



FACUTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE LA FLOR DE VERANO *DELPHINIUM ELATUM* "BLACK VELVET"

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor guía

M.Sc. Fernando Xavier Rivas Romero

Autora

Alejandra Ureta Ponce

Año

2016

## DECLARACIÓN PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

Fernando Xavier Rivas Romero

Master Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

CI: 171809270-1

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

---

Alejandra Ureta Ponce

CI: 171562561-0

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que hicieron posible la elaboración de este trabajo de titulación, a mi familia por todo el apoyo que me han dado desde el inicio de mi carrera. En especial quiero agradecer a mi Profesor Guía Fernando Rivas por toda su ayuda y paciencia; a Benito Jaramillo por darme el espacio y la oportunidad de realizar mi tesis en su laboratorio.

## RESUMEN

Las flores de verano *Delphinium elatum* son plantas ornamentales de gran interés económico para los floricultores. Es una flor muy cotizada en el mercado, por lo cual son imprescindibles sus cultivos. Sin embargo, ésta planta presenta un gran problema de contaminación por parte de bacterias endógenas. Por lo tanto, para poder controlar de mejor manera los cultivos, se los realiza de forma *in vitro*, realizando un número de desinfecciones con la finalidad de eliminar los patógenos. Para el establecimiento adecuado de la flor de verano *Delphinium elatum* "Black Velvet", se realizó un diseño experimental que contempla el uso de tres desinfectantes (hipoclorito de sodio, PTC<sup>3</sup> y kanamicina) a concentraciones diferentes con el propósito de eliminar la contaminación del explante. La mitad de los explantes de cada tratamiento fueron sometidos a termoterapia por un periodo de 24 horas. La otra mitad fueron colocados en la sala de cultivo directamente. Se realizaron evaluaciones de contaminación, necrosamiento y viabilidad de los explantes a los 7 y 15 días de haber sido sembrados. La variable "porcentaje de contaminación fúngica" y "porcentaje de contaminación bacteriana" presentaron diferencias significativas entre tratamientos a los 7 y 15 días de evaluación; la variable "porcentaje de contaminación global" presentó diferencias significativas únicamente a los 15 días de evaluación; y finalmente las variables "porcentaje de necrosamiento" y "porcentaje de viabilidad" no presentaron diferencias significativas a los 7 y 15 días de evaluación. El tratamiento que mostró un mayor porcentaje de explantes viables fue el tratamiento 5, utilizando hipoclorito de sodio al 3% y sometiendo los explantes a termoterapia durante 24 horas a 4°C por lo que podríamos considerarlo el mejor. Desde el punto de vista comercial, uno o dos puntos de diferencia en el porcentaje de viabilidad representan cientos de miles de plantas perdidas con el costo que eso implica para la empresa.

## ABSTRACT

Summer flowers *Delphinium elatum* are ornamental plants of great economic interest for floriculturist. It is a flower with a high demand in the market, making this crop indispensable. However, this plant has a huge contamination problem by endogenous bacteria. Therefore, to have a better control over the cultures, they are grown *in vitro*, performing a number of disinfections in order to eliminate plant pathogens. For the proper establishment of summer flower *Delphinium elatum* "Black Velvet", an experimental design was performed, it includes the use of three disinfectants (sodium hypochlorite, PTC<sup>3</sup> and kanamycin) at different concentrations in order to remove contamination from the explant. Half of the explants of each treatment were subjected to thermotherapy for a period of 24 hours. The other half were placed in the culture room directly. Contamination, necrosis and viability evaluations of the explants at 7 and 15 days after being cultured were made. The variable "percentage of fungal contamination" and "percentage of bacterial contamination" showed significant differences between treatments at 7 and 15 days; the variable "percentage of global contamination" only showed significant differences at 15 days; and finally the variables "percentage of necrosis" and "percentage of viability" showed no significant differences at 7 and 15 days. The treatment that showed a higher percentage of viable explants was treatment 5, using sodium hypochlorite at 3% and subjecting explants to thermotherapy for 24 hours at 4 ° C. From the commercial point of view, one or two points difference in the percentage of viability represent hundreds of thousands of lost plants with the cost that it implies for the company.

## ÍNDICE

1. Capítulo I: Introducción.....	1
1.1. Antecedentes .....	1
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos .....	4
1.3.1. Objetivo general.....	4
1.3.2. Objetivos específicos .....	4
2. Capítulo II: Revisión bibliográfica .....	5
2.1. <i>Delphinium elatum</i> : generalidades.....	5
2.2. <i>Pseudomonas spp</i> : generalidades .....	7
2.3. Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> : generalidades .....	8
2.4. Desinfección del material vegetal .....	9
2.4.1. Hipoclorito de sodio.....	10
2.4.2. “ <i>Plant Tissue Culture Contamination Control (PTC<sup>3</sup>)</i> ”.....	11
2.4.3. Antibióticos.....	11
2.5. Termoterapia.....	12
3. Capítulo III: Diseño del plan experimental.....	13
4. Capítulo IV: Procedimientos .....	15
4.1. Determinación de la población y muestra .....	15
4.2. Selección de instrumentos de medición .....	15
4.2.1. Preparación de soluciones.....	15
4.2.2. Preparación del medio de cultivo .....	16
4.3. Procedimientos para obtención de datos.....	17
4.3.1. Pretratamiento de los explantes.....	19
4.3.2. Trabajo en cámara de flujo laminar.....	19
4.3.2.1. Desinfección con etanol.....	19
4.3.2.2. Obtención de meristemos .....	19
4.3.3. Termoterapia.....	20
4.4. Prueba de confiabilidad de datos.....	20
5. Capítulo V: Resultados .....	21
5.1. Proceso de desinfección .....	21

6. Capítulo VI: Discusión .....	28
6.1. Discusión.....	28
7. Conclusiones y recomendaciones .....	32
7.1. Conclusiones.....	32
7.2. Recomendaciones .....	32
8. Referencias .....	34



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Plantas híbridas de <i>Delphinium elatum</i> y su flor.....	6
<b>Figura 2.</b> Características de los explantes utilizados para realizar el trabajo de titulación.....	15
<b>Figura 3.</b> Diagrama de flujo para el establecimiento de meristemos apicales de <i>Delphinium elatum</i> “Black Velvet” .....	18
<b>Figura 4.</b> Explantes de <i>Delphinium elatum</i> “Black Velvet” .....	21
<b>Figura 5.</b> Contaminación global por tratamiento a los 7 días .....	22
<b>Figura 6.</b> Contaminación global por tratamiento a los 15 días .....	23
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de necrosamiento por tratamiento a los 15 días .....	25
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de viabilidad por tratamiento a los 7 días .....	25
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de viabilidad por tratamiento a los 15 días .....	26

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Delphinium elatum</i> .....	5
<b>Tabla 2.</b> Matriz de diseño experimental. ....	13
<b>Tabla 3.</b> Prueba de Kruskal-Wallis para % de contaminación global .....	23
<b>Tabla 4.</b> Prueba de Kruskal-Wallis para % de contaminación fúngica.....	24
<b>Tabla 5.</b> Prueba de Kruskal-Wallis para % de contaminación bacteriana .....	24
<b>Tabla 6.</b> Prueba de Kruskal-Wallis para % de viabilidad .....	26

## 1. Capítulo I: Introducción

### 1.1. Antecedentes

*Delphinium elatum* es una especie de plantas pertenecientes a la familia de las *Ranunculaceae*, las cuales producen flores de verano. Estas plantas requieren de mucho cuidado ya que sus exigencias en relación a los factores ambientales bióticos y abióticos son sumamente específicas. Por este motivo, muchos floricultores han descartado esta flor, siendo ésta muy cotizada en el mercado. Con el pasar de los años, se han creado híbridos que ofrecen adaptaciones para casi cualquier región del mundo. Estos híbridos combinan muchas características de sus ancestros ingleses con una constitución más vigorosa de la planta (Rogers y Christopher, 2014, pp.133-135).

La variedad “Black Velvet” posee un problema que limita mucho su propagación: se han realizado experimentos de cruzamiento por el método convencional y dos de los hallazgos más relevantes fueron que solo se puede utilizar como parental masculino y que la descendencia que se obtiene no tiene valor comercial ya que sus flores son muy escasas. Además, los patógenos que afectan al cultivo de *Delphinium elatum* “Black Velvet” son innumerables, especialmente las bacterias (Rogers y Christopher, 2014, pp. 134).

Las bacterias de *Pseudomonas syringae* pv. *delphinii* son causantes de enfermedades en *Delphinium elatum* y también causan la contaminación en los medios de cultivo *in vitro* de la planta. Esta bacteria ingresa a la planta a través de los estomas, ocasiona un crecimiento anormal de la planta y el ennegrecimiento de los nodos (Horst, 2001, pp. 93). El control agrícola que existe para esta bacteria consiste en utilizar semillas sanas y plantar variedades que sean menos susceptibles o resistentes a la contaminación. El material vegetal contaminado debe ser eliminado y destruido en su totalidad y de igual manera se recomienda la rotación de los cultivos (Janse, 2005). Sin embargo, esto no resulta ser una solución al problema de contaminación por

parte de la bacteria al cultivo de *Delphinium elatum*, por lo que se debe buscar otras alternativas que puedan proveer resultados favorables.

En las últimas décadas los avances en la tecnología y en el conocimiento han llevado a desarrollar técnicas como la micropropagación y sus alternativas como la embriogénesis somática. La micropropagación consiste en multiplicar plantas usando segmentos pequeños de plantas que crecen en cultivos estériles. Para la propagación de las plantas se puede utilizar meristemas como material vegetativo de partida, colocándolos sobre un medio de cultivo adecuado. Esta técnica ha sido adaptada para la comercialización de plantas ornamentales y se prefiere sobre las técnicas convencionales de propagación ya que se puede multiplicar plantas libres de enfermedades (Ponmurugan y Kumar, 2012, pp. 61).

