

Evaluación del efecto de reemplazar tres reactivos químicos puros por fertilizantes en medio de cultivo para inducción *in vitro* de brotes adventicios de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*)

María Fernanda Pacheco Patrón

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**
Noviembre, 2016

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Evaluación del efecto de reemplazar tres reactivos químicos puros por fertilizantes en medios de cultivos para inducción *in vitro* de brotes adventicios de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*)

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

Presentado por

María Fernanda Pacheco Patrón

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2016

Evaluación del efecto de reemplazar tres reactivos químicos puros por fertilizantes en medios de cultivos para inducción *in vitro* de brotes adventicios de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*)

María Fernanda Pacheco Patrón

Resumen. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de reemplazar tres reactivos químicos puros por fertilizantes en el medio de cultivo basal Murashige y Skoog (MS) modificado para la inducción *in vitro* de brotes adventicios de violeta africana. El establecimiento se realizó con explantes de hoja de *in vitro* plantas. Los explantes se establecieron en cinco tratamientos, el tratamiento testigo consistió en el uso de los reactivos químicos puros, en el tratamiento dos se reemplazaron tres macronutrientes, nitrato de amonio, nitrato de potasio y sulfato de magnesio heptahidratado por fertilizantes, en el tratamiento tres se reemplazó únicamente el macronutriente nitrato de amonio, en el tratamiento cuatro se reemplazó el nitrato de potasio y en el tratamiento cinco se reemplazó el sulfato de magnesio heptahidratado. Se utilizó un diseño completamente al azar, con cinco tratamientos, dos repeticiones y cincuenta unidades experimentales por repetición. Se analizó mediante un ANDEVA con separación de medias por el método de Duncan con una probabilidad <0.05 . Las variables evaluadas fueron porcentaje de brotes al día 21, peso fresco y peso seco. Los mejores resultados de porcentaje de brotes, peso fresco y seco se presentaron en los tratamientos en los que se reemplazó los tres reactivos químicos por fertilizantes y donde se reemplazó el nitrato de amonio y el sulfato de magnesio heptahidratado por fertilizantes individualmente.

Palabras clave: Concentración, fertilizante, micropropagación.

Abstract. The aim of this study was to evaluate the effect of replacing three pure chemical reagents for fertilizer in the basal culture medium Murashige and Skoog (MS) modified for the *in vitro* induction of adventitious buds of African violet. The establishment was made with leaf explants *in vitro* plants. The explants were established in five treatments, the control treatment consisted of the use of pure chemical reagents, in treating two, three macronutrients were replaced, ammonium nitrate, potassium nitrate and magnesium sulfate heptahydrate for fertilizers, in the three treatment were replaced only macronutrient ammonium nitrate, in four treatment potassium nitrate was replaced and in the five treatment the magnesium sulfate heptahydrate is replaced. It was used completely randomized design, with five treatments, two fifty repetitions and experimental units per repetition. It was analyzed by ANOVA with mean separation by Duncan's method with a probability <0.05 . The variables evaluated were percentage of outbreaks at day 21, fresh weight and dry weight. The best results percentage of sprouts, fresh and dry weight occurred in the treatments in which the three chemical reagents was replaced by fertilizers and where ammonium nitrate and magnesium sulfate heptahydrate was replaced by fertilizer individually.

Keywords: Concentration, fertilizer, micropropagation.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Páginas de firmas.....	ii
Páginas de firmas.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de cuadros y figuras.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4. CONCLUSIONES.....	9
5. RECOMENDACIONES.....	10
6. LITERATURA CITADA.....	11

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Medio de cultivo basal Murashige y Skoog modificado para la inducción de brotes adventicios en hojas de violeta africana (<i>Saintpaulia ionantha</i>)... ..	4
2. Aportes y diferencias de los nutrientes aplicados al medio de cultivo al reemplazar los reactivos químicos por fertilizantes	5
3. Resumen de los tratamientos evaluados y su codificación.....	6
4. Efecto del reemplazo de tres reactivos químicos por fertilizantes en el porcentaje de explantes con brote al día 21 en violeta africana.. ..	7
5. Efecto del reemplazo de tres reactivos químicos por fertilizantes en el peso fresco y peso seco de brotes adventicios de violeta africana.....	8

Figuras	Página
1. Establecimiento <i>in vitro</i> de explantes de hojas de violeta africana.	3

1. INTRODUCCIÓN

La violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) tiene origen en África Tropical. Es difundida a nivel mundial como planta de interior, debido a sus características atractivas (Terenti y Verdes 2013). Perteneció a la familia de las Gesneriaceae que es conocida por ser de gran interés tanto taxonómico como biogeográfico, ya que abarca áreas principales del viejo continente y el nuevo mundo. La Gesneriaceae se subdivide en tres subfamilias, Gesnerioideae, Coronantheroideae y Cyrtantheroideae, siendo la última a la cual pertenece la violeta africana (Poll y Álvarez 2013).

