

Multiplicación *in vitro* de *Sansevieria trifasciata* utilizando vitroláminas foliares y tejido callogénico

Claudia Florencia Vallejo Rendón

Zamorano, Honduras

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria.

Diciembre, 2007

ZAMORANO

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Multiplicación *in vitro* de *Sansevieria trifasciata* utilizando vitroláminas foliares y tejido callogénico

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

Presentado por:

Claudia Florencia Vallejo Rendón

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2007

La autora 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.

Claudia Florencia Vallejo Rendón

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2007

Multiplicación *in vitro* de *Sansevieria trifasciata* utilizando vitroláminas foliares y tejido callogénico

Presentado por:

Claudia Florencia Vallejo Rendón

Aprobado:

Dinie Espinal de Rueda, M.Sc.
Asesor Principal

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

Alfredo Rueda, Ph.D.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Abelino Pitty, Ph.D.
Coordinador Área Fitotecnia

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

DEDICATORIA

A Dios Padre y a la Virgen María Auxiliadora, por su protección y nunca dejarme sola.

A mis padres, Alex Vallejo y Claudia Rendón, por ser mis guías y protectores, pero sobre todo por el inmenso amor que me brindan todos los días.

A la Negrita, por todo el amor y alegría que me brinda día a día.

A César Nogales, por creer en mí.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y la Virgen María Auxiliadora, por permitirme cumplir una etapa más en mi vida.

Papi y Mami, gracias por todo el amor, por el apoyo que nunca me falta y por el enorme sacrificio que realizaron para cumplir mis anhelos.

Negrita, gracias por consentirme tanto, por todo el amor, alegría y cariño que me ha brindado desde siempre.

A César Nogales, por todo el amor, alegrías, lágrimas y tristezas que vivimos juntos, gracias.

A mis hermanos: Alex, María Alejandra y Cristina María por todo el cariño y apoyo incondicional.

A Lía Guardiola y Alexandra Manueles, por su verdadera amistad y por todos los buenos momentos que vivimos juntas en Zamorano.

A la Ing. Dinie de Rueda, por haber sido más que una asesora, gracias por todo su apoyo, amistad y confianza depositada en mí.

Al Dr. Alfredo Rueda por la gran colaboración para la realización de esta investigación.

Al Ing. Freddy Llive por el aporte brindado en este estudio.

A Daniela Córdova y Julia Gómez por su amistad, compañerismo y por haberme dejado formar parte de “la mara: *in vitro*”, gracias.

A Erica Ramos y Zoila Sandoval, por la linda amistad y la enorme colaboración que me brindaron para poder realizar este proyecto.

A Jorge Sagastume, Josué Castro y Jessica Villatoro por todo el apoyo que me brindaron en Zamorano.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

A mis padres por el enorme sacrificio que han hecho para cumplir mis anhelos.

A la Secretaria de Agricultura y Ganadería de Honduras (SAG) por brindarme la oportunidad de estudiar en Zamorano.

A USAID, por permitirme terminar mis estudios en Zamorano, al brindarme dos años de beca.

RESUMEN

Vallejo, C. 2007. Multiplicación *in vitro* de *Sansevieria trifasciata* utilizando vitroláminas foliares y tejido callogénico. Proyecto especial de graduación para optar al título de Ingeniería en Ciencia y Producción Agropecuaria. Zamorano, Honduras. 20p.

La *Sansevieria trifasciata* ha sido acogida con mucho auge en el mercado como un ornamental de exportación. El objetivo del presente estudio fue desarrollar un protocolo para la segunda etapa de multiplicación, inducción de brotes o etapa II *in vitro* de *Sansevieria trifasciata* utilizando dos tipos de material de inicio: vitroláminas foliares de 1 cm² y tejido callogénico (TC) de 1 cm² provenientes de la primera etapa de establecimiento *in vitro*. Se utilizaron las citocininas BAP y Kinetina en concentraciones de 1.5 y 3 µM respectivamente, en interacción con la auxina 2,4-D en concentraciones de 0 y 5 µM. Se utilizó un Diseño Completo al Azar para medir el efecto de los dos tipos de material de inicio, los cuatro niveles de citocininas y los dos niveles de auxinas. El experimento tuvo 16 tratamientos con tres repeticiones cada una. Las variables analizadas fueron para las vitroláminas foliares: organogénesis directa e inducción y proliferación de TC. Para el TC se evaluó: organogénesis indirecta, proliferación de TC (PTC) y embriogénesis indirecta. En ambos materiales: porcentaje de contaminación y sobrevivencia de los explantes. Al final de la octava semana se subcultivaron a un nuevo medio los frascos con el mayor número de brotes, y se determinó una tasa de multiplicación del cultivo. En las vitroláminas foliares no se observó organogénesis directa, y la mejor respuesta de inducción de TC se obtuvo con 5 y 3 µM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente. En TC la mejor respuesta de organogénesis indirecta se obtuvo utilizando 0 y 3 µM de 2,4-D y BAP, respectivamente. Para la PTC la mejor respuesta se obtuvo utilizando 5 y 3 µM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente. No hubo respuesta para la embriogénesis indirecta en TC. Al final del experimento se registró una contaminación de 14%, correspondiendo 12% a bacterias y un 2% a hongos, y una sobrevivencia del 86%. Al final de la octava semana se subcultivaron 37 frascos. Seis semanas después de haberse subcultivado se obtuvieron 116 nuevos frascos, con una tasa promedio de multiplicación para el subcultivo S₂ de 2.0. Se recomienda continuar con los subcultivos 2 y 3 antes de proceder con la etapa de enraizamiento *in vitro*.

Palabras clave: Callogénesis, micropropagación, organogénesis, regeneración, tasa de multiplicación.