Las enfermedades de las plantas reducen el rendimiento y la calidad de las mismas, llevando en algunos casos a la muerte de la planta. Curar a la planta toma mucho tiempo y es difícil por lo que es preferible tener un cultivo limpio desde el inicio. Se puede lograr esto mediante la regeneración de plantas a partir de cultivo de tejidos, como por ejemplo los meristemas que generalmente se encuentran libres de enfermedades y contaminación (Ponmurugan y Kumar, 2012, pp. 1-2). Utilizar los meristemas como material de partida resulta muy beneficioso ya que al ser un grupo de células no diferenciadas, se puede aprovechar su totipotencia.

La técnica de embriogénesis somática se ha desarrollado sobre el concepto de totipotencia celular y tienen la capacidad de formar un organismo completo (Roca y Mroginski, 1991, pp. 20). A diferencia de otros organismos, las plantas tienen la capacidad de desarrollar órganos durante todo el transcurso de sus vidas. Realizar embriogénesis somática a partir de los meristemas es eficiente ya que es en esta estructura donde ocurre la regulación del desarrollo de la planta. Los meristemas se forman durante la embriogénesis y consiste en un grupo de células indiferenciadas que van a dar origen a todas las estructuras de una planta. Dentro de las principales aplicaciones de esta

técnica se encuentra la producción de plantas genéticamente idénticas de manera rápida y efectiva (Ponmurugan y Kumar, 2012, pp. 61-64).

Las flores de verano son plantas que han despertado gran interés en las florícolas ecuatorianas para su comercialización. Por este motivo el presente estudio va enfocado a desarrollar un protocolo para establecer meristemas de *Delphinium elatum* “Black Velvet” libre de enfermedades y en grandes cantidades mediante cultivo *in vitro*.

## 1.2. Justificación

Las flores de verano son una gran fuente de ingreso para las florícolas en el Ecuador. Su comercialización no se puede comparar con el mercado de las rosas pero gracias a las condiciones climáticas favorables que existen en el país, el mercado de las flores de verano está creciendo de forma significativa. Dado a que *Delphinium elatum* es una planta perenne que necesita de una fuente de luz intensa, la ubicación y altitud de Ecuador es ideal para su crecimiento y desarrollo. Dentro de la especie *Delphinium elatum*, una de las variedades más difíciles de cultivar es la “Black Velvet”. La dificultad que presenta esta variedad se refleja en el crecimiento disparate entre planta y planta cuando se cultiva en el campo y que tampoco se logra el rendimiento óptimo para satisfacer las demandas del mercado. También es una planta susceptible a ser contaminada por microorganismos, especialmente por bacterias. El problema que presenta la contaminación con bacterias es que impide el desarrollo adecuado y causa la muerte de los esquejes a las pocas semanas de haber sido colocados en el medio de cultivo. El medio de cultivo que se utiliza para la introducción, multiplicación y enraizamiento de la planta contiene antibióticos, lo que ayuda de cierta manera al control de los microorganismos. No obstante, las bacterias desarrollan resistencia contra los antibióticos y terminan matando a la planta, haciendo difícil su control. Tomando en cuenta los problemas previamente mencionados, se puede dar un enfoque diferente al cultivo *in vitro* de *Delphinium elatum*. El utilizar meristemas de la planta podrá ayudar de forma significativa a reducir la

contaminación por parte de las bacterias y también la necesidad de utilizar antibióticos.

La alta tasa de mortalidad de dicha planta causa un impacto negativo para las florícolas del Ecuador que la comercializan, por lo que resulta imprescindible encontrar una solución al problema de la contaminación por parte de bacterias endógenas.

Los cultivos *in vitro* son una posible solución para la propagación de plantas que son difíciles de multiplicar por métodos convencionales (Singh, 2015, pp. 329-346), como es el caso de la variedad *Delphinium elatum* "Black Velvet". Adicional a esto, se ha demostrado que la embriogénesis somática es de gran importancia en la propagación para la agricultura ya que tiene la capacidad de proveer grandes cantidades de plantas en un periodo menor (Thorpe, 1995, pp. vii). Existen ciertas ventajas al utilizar plantas propagadas *in vitro* sobre las obtenidas *in vivo*: en primer lugar, la propagación de plantas *in vitro* ocupa un menor espacio; se pueden propagar plantas que generalmente tardan más *in vivo*; y finalmente son cultivos que se pueden propagar eficientemente cuando se trata de especies de las cuales hay muy pocos ejemplares (Harding, 2010, pp. 167).

### 1.3. Objetivos

#### 1.3.1. Objetivo general

Desarrollar un protocolo que garantice el establecimiento adecuado de *Delphinium elatum* "Black Velvet" para su propagación *in vitro*.

#### 1.3.2. Objetivos específicos

Establecer un procedimiento de introducción del esqueje que garantice una menor contaminación.

Determinar el porcentaje de contaminación global y necrosamiento de cada tratamiento evaluado.

Determinar el porcentaje de viabilidad global de todo el experimento.

## 2. Capítulo II: Revisión bibliográfica

### 2.1. *Delphinium elatum*: generalidades

La flor de verano *Delphinium elatum* es una especie perteneciente a las Ranunculaceae. Su clasificación taxonómica se detalla en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Delphinium elatum*

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Filum</b>	<i>Tracheophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Orden</b>	<i>Ranunculales</i>
<b>Familia</b>	<i>Ranunculaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Delphinium</i>
<b>Especie</b>	<i>Delphinium elatum</i>

Tomada de NCBI Taxonomy, Taxon ID: 46247

El género *Delphinium* es originario del hemisferio norte, donde se han descrito más de 250 especies. Son plantas perennes que se desarrollan a partir de una raíz leñosa. Los tallos son erguidos y huecos por dentro; las hojas son simples, alternadas y basales, reduciendo su tamaño a medida que van hacia arriba del tallo. Las flores tienen simetría bilateral, con 5 sépalos y 4 pétalos (Knight, 2007, pp.100).

Las plantas de *Delphinium* por lo general varían en el patrón de crecimiento, sin embargo todas tienen en común que son efectivas para proporcionar tallos rectos y fuertes. Estas plantas tienen afinidad por la tierra bien drenada y rica en humus, con una intensidad de luz elevada (Rogers y Christopher, 2014, pp.133-135).



**Figura 1.** Plantas híbridas de *Delphinium elatum* y su flor.

Tomada de (Knight, 2007, pp.100)

Las plantas de *Delphinium* son también conocidas como “larkspur” o “espuela de caballero”. Los cultivos por lo general llegan a una altura aproximada de 1.80 metros. Cada planta termina en un racimo que contiene varias flores, teniendo el racimo una forma de cono invertido. El color más representativo de las flores de *Delphinium* es el azul, sin embargo existen subespecies de distintos colores como rojo, amarillo, rosado y blanco (Knight, 2007, pp.100).

Las plantas de *Delphinium* tienen 3 plagas importantes, el minador de hoja causada por larvas del insecto *Phytomyza aconiti* que al crecer y desarrollarse se van alimentando del parénquima de las hojas (Syngenta, 2016), el oidio causada por *Erysiphe aquilegiae var. ranunculi* que es un hongo; y la que es más común, la mancha negra causada por *Pseudomonas syringae pv. delphinii* siendo ésta una bacteria (Alford, 2000, pp. 475).



## 2.2. *Pseudomonas spp*: generalidades

Las *Pseudomonas* son un género de bacterias metabólicamente diversas. Son conocidas ya que tienen la capacidad de proliferarse y vivir en varios entornos diferentes como en el agua y el suelo. Lo que hace que las *Pseudomonas* sean tan infecciosas es que contienen resistencia antimicrobial intrínseca, haciéndolas patógenos de plantas, animales y humanos (Winsor *et al.*, 2008, pp. 483). En la actualidad el género de *Pseudomonas* abarca 202 especies registradas, siendo en su mayoría patógenos que afectan a plantas. Son bacterias Gram negativas, aeróbicas y se las puede encontrar en forma de plancton (Özen y Ussery, 2011, pp. 239-240).

La distinción de los patógenos entre otras especies de *Pseudomonas* se realiza teniendo en cuenta su morfología, la presencia o ausencia de pectinasa y su habilidad para inducir respuesta hipersensible (HR). La presencia de *P. syringae* no significa necesariamente que va a infectar la planta hospedera. Esto va a depender de varios factores como la temperatura, disponibilidad de oxígeno, humedad y la capacidad de virulencia de la cepa bacteriana (Beiki *et al.*, 2016, pp. 1-2).

Las bacterias de *Pseudomona syringae* son las responsables de varias enfermedades de importancia económica, ya que pueden infectar una gran variedad de frutas, vegetales y plantas ornamentales (Moore y Pscheidt, 2016). En el 2012 se realizó una votación entre científicos para determinar que bacterias son las que causan mayor daño a las plantas tomando en consideración su importancia y lo que implica económicamente cada patógeno; las bacterias de *Pseudomona syringae* se llevaron el primer lugar (Mansfield *et al.*, 2012, pp.614-616). Uno de los motivos por el cual se consideró esta bacteria una de las más importantes es debido al impacto económico que esta bacteria está causando. Algunos de los patovares de *Pseudomona syringae* causan enfermedades que reflejan daños a largo plazo, mientras existen otras que producen enfermedades esporádicamente y de manera violenta (Mansfield *et al.*, 2012, pp.614-616).

Una de las principales enfermedades causadas por *Pseudomonas syringae* pv. *delphinii* es la mancha negra. Como su nombre lo indica, esta causa necrosis en las hojas de las plantas, en los botones florales, los peciolos y los tallos, la cual se manifiesta como “manchas negras”. Éstas se las puede ver cuando la enfermedad se encuentra en estados avanzados. La bacteria ingresa a la planta a través de los estomas y su presencia puede causar anomalía en el desarrollo de las hojas y el ennegrecimiento de los nodos (Horst, 2001, pp. 93).

Una de las técnicas modernas para obtener plantas libres de patógenos, entre ellos *Pseudomonas syringae* pv. *delphinii* es el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, donde se puede controlar las condiciones bajo las cuales se va a desarrollar la planta.