La micropropagación es una técnica de propagación masiva en ambientes controlados artificialmente y con medios de cultivos para cada una de las especies deseadas. Ésta técnica es una herramienta necesaria para la propagación y mejoramiento de cultivos, ya que se obtienen resultados a grandes proporciones comerciales a partir de muy poco material vegetal y que además puede tener varias multiplicaciones. Estos beneficios son debido a la totipotencia, es decir la capacidad de las células vegetales de poder regenerar una planta entera en las condiciones ideales (Levitus et al. 2010).

Principales ventajas de la micropropagación son la posibilidad de controlar la sanidad de los explantes y mayor facilidad de transporte. Desventajas como los altos costos de inversión, reactivos, equipo y el escaso personal capacitado en el área, hacen que ésta técnica sea poco implementada (Rojas González et al. 2004).

Los reactivos que se usan para la micropropagación son sustancias inorgánicas como los macro y micronutrientes, orgánicas como aminoácidos, vitaminas y reguladores de crecimiento como auxinas, y citocininas. Aunque en la actualidad existen premezclas comerciales, normalmente los medios son preparados en el laboratorio (Sharry et al. 2015).

Debido a que las sales minerales que conforman el medio de Murashige y Skoog (MS) tienen un alto costo, se han buscado alternativas para reemplazar estas sales con fertilizantes foliares u otro tipo de insumos agrícolas (Azofeifa et al. 2008).

Los insumos agrícolas son parte de las enmiendas que aplican los agricultores para favorecer o mejorar el desarrollo y la producción de los cultivos, entre ellos están fertilizantes, plaguicidas, fungicidas, insecticidas y adecuadores de suelos (García 2009). Debido a que los ingredientes de algunos de los insumos agrícolas son similares en composición a los componentes de los reactivos químicos usados en cultivo de tejidos se puede usar estas sustancias en la micropropagación como alternativa de bajo costo en cultivos ornamentales como el del presente estudio (Suárez y Hernández 2008).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de reemplazar tres reactivos químicos puros por fertilizantes en el medio de cultivo basal MS para la inducción *in vitro* de brotes adventicios de violeta africana.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio. El estudio se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Valle del Yeguaré, Honduras.

Establecimiento *in vitro* de explantes. Para el establecimiento se usaron hojas de *in vitro* plantas establecidas a partir de explantes foliares y que estaban en etapa de multiplicación. Para el experimento se seleccionaron hojas con el mejor aspecto de vigor y tamaño medio aproximado de 1 cm², las hojas fueron seleccionadas y separadas de las *in vitro* plantas, posteriormente fueron sembradas en los tubos de ensayos que contenían los tratamientos que se evaluaron (Figura 1).

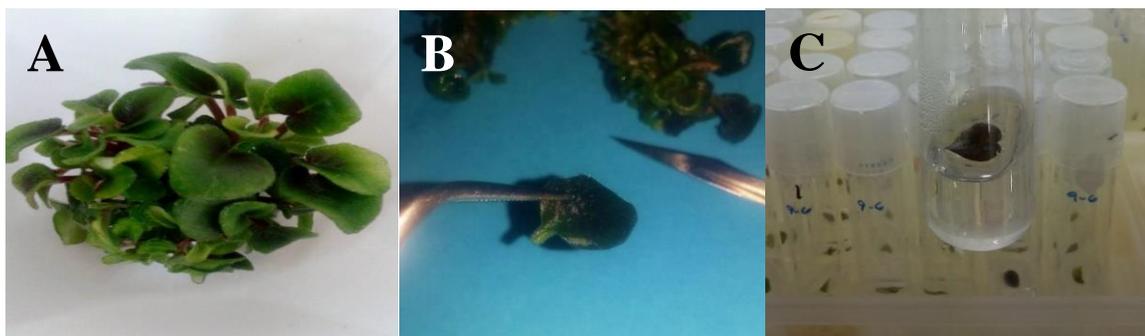


Figura 1. Establecimiento *in vitro* de explantes de hojas de violeta africana. A- Selección de los explantes más vigorosos y del mismo tamaño. B- Separación del explante. C- Siembra de los explantes en los tratamientos.