CONTENIDO

Portadilla	i
Autoría.....	ii
Página de firmas	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos.....	vi
Resumen	viii
Contenido	ix
Índice de cuadros.....	x
Índice de figuras	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
CONCLUSIONES.....	16
RECOMENDACIONES.....	17
LITERATURA CITADA	18
ANEXOS	19

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Concentraciones hormonales para el ensayo de proliferación de brotes e inducción callogénica <i>in vitro</i> de <i>Sansevieria trifasciata</i> . Zamorano, Honduras. 2007	4
2. Efecto de la interacción del 2,4-D con BAP y Kinetina en la inducción de tejido callogénico en la etapa de multiplicación de brotes de <i>Sansevieria trifasciata</i> , utilizando vitroláminas foliares. Zamorano, Honduras. 2007.....	8
3. Efecto de la concentración de BAP y Kinetina en la estimulación y formación indirecta de brotes en tejido callogénico en la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Sansevieria trifasciata</i> . Zamorano, Honduras. 2007	9
4. Efecto de la interacción del 2,4-D con BAP y Kinetina en la estimulación y formación de brotes en la etapa de multiplicación de <i>Sansevieria trifasciata</i> utilizando TC. Zamorano, Honduras. 2007	10
5. Efecto de la concentración de BAP y Kinetina en la proliferación de tejido en la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Sansevieria trifasciata</i> , utilizando tejido callogénico. Zamorano, Honduras. 2007	11
6. Efecto de la interacción del 2,4-D con BAP y Kinetina en la proliferación de tejido callogénico en la etapa de multiplicación de brotes de <i>Sansevieria trifasciata</i> , utilizando tejido callogénico. Zamorano, Honduras. 2007.....	12
7. Tasa de Multiplicación al final del subcultivo S ₂ en los tratamientos con mayor producción de brotes utilizando tejido callogénico en la etapa de multiplicación de <i>Sansevieria trifasciata</i> . Zamorano, Honduras. 2007.....	14

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Inducción de tejido callogénico de <i>Sansevieria trifasciata</i> utilizando vitroláminas foliares y una combinación de 5 y 3 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente	8
2. Producción de brotes utilizando tejido callogénico en <i>Sansevieria trifasciata</i> y una concentración de 0 y 3 μM de 2,4-D y BAP, respectivamente	10
3. Proliferación de tejido callogénico en <i>Sansevieria trifasciata</i> utilizando tejido callogénico y una combinación de 5 y 3 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente	12

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Página
1. Medio básico Linsmaier y Skoog (LS) utilizado para la estimulación de brotes e inducción callogénica <i>in vitro</i> de <i>Sansevieria trifasciata</i> utilizando vitroláminas foliares y tejido callogénico. Zamorano, Honduras, 2007.	19

INTRODUCCIÓN

La *Sansevieria trifasciata*, conocida comúnmente como “Lengua de Suegra” o “Espada de San Jorge”, ha sido acogida en la actualidad con mucho auge en el mercado de exportación. La mayoría de fincas han girado su producción a la explotación de esta planta tan poco común que presenta una rara y única belleza como ornamental. Los ingleses le dan el nombre de ‘bastón de la suegra’ por ser sus hojas puntiagudas y largas (Kromdijk 1974).

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 sin embargo, en la actualidad la mayoría de estas plantas son producidas en Centro América y el Caribe (Griffith 1998). Es una de las pocas plantas que puede ser utilizada para interiores y exteriores, soporta la atmósfera seca y caliente de las habitaciones, la luz pobre y la falta de riego, razones por las cuales, resulta sumamente adecuada para quienes no disponen de tiempo para su cuidado o para la decoración de lugares públicos.

La propagación de *Sansevieria trifasciata* se puede llevar por métodos sexuales o asexuales, ya sea utilizando técnicas convencionales o los métodos más sofisticados de reproducción *in vitro*. La propagación convencional de esta especie es a través de cortes de la hoja o de la división de raíces, regenerando los órganos que le faltan hasta conseguir formar una planta completa (Ronquillo López 2005).

“La micropropagación es una técnica de reproducción bajo condiciones totalmente asépticas, con la gran ventaja de que a partir de una porción inicial de tejido vegetativo es posible regenerar en poco tiempo, miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre” (Sánchez 2005). La regeneración de plantas por medio de la organogénesis, es decir a partir de tejido meristemático utilizando diferentes concentraciones de hormonas, o a partir de la embriogénesis somática, derivada de células somáticas, de forma directa o indirecta, ha sido utilizada como una importante fuente en la propagación de cultivos.

La utilización de hormonas sintéticas en el cultivo de tejidos proporciona un adecuado y seguro desarrollo del tejido vegetal. “Las auxinas que más se utilizan en el establecimiento de los cultivos son: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftaleneacético (ANA), ácido indoleacético (AIA); las citocininas que más se emplean son: Kinetina y 6-bencilaminopurina (BAP)”(Montoya 1991). En 1957, Skoog y Miller demostraron, el modo en que cualquier cambio del equilibrio entre citocininas y auxinas, puede afectar las expresiones del crecimiento *in vitro*; cuando la cantidad de citocininas es baja en proporción con las auxinas, se produce un desarrollo en las raíces; pero cuando la proporción de citocininas es elevada, se desarrollan las yemas y los brotes. Las auxinas en altas concentraciones fomentan la división celular (desarrollo de tejido callogénico), y a partir de este tejido se desprende el crecimiento de raíces y brotes (Weaver 1989).

Tukan Agro Products es una de las empresas hondureñas de mayor auge de exportación de ornamentales hacia los Estados Unidos, Asia y Europa. Esta finca está ubicada en Santa Cruz de Yojoa, Cortés, Honduras, y centra su producción en ornamentales de exterior tales como: *Schefflera nora*, *Schefflera capela* y de interior: *Zamioculcas zamiifolia* y *Scindapsus aureum*. Tukan Agro Products comenzó con la producción de *Sansevieria trifasciata* recientemente, representando altos rubros de ingresos, ya que es considerada una planta muy llamativa para el consumidor por su apariencia física y su resistencia al estrés ambiental.

Con el estudio realizado anteriormente por Ronquillo López (2005) se logró establecer las condiciones necesarias para el establecimiento *in vitro* y la inducción callogénica de *Sansevieria trifasciata*, utilizando láminas foliares de 1 cm² como explantes, procedentes de hojas jóvenes. En este estudio, la mejor formulación nutritiva fue la de Linsmaier & Skoog (1965) con una concentración de 0 y 1 mg/L de BAP y 2,4-D, respectivamente.