### 2.3. Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*: generalidades

El cultivo de tejidos involucra el crecimiento y multiplicación de células, tejidos u órganos vegetales en condiciones asépticas y controladas. El crecimiento del tejido se debe realizar en medio de cultivo que puede ser tanto líquido como sólido. Esta metodología se utiliza ampliamente para la multiplicación de plantas a gran escala ya que a partir de un solo explante se pueden obtener varias plantas de la misma calidad y tamaño (Ponmurugan y Kumar, 2012, pp. 61).

La micropropagación se puede dividir en 5 etapas principales, la etapa 0 es la de preparación. En esta etapa se selecciona la planta donante, la cual debe cumplir con ciertas características que sean deseables. Dentro de estas características se encuentra la calidad del explante, el vigor y que sea capaz de resistir el proceso de desinfección. La etapa 1 es el establecimiento del explante en el cultivo, donde se realizan las desinfecciones necesarias para eliminar los microorganismos de la planta, se realiza la formulación y preparación del medio de cultivo, para finalmente sembrarlo en condiciones asépticas (Ponmurugan y Kumar, 2012, pp. 65-67).

La etapa 2 es la de multiplicación; se realiza el corte de los brotes de la planta madre para colocarlos en un medio de cultivo nuevo y obtener gran cantidad de plantas. La etapa 3 se conoce como el enraizamiento. En la cual se van a inducir el desarrollo de las raíces *in vitro* previo al último paso. La etapa 4 consiste la transferencia de las plantas propagadas *in vitro* al ambiente. Esta etapa es de suma importancia ya que de la climatización depende si las plantas sobreviven o no. Este es un proceso gradual y toma varias semanas ya que las plantas se deben ajustar a condiciones diferentes para garantizar su supervivencia (Ponmurugan y Kumar, 2012, pp. 65-67).

Un explante se refiere a cualquier tejido de la planta que va a ser utilizado para dar inicio al cultivo madre. Tomando en consideración que el cultivo de tejidos se puede realizar a partir de diferentes estructuras vegetales, el cultivo de meristemas resulta ser de gran ayuda cuando se trata de plantas que son propensas a la contaminación ya que generalmente los meristemas se encuentran libres de enfermedades y contaminación. En el cultivo de meristemas, el explante es sumamente pequeño, consistiendo del domo meristemático apical con o sin dos primordios foliares (George *et al*, 2008, pp. 1). En el meristemo se encuentran células indiferenciadas que son las responsables de dar origen a todas las estructuras de una planta, también son las encargadas de transmitir señales al resto de la planta (Ponmurugan y Kumar, 2012, pp. 61-62).

#### 2.4. Desinfección del material vegetal

El pretratamiento del material vegetal puede influenciar significativamente en la reducción de los contaminantes que se encuentran en las plantas. Por lo general, las plantas que crecen en invernaderos o lugares cerrados tienden a tener menos contaminación que aquellas plantas que crecen al aire libre. Sin embargo, muchos de los cuidados que son fundamentales para todas las plantas, incrementarán la carga de contaminación. Por ejemplo, al momento de regar una planta, la tierra superficial que contiene miles de microorganismos, salpica y se deposita sobre la planta. Esto causa un

aumento de la contaminación ya que los microorganismos de la tierra ahora también están presentes en la planta (Ponmurugan y Kumar, 2012, pp. 20-21).

Utilizar una solución de bactericidas y fungicidas es recomendable para eliminar cierto porcentaje de los microorganismos que se encuentran presentes en el explante. Utilizar etanol es ideal ya que es un fuerte agente esterilizante, sin embargo tiene ciertas desventajas ya que es extremadamente fitotóxico (Ponmurugan y Kumar, 2012, pp. 20-21). Por este motivo el tiempo de exposición al etanol es reducido, siendo de segundos a pocos minutos. Generalmente no se utiliza etanol al 100% cuando se trata de desinfecciones vegetales, lo más recomendable es utilizar etanol al 70% (Ponmurugan y Kumar, 2012, pp. 20-21).

#### 2.4.1. Hipoclorito de sodio

El hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) es el más común de los desinfectantes utilizados para la superficie vegetal. Es un agente oxidante que causa daños al ADN y a los lípidos (Small *et al.*, 2006, pp.1). El oxidante comercial por lo general viene en una concentración del 5%; a partir de esto se pueden realizar las diluciones necesarias para las desinfecciones vegetales en función del tipo de explante y de la especie vegetal utilizada, así en la mayoría de desinfecciones se diluye en órdenes del 1% de la concentración original (Ponmurugan y Kumar, 2012, pp. 21-22).

Existen varias formas para mejorar la efectividad de la esterilización del material vegetal utilizando hipoclorito de sodio; agregando un detergente a la solución, el cual reduce la tensión superficial del agua, permitiendo así que la solución pueda acceder a todas las hendiduras dentro del explante (Ponmurugan y Kumar, 2012, pp. 22).

El uso de antibióticos y conservantes de la planta también son una forma de mejorar la efectividad de la esterilización de la misma (Ponmurugan y Kumar, 2012, pp. 22).

#### 2.4.2. “*Plant Tissue Culture Contamination Control (PTC<sup>3</sup>)*”

El PTC<sup>3</sup> es un biocida de amplio espectro que comúnmente se lo añade al medio de cultivo para reducir la contaminación bacteriana y fúngica (PhytoTechnology Laboratories, 2016). Sin embargo, gracias a que es un biocida de amplio espectro, también se lo puede utilizar durante el proceso de desinfección. Las dosis recomendadas de PTC<sup>3</sup> son de 1 a 2 mL por litro de medio, pero en caso de que se esté tratando con contaminación endógena de la planta, la dosis puede aumentar. El PTC<sup>3</sup> tiene ciertas ventajas sobre los antibióticos; la principal ventaja es que actúa contra hongos y bacterias mientras que los antibióticos están más limitados. La probabilidad de que los microorganismos contaminantes adquieran resistencia contra el PTC<sup>3</sup> es relativamente baja ya que inhibe la formación de varias enzimas y no de una en particular (Ponmurugan y Kumar, 2012, pp. 22).

#### 2.4.3. Antibióticos

Por lo general el uso de antibióticos en cultivo de tejidos vegetales se limita a colocar el antibiótico dentro del medio de cultivo para que funcione como un inhibidor del crecimiento microbiano. Sin embargo, hay otras alternativas para su uso. Se pueden utilizar antibióticos para realizar desinfecciones previamente a que los explantes sean sembrados. También puede ser beneficioso realizar enjuagues con soluciones de antibiótico luego de la desinfección con hipoclorito de sodio para reducir la carga microbiana (Smith, 2013, pp. 55). Comúnmente no se recomienda utilizar antibióticos ya que suelen ser fitotóxicos (Ponmurugan y Kumar, 2012, pp. 22), pero dado a que luego de utilizarlos se realizarán enjuagues, la utilización de los mismos para la desinfección del explante es válida. Utilizar antibióticos del grupo de los aminoglucósidos puede resultar óptimo ya que inhiben la síntesis de proteínas al interactuar con las subunidades ribosomales 30S o 50S (Sathyanarayana y Varghese, 2007, pp. 63), la kanamicina se encuentra dentro de este grupo de antibióticos.

## 2.5. Termoterapia

La termoterapia es una técnica que se ha utilizado para liberar plantas de patógenos desde hace varias décadas. Los primeros experimentos de termoterapia utilizaban agua caliente, sin embargo estas técnicas se han perfeccionado con el propósito de eliminar virus, bacterias, nemátodos, hongos e insectos de las plantas. Una de las principales ventajas de utilizar termoterapia es que no deja residuos de ningún tipo y elimina los patógenos endógenos de la planta. Esto es especialmente efectivo para infecciones víricas puesto que se ha podido evidenciar en estudios anteriores que la termoterapia a altas temperaturas en el orden de los 40 a 45 °C durante unos minutos, puede activar mecanismos de defensa en algunas plantas como el banano, donde se ha visto que la termoterapia a altas temperaturas causa alteraciones subcelulares como el agrandamiento de la vacuola, cambios conformacionales en los plasmodesmos lo cual inhibe la movilidad eficiente del virus célula a célula, reduciendo la replicación de los mismos (Wang *et al.*, 2008, pp. 237-245). Sin embargo, la termoterapia puede ser o no efectiva dependiendo del explante que se utilice. La efectividad va a depender mayoritariamente de las condiciones fisiológicas de la planta; el tamaño, la edad, el vigor y también de su constitución genética (Cassells, 1997, pp. 219).

La producción de plantas ornamentales al igual que cultivos agrícolas están constantemente amenazados por enfermedades causadas por virus, bacterias y fitoplasmas. Es importante recalcar que la amenaza es continua y ocurre durante cualquiera de las etapas de la planta, lo que representa una pérdida importante. Por ejemplo, la enfermedad de Huanglongbing (HLB), producida por la bacteria *Candidatus liberibacter*, la cual afecta a varias especies de plantas del género *Citrus*, con un 100% de mortalidad (Feng *et al.*, 2013, pp. 463-464). Esto generó gran interés en la obtención de plantas libres de patógenos. Perfeccionando las técnicas se llegó a la aplicación de termoterapia, el cultivo de meristemas y una combinación de ambos alcanzando resultados relativamente exitosos (Feng *et al.*, 2013, pp. 463-464).

### 3. Capítulo III: Diseño del plan experimental

Se realizó un diseño experimental completamente aleatorio, utilizando como unidad experimental 1 tubo de ensayo con 1 explante. El experimento se replicó 3 veces de forma independiente, con 5 repeticiones por tratamiento y por réplica biológica.

