

HIDROGELES DERIVADOS DE ACRILAMIDA Y ÁCIDO ITACÓNICO COMO SOPORTE EN MEDIOS DE CULTIVO DE PLÁNTULAS DE PAPA

Dr. Jesús Contreras^{1*}, Lic. Jessica Juárez¹, Lic. Juan Jaimez²

¹Grupo de Polímeros, Departamento de Química, Universidad de Los Andes, Mérida 5101-A, Venezuela.

²Laboratorio de Cultivo y Tejido Vegetal, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Mérida 5101-A, Venezuela.

*Autor para la correspondencia. E-mail:

Recibido: 2-4-2018 / Aceptado: 1-7-2018

RESUMEN

Hidrogeles de poliacrilamida (PAAm) y de poli(acrilamida-co-ácido itacónico) (P(AAm-co-Al)) sintetizados en agua y en una solución acuosa de buffer de fosfato al 0,2 M, fueron usados como soporte en los medios de cultivo de tejido vegetal sistema autotrófico hidropónico (SAH) y cultivo in-vitro con solución nutritiva Murashige-Skoog (MS) para la producción de plántulas de papa (*Solanum Tuberosum*, L). En los bioensayos realizados fue evaluado el comportamiento de los hidrogeles mediante el análisis de las características morfológicas de las plántulas: longitud de la parte aérea, longitud de la raíz, número de entrenudos y biomasa. Estos parámetros fueron analizados aplicando el análisis de varianza ANOVA de dos factores con múltiples muestras, en donde los factores evaluados fueron el tipo de hidrogel y el solvente usado para su síntesis. Los resultados obtenidos muestran que según el medio de cultivo estas variables se ven favorecidas por el uso de un determinado tipo de hidrogel, es decir, en el SAH los hidrogeles de PAAm son los que presentaron mejores resultados desde el punto de vista morfológico y estadístico. Para el cultivo in-vitro con solución nutritiva MS, las propiedades morfológicas de las plántulas, se vieron beneficiadas por el hidrogel de P(AAm-co-Al) sintetizado en la solución acuosa de buffer de fosfato.

Palabras clave: Hidrogeles, medios de cultivo, Poliacrilamida, Poli (acrilamida-co-ácido itacónico).

HIDROGELS DERIVED FROM ACRYLAMIDE AND ITACONIC ACID AS A SUPPORT IN CULTURE MEDIA IN POTATO SEEDLINGS

ABSTRACT

Hydrogels from poly (acrylamide) (PAAm) and of poly (acrylamide-co-itaconic acid) (P (AAm-co-Al)) synthesized in water and in an aqueous solution of phosphate buffer 0.2 M, were used as a support in the vegetable tissue culture media hydroponic autotrophic system (HAS) and in-vitro culture with Murashige-Skoog (MS) nutrient solution for the production of potato seedlings (*Solanum Tuberosum*, L). In the bioassays carried out, the behavior of the hydrogels was evaluated by analyzing the morphological characteristics of the seedlings: length of the aerial part, length of the root, number of internodes and biomass. These parameters were analyzed by applying the ANOVA variance analysis of two factors with multiple samples, in which the factors evaluated were the type of hydrogel and the solvent used for its synthesis. The results obtained show



that, according to the culture medium, these variables are favored by the use of a certain type of hydrogel, which, in the SAH the PAAm hydrogels are the ones that presented the best results from the morphological and statistical point of view. For the in-vitro culture with MS nutrient solution, the morphological properties of the seedlings were advantageous due to the P(AAm-co-Al) hydrogel synthesized in the aqueous solution of phosphate buffer.

Key words: Hydrogels, medium culture, Polyacrylamide, Poly(acrylamide-co-itaconic acid).

HIDROGELES DERIVADOS DE ACRILAMIDA E ÁCIDO ITACÔNICO COMO SUPORTE EM MEIO À CULTURA DA PLANTA DE BATATA

RESUMO

Hidrogéis de poliacrilamida (PAAm) e poli (acrilamida-co-ácido itacônico) (P (AAm-co-Al)) sintetizados em água e em uma solução aquosa de tampão fosfato 0,2 M, foram usadas como suporte nos meios de cultivo de tecido vegetal do sistema hidropônico (HAS) com solução nutritiva de Murashige-Skoog (MS), para a produção de plântulas de batateira (*Solanum tuberosum* L). Nos bioensaios realizados, o comportamento dos hidrogéis foram avaliados pela análise das características morfológicas das plantas: comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, número de entrenós e biomassa. Esses parâmetros foram analisados aplicando-se a análise de variância ANOVA de dois fatores com múltiplas amostras, em que os fatores avaliados foram o tipo de hidrogel e o solvente utilizado para sua síntese. Os resultados mostram que a partir do meio de cultura dessas variáveis são favorecidos pela utilização de um tipo específico de hidrogel, isto é, na HAS hidrogéis PAAm são apresentados os melhores resultados obtidos morfolologicamente e estatisticamente. Para a cultura in vitro com solução nutritiva MS, as propriedades morfológicas das plântulas foram beneficiadas pelo hidrogel P (AAm-co-Al) sintetizado na solução aquosa de tampão fosfato.

Palavras-chave: Hidrogéis, meios de cultura, Poliacrilamida, Poli (acrilamida-co-ácido itacônico).

1. INTRODUCCIÓN

Los hidrogeles son polímeros hidrófilos tridimensionalmente reticulados cuya principal propiedad es que son capaces de hincharse en agua y retener enormes volúmenes de dicho solvente en estado hinchado (polímeros súperabsorbentes (PSA)). Esta propiedad ha conducido a muchas aplicaciones prácticas de estos nuevos materiales, en particular, en la agricultura (Akhter *et al.*, 2004; Azzam, 1985; Callaghan & Lindley, 1988; El-Hady & Wanas, 2006; Johnson, 1984; Koupai *et al.*, 2008; Mohana & Padmanabha, 2001; Specht & Harvey-Jones, 2000; Wang & Boogher, 1987). En este sentido, los PSA tienen un rol muy importante en el acondicionamiento de suelos (Akhter *et al.*, 2004; Azzam, 1985; El-Hady & Wanas, 2006), liberación controlada de agroquímicos (El-Hady & Wanas, 2006; Hussain *et al.*, 2012; Mikkelsen, 1994; Saradyn *et al.*, 1998; Zare *et al.*, 2013) y retención de humedad en los suelos, lo que maximiza la eficiencia de absorción de agua por las plantas (Akhter *et al.*, 2004; Callaghan & Lindley, 1988; Johnson, 1984; Koupai *et al.*, 2008, Lopez-Elías *et al.*, 2016).

Además, mejoran la aireación y la filtración a través del suelo y reducen el estrés hídrico de las plantas (Eikhof *et al.*, 1994). Se ha encontrado que los hidrogeles mejoran la tasa de supervivencia de las plántulas en condiciones áridas (Akhter *et al.*, 2004; Callaghan & Lindley, 1988; Dorraji *et al.*, 2010; Robiul *et al.*, 2011; Specht & Harvey-Jones, 2000). Este considerable aumento en el grado de aprovechamiento del agua por las plantas, trae como resultado una rápida y más frecuente germinación, una mejora en la actividad biológica y en la eficiencia de nutrición mineral con el consecuente aumento en la producción de biomasa (Akhter *et al.*, 2004; Azzam, 1985; Dorraji *et al.*, 2010; El-Hady & Wanas, 2006; Robiul *et al.*, 2011; Zare *et al.*, 2013).