En esta investigación se pretende establecer un protocolo adecuado para la siguiente etapa *in vitro* del cultivo: la etapa II o etapa de multiplicación o proliferación de brotes de *Sansevieria trifasciata*, a partir de vitroláminas foliares y tejido callogénico en incubación, procedentes de la primera etapa de establecimiento *in vitro*.

Los objetivos específicos de la investigación fueron determinar el mejor tipo de material de inicio para la proliferación de brotes *in vitro* de *Sansevieria trifasciata*; evaluar el efecto de dos concentraciones de la auxina 2,4-D durante la etapa de multiplicación *in vitro* en ambos tipos de material de inicio; evaluar el efecto de las citocininas BAP y Kinetina, en dos concentraciones cada una y en interacción con la auxina 2,4-D, durante la etapa de multiplicación, para ambos tipos de material de inicio; establecer la tasa de multiplicación *in vitro* de *Sansevieria trifasciata* y poder determinar el número de frascos con vitroplantas para el subcultivo 2 (S₂).

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente ensayo se llevó a cabo durante los meses Junio-Agosto de 2007 en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Reproducción *in vitro* (LCTRIV) 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 (Ronquillo López 2005).

Reactivos: Entre los reactivos se utilizó la auxina 2,4-D y las citocininas Kinetina y BAP, cada una utilizada de acuerdo al tratamiento correspondiente; Etanol al 70% utilizado para la adecuada esterilización de la cámara de flujo laminar y demás utensilios de laboratorio al momento de entrar al cuarto de transferencias. Como agente gelatinizante se utilizó Gelrite, a razón de 2 g/L para la adecuada solidificación del medio y soporte de los explantes. Para la limpieza de utensilios y elaboración de los medios de cultivo se utilizó agua destilada.

El medio nutritivo básico sólido utilizado fue Linsmaier y Skoog (1965) para estimular la formación de brotes y la inducción y proliferación callogénica, de acuerdo al material de inicio a utilizar (Anexo1).

Entre el material vegetal utilizado, la mitad de los explantes se obtuvo a partir de tejido callogénico procedente de explantes foliares establecidos en la cámara de incubación del LCTRIV con una edad de tres meses. La otra mitad de material se obtuvo a partir de vitrohojas derivadas de vitroplantas establecidas en el laboratorio con una edad de seis meses.

Se elaboraron 20 L de medio de cultivo utilizando bikers de 500 ml. Cada biker se llenó con agua destilada y seguidamente se añadieron las soluciones madre de macronutrientes, micronutrientes, hierro en las cantidades recomendadas según la formulación básica utilizada, así como la respectiva concentración de vitaminas, sacarosa y hormonas de acuerdo al tratamiento y material de inicio a utilizar (Cuadro 1). Posteriormente se ajustó el pH a 5.8, utilizando soluciones de hidróxido de potasio o ácido clorhídrico. Finalmente se colocó el agente gelificante, Gelrite, a razón de 2 g/L.

El medio se dispensó en los frascos de cristal, a razón de 20 ml por frasco. Finalmente el medio de cultivo de cada frasco fue esterilizado en un autoclave durante 25 minutos a 120°C y 15 PSI de presión (Oliva Chávez 2003).

Cuadro 1. Concentraciones hormonales para el ensayo de proliferación de brotes e inducción callogénica *in vitro* de *Sansevieria trifasciata*. Zamorano, Honduras, 2007.

Material de Inicio	μM		
	2,4-D ^Ω	BAP ^Ψ	Kinetina
Vitrolámina foliar	0	1.5	
Vitrolámina foliar	0	3.0	
Vitrolámina foliar	5	1.5	
Vitrolámina foliar	5	3.0	
Vitrolámina foliar	0		1.5
Vitrolámina foliar	0		3.0
Vitrolámina foliar	5		1.5
Vitrolámina foliar	5		3.0
Tejido callogénico	0	1.5	
Tejido callogénico	0	3.0	
Tejido callogénico	5	1.5	
Tejido callogénico	5	3.0	
Tejido callogénico	0		1.5
Tejido callogénico	0		3.0
Tejido callogénico	5		1.5
Tejido callogénico	5		3.0

^Ω 2,4-Diclorofenoxiacético ^Ψ 6- Bencilaminopurina

Vitroláminas Foliars: De la cámara de incubación se cosecharon vitroplantas establecidas, que fueron extraídas de los frascos y colocados en un plato petri. Con bisturí y pinzas totalmente esterilizados se seccionó cada vitroplanta seleccionando las vitroláminas foliars en porciones de 1 cm², de acuerdo a lo establecido en el protocolo de establecimiento anterior. Cada porción se colocó de manera horizontal polar, en un frasco conteniendo su respectivo tratamiento. Cada frasco fue sellado con papel aluminio y parafilm para evitar la entrada de patógenos, y transportado al cuarto de crecimiento bajo un fotoperíodo de luz:oscuridad de 16:8 horas y una temperatura promedio de 25°C durante las ocho semanas. Se utilizaron lámparas fluorescentes “cool white” de 8 pies (2.4 m) de largo espaciadas a 50 cm con una intensidad cada lámpara de 1000-3000 lux.

Tejido Callogénico (TC): De la cámara de incubación se cosechó TC establecido, extraído de los frascos y colocados en un plato petri. Por medio de pinzas esterilizadas se seleccionó el TC adecuado en porciones de 1cm². Cada nueva porción de TC fue colocada de manera vertical en un frasco con su respectivo tratamiento. Los frascos se trasladaron al cuarto de crecimiento bajo un fotoperíodo de luz:oscuridad de 16:8 horas y una temperatura promedio de 25°C. Se utilizaron lámparas fluorescentes “cool white” de 8 pies (2.4 m) de largo espaciadas a 50 cm y con una intensidad cada lámpara de 1000-3000 lux.

Para el análisis estadístico del experimento se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con un arreglo factorial (2 × 4 × 2) donde:

Factor A, los dos tipos de material de inicio, provenientes de TC o vitroláminas foliares. **Factor B**, cuatro concentraciones de citocininas; dos de BAP (1.5 y 3 μM) y dos de Kinetina (1.5 y 3 μM). **Factor C**, dos concentraciones de la auxina 2,4-D (0 y 5 μM).

