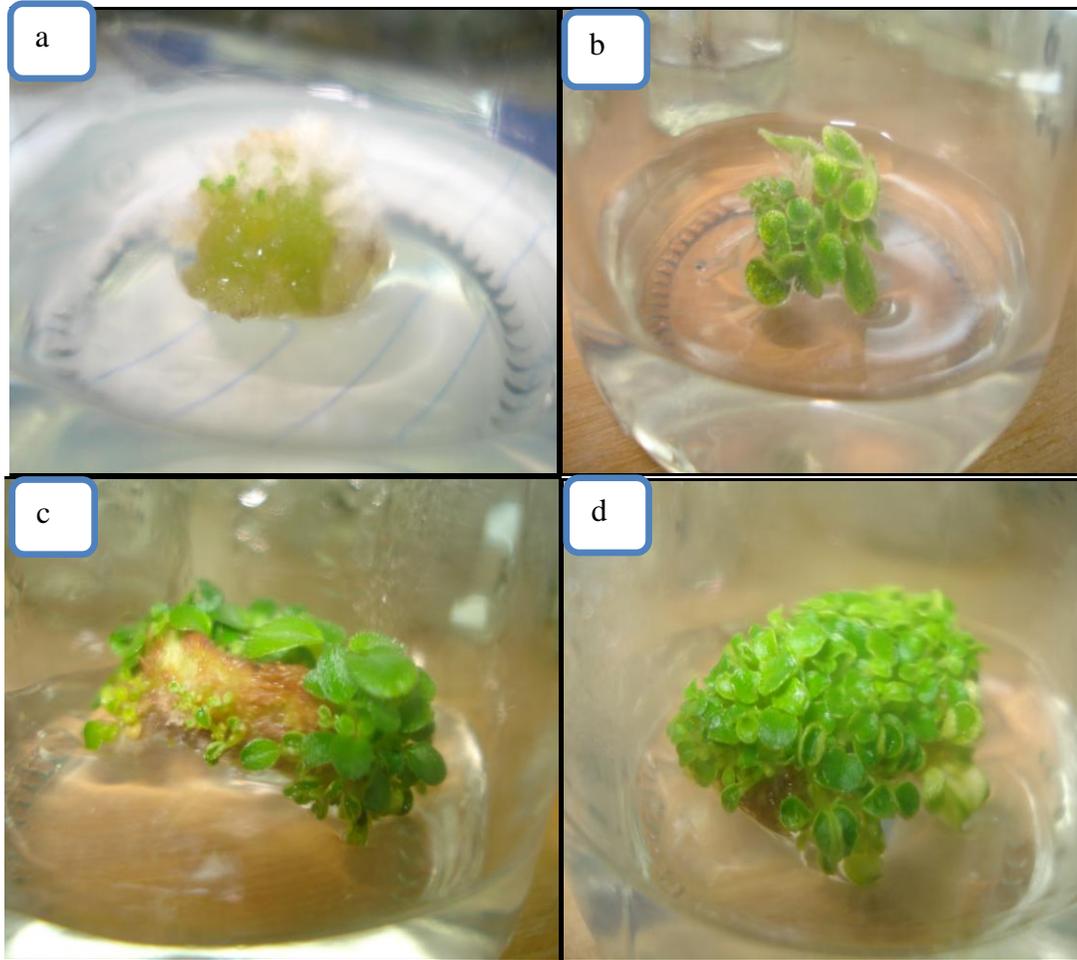
ANEXOS

Anexo 1. Categorías en la formación de tejido callogénico en el establecimiento *in vitro* de violeta africana a partir de vitroláminas foliares.



- a. Formación nula de tejido callogénico
- b. Formación leve de tejido callogénico
- c. Formación intermedia de tejido callogénico
- d. Formación profusa de tejido callogénico

Anexo 2. Categorías en la formación de brotes en el establecimiento *in vitro* de violeta africana a partir de vitroláminas foliares.



- a. Formación nula de brotes
- b. Formación leve de brotes
- c. Formación intermedia de brotes
- d. Formación profusa de brotes