Por tanto, estos materiales poliméricos se han aplicado para la solución de problemas como la erosión del suelo, las consecuencias de las sequías, suministro de alimentos, el establecimiento de cultivos forestales y agrícolas en ambientes áridos (facilitando la implantación de asentamientos humanos en las mismas) y en preparación de sustratos artificiales para las plantas (Callaghan & Lindley, 1988; Koupai *et al.*, 2008; Molesmi *et al.*, 2012; Narjary *et al.*, 2013; Ulla *et al.*, 2015). Por esto, las investigaciones de síntesis y usos de hidrogeles se deben enfocar en solucionar problemas en este campo; ya que si se aplican estos materiales como soporte de medios de cultivo se podrá aprovechar al máximo su capacidad para retener agua, con lo que se estaría disminuyendo la cantidad de agua que diariamente es utilizada para el riego de los cultivos. También estos materiales se pueden utilizar de forma sinérgica con fertilizantes y agroquímicos, para favorecer el suelo y a las plantas durante el proceso de crecimiento aportándole los nutrientes que necesita.

Algunos de estos materiales fueron usados como soporte para medios de cultivo in vitro en la germinación de semillas de pepino (*Cucumis sativus L. var Madina*) (Romero, 2010) y de calabaza (*Cucurbita maxima Duch. ex Lam.*) (Kurtar *et al.*, 2010), pudiéndose observar que los mismos no presentaban fitotoxicidad y que en algunos casos el proceso de crecimiento y desarrollo de las plántulas se veía favorecido. Estos resultados sugieren que los hidrogeles se pueden utilizar directamente como soporte en medios de cultivo para generar y desarrollar plántulas en condiciones experimentales con la finalidad inmediata de sustituir el agar-agar, el cual es el material usado desde hace mucho tiempo como soporte para el desarrollo de diferentes variedades de plántulas de papa (*Solanum Tuberosum, L*) (Dodds & Roberts, 1985; López *et al.*, 2013; Mejía *et al.*, 2013; Rigato *et al.*, 2001; Roca & Mroginski, 1993; Salas, 1995). A diferencia de los hidrogeles, el agar-agar es un material relativamente costoso y no reusable, ya que una vez terminado su uso suele descartarse. Por lo tanto, al desarrollar la metodología adecuada y de esta forma poder optimizar las características fisicoquímicas

de los hidrogeles para que estos sirvan como soporte en el desarrollo de plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L), se conseguirá sustituir el agar-agar como soporte y con ello la disminución del costo económico que este material induce en el desarrollo de dichas plántulas. Por esta razón, en este trabajo se estudió el efecto de los hidrogeles de PAAm y de P(AAm-co-Al) al ser usados como soporte en los ambientes de cultivo: SAH y cultivo in vitro con solución MS para la producción de plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L), variedad andinita.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos

Agar-Bacteriological (Alfa Biosciences), acrilamida (AAm, Sigma Aldrich 98 %), ácido itacónico (AI, Sigma Aldrich 99 %); persulfato de amonio (PSA, Riedel-de-Haën 98 %), N, N'-bismetilenacrilamida (BMA, Riedel-de-Haën 98 %). Los hidrogeles fueron sintetizados, en agua y en solución buffer de fosfato, según el método previamente reportado (Contreras *et al.*, 2017; El Halah *et al.*, 2015).

2.2. Ensayos para el desarrollo de tejido vegetal, plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L)

2.2.1. Cultivo de tejido vegetal Sistema Autotrófico Hidropónico (SAH):

-Soportes: Los soportes usados en el cultivo de plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L) en el Sistema Autotrófico Hidropónico (SAH) fueron:

- a) *Turba canadiense* (Sunshine professional growing mix): Fue esterilizada durante 1 hora y media usando un autoclave a 121 ° C y 1,34 atm de presión, y luego en contenedores de polipropileno (14,4 cm x 13cm x 8 cm) con orificios en las tapas, para permitir el intercambio de gases, se depositaron 150 g del sustrato canadiense. Posteriormente, fueron añadidos 50 mL de la solución nutritiva del SAH (López *et al.*, 2013). La solución nutritiva se preparó de acuerdo con lo reportado por Rigato *et al* (2001).
- b) *Hidrogeles*: Los hidrogeles de PAAm y P(AAm-co-Al) en su estado deshidratado (xerogel), previamente fueron triturados y posteriormente fueron hidratados con solución nutritiva del SAH. Se depositaron 150 gramos de los diferentes tipos de hidrogel en los contenedores previamente rotulados.

-Corte de esquejes y siembra: Para el ensayo en el SAH de cada planta madre se cortaron los esquejes (cada uno con una yema apical o axilar) de los ápices, medios (entrenudos) y basales, los cuales fueron sembrados inmediatamente en los contenedores con la turba canadiense y los hidrogeles (López *et al.*, 2013).

-Siembra: En los contenedores con los respectivos soportes (turba canadiense e hidrogeles) se realizó un pequeño hoyo con una pinza, para plantar el esqueje y se aplicó una leve presión para su fijación (Mejía *et al.*, 2013). El esqueje se colocó en forma vertical procurando que este quedara igual en ambos soportes. En cada contenedor se sembraron 40 esquejes, realizándose este ensayo por duplicado ($n=2$). Posteriormente cada contenedor fue colocado en una cámara de crecimiento, mantenida a un 60 % de humedad relativa y a una temperatura de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

-Riego: Se aplicaron dos riegos por semana con agua destilada (lunes y viernes) a los contenedores con la turba canadiense conteniendo la solución nutritiva del SAH, mientras que a los contenedores con los hidrogeles se le realizaron riegos cada 5 días con agua destilada. Esta diferencia en los tiempos de riego es debido a que en este lapso de tiempo el hidrogel se mantiene hidratado, con lo cual se evitó el estrés hídrico tipo 2 en las plántulas. igual a 25.

2.2.2. Cultivo in-vitro con solución nutritiva Murashige-Skoog (MS)

La solución nutritiva Murashige-Skoog se preparó utilizando las soluciones madres descritas en la bibliografía (Dodds & Roberts, 1985; Roca & Mroginski, 1993).

-Soportes: Los soportes usados para el cultivo in-vitro con solución nutritiva Murashige-Skoog de tejidos meristemático de ápices y medios de papa (*Solanum tuberosum*, L) fueron agar-agar (grado bacteriológico), el cual se disolvió en caliente a la temperatura de 60°C dentro de la solución nutritiva MS. Posteriormente se agregaron 33 mL en frascos de vidrio (Dodds & Roberts, 1985). Los hidrogeles en su estado deshidratado (xerogel) fueron triturados e hidratados con la solución nutritiva Murashige-Skoog, y posteriormente en frascos de vidrio se introdujeron 33 gramos de cada tipo de hidrogel. Estos fueron esterilizados en un autoclave por 15 minutos a una temperatura de 121°C a 15 psi.