Preparación y manejo del material vegetal. La siembra se realizó dentro de la cámara de flujo laminar, la cual fue encendida con 15 minutos de anticipación, las paredes y mesón de la misma fueron desinfectadas con etanol al 70%, las pinzas y los bisturís usados fueron previamente lavados con agua y jabón, desinfectados con etanol al 70% y esterilizados durante 15 segundos en los esterilizadores de calor seco a 250-300°C.

Medio de cultivo. La formulación usada fue la de Murashige y Skoog modificada por Kyte (1987) (Cuadro 1). Todos los medios fueron solidificados con 1.8 g de Phytigel[®], el pH se ajustó a 5.8 con KOH o HCL. Los medios fueron esterilizados en autoclave a 15 PSI, a 20 °C durante 20 minutos.

Cuadro 1. Medio de cultivo basal Murashige y Skoog modificado para la inducción de brotes adventicios en hojas de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*).

Componentes	Fórmula	Nombre común	mg L⁻¹
Macro elementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio dihidratado	220.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio	85.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	950.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	185.000
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	825.000
Micro elementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio dihidratado	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Hierro	FeNaEDTA	Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	50.000
Vitaminas		Myo-inositol	100.000
		Tiamina	0.400
Fito-hormona		AIA	1.000
Carbohidratos		Sacarosa	15,000.000

Fuente: Kyte, 1987.

En los tratamientos evaluados se reemplazaron tres reactivos químicos de los macroelementos por fertilizantes. De acuerdo a Arévalo y Castellanos (2011) una de las principales características químicas de los fertilizantes en su solubilidad tanto en agua como en otros compuestos, debido a esto es posible su utilización en medios de cultivo.

Los tres reactivos químicos de los macroelementos que se reemplazaron por fertilizantes se detallan en el cuadro 2.

Cuadro 2: Aportes y diferencias de los nutrientes aplicados al medio de cultivo al reemplazar los reactivos químicos por fertilizantes.

Reactivo químico	Fertilizante	Aporte reactivo químico (%)	Aporte fertilizante (%)	Diferencia (mg)	Diferencia (%)
NH ₄ NO ₃	34.4-0-0	N 35.0	N 34.5	4.125	1.4
KNO ₃	13-0-46	N 13.9	N 13.3	3.400	2.6
		K 38.6	K 36.0	24.800	6.8
MgSO ₄ .7H ₂ O	0-0-0-0-16-13	Mg 9.8	Mg 9.6	0.300	1.6
		S 13.0	S 13.0	0.000	0.0

Los tratamientos fueron los siguientes:

- Tratamiento Reactivos químicos: Se usó el protocolo de Kyte (1987) como testigo, con los macroelementos proporcionados por reactivos químicos.
- Tratamiento Fertilizantes: Se reemplazaron los reactivos: nitrato de amonio, nitrato de potasio y sulfato de magnesio heptahidratado por fertilizantes.
-
- Tratamiento fertilizante NH₄NO₃: Se reemplazó únicamente el reactivo químico nitrato de amonio por el fertilizante.
- Tratamiento fertilizante KNO₃: Se reemplazó únicamente el reactivo químico nitrato de potasio por el fertilizante.
- Tratamiento fertilizante MgSO₄.7H₂O: Se reemplazó únicamente el reactivo químico sulfato de magnesio heptahidratado por el fertilizante.

En todos los tratamientos los demás ingredientes de los macroelementos fueron agregados en forma de reactivo químico. Cada 30 días se hizo un refrescamiento de medio de cultivo para mantener los nutrientes disponibles a cada explante o brote.

Cuadro 3. Resumen de los tratamientos evaluados y su codificación.

Tratamiento (Reemplazo de reactivo químico por fertilizante)	Codificación
1. Reactivos químicos (Testigo)	Reactivos químicos
2. Fertilizantes	$\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{KNO}_3 + \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
3. Fertilizante NH_4NO_3	NH_4NO_3
4. Fertilizante KNO_3	KNO_3
5. Fertilizante $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Incubación. Luego de la siembra los cultivos fueron trasladados al cuarto de crecimiento a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, humedad relativa de 70%, intensidad lumínica de 2000 lux y un fotoperiodo de 16 horas luz y de 8 horas de oscuridad durante 90 días.