El experimento constó de 16 combinaciones o tratamientos, tres repeticiones por tratamiento, 20 frascos por repetición para un total de 960 frascos. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS[®] 2005, a través de ANDEVA, utilizando un modelo lineal general (GLM), el grado de significancia fue determinado con una probabilidad de 0.05, y la prueba Duncan para la separación de medias.

La **respuesta regenerativa** observada en cada material varía de acuerdo al tratamiento.

Para las **vitroláminas foliares** se evaluó:

Organogénesis directa: A través de la presencia o ausencia de brotes, se evaluó una vez por semana a través de valores categorizados de acuerdo al número de brotes observados, indicando 0 como la ausencia de brotes, 1 para una brotación leve (1 a 3 brotes); 2 representando una brotación intermedia (4 a 6 brotes) y el valor de 3 indicando una brotación profusa (> 6 brotes).

Inducción de tejido callogénico (TC): La formación de TC se evaluó una vez por semana categorizando de la siguiente manera: 0 indicando que no hubo formación de TC, 1 para una formación leve de TC en el contenedor (1-25%), 2 indicando una formación intermedia de TC (26-50%), y 3 para una formación profusa de TC en el contenedor (> 51%).

Para el **tejido callogénico (TC)** se evaluó:

Proliferación de tejido callogénico (TC): Se categorizó la expansión o crecimiento de TC utilizando los mismos valores de categorización; 0 indicando que no hubo expansión en la formación de TC, 1 para una expansión leve de TC en el frasco (1-25%), 2 indicando una expansión intermedia de TC en el frasco (26-50%), y 3 para una expansión profusa de TC en el frasco(> 51%).

Organogénesis indirecta: La presencia o ausencia de brotes se evaluó una vez por semana a través de valores categorizadas de acuerdo al número de brotes observados, indicando 0 como la ausencia de brotes, 1 para una brotación leve (1 a 3 brotes); 2 representando una brotación intermedia (4 a 6 brotes) y el valor de 3 indicando una brotación profusa (> 6 brotes).

Embriogénesis indirecta: De igual manera se evaluó una vez a la semana cada siete días la formación de embriones somáticos a partir de tejido callogénico.

En **ambos materiales** se evaluó:

Sobrevivencia: Durante las ocho semanas de observación, una vez por semana se determinó el número de explantes vivos, libres de contaminación, hasta el final de la octava semana.

Contaminación: Se evaluó en cada frasco la presencia o ausencia de contaminación, como también si la contaminación fue causada por hongo, bacteria o ambas.

Tasa de multiplicación (TM)

La tasa de multiplicación indica la cantidad de frascos con vitroplantas que se pueden obtener de un solo frasco, al realizar la transferencia entre subcultivos y etapas anteriores. Los frascos que presentaron el mayor número de brotes (2 a 5 brotes) durante las ocho semanas de observación, fueron subcultivados a un nuevo medio de cultivo S₁ y seguidamente fueron subcultivados a un medio de cultivo S₂. Para obtener la tasa de multiplicación promedio al final del subcultivo S₂ se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{TMFS}_2 = \frac{\text{Fascos no contaminados al final (S}_2\text{)}}{\text{Fascos transferidos de la etapa II}}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VITROLÁMINAS FOLIARES:

La respuesta regenerativa observada a partir de vitroláminas foliares varió de acuerdo a la concentración e interacción de las hormonas presentes en cada tratamiento.

Organogénesis directa

No se observó la formación directa de brotes a partir de vitroláminas foliares durante las ocho semanas del experimento. Las diferentes interacciones establecidas no influyeron en la formación de brotes; las citocininas BAP y Kinetina utilizadas a diferentes concentraciones no tuvieron efecto sobre la formación directa de brotes ($P < 0.05$).

Inducción de tejido callogénico (TC)

Durante las ocho semanas del estudio se observó 47.8% de inducción y formación de TC, presentando TC en categoría 1 (0-25% de TC cubriendo el frasco) al final del experimento.

La concentración de la auxina 2,4-D utilizada influyó significativamente la inducción de TC en vitroláminas foliares. Las auxinas generalmente inducen a la formación de TC (Pierik 1990) y en este caso la concentración de 5 μM de 2,4-D fue significativamente superior a la concentración de 0 μM , ya que la primera promovió una mayor inducción de TC a partir de los explantes foliares.

La formación de TC puede ser estimulada por una variedad de auxinas y citocininas (Montoya 1991). Existen especies que para la inducción de TC *in vitro* requieren el suplemento de una auxina, otras requieren solamente de una citocinina, otras de auxina y de citocinina o simplemente responden al estímulo del medio bajo el cual se encuentran.

Las interacciones entre citocinina–auxina constituyeron un papel fundamental en la formación de TC, presentando una alta diferencia regenerativa. La adición de la auxina 2,4-D (5 μM) en conjunto con la citocinina Kinetina (3 μM) promovieron un mejor desarrollo de tejido callogénico (0-25% de TC en el contenedor) en las vitroláminas foliares (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de la interacción del 2,4-D con BAP y Kinetina en la inducción de tejido calogénico en la etapa de multiplicación de brotes de *Sansevieria trifasciata*, utilizando vitroláminas foliares. Zamorano, Honduras. 2007.

Concentración Hormonal (μM)			Inducción de tejido calogénico ¹
2,4-D ^Ω	Kinetina	BAP ^Ψ	
0		1.5	0 ^e
0		3.0	0 ^e
5		1.5	1.06 ^{bc}
5		3.0	0.76 ^{bcd}
0	1.5		0 ^e
0	3.0		0 ^e
5	1.5		1.16 ^{ab}
5	3.0		1.33 ^a

^{abcde} Medias con letras diferentes difieren estadísticamente a $P < 0.05$

¹ Promedio Inducción de TC: 0= 0% TC 1= 1-25% TC, 2=26-50% TC

^Ω 2,4-Diclorofenoxiacético ^Ψ 6- Bencilaminopurina

Al final de la octava semana, 95% de los explantes indujo TC, utilizando la concentración de 5 y 3 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente. A partir de la segunda semana se pudo observar inicios de la inducción de TC en un 20% de las vitroláminas foliares. Durante las ocho semanas del experimento se pudo observar un incremento lineal estable en el porcentaje de frascos con TC para la concentración de 5 y 3 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente (Figura 1).