-Corte de esquejes y siembra: Para la micro-propagación de meristemas de papa (*Solanum tuberosum*, L) por cultivo in vitro con solución nutritiva MS se seccionaron asépticamente los explantes bajo una cámara de flujo laminar, los segmentos de los explantes estaban provistos con una yema apical y una yema del medio. Luego, fueron transferidos a recipientes de vidrio

(250 mL), con 33 mL de medio de cultivo (Salas, 1995). En cada recipiente se colocaron 8 explantes. Se realizaron un total de diez réplicas ($n=10$) por cada tratamiento.

Diseño experimental estadístico. Análisis de varianza de dos factores (ANOVA) (Miller & Miller, 2002)

Tal y como se representa en la **figura 1**, durante el desarrollo experimental se evaluó el efecto que tiene sobre las plántulas de papa el uso de diferentes tipos de hidrogeles que fueron sintetizados con dos tipos de solventes.

Variable dependiente: Crecimiento de plántulas de papa
 Factor 1) Hidrogel con dos niveles 1^{er} nivel PAAm y 2^{do} nivel P(AAm-co-AI).
 Factor 2) solvente de síntesis con dos niveles 1^{er} nivel agua y 2^{do} nivel solución acuosa de buffer de fosfato.

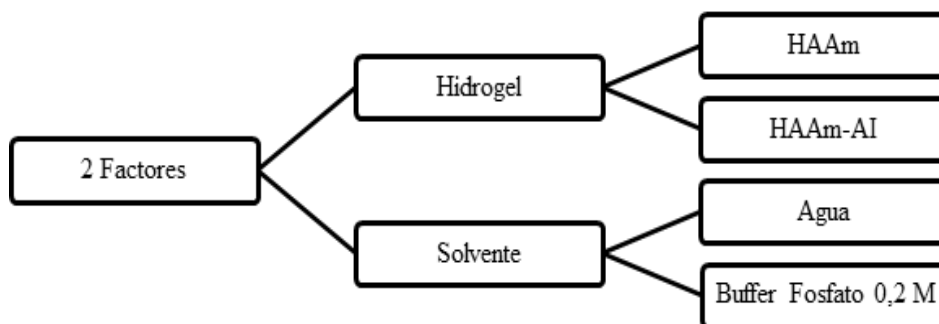


Figura 1. Esquema representativo del diseño experimental a aplicar.

Caracterización de las plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L) obtenidas en los ambientes de cultivo (SAH e *in-vitro*) y de los hidrogeles de PAAm y P(AAm-co-AI) usados como soporte:

Caracterización morfológica de las plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L):

-Longitud de la parte aérea: Luego de cumplido el tiempo de crecimiento, se retiraron, una a una, las plántulas del contenedor y usando un vernier se les determinó la longitud de su tallo desde la yema hasta el cuello de la plántula. El valor promedio de la longitud del tallo, fue obtenido a partir de los valores obtenidos de este parámetro para cada una de las plántulas que fueron sometidas al mismo tratamiento experimental (López *et al.*, 2013).

-Longitud de la raíz: Se tomó de cada contenedor la plántula de papa y se midió con un vernier la longitud de las raíces más largas, las cuales fueron consideradas como las raíces principales. Se determinó el valor promedio de la longitud de la raíz (López *et al.*, 2013).

- **Biomasa:** masa fresca y masa seca: Para la determinación de la masa fresca de las plántulas de papa, todas las plántulas de cada contenedor se pesaron en una balanza analítica OHAUS GA-200. Posteriormente se colocaron las plántulas en papel de aluminio y se llevaron a una estufa (OHAUS, GA360) a 50°C hasta alcanzar peso constante (masa seca) (López *et al.*, 2013). Con todas las medidas se determinaron los valores promedio de ambos tipos de biomasa.

-**Número de entrenudos:** Para la determinación del número de entrenudos de las plántulas, se contó el número de entrenudos por planta, el cual indica la cantidad de hojas nuevas que se formarán por plántula en función del tiempo de estudio. Con estos datos se determinó el valor promedio del número de entrenudos en función del tratamiento (López *et al.*, 2013).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ambos ensayos (Sistema Autotrófico Hidropónico (SAH) y cultivo in vitro con solución nutritiva Murashige-Skoog (MS)), fueron realizados durante treinta días (1 mes).

Cultivo de plántulas de papa (*Solanum Tuberosum*, L), usando el SAH:

En los resultados mostrados en la **tabla 1**, se puede observar que el solvente usado como medio de síntesis de los hidrogeles usados como soportes, pareciera no afectar al crecimiento de las plántulas. Sin embargo, existen diferencias significativas en el desarrollo normal de la plántula según el tipo de hidrogel considerado, pudiéndose determinar que las plántulas muestran un mayor crecimiento en los hidrogeles de PAAm que los de P(Am-co-IA).

Tabla 1. Análisis de varianza (ANOVA): aplicando como variable longitud parte aérea plántula de papa y tipo de hidrogel usado como soporte de crecimiento.

Tratamiento	F	Probabilidad	valor crítico F	Diagnostico
Solvente	7,35522	0,05342	7,70865	NS
Hidrogel	17,30406	0,01415	7,70865	PAAm>P(AAm-co-IA)
Interacción	5,04349	0,08806	7,70865	NS

Probabilidad ($p < 0,05$). NS: no hay diferencia significativa. $n=80$.

En la **figura 2** se muestran los resultados obtenidos para el crecimiento de la parte aérea de la plántula, donde es posible observar que el soporte control (turba canadiense) es más eficiente que los hidrogeles. Es muy posible, que en los experimentos en los que fueron usados los hidrogeles como soportes del medio de cultivo, los nutrientes pudieran quedar

ocluidos dentro de la estructura de los mismos. Este hecho, pudiera provocar que los diferentes nutrientes migren más lentamente hacia las raíces y, por tanto, su posterior absorción se hace más lenta. En este aspecto los nutrientes que parecen ser más afectados son: el fósforo, el boro, y el potasio, puesto que estos están asociados al crecimiento de la plántula de papa (Navarro & Navarro, 2003).

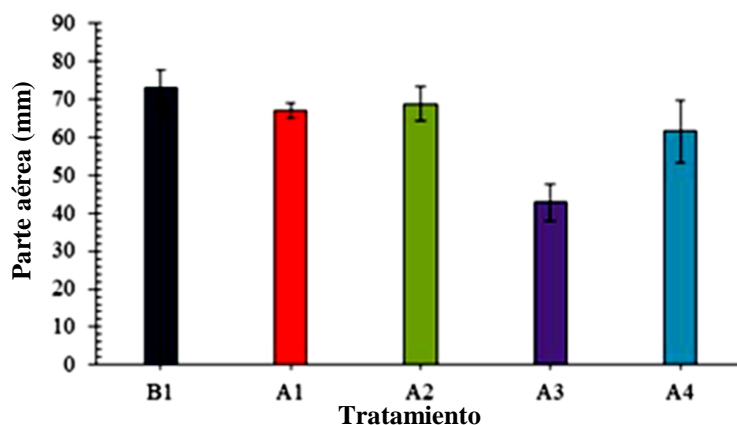


Figura 2. Comparación de la longitud de la parte aérea de las plántulas de papa (*Solanum Tuberosum*, L.) según el sustrato empleado en el medio de crecimiento: **B1**(sustrato canadiense), **A1**(PAAm (agua)), **A2** (PAAm (Buffer fosfato)), **A3** (P(AAm-co-Al)(agua)), **A4** (P(AAm-co-Al) (buffer fosfato)).