**Tabla 2.** Matriz de diseño experimental

Tratamiento	Variable [desinfectante]	Proceso	# explantes	# total explantes
1	Hipoclorito de sodio 2%	Termoterapia 24h	5	10
2		Sin termoterapia	5	
3	Hipoclorito de sodio 2.5%	Termoterapia 24h	5	10
4		Sin termoterapia	5	
5	Hipoclorito de sodio 3%	Termoterapia 24h	5	10
6		Sin termoterapia	5	
7	PTC 2.5% v/v	Termoterapia 24h	5	10
8		Sin termoterapia	5	
9	PTC 5% v/v	Termoterapia 24h	5	10
10		Sin termoterapia	5	
11	PTC 7.5% v/v	Termoterapia 24h	5	10
12		Sin termoterapia	5	
13	Kanamicina [250mg/L]	Termoterapia 24h	5	10
14		Sin termoterapia	5	
15	Kanamicina [300 mg/L]	Termoterapia 24h	5	10
16		Sin termoterapia	5	
17	Kanamicina [350 mg/L]	Termoterapia 24h	5	10
18		Sin termoterapia	5	
			Total:	90

Como variables se evaluaron: % de contaminación global, % de contaminación fúngica, % de contaminación bacteriana, % de necrosamiento y % de viabilidad de explantes a los 7 y 15 días después de la desinfección. La viabilidad de los explantes se define como aquellos explantes que se encuentran libres de contaminación y sobreviven a todo el procedimiento.

Para la variable de % de contaminación global:

$H_0$ : No hay diferencias significativas entre tratamientos.

$H_a$ : Si hay diferencias significativas entre tratamientos.

Para la variable de % de contaminación fúngica:

$H_0$ : No hay diferencias significativas entre tratamientos.

$H_a$ : Si hay diferencias significativas entre tratamientos.

Para la variable de % de contaminación bacteriana:

$H_0$ : No hay diferencias significativas entre tratamientos.

$H_a$ : Si hay diferencias significativas entre tratamientos.

Para la variable de % de necrosamiento:

$H_0$ : No hay diferencias significativas entre tratamientos.

$H_a$ : Si hay diferencias significativas entre tratamientos.

Para la variable de % de viabilidad:

$H_0$ : No hay diferencias significativas entre tratamientos.

$H_a$ : Si hay diferencias significativas entre tratamientos.

Para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos se realizó un análisis no paramétrico Kruskal-Wallis con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ .



## 4. Capítulo IV: Procedimientos

### 4.1. Determinación de la población y muestra

El material vegetal fue suplementado por la empresa Valleflor, ubicada en Pifo. Los explantes fueron recolectados a partir de coronas, todas ubicadas en la misma cama dentro del mismo invernadero. Las cosechas fueron realizadas con un día de diferencia por cada repetición biológica. La calidad del explante fue uniforme para las 270 plantas. Fueron plantas vigorosas, de un tamaño aproximado de 10 centímetros (Figura 2) con hojas grandes sin presencia de clorosis ni enfermedades.



**Figura 2.** Características de los explantes utilizados para realizar el trabajo de titulación.

### 4.2. Selección de instrumentos de medición

#### 4.2.1. Preparación de soluciones

Para la solución de detergente, se pesó el detergente utilizando una balanza analítica, una vez pesado se lo colocó en un frasco de 1 litro. Se aforó con agua hasta alcanzar 1 litro y se homogenizó la solución mediante agitación.

Para la solución de bactericidas y fungicidas, se pesaron los bactericidas y fungicidas sólidos utilizando una balanza analítica. Éstos se colocaron en un frasco de 1 litro. Con la ayuda de una pipeta, se agregaron los bactericidas y fungicidas líquidos en el mismo frasco. Se aforó con agua hasta alcanzar 1 litro y se homogenizó la solución mediante agitación.

Para la solución de hipoclorito de sodio, se utilizó una probeta de 1 litro para medir la cantidad necesaria de hipoclorito de sodio para cada tratamiento. Se aforó a 1 litro con agua destilada en un balón aforado por cada tratamiento. Se colocó la solución en un frasco. Con la ayuda de una punta de pipeta, se agregó el detergente Tween 20 a la solución. Se agitó hasta homogenizar la solución.

Para la solución de PTC<sup>3</sup>, se preparó 1 litro de medio de cultivo MS. Se utilizó una pipeta esterilizada para medir la cantidad necesaria de PTC<sup>3</sup> para cada tratamiento. Se aforó con el medio de cultivo MS en un balón aforado por cada tratamiento. Se agitó hasta homogenizar la solución. Se colocó cada solución en varios frascos previamente identificados.

Finalmente, para la solución de kanamicina, se pesó en una balanza analítica la cantidad necesaria de kanamicina para cada tratamiento. Se aforó a 1 litro con agua destilada en un balón aforado por cada tratamiento. Se agitó hasta homogenizar la solución. Se colocó cada solución en distintos frascos previamente identificados.

#### 4.2.2. Preparación del medio de cultivo

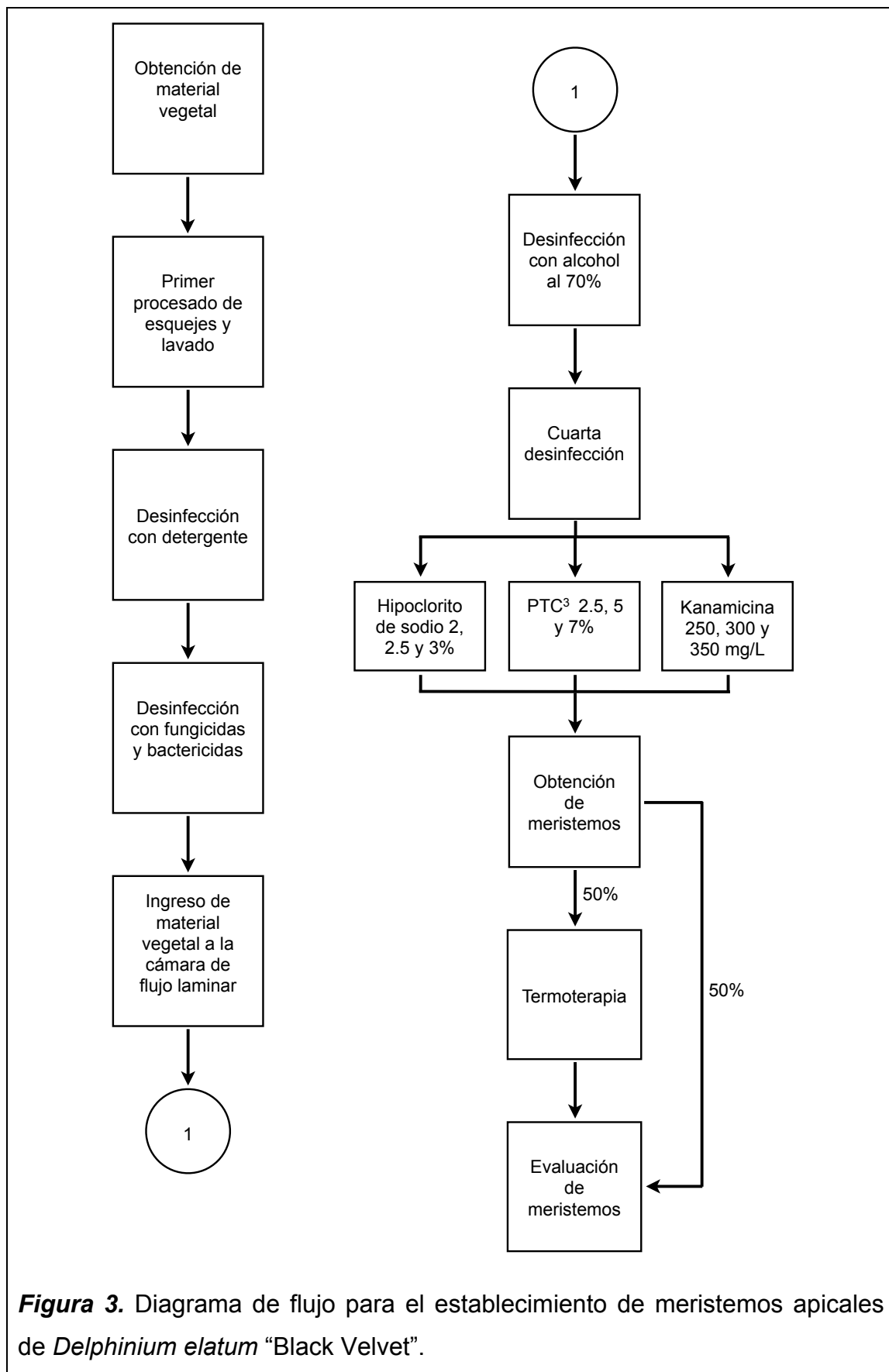
El medio de cultivo utilizado para este experimento fue un MS modificado. Se utilizó una probeta y se midieron 500 mL de agua destilada. Se pesaron cada uno de los reactivos en una balanza analítica y se los colocó en un vaso de precipitación junto con los 500 mL de agua destilada, con excepción del gelificante y el antioxidante. Se ajustó el pH a 5.3. Se aforó el volumen a 1 litro

y se añadió el agente gelificante. Se autoclavó el medio durante 15 minutos a 121 °C y 15 psi.

Una vez frío el medio, se lo llevó a la cámara de flujo laminar. Se añadió el antioxidante y se dispensaron 20 mL de medio de cultivo en cada tubo de ensayo.

#### 4.3. Procedimientos para obtención de datos

El proceso general esquematizado se ilustra en la Figura 3.



#### 4.3.1. Pretratamiento de los explantes

Se removieron las hojas 2-3 centímetros por encima del meristemo, se limpió el nodo y se removieron las hojas muertas. Se colocaron los explantes procesados en un frasco.

Se lavaron los explantes en la solución de detergente durante 10 minutos en agitación. Transcurrido ese tiempo, se enjuagaron los explantes con abundante agua, asegurándose de que no queden residuos de detergente.

Inmediatamente después, los explantes se sumergieron en la solución previamente preparada de bactericidas y fungicidas en el frasco que contiene los explantes. El procedimiento fue el mismo realizado para la desinfección con detergente.

Finalizado el pretratamiento, el resto del proceso se desarrolló en cámara de flujo laminar. Todo material que ingresa a la cámara debe ser previamente desinfectado con alcohol.