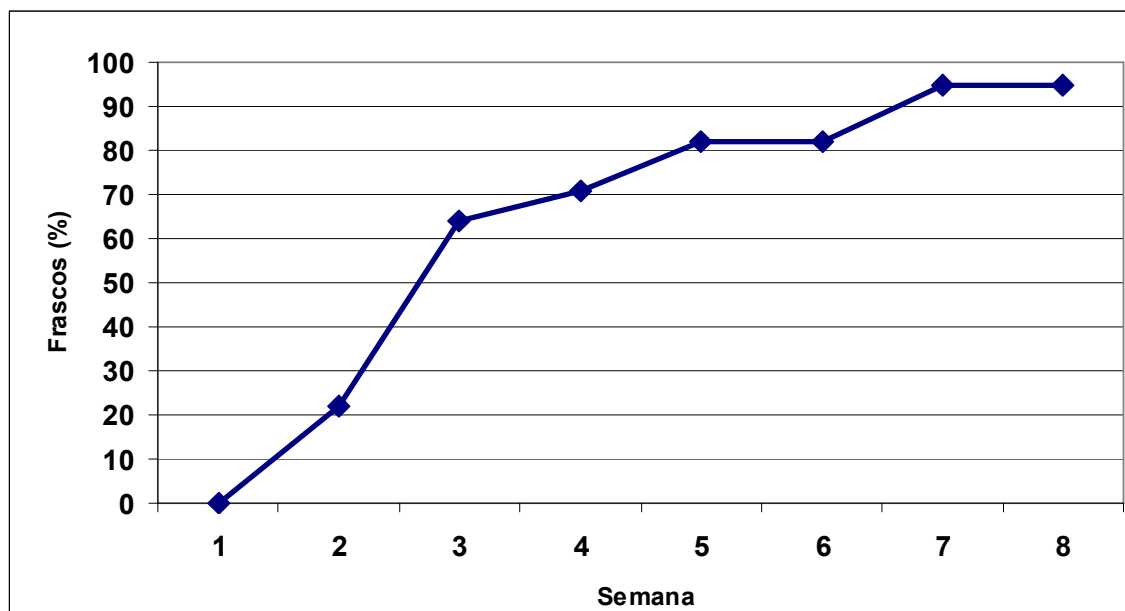


Figura 1. Inducción de tejido calogénico de *Sansevieria trifasciata* utilizando vitroláminas foliares, y una combinación de 5 y 3 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente.

TEJIDO CALLOGÉNICO (TC):

Organogénesis indirecta

En el material de inicio de TC se observó 20.8% de formación y proliferación de brotes, en comparación con las vitroláminas foliares. La característica más importante del TC es la totipotencialidad de sus células, ya que en general, con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales tienen una alta capacidad de desarrollar brotes, raíces y embriones (Hurtado y Merino 1994).

La Kinetina y el BAP fueron evaluados en dos concentraciones cada una. Se concluyó que existe una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las citocininas utilizadas y sus respectivas concentraciones. La citocinina BAP a una concentración de 3 μM fue significativamente superior a las concentraciones de 3 μM de Kinetina y 1.5 μM de BAP, sin embargo, no presentó diferencia significativa cuando se utilizó 1.5 μM de Kinetina para estimular la formación de brotes en TC (Cuadro 3). Las citocininas tienen un papel fundamental en la organogénesis, ya que pueden inducir yemas adventicias, en tejidos cultivados *in vitro* de callo, hojas, raíces o piezas de tallo (Hurtado y Merino 1994).

Cuadro 3. Efecto de la concentración de BAP y Kinetina en la estimulación y formación indirecta de brotes en tejido callogénico en la multiplicación *in vitro* de *Sansevieria trifasciata*. Zamorano, Honduras. 2007

Citocinina	Concentración	Formación indirecta de brotes ¹
BAP ^ψ	1.5 μM	0.08 ^b
BAP	3.0 μM	0.19 ^a
Kinetina	1.5 μM	0.10 ^{ab}
<i>Kinetina</i>	3.0 μM	0.02 ^b

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

¹ Promedio de Formación indirecta de Brotes: 0=0 Brotes, 1= 1-3 Brotes, 2= 4-6 Brotes.

^ψ 6-Benilaminopurina

Las concentraciones de 2,4-D utilizadas en tejido callogénico influyeron en la formación de brotes; en la ausencia de 2,4-D se observó mayor formación de brotes. Existen muchos cultivos que exigen requisitos absolutos de citocininas en adición a la auxina utilizada para la formación de brotes.

Al igual que sucede en el caso de las vitroláminas foliares, el exceso de auxinas puede suprimir la división y crecimiento celular. Por tanto el balance auxina:citocinina es un factor muy importante en la regulación del crecimiento del cultivo vegetal (Hurtado y Merino 1994).

La interacción entre las citocininas y auxinas evaluadas proporcionó una alta significancia en los resultados. La mayor formación de brotes (0.6) se observó utilizando

0 y 3 μM de 2,4-D y BAP, respectivamente (Cuadro 4). La relación alta:baja de citocininas:auxinas estimula una alta producción de brotes.

Cuadro 4. Efecto de la interacción del 2,4-D con BAP y Kinetina en la estimulación y formación de brotes en la etapa de multiplicación de *Sansevieria trifasciata* utilizando tejido callogénico. Zamorano, Honduras. 2007.

Concentración	Hormonal	(μM)	Brotes ¹
2,4-D ^Ω	KIN	BAP ^Ψ	
0		1.5	0.13bc
0		3.0	0.60 ^a
5		1.5	0.16 ^{bc}
5		3.0	0.16 ^{bc}
0	1.5		0.33 ^b
0	3.0		0.06 ^c
5	1.5		0.13 ^{bc}
5	3.0		0.03 ^c

^{abc} Medias con letras diferentes difieren estadísticamente a $P < 0.05$

¹ Promedio de Formación de Brotes: 0=0 Brotes, 1= 1-3 Brotes, 2= 4-6 Brotes.