Por otro lado, en la **tabla 2**, se puede observar que el comportamiento del crecimiento de la raíz se ve afectado por el tipo de solvente de síntesis y del tipo de hidrogel, ya que al comparar los valores críticos de F, los soportes en los que fueron observados una mayor longitud de la raíz, fueron aquellos hidrogeles sintetizados con la solución acuosa de buffer de fosfato al 0,2 M.

Tabla 2. Análisis de varianza (ANOVA): variable longitud raíz plántula según el tipo de solvente y soporte de crecimiento de la papa (*Solanum Tuberosum*, L.).

Tratamiento	F	Probabilidad	Valor crítico de F	Diagnóstico
Solvente	11,6445	0,0270	7,7086	Buffer>Agua
Hidrogel	8,6744	0,0422	7,7086	HAAm>HAAm-Al
Interacción	2,5987	0,1822	7,7086	NS

Probabilidad ($p < 0,05$). NS: no hay diferencia significativa. $n=80$.

Este resultado indica que estos materiales al tener adsorbida la solución buffer, en cierta medida regulan el pH del medio; evitando con ello una disminución brusca del mismo lo cual podría dificultar la movilidad de los nutrientes que favorecen el crecimiento radicular (calcio, fosforo, cinc y el potasio) (Navarro & Navarro, 2003). Tal como se puede apreciar en la **figura 3**, el crecimiento de las raíces es mayor en los hidrogeles que en el soporte control (turba canadiense).

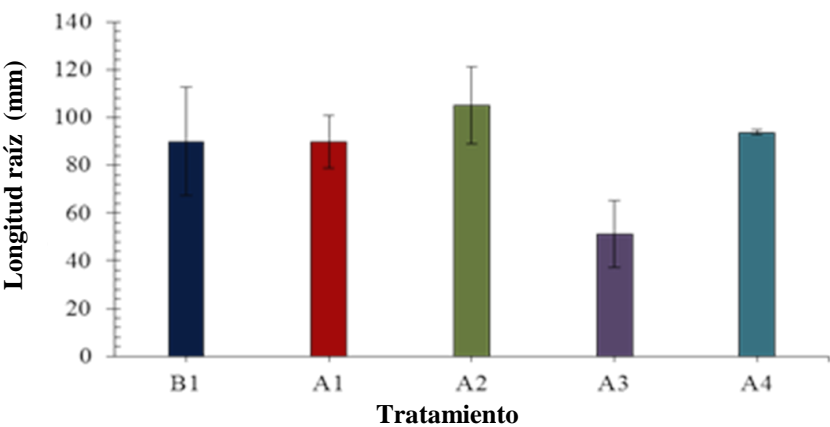


Figura 3. Comparación del desarrollo de la raíz de la plántula de papa (*Solanum tuberosum*, L) según el sustrato empleado en el medio de crecimiento. **B1** (sustrato canadiense), **A1** (PAAm)_(agua), **A2** (PAAm)_(Buffer fosfato), **A3** (PAAm-co-Al)_(agua), **A4** (P(AAm-co-Al))_(buffer fosfato).

Los resultados correspondientes al número de entrenudos (**tabla 3 y figura 4**) muestran el mismo comportamiento observado en lo que respecta al crecimiento de la longitud de la raíz de la plántula, siendo los hidrogeles sintetizados en la solución de buffer de fosfato en los que se presenta un mayor número de entrenudos, ya que en este caso los hidrogeles dosifican la movilidad de los macro y micro nutrientes, los cuales favorecen el crecimiento de los entrenudos de las plántulas (Navarro & Navarro, 2003).

Tabla 3. Análisis de varianza (ANOVA): variable número de entrenudos plántula de papa (*Solanum tuberosum*, L).

Tratamiento	F	Probabilidad	Valor crítico de F	Diagnóstico
Solvente	24,9391	0,0075	7,7086	Buffer>Agua
Hidrogel	25,6755	0,0071	7,7086	HAAm>HAAm-Al
Interacción	20,0839	0,0110	7,7086	HAAm-Al _(agua) < Los otros

Probabilidad (p<0,05). n=80.

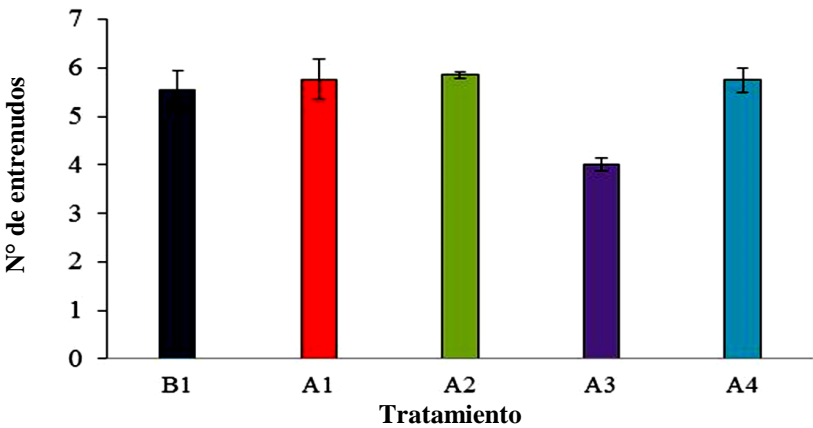


Figura 4. Comparación del número de entrenudos plántula de papa (*Solanum tuberosum*, L): B1(sustrato canadiense), **A1** (PAAm)_(agua), **A2** (PAAm)_(Buffer fosfato), **A3** (P(AAm-co-Al))_(agua), **A4** (P(AAm-co-Al))_(buffer fosfato).

En la **tabla 4** y en la **figura 5**, se muestra que el contenido de materia fresca se ve influenciado por el tipo de soporte, siendo en este caso los hidrogeles sintetizados en el buffer de fosfato, más efectivos.

Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA): para la variable masa fresca de plántula según el soporte de cultivo y solvente.

Tratamiento	F	Probabilidad	Valor crítico de F	Diagnóstico
Solvente	11,9425	0,0259	7,7086	Buffer > Agua
Hidrogel	8,8788	0,0407	7,7086	HAAM>HAAM-AI
Interacción	0,1189	0,7476	7,7086	NS

Probabilidad ($p < 0,05$). NS: no hay diferencia significativa. $n=2$.