#### 4.3.2. Trabajo en cámara de flujo laminar

##### 4.3.2.1. Desinfección con etanol

Los explantes fueron desinfectados con etanol al 70% en agitación durante 2 minutos. Transcurrido ese tiempo se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril y se separaron los explantes para cada uno de los tratamientos de desinfección a evaluarse.

##### 4.3.2.2. Obtención de meristemos

Después de cada uno de los tratamientos de desinfección respectivos, se colocaron los explantes en cajas Petri estériles. Con la ayuda del estéreo

microscopio se seccionaron los meristemos de los explantes y se colocaron dentro del medio de cultivo (MS con modificaciones).

#### 4.3.3. Termoterapia

La mitad de los tratamientos fueron sometidos a termoterapia. Esto consistió en colocar los explantes a 4 °C durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se colocaron los explantes a 16 °C en oscuridad durante 7 días, luego del cual se incubaron los mismos con un fotoperiodo de 16/8. La otra mitad de los tratamientos fueron directamente a la incubación a 16 °C en oscuridad durante 7 días y después incubación a fotoperiodo 16/8.

#### 4.4. Prueba de confiabilidad de datos

Se realizaron dos evaluaciones por cada repetición biológica, la primera fue transcurridos 7 días y la segunda a los 15 días. Se evaluó el porcentaje de contaminación global, por hongos y bacterias. También se realizó una evaluación del número de explantes necrosados y viables que se tiene por cada tratamiento. Las fórmulas utilizadas se detallan a continuación:

$$\% \text{ de contaminación} = \frac{\# \text{ explantes contaminados}}{\# \text{ explantes totales}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 1}$$

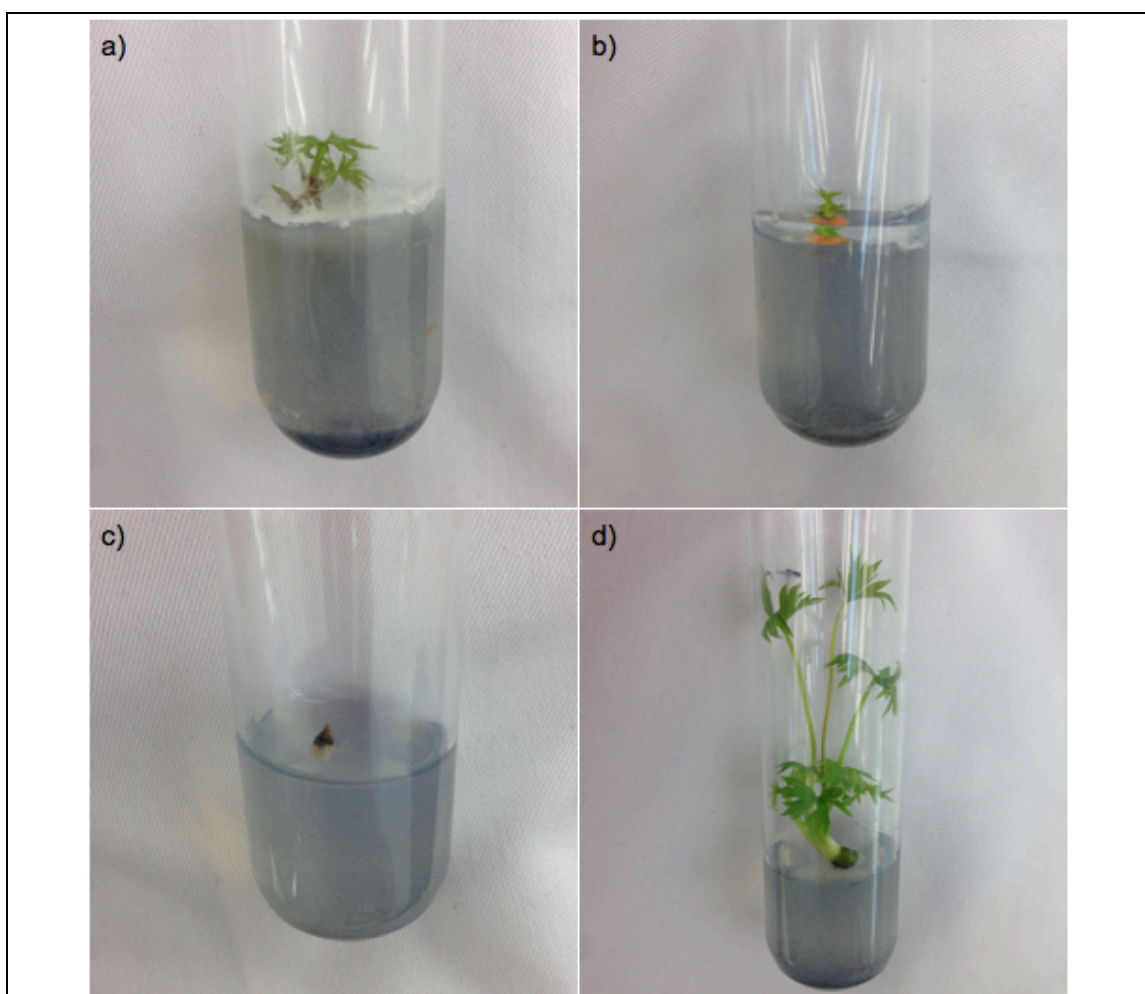
$$\% \text{ de necrosamiento} = \frac{\# \text{ explantes necrosados}}{\# \text{ explantes no contaminados}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\# \text{ explantes viables}}{\# \text{ explantes no contaminados}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 3}$$

## 5. Capítulo V: Resultados

### 5.1. Proceso de desinfección

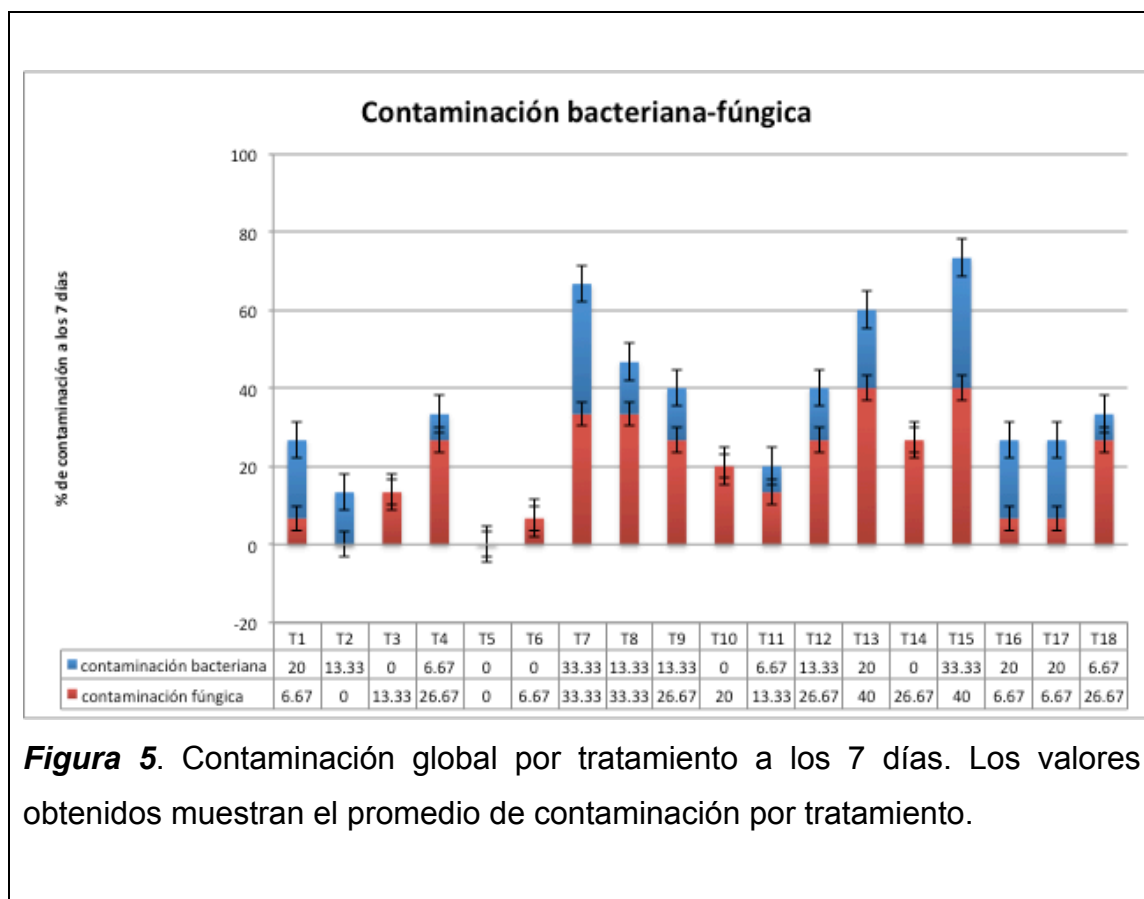
Para el proceso de desinfección, se utilizaron distintas concentraciones de hipoclorito de sodio, PTC<sup>3</sup> y kanamicina. Cada tratamiento fue evaluado a los 7 y 15 días desde la desinfección. Se evaluó de forma visual los explantes que se encontraban contaminados por hongos y bacterias, los explantes necrosados y los explantes viables (Figura 3).