^Ω 2,4-Diclorofenoxiácetico ^Ψ 6-Bencilaminopurina

Utilizando la mejor concentración hormonal, (3 y 0 μM de 2,4-D y BAP, respectivamente) al final de la octava semana un 58 % de los explantes presentaron brotación. A partir de la segunda semana se puede observar el incremento semanal de frascos con brote. Se observó un comportamiento lineal durante toda la duración del experimento (Figura 2).

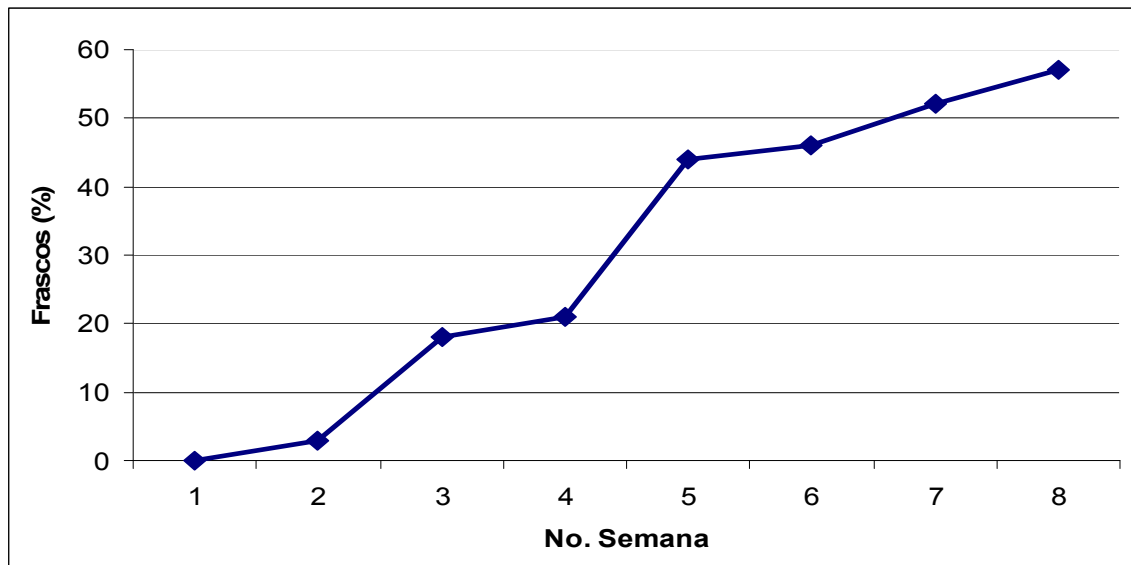


Figura 2. Producción de brotes utilizando tejido callogénico en *Sansevieria trifasciata* y una concentración de 0 y 3 μM de 2,4-D y BAP, respectivamente.

Proliferación de tejido callogénico (PTC)

Las células callogénicas presentan una proliferación continua y acelerada, dando origen a una apariencia desorganizada, que posteriormente se regenerará en órganos o en el crecimiento de tejido calloso. Al final del experimento se presentó una PTC (75%) de categoría 2 (26-50% de TC cubriendo el contenedor).

La concentración de auxina 2,4-D influyó significativamente durante las ocho semanas en la PTC. Las auxinas generalmente inducen a la expansión celular (Pierik 1990), es así como al utilizar la concentración de 5 μM de 2,4-D se observó una expansión y crecimiento significativo del tejido callogénico.

Un callo puede formar brotes, raíces, embrioides, o simplemente continuar proliferando como callo, dependiendo de las cantidades relativas de auxinas y citocininas suministradas (Hurtado y Merino 1994). La formación de tejido callogénico puede ser estimulada por una variedad de auxinas y/o citocininas (Montoya 1991). La concentración de 3 μM de Kinetina proporcionó una mejor proliferación de tejido callogénico (0.7), aunque no presentó diferencia significativa ($P < 0.05$) al utilizar 1.5 μM de Kinetina (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto de la concentración de BAP y Kinetina en la proliferación de tejido callogénico en la multiplicación *in vitro* de *Sansevieria trifasciata*, utilizando tejido callogénico. Zamorano, Honduras. 2007

Citocinina	Concentración	Proliferación de tejido callogénico ¹
BAP ^ψ	1.5 μM	0.43 ^b
BAP	3.0 μM	0.38 ^b
Kinetina	1.5 μM	0.58 ^{ab}
<i>Kinetina</i>	3.0 μM	0.74 ^a

^{a y b} medias con diferente letra difieren estadísticamente a $P < 0.05$. ^ψ 6-Bencilaminopurina

¹ Proliferación de tejido callogénico: 0= 0% TC, 1= 1-25% TC, 2=26-50% TC.

Las interacción entre citocininas–auxinas constituyó un papel fundamental en la PTC, presentando una alta diferencia significativa (1.3) al utilizar 5 y 3 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente. La interacción de auxinas y citocininas en concentraciones medias trae como resultado la proliferación organizada del TC (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de la interacción del 2,4-D con BAP y Kinetina en la proliferación de tejido callogénico en la etapa de multiplicación de brotes de *Sansevieria trifasciata*, utilizando tejido callogénico. Zamorano, Honduras. 2007.

Concentración Hormonal		(μM)	Tejido callogénico ¹
2,4-D ^Ω	Kinetina	BAP ^Ψ	
0		1.5	0.23 ^{cd}
0		3.0	0.16 ^d
5		1.5	0.40 ^c
5		3.0	0.60 ^{bc}
0	1.5		0.33 ^{bc}
0	3.0		0.30 ^{bc}
5	1.5		0.83 ^{bc}
5	3.0		1.33 ^a

^{abcd}medias con letras diferentes difieren estadísticamente a $P < 0.05$

¹ Promedio de Formación de TC: 0= 0% TC, 1= 1-25% TC, 2=26-50% TC.

^Ω 2,4-Diclorofenoxiacético ^Ψ 6-Bencilaminopurina

A través de las ocho semanas del experimento, se pudo observar un crecimiento lineal en la PTC utilizando la concentración de 5 y 3 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente, alcanzando una PTC en 85% de los explantes durante la semana ocho. A partir de la primera semana se inició la PTC en los explantes (Figura 3).