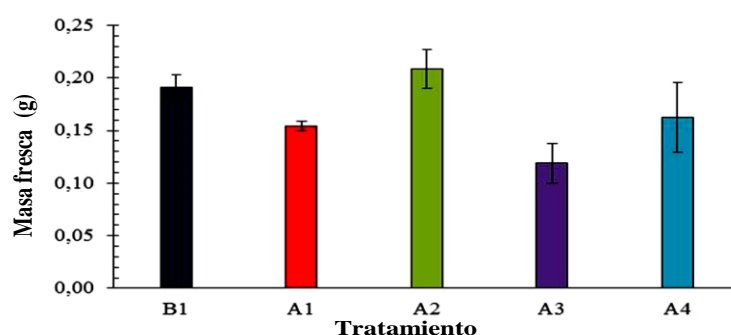


Figura 5. Comparación del contenido de masa fresca plántula de papa (*Solanum tuberosum*, L) **B1** (sustrato canadiense), **A1** (PAAm) (agua), **A2** (PAAm)(Buffer fosfato), **A3** (P(AAm-co-AI))(agua), **A4** (P(AAm-co-AI))(buffer fosfato).

Tal como se muestra en la **tabla 5** y en la **figura 6**, al analizar la masa seca para las plántulas de papa se tiene que el valor de esta variable no se ve afectado por el solvente usado para la síntesis de los hidrogeles. Sin embargo, el tipo de hidrogel si modifica este, siendo en este caso el hidrogel de PAAm_(agua) más eficiente en comparación con la turba canadiense.

Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA): variable masa seca plántula de papa (*Solanum tuberosum*, L) según el tipo de soporte y de solvente.

Tratamiento	F	Probabilidad	Valor crítico de F	Diagnóstico
Solvente	0,9396	0,3873	7,7086	NS
Hidrogel	39,1307	0,0033	7,7086	HAAM>HAAM-AI
Interacción	51,8262	0,0020	7,7086	HAAM-AI < Los otros

Probabilidad ($p < 0,05$). ($n=2$). NS no hay diferencia significativa.

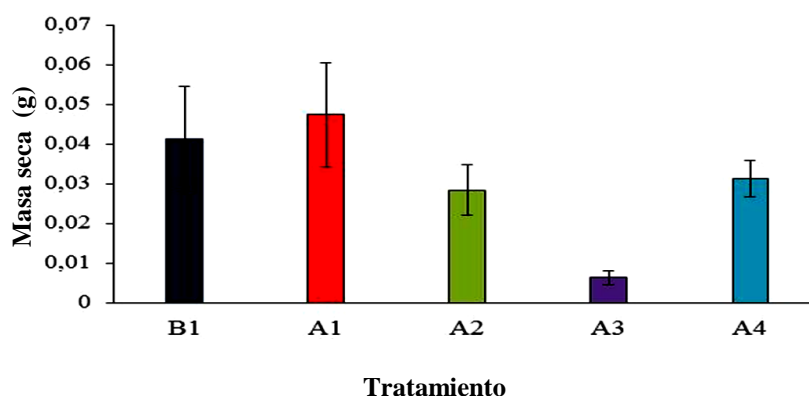


Figura 6. Comparación del contenido de masa seca plántula de papa (*Solanum tuberosum*, L): **B1** (sustrato canadiense), **A1** (PAAm)_(agua), **A2** (PAAm)_(Buffer fosfato), **A3** (P(AAm-co-Al))_(agua), **A4** (P(AAm-co-Al))_(buffer fosfato).

En general, se puede observar que en este medio de cultivo (SAH), el crecimiento de las plántulas de papa se vio afectado por el solvente usado en la síntesis de los hidrogeles sintetizados: crecimiento Hidrogel_{Buffer de fosfato} > hidrogel_{agua}. Igualmente, este parámetro fue influenciado por el tipo de hidrogel, dado que con los hidrogeles de PAAm se obtuvo un mejor crecimiento que con los hidrogeles de P(AAm-co-Al).

Cultivo de plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L), cultivo *in-vitro* con solución nutritiva Murashige-Skoog

En cuanto al crecimiento de la parte aérea se aprecia en la **tabla 6**, que el tipo de hidrogel que afecta este parámetro desde el punto de vista estadístico es el hidrogel de P(AAm-co-Al) sintetizado en buffer de fosfato. En la **figura 7** se muestra el comportamiento de los diferentes soportes, y en este caso se observa que el soporte control (agar-agar) es más efectivo que los hidrogeles.

Tabla 6. Análisis de variable (ANOVA): variable longitud parte aérea plántula de papa (*Solanum tuberosum*, L).

Tratamiento	F	Probabilidad	Valor crítico de F	Diagnóstico
Solvente	0,4996	0,4842	4,1132	NS
Hidrogel	10,6180	0,0024	4,1132	HAAm-Al>HAAm
Interacción	1,1092	0,2993	4,1132	NS

Probabilidad ($p < 0,05$). NS No hay diferencia significativa.

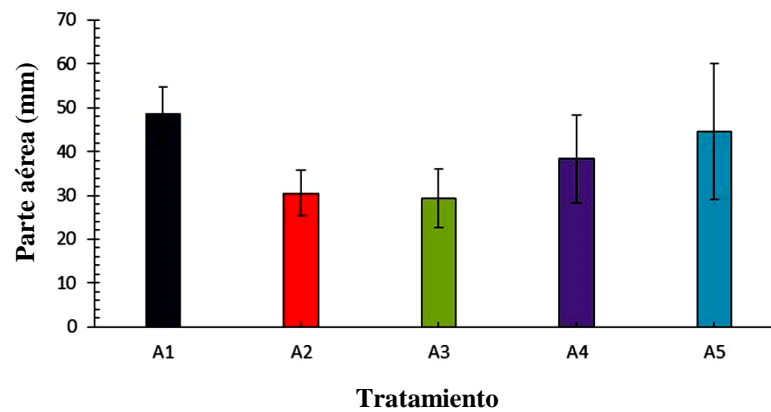


Figura 7. Comparación de la Longitud parte aérea de papa (*Solanum tuberosum*, L): **A1** (Agar-Agar), **A2** (PAAm)_(agua), **A3** (PAAm)_(Buffer fosfato), **A4** (P(AAm-co-Al))_(agua), **A5** (P(AAm-co-Al))_(buffer fosfato).

Para la longitud de la raíz, en la **tabla 7** se muestra el análisis realizado usando ANOVA, pudiéndose notar que los diferentes tipos de hidrogeles de PAAm y P(AAm-co-Al) sintetizados en ambos solventes de reacción, no presentan diferencia significativa entre los valores medios.

Tabla 7. Análisis de varianza para la longitud de la raíz plántula de papa.

Tratamiento	F	Probabilidad	Valor crítico de F	Diagnóstico
Solvente	0,1594	0,6921	4,1132	NS
Hidrogel	0,0533	0,8187	4,1132	NS
Interacción	3,6402	0,0644	4,1132	NS

Probabilidad ($p > 0,05$). NS No hay diferencia significativa.

En la **figura 8** se observa que los hidrogeles PAAm_(buffer de fosfato) y P(AAm-co-Al)_(agua) son más efectivos que el soporte control (agar-agar).