**Figura 4.** Explantes de *Delphinium elatum* “Black Velvet”

- a) contaminado por hongo
- b) contaminado por bacteria
- c) necrosado
- d) viable

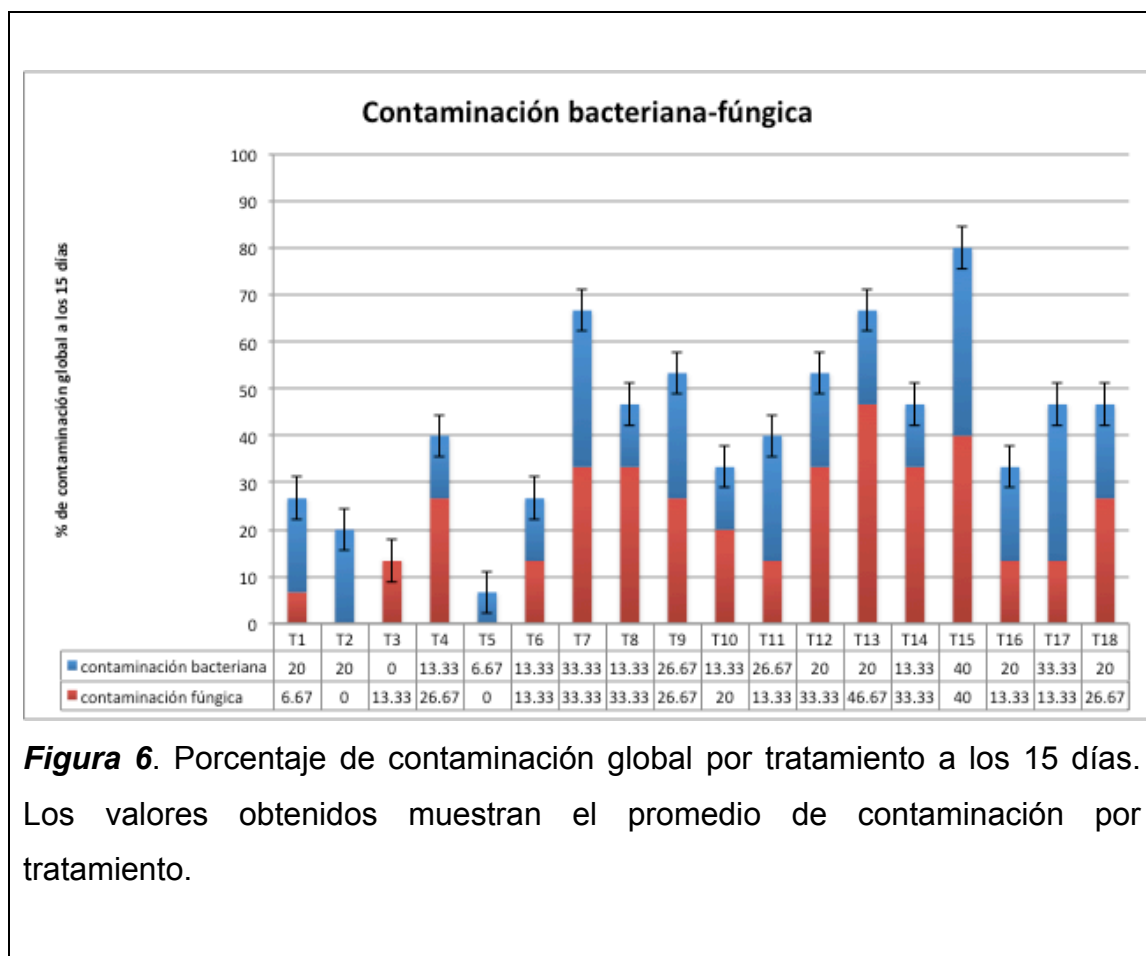
Se observó que en los primeros 7 días es cuando más contaminación se presentó (Figura 6).



**Figura 5.** Contaminación global por tratamiento a los 7 días. Los valores obtenidos muestran el promedio de contaminación por tratamiento.

A medida que pasaron los días, el número de explantes que presentaron contaminación no aumentó considerablemente (Figura 7).





**Figura 6.** Porcentaje de contaminación global por tratamiento a los 15 días. Los valores obtenidos muestran el promedio de contaminación por tratamiento.

Para determinar si existieron diferencias significativas, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis. Para la variable “% de contaminación global” no se encontraron diferencias significativas a los 7 días, sin embargo a los 15 días se pudieron evidenciar diferencias significativas.

**Tabla 3.** Prueba de Kruskal-Wallis para % de contaminación global

Prueba de Kruskal-Wallis		
Estadísticos	7 días	15 días
$\alpha$	0.05	0.05
H crítico	27.59	27.59
H calculado	27.09	<b>32.09*</b>

Distinto comportamiento se encontró para las variables “% de contaminación fúngica” y “% de contaminación bacteriana”, en las cuales se encontraron

diferencias significativas entre los tratamientos a los 7 y 15 días (Tabla 4 y Tabla 5).

**Tabla 4.** Prueba de Kruskal-Wallis para % de contaminación fúngica

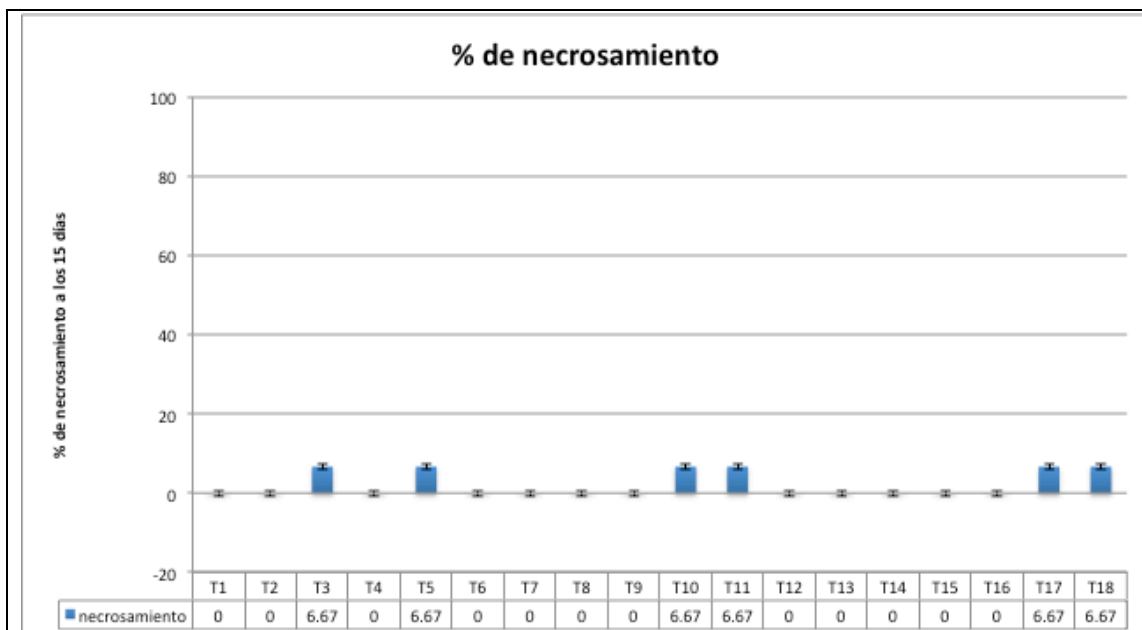
Prueba de Kruskal-Wallis		
Estadísticos	7 días	15 días
$\alpha$	0.05	0.05
H crítico	27.59	27.59
H calculado	<b>31.55*</b>	<b>47.56*</b>

**Tabla 5.** Prueba de Kruskal-Wallis para % de contaminación bacteriana

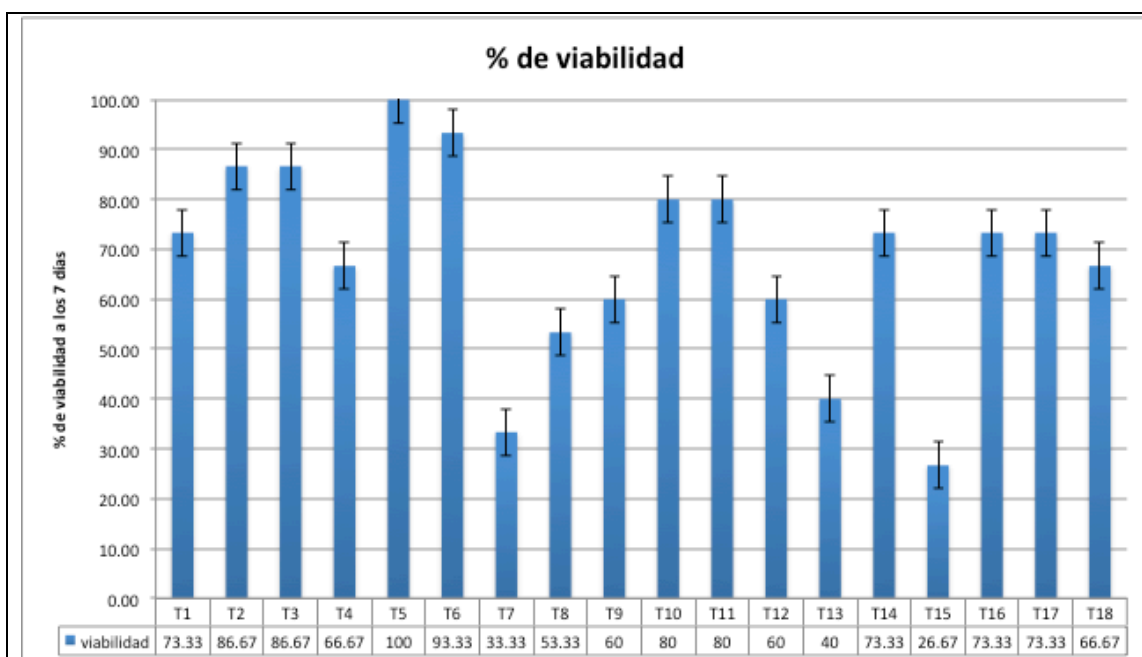
Prueba de Kruskal-Wallis		
Estadísticos	7 días	15 días
$\alpha$	0.05	0.05
H crítico	27.59	27.59
H calculado	<b>29.73*</b>	<b>31.80*</b>

Esto se podría deber al comportamiento específico que presentan las distintas especies contaminantes. Como se puede observar en la Figura 9, la contaminación que destaca a los 7 días es la contaminación fúngica, mientras que a los 15 días, la que prevalece es la contaminación bacteriana (Figura 10) y ambas interactúan para que la contaminación global adquiera ese comportamiento.