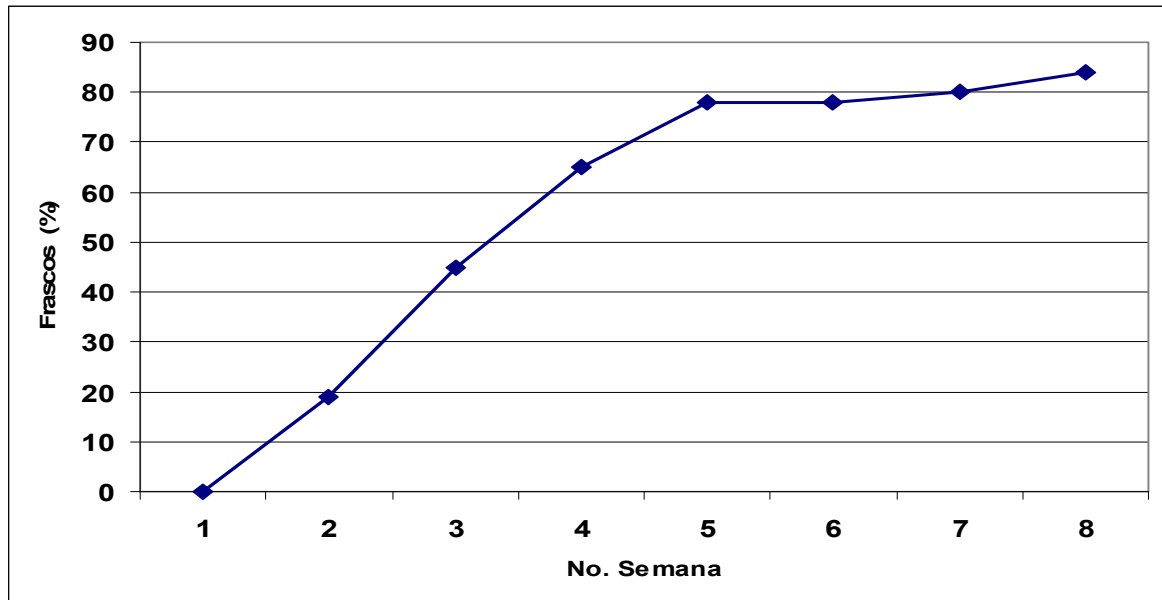


Figura 3. Proliferación de tejido callogénico utilizando tejido callogénico en *Sansevieria trifasciata* y una combinación de 5 y 3 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente.

Embriogénesis indirecta

La formación de embriones somáticos a partir de TC no fue observada en ninguna de las interacciones durante las ocho semanas del ensayo. Se debe tener en cuenta que la tendencia embriogénica en los cultivos parece ser específica de cada especie, unas tienden a formar embriones y otros órganos (Montoya 1991).

AMBOS MATERIALES:

Contaminación

El nivel de contaminación observado al final de las ocho semanas fue de un 14%, correspondiendo un 12% a bacterias y un 2% a hongos. La mayor contaminación por bacterias pudo deberse a una contaminación endógena latente de los tejidos del material, que se expresan en las etapas más avanzadas del cultivo *in vitro*. Además, esta la posibilidad también del manejo de las condiciones asépticas del laboratorio, ya que el 100% del material de inicio estaba ya establecido en las cámaras de incubación sin la necesidad de desinfectar el material al momento de la siembra.

El nivel de sobrevivencia al final de la octava semana fue de 86%, correspondiendo en un 45% de vitroláminas foliares y un 46% de TC.

Tasa de multiplicación (TM)

Constantemente se debe evaluar las vitroplantas en los diferentes subcultivos. La cantidad total de vitroplantas se divide de un subcultivo a otro, con el fin de favorecer el desarrollo óptimo de la planta y poder disminuir la competencia por nutrientes. El número de subdivisiones o subcultivos se repite cuantas veces sea necesario sin dañar la estabilidad del cultivo (Lara Chávez 2001).

Para obtener una TM promedio del cultivo se tomaron en cuenta los tratamientos con TC que presentaron el mayor número de brotes durante las ocho semanas del experimento en la etapa II de multiplicación: **A**: 3 y 0 μM de BAP y 2,4-D, respectivamente y **B**: 1.5 y 0 μM de KIN y 2,4-D. Estos tratamientos presentaron de 1 a 5 brotes por frasco al final de la octava semana, fueron subcultivados a un nuevo medio de cultivo y se mantuvieron en observación por seis semanas.

Los nuevos brotes fueron subcultivados a un mismo medio básico de cultivo Linsmaier y Skoog con las concentraciones hormonales de 3 y 0 μM de BAP y 2,4-D, respectivamente. Se utilizó este medio debido a que fue la combinación que obtuvo la mejor respuesta de brotación en TC durante el experimento.

Combinación A: Al final de la octava semana, 24 frascos de esta combinación con porciones de tejido callogénico de 1 cm^2 , presentaron de 1 a 5 brotes por frasco. Cada frasco fue subcultivado a un medio de cultivo fresco S₁. Se obtuvieron 2.5 frascos aproximadamente, por frasco subcultivado para un total de 60 frascos subcultivados.

Los frascos se mantuvieron en observación durante seis semanas que fue el tiempo de incubación del primer subcultivo. Al final del subcultivo (S_1) 46 frascos se encontraban listos para ser transferidos a un subcultivo S_2 . Se obtuvieron 80 nuevos frascos en el segundo subcultivo, con un promedio de 1.74 frascos por cada frasco procedente de S_1 .

Tomando en cuenta ambas TM para la combinación A en el primero y segundo subcultivo, se obtuvo una TM promedio de 2.1 frascos por cada frasco subcultivado.

Combinación B: Al finalizar las ocho semanas, la combinación B presentó la segunda mayor cantidad de brotes por frasco (1 a 3 brotes/frasco) al final de la etapa II de multiplicación. De este tratamiento se subcultivaron 13 frascos en un nuevo medio S_1 , obteniéndose 29 nuevos frascos en total para el S_1 , es decir que se obtuvo 2.23 frascos por cada frasco. Luego de seis semanas de observación del subcultivo S_1 , 27 frascos se encontraban listos para ser transferidos al subcultivo S_2 , donde se obtuvieron 1.30 frascos por cada frasco subcultivado del S_2 para un total de 35 nuevos frascos.