Variables a evaluar. Las variables medidas fueron formación de brotes al día 21, peso fresco y peso seco en gramos al día 90.

Toma de peso fresco y peso seco. Para la obtención de datos de peso fresco se procedió a tomar los brotes que se encontraban en medio de refrescamiento con 60 días, se pesaron en la balanza analítica, luego se colocaron en bolsas de papel y se secaron en el horno durante 48 horas, a $65-75^\circ\text{C}$. Luego se tomó el peso seco de cada planta en la balanza analítica.

Diseño experimental y análisis estadístico. Se usó un diseño completo al azar con cinco tratamientos, cincuenta repeticiones por tratamiento. Se realizó un análisis de varianza y una separación de medias con el método Duncan con un nivel de significancia ≤ 0.05 . Los datos fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” versión 9.4[®] (SAS, 2013).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al día siete del establecimiento se observó crecimiento en los explantes, cambio de coloración y formación de estructuras globulares. Al día 15 del establecimiento se observó explantes con brotes adventicios. Al día 21 se observó un alto porcentaje de explantes con brotes en todos los tratamientos. El porcentaje más bajo de explantes con brote se observó en el tratamiento donde se reemplazó el KNO_3 por el fertilizante, esto puede deberse a que la diferencia de nutrientes en este medio fue la más alta (9.4%) ya que no se realizó equiparación molar, si no que únicamente se reemplazaron las fuentes de los nutrientes (Cuadro 4).

En el estudio de Montenegro et al. (2013) usó el un fertilizante de sulfato de potasio y magnesio como sustituto del medio de cultivo para la propagación *in vitro* de banano (*Musa sp*) usando equiparación molar, éste estudio presentó mejores resultados a comparación del testigo el cual contenía el medio de cultivo con las concentraciones totales normales para la propagación *in vitro* de banano.

Cuadro 4. Efecto del reemplazo de tres reactivos químicos por fertilizantes en el porcentaje de explantes con brote al día 21 en violeta africana.

Tratamiento	Unidades observacionales	Explantes con brote (%)
Reactivos químicos	96	82.2ab Σ
Fertilizantes	91	91.2a
NO_3NH_4	97	89.6ab
KNO_3	93	80.6b
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	93	92.4a

Σ : Datos con letras iguales no son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$)

El mayor peso fresco se obtuvo en los tratamientos fertilizantes, nitrato de amonio y sulfato de magnesio, mientras que el tratamiento con nitrato de potasio fue el que presentó el menor peso. En el peso seco también se observaron diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, los tratamientos fertilizantes, nitrato de amonio y sulfato de magnesio heptahidratado presentaron mayor peso seco a comparación de los tratamientos con reactivos químicos y nitrato de potasio (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto del reemplazo de tres reactivos químicos por fertilizantes en el peso fresco y peso seco de brotes adventicios de violeta africana.

Tratamiento	Promedio de peso (g)	
	Peso fresco	Peso seco
Reactivos químicos	4.03b ^Ω	0.15b
Fertilizantes	5.29a	0.20a
NO ₃ NH ₄	4.68ab	0.19a
KNO ₃	2.69c	0.14b
MgSO ₄ .7H ₂ O	4.74ab	0.20a

Ω: Datos con letras iguales no son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Para este estudio únicamente se reemplazaron las cantidades de los ingredientes, no se hizo equiparación molar, se observaron buenos resultados en los tratamientos donde se reemplazaron los tres reactivos químicos a la vez y donde sólo se reemplazó el nitrato de amonio y sulfato de magnesio heptahidratado.

Esto quiere decir que el cultivo evaluado puede ser inducido a brotes adventicios con dosis más bajas en los nutrientes de los macroelementos.

El tratamiento nitrato de potasio, en el cual se reemplazó únicamente este reactivo químico puro por el fertilizante, fue el único que presentó resultados menores, tanto en porcentaje de brotes al día 21 como el peso en fresco y seco, esto puede ser debido a que el fertilizante proporciona 2.6% menos de potasio y 6.8% de nitrógeno en comparación con lo que proporciona el reactivo químico y a que el potasio ayuda en la síntesis y reducción de nitratos y el nitrógeno es el que influencia el crecimiento de las plantas.