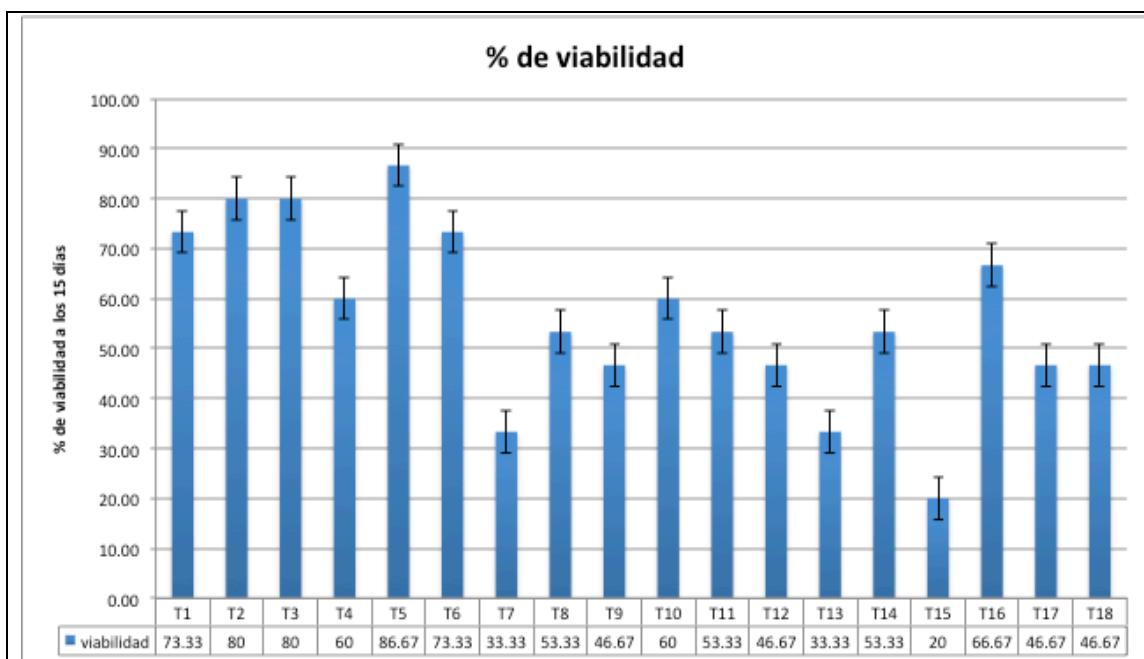
Con respecto al necrosamiento, se observó que a los 7 días no existió necrosis, por lo que se sugiere que este tiempo no es suficiente para determinar una tasa de necrosamiento significativa. Sin embargo a partir de los 15 días, la necrosis aumenta aunque el porcentaje de explantes viables es aún elevado (Figura 8, Figura 9 y Figura 10).



**Figura 7.** Porcentaje de necrosamiento por tratamiento a los 15 días. Los valores obtenidos muestran el promedio de necrosamiento por tratamiento.



**Figura 8.** Porcentaje de viabilidad por tratamiento a los 7 días. Los valores obtenidos muestran el promedio de viabilidad por tratamiento.



**Figura 9.** Porcentaje de viabilidad por tratamiento a los 15 días. Los valores obtenidos muestran el promedio de viabilidad por tratamiento.

Al encontrarse porcentajes de necrosamiento tan bajos, éstos no fueron significativos para los tratamientos evaluados, por lo que podríamos sugerir que la necrosis en este experimento resultó no significativa a los 7 y 15 días.

En lo referente a la viabilidad de los explantes se pudo encontrar que no se encontraron diferencias significativas a los 7 y 15 días (Tabla 6).

**Tabla 6.** Prueba de Kruskal-Wallis para % de viabilidad

Prueba de Kruskal-Wallis		
Estadísticos	7 días	15 días
$\alpha$	0.05	0.05
H crítico	27.59	27.59
H calculado	21.99	16.05

Este resultado sugiere que la viabilidad en todos los tratamientos es similar, por lo que el discriminante entre ellos es el porcentaje de contaminación.

Transcurridos 15 días, podríamos afirmar que el tratamiento 5 (hipoclorito de sodio al 3%, termoterapia) es el mejor, siendo el tratamiento que mayor viabilidad tiene y menor porcentaje de contaminación presenta, a diferencia de los demás tratamientos los cuales presentan inconsistencias en una u otra variable. Un ejemplo de ello puede ser el tratamiento 17 el cual presenta una viabilidad relativamente alta a los 15 días (Figura 10) y un porcentaje de contaminación relativamente alto a los 15 días (Figura 7).

Al tratamiento 5 le sigue el tratamiento 2 (hipoclorito de sodio al 2%, sin termoterapia) y 3 (hipoclorito de sodio al 2.5%, termoterapia), con lo que podríamos garantizar que éstos son los 3 mejores tratamientos para realizar las introducciones de los meristemas de *Delphinium elatum* "Black Velvet".

## 6. Discusión

### 6.1. Discusión

Existen tres metodologías por las cuales se puede eliminar patógenos de una planta. Éstas son la quimioterapia, la termoterapia y el cultivo de meristemas. El cultivo de meristemas se lo puede o no combinar con cualquiera de las dos técnicas mencionadas previamente. La quimioterapia a pesar de ser un método efectivo, no es muy utilizado ya que su costo es elevado (Trigiano y Gray, 2011, pp. 232). Sin embargo, el cultivo de meristemas es utilizado frecuentemente ya que se basa en la hipótesis de que el ápice no se encuentra contaminado. Mientras más cercano al meristemo se realice el corte, menor es la probabilidad de que exista contaminación por parte de microorganismos (Trigiano y Gray, 2011, pp. 232).

El cultivo de meristemas junto a la termoterapia ha sido descrita por varios autores, sin embargo no existe un protocolo que especifique el orden en el cual se debe aplicar cada técnica. En el presente trabajo se realizó el cultivo de meristemas, seguido de la termoterapia. El tratamiento 5 fue el mejor ya que se obtuvo una menor contaminación y una mayor viabilidad. Este tratamiento contemplaba el uso de termoterapia. Sin embargo los dos tratamientos que le siguen son el tratamiento 2 y 3. En el tratamiento 3 los explantes de igual manera fueron sometidos a termoterapia, mientras que en el tratamiento 2 los explantes pasaron directamente a la sala de cultivo. Al finalizar los 15 días, ambos tratamientos tenían el mismo porcentaje de viabilidad, por lo que se sugiere que la termoterapia podría no ser un factor determinante en el porcentaje de contaminación de los explantes. Los tres tratamientos, 2, 3 y 5, fueron sometidos a una desinfección con hipoclorito de sodio, lo que nos lleva a pensar que éste podría ser el factor determinante.

Utilizar hipoclorito de sodio a concentraciones elevadas (5%), no genera resultados deseables ya que afecta negativamente al crecimiento y desarrollo

de la planta (Yildiz y Ekiz, 2014, pp. 1163). Cuando la concentración de hipoclorito de sodio es más alta, la contaminación disminuye pero la necrosis de los explantes aumenta y se reduce la viabilidad de los mismos. Sin embargo, utilizarlo a concentraciones bajas (1%) es ineficiente, ya que se puede evidenciar que mientras más baja es la concentración de hipoclorito de sodio, existe un alto porcentaje de contaminación, un bajo porcentaje de necrosis y la viabilidad es muy alta. (Yildiz y Ekiz, 2014, pp. 1163). El tratamiento 5 (hipoclorito de sodio al 3%) presenta una concentración ideal, ya que se obtuvo un balance entre descontaminación y viabilidad de los explantes. La contaminación fue casi nula mientras que la viabilidad fue alta, sobrepasando el 80%. Es importante recordar que el hipoclorito al ser un agente oxidante, causa daño tanto al explante como a las bacterias y hongos contaminantes, específicamente alterando su DNA y lípidos (Small *et al.*, 2006, pp.1).

La contaminación fue evaluada a los 7 y 15 días. Durante los primeros 7 días se pudo observar que la que prevalecía era la contaminación fúngica. Sin embargo a los 15 días la mayor contaminación se presentaba por parte de las bacterias. Esto se puede evidenciar en otros cultivos como el banano, el cual tiene un gran problema de contaminación bacteriana. Inicialmente la esterilización superficial del explante funciona, sin embargo en este estudio observaron que entre los 7 y 15 días aparecía contaminación en la base del explante. De igual manera encontraron crecimiento bacteriano alrededor del explante en el medio de cultivo. Esto generó pérdidas que se podrían atribuir a la presencia de bacterias endógenas del banano (Habiba, 2002, pp. 118). Esto se pudo corroborar en nuestro experimento ya que se observó el crecimiento de bacterias en los explantes a una mayor tasa entre los 7 y 15 días, a pesar de que el ciclo de crecimiento bacteriano es mucho más corto. Este comportamiento nos permite afirmar que luego de las desinfecciones superficiales que se realizaron con todos los tratamientos, quedó un remanente de contaminación bacteriana que lo podríamos atribuir a la

presencia de bacterias endógenas en los explantes de *Delphinium elatum* "Black Velvet".

La presencia de bacterias endógenas hace que resulte de mayor importancia someter los explantes a un pretratamiento y en algunas ocasiones aplicar antibióticos al medio de cultivo. Un tratamiento con fungicidas y bactericidas previo al cultivo puede ayudar de manera significativa a reducir la contaminación por parte de estos patógenos (Smith, 2015, pp. 57). Los antibióticos se usan para reducir, eliminar o controlar los microorganismos que causan contaminación en los explantes *in vitro*. Sin embargo no existe un antibiótico que sea capaz de actuar sobre todo tipo de microorganismo, por lo cual es de suma importancia seleccionar con criterio el antibiótico que se vaya a aplicar. También se tiene que considerar que el antibiótico a utilizar sea soluble en el medio de cultivo, no se vea afectado por cambios en el pH y especialmente que sea inocuo para el explante (Sathyanarayana y Varghese, 2007, pp. 62-63).