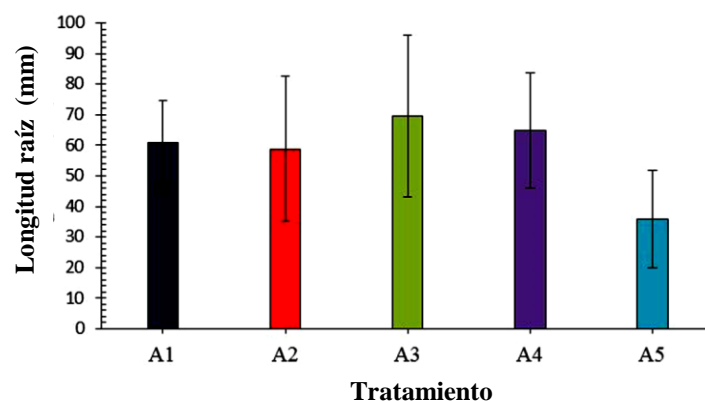


Figura 8. Comparación de la longitud de la raíz de las plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L): **A1** (agar), **A2** (PAAm)_(agua), **A3** (PAAm)_(Buffer fosfato), **A4** (P(AAm-co-Al))_(agua), **A5** (P(AAm-co-Al))_(buffer fosfato).

En general, el crecimiento de la longitud de la raíz de las plántulas aumenta en mayor medida cuando son usados los hidrogeles de PAAm como soportes de los medios de cultivo, que cuando se usan los hidrogeles de P(AAm-co-Al). Este comportamiento podría estar asociado, a la posible ionización de los grupos carboxilo (-COOH) de las unidades comonoméricas ácido itacónico (Al) presentes en el hidrogel, lo que da lugar a la formación de grupos carboxilato (-COO⁻) en las cadenas del hidrogel sintetizado ($R-COOH + H_2O \rightarrow RCOO^- + H_3O^+$; o en el caso de los hidrogeles sintetizados en la solución buffer: $R-COOH + H_2PO_4^- \rightarrow RCOO^- + H_3PO_4$). Tomando en cuenta que los nutrientes presentes en la solución nutritiva MS, están en la forma de iones positivos, es muy posible que entre los grupos carboxilato y estos iones se establezca una atracción electrostática; lo que implicaría que dichos nutrientes sean liberados al medio de cultivo de forma controlada, y por tanto, el crecimiento de las raíces sea más lento (Guo et al., 2005; Milani *et al.*, 2017).

El parámetro del número de entrenudos, tal como se muestra en la **tabla 8**, no se ve afectado por usar los hidrogeles como soporte, ya que entre cada uno de los tratamientos no hay diferencias significativas en la cantidad de entrenudos que presentaron las plántulas de papa (*Solanum Tuberosum*, L).

Tabla 8. Análisis de varianza (ANOVA): variable Número de entrenudos plántula según el tipo de soporte

Tratamiento	F	Probabilidad	Valor crítico de F	Diagnóstico
Solvente	0,3519	0,5568	4,1132	NS
Hidrogel	0,0049	0,9447	4,1132	NS
Interacción	0,0032	0,9555	4,1132	NS

Probabilidad ($p > 0,05$). NS no significativo.

En la **figura 9**, es posible notar que, en comparación con los hidrogeles, el agar-agar es el que presenta el mayor número de entrenudos.

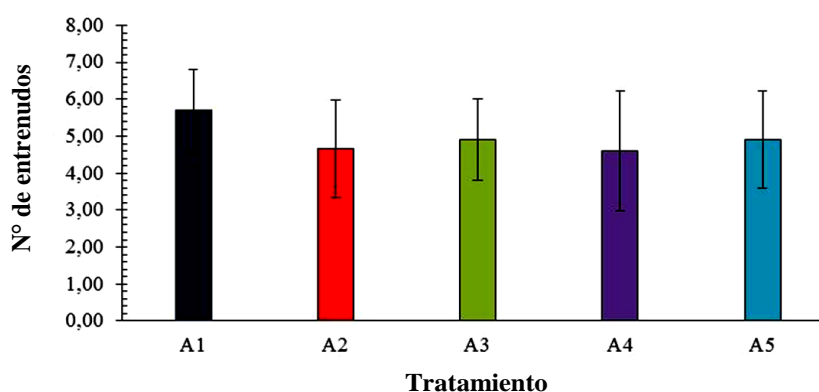


Figura 9. Comparación del número de entrenudos en las plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L): **A1** (agar-agar), **A2** (PAAm)_(agua), **A3** (PAAm)_(Buffer fosfato), **A4** (P(AAm-co-Al))_(agua), **A5** (P(AAm-co-Al))_(buffer fosfato).

Por otra parte, tal como se muestra en las **tablas 9 y 10** la masa fresca y masa seca de las plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L) no se vio afectada por el uso de los hidrogeles como soporte en el cultivo in vitro con solución nutritiva Murashige-Skoog. Esto se deduce del hecho, de que, desde el punto de vista estadístico, la diferencia tanto en el contenido de masa fresca como de masa seca, varía poco cuando fueron usados los diferentes tipos de hidrogeles como soportes.

Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA): variable masa fresca plántula de papa según el soporte usado y el solvente.

Tratamiento	F	Probabilidad	Valor crítico de F	Diagnóstico
Solvente	0,0283	0,8674	4,1132	NS
Hidrogel	0,0698	0,7931	4,1132	NS
Interacción	2,8479	0,1001	4,1132	NS

Probabilidad ($p > 0,05$). NS No hay diferencia significativa.

Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA): variable masa seca plántula de papa según el tipo de soporte y el solvente.

Tratamiento	F	Probabilidad	Valor crítico de F	Diagnóstico
Solvente	0,65081	0,42512	4,11317	NS
Hidrogel	0,05713	0,81245	4,11317	NS
Interacción	1,06269	0,30948	4,11317	NS

Probabilidad ($p < 0,05$). NS no hay diferencia significativa.

No obstante, evaluando el comportamiento gráficamente se puede observar en la **figura 10**, que el contenido de peso fresco es mayor en el soporte control (agar-agar) en comparación con los hidrogeles.

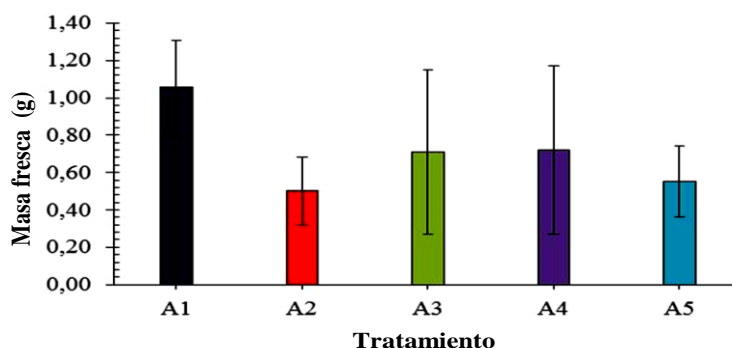


Figura 10. Comparación del contenido de masa fresca en las plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L): A1 (agar-agar), A2 (PAAm)_(agua), A3 (PAAm)_(Buffer fosfato), A4 (P(AAm-co-Al))_(agua), A5 (P(AAm-co-Al))_(buffer fosfato).