En el estudio de Azofeifa et al. (2008) también se realizó una evaluación sustituyendo abonos foliares comerciales para establecimiento *in vitro* de micro estacas de papa cv. Atzimba, realizando equiparación molar, como alternativa a las sales minerales Murashige y Skoog, el tratamiento en el que sustituyeron nitrato de amonio y nitrato de potasio no presentó diferencia significativa e a comparación con el tratamiento MS, además sugieren que los resultados obtenidos permiten considerar el uso de fertilizantes como alternativa de ingredientes de medios de cultivo, al menos por periodos de tiempo limitados.

4. CONCLUSIONES

- Reemplazar tres reactivos químicos puros por fertilizantes, no afecta la formación de brotes, peso fresco y seco en la producción *in vitro* de violeta africana.

5. RECOMENDACIONES

- Usar los fertilizantes en los medios de cultivo haciendo equiparación molar para determinar las cantidades.
- Realizar estudios con otros cultivos y con lapsos de tiempos más prolongados para poder evaluar otros efectos y así recomendar de forma más segura el uso de fertilizantes en medios de cultivos.
- Realizar un análisis de costos que permita tener información sobre la factibilidad de reemplazar los reactivos químicos por fertilizantes.

6. LITERATURA CITADA

- Arévalo de Gauggel G, Castellanos M. 2011. Fertilizantes y Enmiendas.: Programa para la Agricultura Sostenible en Laderas de América Central. Módulo 6. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano(Honduras): Zamorano Academic Press [consultado 2016 sep 27]. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1340/3/03.pdf>.
- Azofeifa Á, Guevara E, Jiménez VM. 2008. Uso de abonos foliares comerciales en la elaboración de medios de cultivo in vitro. *Agronomía Costarricense*; [consultado 2016 sep 20]. 32(2): 151-160. esp. <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/6762>.
- García N. 2009. Uso seguro de plaguicidas e insumos agrícolas: Reducción del escurrimiento de plaguicidas al mar caribe, 1era ed. Medellín(Colombia): Comunicaciones Augura; [consultado 2016 oct 6]. <http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/colombia-1/publicaciones-colombia/cartilla-plaguicidas-definitiva.pdf>.
- Kyte, L. 1987. Plants from test tubes an introduction to micro propagation, 3era. ed. Oregon(USA): Timber Press; [consultado 2016 ago 15]. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19970302077>.
- Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L. 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal; 2da. ed. Buenos Aires(Argentina): INTA; [consultado 2016 sep 14]. http://intainforma.inta.gov.ar/wp-content/uploads/2010/09/bio_WEB.pdf.
- Montenegro Frank, Rojas Consuelo, Quevedo David, Delgado Guillermo. 2013. Efecto del sulpomag y complejos orgánicos como sustitutos parciales del medio de cultivo de micropropagación de *Musa sp.* Cv. Cavendish. *Agronomía Costarricense*; [consultado 2016 sep 14]. 38(1): 157-159. esp. http://www.mag.go.cr/rev_agr/v38n01_147.pdf.
- Poll E, Álvarez MR. 2013. Gesneriaceae, familia de gran interés taxonómico y ornamental.
- Revista UVG; [consultado 2016 sep 3]; 25(6):49-57. esp. http://www.uvg.edu.gt/publicaciones/revista/volumenes/numero-25/6_gesneriaceae.pdf.

- Rojas González S, García Lozano J, Alarcón Rojas M. 2004. Propagación asexual de plantas: Conceptos Básicos y Experiencias con Especies Amazónicas; 1era. ed. Bogotá(Colombia): Produmedios; [consultado 2016 sep 14]. <https://ecojardines.files.wordpress.com/2013/12/propagacinasexualdeplantas.pdf>.
- SAS. 2013. SAS User guide. Statistical Analysis Institute Inc. Cary N.C., United States of America.
- Sharry S, Adema M, Abedini W. 2015. Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro; 1era. ed. La Plata(Argentina): EDULP; [consultado 2016 sep 15]. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento_completo__.pdf-PDFA.pdf?sequence=1.
- Suárez L, Hernández MM. 2008. Efecto de una mezcla de Oligogalacturónidos en la propagación in Vitro de la Yuca (*Manihot esculenta* Crantz), var. CMC-40. Cultivos Tropicales. INCA; [consultado 2016 sep 6] 29(3):47-52. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362008000300007.
- Terenti CM, Verdes P. 2013. Micropropagación de *Saintpaulia ionantha* H. Wendel var. Bangle Blue. Huayllu-Bios.; [consultado 2016 ago 30] 7(2):25-38. <http://www.exactas.unca.edu.ar/HUAYLLUBIOS/num-7/2.pdf>.