El porcentaje de necrosamiento en todos los tratamientos es bajo por lo que se podría afirmar que no existen diferencias significativas entre tratamientos. La baja necrosis se puede deber al mal corte del meristemo, una mala introducción dentro del medio de cultivo, oxidación espontánea o heridas previas del explante (Roca y Mroginski, 1991, pp. 26). La viabilidad de los explantes está directamente relacionada con el necrosamiento, ya que la viabilidad se evalúa en los explantes que no se encuentran contaminados. Por lo tanto, mientras más bajo sea el porcentaje de necrosamiento, mayor va a ser la viabilidad de los explantes. Uno de los procesos que posiblemente afecte más a la viabilidad de los explantes antes de ser cultivados, es la esterilización superficial del mismo. Este proceso tiene la finalidad de eliminar los microorganismos del explante, sin embargo también tiene que garantizar la viabilidad del tejido y su capacidad de regeneración que por lo general son afectados por factores como la temperatura, la concentración y tiempo de exposición del agente desinfectante (Yildiz y Ekiz, 2014, pp. 1161). Dentro de



los desinfectantes que se han utilizado se encuentran: etanol, peróxido de hidrógeno, cloruro de mercurio, nitrato de plata, antibióticos y el que es más ampliamente utilizado, el hipoclorito de sodio (Yildiz y Ekiz, 2014, pp. 1161).

Quizás no se evidencian diferencias significativas por el número de repeticiones, sin embargo, aunque estadísticamente no se las encuentren, es lógico encontrar pequeñas diferencias que nos hacen suponer que los tratamientos 2, 3 y 5 pueden ser los mejores. No obstante, harían falta más pruebas para comprobarlo.

Se hicieron ensayos previos en donde se realizaron las introducciones de *D. elatum* "Black Velvet" utilizando una concentración de 2% de hipoclorito de sodio durante 10 minutos, únicamente limpiando los explantes y removiendo sus hojas más superficiales. La viabilidad no sobrepasó el 25% a los 15 días posteriores a la siembra, debido a la alta contaminación. La desinfección juega un rol muy importante al momento de realizar introducciones, sin embargo también se podría afirmar que la metodología de utilizar meristemas y no un segmento de mayor tamaño de la planta ayuda significativamente a disminuir la contaminación de la misma. El cultivo *in vitro* de meristemas es una técnica utilizada mundialmente para erradicar patógenos de las plantas, además que permiten utilizar estas plantas como propágulos para la micropropagación (Kane, Kauth y Stewart, 2015, pp.361).

La empresa se dedica a producir plantas de *Delphinium elatum* "Black Velvet" en altas cantidades, por lo que 1 o 2 unidades de porcentaje de viabilidad representan cientos de miles de plantas con el costo respectivo que esto acarrea, por lo que se hace imprescindible mejorar los números de porcentaje de viabilidad para reducir al mínimo estas pérdidas.

## 7. Conclusiones y recomendaciones

### 7.1. Conclusiones

Se logró definir un protocolo para el establecimiento adecuado de *Delphinium elatum* "Black Velvet" para su propagación *in vitro*. El protocolo fue establecido al utilizar meristemas como explantes.

El mejor tratamiento evaluado fue el tratamiento 5, con el cual se obtuvo el menor porcentaje de contaminación durante el proceso de introducción. Este tratamiento consistió en una concentración de hipoclorito de sodio del 3% y termoterapia a 4 °C durante 24 horas.

Se pudo evidenciar que el necrosamiento en general es bajo para todos los tratamientos, por lo cual podríamos sugerir que no existen diferencias significativas en el porcentaje de necrosamiento.

Para el porcentaje de viabilidad, no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo al determinar el porcentaje de contaminación como nuestra variable diferenciadora, podríamos establecer que el mejor tratamiento es el tratamiento 5.

### 7.2. Recomendaciones

Se recomienda tapar las coronas que contienen las plantas que se encuentran en el invernadero por algunos días o incluso una semana antes de que se cosechen los explantes con el objetivo de obtener material con menor tasa de contaminación endógena.

Se recomienda plantear un diseño experimental combinando las desinfecciones y haciendo una doble desinfección. Esto quiere decir que se haría la desinfección con hipoclorito de sodio y luego una segunda desinfección con PTC<sup>3</sup> o kanamicina.

Se recomienda realizar termoterapia antes de las desinfecciones, corte y/o sembrado, con el objetivo de determinar la efectividad de la misma durante estos periodos.

Se recomienda probar protocolos de termoterapia no solo a temperaturas bajas por intervalos prolongados, sino también termoterapia a altas temperaturas por intervalos cortos.

## 8. Referencias

- Alford, D. (2000). *Pest and Disease Management Handbook*. London: Blackwell Science Ltd.
- Beiki, F., Busquets, A., Gomila, M., Rahimian, H., Lalucat, J., García-Valdés, E. (2016). New *Pseudomonas spp.* Are Pathogenic to Citrus. Recuperado el 29 de junio de 2016 de <http://journals.plos.org/plosone/article/asset?id=10.1371%2Fjournal.pone.0148796.PDF>
- Cassells, A. (1997). *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*. Springer Science+Business Media Dordrecht.
- Feng, C., Wang, R., Li, J., Wang, B., Yin, Z., Cui, Z., Li, B., Bi, W., Zhang, Z., Li, M., Wang, Q. (2013). Production of Pathogen-Free Horticultural Crops by Cryotherapy of *In Vitro*-Grown Shoot Tips. Recuperado el 29 de junio de 2016 de [http://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-62703-074-8\\_35](http://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-62703-074-8_35)
- George, E., Hall, M., De Klerk, G. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Habiba, U., Reza, S., Lal Saha, M., Khan, M., Hadiuzzaman, S. (2002). Endogenous Bacterial Contamination During *In vitro* Culture of Table Banana: Identification and Prevention. Recuperado el 29 de junio de 2016 de [http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/31685631/ptc12\\_2\\_04.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAJ56TQJRTWSMTNPEA&Expires=1473204676&Signature=9X1hYI9jfc1gnY7eY0L4FoZjaRk%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DEndogenous\\_Bacterial\\_Contamination\\_Durin.pdf](http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/31685631/ptc12_2_04.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAJ56TQJRTWSMTNPEA&Expires=1473204676&Signature=9X1hYI9jfc1gnY7eY0L4FoZjaRk%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DEndogenous_Bacterial_Contamination_Durin.pdf)
- Harding, S., (2010). *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*. Nottingham, United Kingdom: Nottingham University Press.
- Horst, R. (2001). *Westcott's Plant Disease Handbook*. New York: Springer Science+Business Media.

- Janse, J. (2005). *Phytobacteriology: principles and practice*. London, UK: CABI Publishing.
- Kane, M., Kauth, P., Stewart, S. (2015). *Plant Propagation Concepts and Laboratory Exercises: Chapter 30: Micropropagation*. Boca Raton, Florida: CRC Press
- Knight, A. (2007). *A Guide to Poisonous House and Garden Plants*. Jackson: Teton NewMedia.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S., Machado, M., Toth, I., Salmond, G., Foster, G. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Recuperado el 30 de junio de 2016 de <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- Moore, L., Pscheidt, J. (2016). Diseases Caused by *Pseudomonas syringae*. Recuperado el 30 de junio de 2016 de <http://pnwhandbooks.org/plantdisease/pathogen-articles/pathogens-common-many-plants/bacteria-and-other-prokaryotes/diseases-caused-pseudo>
- Özen, A., Ussery, D. (2011). Defining the *Pseudomonas* Genus: Where do we Draw the Line with *Azotobacter*? Recuperado el 28 de junio de 2016 de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3275731/pdf/248\\_2011\\_Article\\_9914.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3275731/pdf/248_2011_Article_9914.pdf)
- PhytoTechnology Laboratories. (2016). PTC<sup>3</sup>. Recuperado el 27 de junio de 2016 de <http://phytotechlab.com/index.php/ptc-sup-3-sup.html>
- Ponmurugan, P., Kumar, K. (2012). *Applications of Plant Tissue Culture*. Daryaganj, New Delhi: New Age International Publishers.
- Roca, W., Mroginski, L. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura*. Cali, Colombia: CIAT.
- Rogers, R., Christopher, T. (2014). *Essential Perennials: The Complete Reference to 2700 Perennials for the Home Garden*. Portland, London: Timber Press.

- Sathyanarayana, B., Varghese, D. (2007). *Plant Tissue Culture: Practices and New Experimental Protocols*. New Delhi, India: I.K. International Publishing House.
- Singh, A. (2015). Micropropagation of Plants. En B. Bahadur, M. V. Rajam, L. Sahijram, & K. V. Krishnamurthy (Eds.). *Plant Biology and Biotechnology, Vol II*. India: Springer.
- Small, D., Chang, W., Toghrol, F., Bentley, W. (2006). Toxicogenomic analysis of sodium hypochlorite antimicrobial mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. Recuperado el 28 de junio de 2016 de <http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-006-0644-7>
- Smith, R. (2015). *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. London: Elsevier Inc.
- Syngenta. (2016). Minadores de hoja (*Liriomyza trifolii*, *Liriomyza huidobrensis*, *Liriomyza strigata*, *Liriomyza bryoniae*). Recuperado el 23 de mayo de 2016 de <http://www3.syngenta.com/country/es/sp/cultivos/ensalada/plagas/Paginas/minadores-hoja.aspx>
- Thorpe, T. (1995). *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Calgary, Alberta, Canada: Springer Science+Business Media Dordrecht.
- Trigliano, R., Gray, D. (2011). *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Wang, Q., Cuellar, W., Rajamaki, M., Hirata, Y., Valkonen, J. (2008). Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. Recuperado el 14 de mayo de 2016 de <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1364-3703.2007.00456.x>
- Winsor, G., Van Rossum, T., Lo, R., Khaira, B., Whiteside, M., Hancock R., Brinkman, F. (2008). Pseudomonas Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. Recuperado el 9 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2686508/pdf/gkn861.pdf>

Yildiz, M., Ekiz, H. (2014). The effect of sodium hypochlorite solutions on in vitro seedling growth and regeneration capacity of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) hypocotyl explants. Recuperado el 11 de mayo de 2016 de <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.4141/cjps2013-250>