En la **figura 11**, en comparación con los hidrogeles se nota que el contenido en peso seco, es mayor en el soporte control (agar-agar).

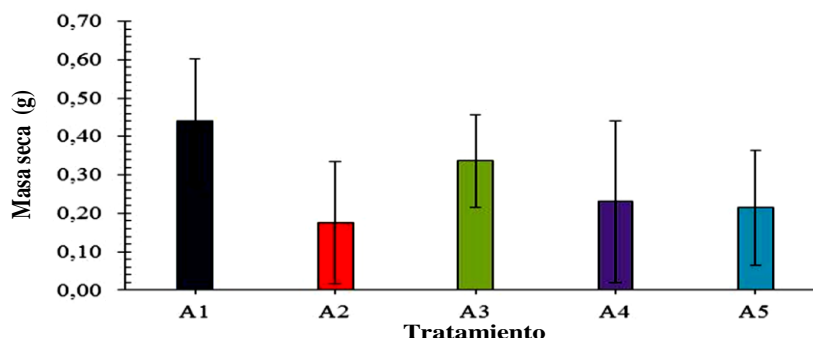


Figura 11. Comparación del contenido de masa seca en las plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L): **A1** (agar-agar), **A2** (PAAm)_(agua), **A3** (PAAm)_(Buffer fosfato), **A4** (PAAm-co-Al)_(agua), **A5** (P(AAm-co-Al))_(buffer fosfato).

En lo que respecta al contenido de biomasa (masa fresca y masa seca), se puede observar que el hidrogel de PAAm_(agua) presentó los valores más bajos. Indicando que, en comparación con los demás soportes utilizados, este material no favoreció la capacidad de retención de agua y por ende la asimilación de los macro y micro nutrientes que estaban presentes en el medio de cultivo.

Finalmente, en la **tabla 11** se muestra de manera comparativa el orden de eficiencia de los diferentes soportes (hidrogeles, turba canadiense y agar-agar) sobre el desarrollo de los parámetros morfológicos de las plántulas de papa.

Como es posible observar, la efectividad de los hidrogeles como soportes de los medios de cultivo depende de este. Así en el caso del medio de cultivo SAH, en general los hidrogeles permiten un mejor desarrollo de los diferentes parámetros morfológicos en comparación con el sustrato control (turba canadiense). Las variaciones en el comportamiento de los diferentes tipos de hidrogeles en cada uno de los parámetros analizados, pueden estar asociadas a la regulación del pH del medio, lo que controla la migración de algunos nutrientes que necesitan las plántulas para su crecimiento (Navarro & Navarro, 2003). Por otra parte, en el caso del medio de cultivo MS el soporte control (agar-agar) muestra un mejor desempeño que los hidrogeles. En este caso los componentes de la solución nutritiva MS, pueden interactuar con los grupos amida (CONH₂) y grupos carboxilato presentes en los hidrogeles, ya sea formando complejos o mediante interacciones electrostáticas, lo que provoca que la dosificación de dichos nutrientes hacia las plántulas de papa sea más lenta (Contreras *et al.*, 2017; Rudzinski *et al.*, 2002).

Tabla 11. Eficiencia de los soportes sobre la evolución de los parámetros morfológicos de las plántulas de papa, según el medio de cultivo.

Medio de cultivo	Parámetro morfológico	Eficiencia de los soportes
SAH	Parte aérea	turba canadiense>PAAm _(buffer fosfato) >PAAm _(agua) >P(AAm-co-Al) _(Buffer fosfato) >P(AAm-co-Al) _(agua)
	Longitud de la raíz	PAAm _(buffer de fosfato) >P(AAm-co-Al) _(buffer de fosfato) > PAAm _(agua) > turba canadiense>P(AAm-co-Al) _(agua)
	N° de entrenudos	PAAm _(buffer de fosfato) >P(AAm-co-Al) _(buffer de fosfato) > PAAm _(agua) > turba canadiense>P(AAm-co-Al) _(agua)
	Masa fresca	PAAm _(buffer de fosfato) > turba canadiense> P(AAm-co-Al) _(buffer de fosfato) >PAAm _(agua) > P(AAm-co-Al) _(agua)
	Masa seca	PAAm _(agua) > turba canadiense>P(AAm-co-Al) _(buffer de fosfato) >PAAm _(buffer de fosfato) > P(AAm-co-Al) _(agua)
MS	Parte aérea	Control _(agar-agar) >P(AAm-co-Al) _(buffer fosfato) > P(AAm-co-Al) _(agua) >PAAm _(agua) > PAAm _(buffer de fosfato)
	Longitud de la raíz	PAAm _(buffer de fosfato) >P(AAm-co-Al) _(agua) >Control _(agar) >PAAm _(agua) >P(AAm-co-Al) _(buffer de fosfato)
	N° de entrenudos	Control _(agar) >PAAm _(buffer fosfato) >P(AAm-co-Al) _(buffer fosfato) > P(AAm-co-Al) _(agua) >PAAm _(agua)
	Masa fresca	Control _(agar-agar) >PAAm _(buffer fosfato) >P(AAm-co-Al) _(agua) > P(AAm-co-Al) _(buffer fosfato) >PAAm _(agua)
	Masa seca	Control _(agar-agar) >PAAm _(buffer fosfato) > P(AAm-co-Al) _(agua) >P(AAm-co-Al) _(buffer fosfato) >PAAm _(agua)

4. CONCLUSIONES

Tomando en cuenta que las diferentes variables evaluadas, resultaron ser comparables con ambos soportes control (turba canadiense y agar-agar), los resultados obtenidos permiten establecer que ambos hidrogeles ensayados: PAAm y P(AAm-co-Al), pueden ser usados como posibles soportes de medios de cultivo de plántulas de papa. Por tanto, Estos materiales pueden sustituir como soportes de los medios de cultivo, al agar-agar y a la turba canadiense; los cuales son relativamente más costosos, y a diferencia de los hidrogeles, no reusables.

La eficiencia de estos hidrogeles como soporte, depende del solvente de síntesis y del medio de cultivo (SAH o MS). En comparación con la turba canadiense, los hidrogeles resultaron ser más efectivos cuando se usan como soportes en el sistema SAH. Mientras que el agar-

Hidrogeles Derivados de Acrilamida y Ácido Itacónico, como Soporte en Medios de Cultivo de Plántulas de Papa

agar fue más efectivo que los hidrogeles, como soportes en el cultivo in-vitro con solución nutritiva MS.

5. AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes de la Universidad de Los Andes (CDCHTA-ULA) a través del proyecto C-2001-18-08-A. Además, agradecemos al Dr. Daniel Machado, del Laboratorio de Investigación en Análisis Químico, Industrial y Agropecuario (LIAQIA), Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, por su asesoramiento en el tratamiento estadístico de los datos.