Tomando en cuenta ambas TM para la combinación B en el primero y segundo subcultivo, se obtuvo una TM promedio de 1.8 frascos por cada frasco subcultivado.

Considerando las TM promedio al final del S_2 se obtuvo una TM final promedio de 2.0, lo que significa que por cada frasco procedente del subcultivo 2 se obtuvieron 2 nuevos frascos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Tasa de Multiplicación al final del subcultivo S_2 en los tratamientos con mayor producción de brotes utilizando tejido callogénico en la etapa de multiplicación de *Sansevieria trifasciata*. Zamorano, Honduras. 2007.

Combinación	Etapa						
	II (No. de Frascos ¹)	TM EII	Subcultivo 1 (S_1) (No. de Frascos)	Final S_1 (No. de Frascos ²)	TM S_1	Subcultivo 2 (S_2) (No. de Frascos)	TMFS ₂
A	24	2.50	60	46	1.74	80	2.1
B	13	2.23	29	27	1.30	35	1.8
Total	37		89	73		115	
Promedio	18.5		45.0	36.5		57.5	2.0

TMFS₂ = Tasa de Multiplicación Promedio al Final del Subcultivo 2.

TM EII= Tasa de multiplicación al Final de la etapa II.

TM S_1 = Tasa de multiplicación al Final del Subcultivo 1.

¹ Número de frascos transferidos a la etapa II (E II).

² Número de frascos al final del subcultivo 1 (S_1).

CONCLUSIONES

1. En vitroláminas foliares no se observó respuesta para la formación directa de brotes *in vitro* de *Sansevieria trifasciata* bajo ninguna concentración hormonal.
2. En vitroláminas foliares la mejor inducción de tejido callogénico (0.9) utilizando 2,4-D se observó a una concentración de 5 μ M.
3. En vitroláminas foliares la mejor inducción de tejido callogénico (1.3) utilizando 2,4-D y Kinetina se observó utilizando 5 y 3 μ M, respectivamente.
4. En tejido callogénico la mejor formación indirecta de brotes (0.6) se observó utilizando una concentración hormonal de 0 y 3 μ M de 2,4-D y BAP, respectivamente.
5. En tejido callogénico la mejor proliferación de tejido callogénico se observó utilizando una concentración de 5 y 3 μ M de 2,4-D y Kinetina, respectivamente.
6. No se observó respuesta para la formación de embriones somáticos a partir de tejido callogénico.
7. En la multiplicación *in vitro* de *Sansevieria trifasciata* la tasa de multiplicación al final del subcultivo S₂ fue de 2.0, lo cual indica que a partir de un frasco se obtuvieron 2.0 nuevos frascos.

RECOMENDACIONES

1. Para la inducción callogénica *in vitro* de *Sansevieria trifasciata* a partir de vitroláminas foliares, utilizar una concentración hormonal de 3 y 5 μM de Kinetina y 2,4-D, respectivamente.
2. Para la reproducción masiva y la multiplicación indirecta de brotes *in vitro* de *Sansevieria trifasciata* a partir de tejido callogénico, utilizar una concentración hormonal de 3 y 0 μM BAP y 2,4-D respectivamente.
3. Continuar con los subcultivos 2 y 3 para la multiplicación de brotes *in vitro* de *Sansevieria trifasciata* y continuar evaluando las tasas de multiplicación *in vitro* de *Sansevieria trifasciata* .
4. Realizar un estudio económico para la etapa de multiplicación de brotes *in vitro* de *Sansevieria trifasciata* de acuerdo con el protocolo establecido en esta investigación.
5. Realizar estudios de investigación sobre la inducción de embriones somáticos *in vitro* a partir de tejido callogénico ya establecido.
6. Realizar estudios para el enraizamiento o etapa III *in vitro* de *Sansevieria trifasciata*.

LITERATURA CITADA

Griffith, L. 1998. Tropical Foliage Plants. Ball. Estados Unidos. 318 p.

Hurtado, D; Merino, M. 1994. Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas. México, D.F. México. 232 p.

Kromdijk, G. 1974. Plantas de Interior. Ayma. España. 222 p.

Lara Chávez, A. 2001. Análisis de costos de producción *in vitro* y mercado de orquídeas en Zamorano. Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 60 p.

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

Oliva Chávez 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.

Ronquillo López, M. 2005. Inducción de callogénesis *in vitro* a partir de láminas foliares de *Sansevieria trifasciata*. Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 19 p.

Sánchez, J. 2005. La multiplicación vegetativa (En línea). Consultado 18 de Agosto de 2006. Disponible en: <http://www.arbolesornamentales.com/multiplicacionvegetativa.htm>

Weaver, R. 1989. Reguladores de crecimiento de plantas en la agricultura. Trillas. México, D.F. México. 622 p.

ANEXOS

Anexo 1. Medio básico Linsmaier y Skoog (LS) utilizado para la estimulación de brotes e inducción callogénica *in vitro* de *Sansevieria trifasciata* utilizando vitroláminas foliares y tejido callogénico. Zamorano, Honduras, 2007.

Componente	Fórmula	Nombre Común	Cantidad (mg/L)
Macronutrientes LS	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1,650.00
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1,900.00
	MgSO ₄ 7H ₂ O	Sulfato de magnesio	370.00
	CaCl ₂ 2H ₂ O	Cloruro de calcio	400.00
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.00
Micronutriente LS	KI	Yoduro de potasio	0.33
	H ₃ BO ₃	Acido bórico	6.20
	MnSO ₄ 4H ₂ O	Sulfato de manganeso	22.30
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	Sulfato de zinc	8.60
	CuSO ₄ 5H ₂ O	Sulfato cúprico	0.02
	CoCl ₂ 6H ₂ O	Cloruro de cobalto	0.02
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	Molibdato de sodio	0.25
Hierro LS	FeSO ₄ 7H ₂ O	Sulfato ferroso	2.80
	Na-EDTA		37.30
Vitamina	Inositol		100.00
Otros	Sacarosa		30,000
	Gelrite		2,000
pH			5.8

Fuente: George, E. 1993. Plant propagation by tissue culture. Vol.2. Exegetics Limited. Londres, Gran Bretaña. 574 p.