6. REFERENCIAS

- Akhter, J., Mahmood, K., Malik, K., Mardan, A.M., Ahmad, M. & Iqbal, M. (2004). Effects of hydrogel amendment on water storage of sandy loam soils and seedling growth of barley, wheat and chickpea. *Plant, soil and Environment*, 50(10), 463-469.
- Azzam, R. (1985). Tailoring polymeric gels for soil reclamation and hydroponics. *Communications in soil science and Plant Analysis*, 16(10), 1123-1138.
- Callaghan, T. & Lindley, D. (1988). The environmental crisis in the Sudan: the effect of water absorbing synthetic polymers on tree germination and early survival. *Journal of Arid Environments*, 14(3), 301-317.
- Contreras, J., Juárez, J. & Oliveros, A. (2017). Estudio de la fitotoxicidad de hidrogeles derivados de acrilamida y ácido itacónico hacia plántulas de papa (*solanum tuberosum*, l). *Revista Científica UNET*, 29(1), 56-67.
- Dodds, J. & Roberts, L. (1985). Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press, New York, pp: 46-47.
- Dorraj, S., Golchin, A. & Ahmadi, S. (2010). The effects of hydrophilic polymer and soil salinity on corn growth in sandy and loamy soils. *Clean-Soil, Air, Water*, 38(7), 584-591.
- Eikhof, R., King, P. & Koven, G. (1994). Control of wilting in potted plants. *Ohio Florists' Association Bulletin*, 532, 6-7.
- El-Hady, O. & Wanas, S. (2006). Water and Fertilizer Use Efficiency by Cucumber Grown under Stress on Sandy Soil Treated whit Acrylamide Hydrogels. *Journal of Applied Sciences Research*, 2(12), 1293-1297.
- El Halah, A., Contreras, J., Rojas-Rojas, L., Rivas, M., Romero, M. & López-Carrasquero, F. (2015). New superabsorbent hydrogels synthesized by copolymerization of acrylamide and N-2-hydroxyethyl acrylamide with itaconic acid or itaconates containing ethylene oxide units in the side chain. *Journal of Polymer Research*, 22:233.
- Guo, M., Liu, M., Zhan, F. & Wu, L. (2005). Preparation and Properties of a Slow-Release Membrane-Encapsulated Urea Fertilizer with Superabsorbent and Moisture Preservation. *Industrial & engineering chemistry research*, 44(12), 4206-4211.
- Hussain, M., Devi, R. & Maji, T. (2012). Controlled release of urea from chitosan microsphere prepared by emulsification and cross-linking method. *Iranian Polymer Journal*, 21(8), 473-479.

- Johnson, M. (1984). The effects of gel-forming polyacrilamides on Moisture Storage in sandy Soils. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 35(1), 1196-1200.
- Koupai, J., Eslamian, S. & Kazemi, J. (2008). Enhancing the available water content in unsaturated soil zone using hydrogel, to improve plant growth indices. *Ecohydrology Hydrobiology*, 8(1), 67-75.
- Kurtar, E., Balkaya, A. & Özbek, N. (2010). Effects of Polymers and Growth Mediums on in vitro Plantlets of Winter Squash (*Cucurbita maxima* Duch. ex Lam.) and Pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch. ex Poir.) in Acclimatization. *Annals of Biological Research*, 1(2), 148-154.
- López, D., Gómez, T., González, A., Franco, O., Rubí, A., Gutiérrez, F. & Serrato, R. (2013). Calidad de plántula en cinco cultivares de papa determinada por la intensidad de luz blanca y tipo de propagación. *Ciencia Ergo Sum*, 20(2), 138-147.
- López-Elías, J., Garza, S., Jiménez, J., Huez, M. & Garrido, O. (2016). Uso de un polímero hidrófilo a base de poliacrilamida para mejorar la eficiencia en el uso del agua. *European Scientific Journal*, 12(15), 160-175.
- Mejía, R., Méndez, J., Pineda, L. & Hernández, S. (2013) Manual de producción de semilla de papa mediante técnicas de reproducción asexual. Editorial PYMERURAL, Tegucigalpa.
- Milani, P., França, D., Balieiro, A. & Faez, R. (2017). Polymers and its applications in agriculture. *Polímeros*, 27(3), 256-266.
- Miller, JN. & Miller, JC. (2002). Estadística y quimiometría para química analítica. Pearson educación, Madrid.
- Mikkelsen, R. (1994). Using hydrophilic polymers to control nutrient release. *Fertilizer Research*, 38 (1), 53-59.
- Mohana, R. & Padmanabha, R. (2001). Synthesis of Novel Superabsorbing Copolymers for Agricultural and Horticultural Applications. *Polymer International*, 50(8), 946-951.
- Molesmi, Z., Habibi, D., Asgharzadeh, A., Ardakani, M., Mohammadi, A. & Sakari, A. (2012). Effects of super absorbent polymer and plant growth promoting Rhizobacteria on yield components of Maize under drought stress and normal conditions. *American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science*, 12(3), 358-364.
- Narjary, B., Aggarwal, P., Kumar, S. & Meena, M. (2013). Significance of hydrogels and its applications in agriculture. *Indian Farming*, 62(10), 15-17.
- Navarro, S. & Navarro, G. (2003). Química Agrícola. El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. Mundi-prensa libros S.A., Madrid.
- Rigato, S., Gonzáles, A. & Huarte, M. (2001). Producción de Plántulas de Papa a partir de técnicas combinadas de Micropropagación e Hidroponía para la obtención de semillas Pre-básica. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 12(1), 110-120.
- Robiul, M., Hu, Y., Fei, Ch., Qian, X., Egrinya, A. & Xue, X. (2011). Application of superabsorbent polymer: A new approach for wheat (*Triticum aestivum* L.) production in drought-affected areas of northern China. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 9(1), 304-309.
- Roca, W., Mroginski, L. (1993). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Capítulo 1: establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. Editorial Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali.
- Romero, M. (2010). Síntesis y caracterización de hidrogeles de poli (acrilamida-co-diitaconato de metoxietilo). Trabajo de Grado de Licenciatura. Universidad de Los andes, Mérida-Venezuela.
- Rudzinski, W., Dave, A., Vaishnav, U., Kumbar, S., Kulkarni, A. & Aminabhavi, T. (2002). Hydrogels as controlled release devices in agriculture. *Designed Monomers and Polymers*, 5(1), 39-65.
- Salas, J. (1995). Producción de semilla pre-básica de papa. FONAIAP Divulga, 48, 1-4.
- Saradyn, D., Karadag, E. & Güven, O. (1998). The releases of agrochemicals from induced acrylamide/crotonic acid hydrogels. *Polymer Bulletin*, 41(5), 577-584.

- Specht, A. & Harvey-Jones, J. (2000). Improving water delivery to the roots of recently planted seedling trees: the use of hydrogels to reduce leaf and hasten root establishment. *Forestal Research*, 1, 117–123.
- Ullah, F., Othman, M., Javed, F., Ahmad, Z. & Akil, H. (2015). Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering C*, 57, 414-433.
- Wang, Y. & Boogher, C. (1987). Effect of a Medium-Incorporated Hydrogel on plant growth and water use of two foliage species. *Journal of Environmental Horticulture*, 5(3), 127-130.
- Zare, A., Shahhosseini, R., Ali-Bahrami, H., Ghovahi, M. & Askary. A. (2013). Evaluation the effect of nitroxin and super absorbent on yield components of chickpea in dry farm. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(8), 2033-2038.